

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



**ESTUDIO Y FORMULACIÓN DE NUEVOS CÓCTELES
ENZIMÁTICOS PARA LA MEJORA DE LA PRODUCCIÓN
DE ETANOL A PARTIR DE PAJA DE TRIGO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pablo Alvira Iráizoz

Bajo la dirección de la doctora

Mercedes Ballesteros Perdices

Madrid, 2012

© Pablo Alvira Iráizoz, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

TESIS DOCTORAL

Estudio y formulación de nuevos cócteles enzimáticos para la
mejora de la producción de etanol a partir de paja de trigo

Pablo Alvira Iráizoz

Memoria presentada por Pablo Alvira Iráizoz para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de la Dra. Mercedes Ballesteros Perdices.

Madrid, Junio de 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pablo Iráizoz', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo: Pablo Alvira Iráizoz

A stylized handwritten signature in black ink, consisting of a large 'C' and 'B' intertwined, with a horizontal line crossing through them.

Fdo: Mercedes Ballesteros Perdices

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Mercedes Ballesteros, responsable de la Unidad de Biocarburantes del Ciemat y directora de esta Tesis Doctoral, por poner toda su experiencia a disposición de este trabajo, por su implicación y por su esfuerzo.

También quiero agradecer a la Dra. María José Negro y a la Dra. Elia Tomás, por su implicación personal y profesional en este trabajo. No sé cómo hubiera salido esto sin su ayuda, pero sin duda, habría sido distinto.

Cómo no, agradezco enormemente a todos los que forman o han formado parte durante este tiempo de la Unidad de Biocarburantes del Ciemat. Una vez me dijeron que es mejor llegar todos y a tiempo, que solo y el primero. He intentado que así fuera. A los Drs. Paloma Manzanares, Ignacio Ballesteros y José Miguel Oliva; a José María Martínez, Felicia Sáez y Alberto González, gracias por estar siempre disponibles para compartir sus conocimientos y echar una mano. Gracias también a María, Sete, Pili, Javi, José Luis, Miguel, Jhoan, Olga, Isabel, Miguel ati, Mónica, Cristina, José Manuel, Altagracia, Txema, Aleta, Arantxa, Sergio, David I, David II y algunos otros que han pasado por aquí. Creo que gracias a todos vosotros, este grupo no sólo ha ido creciendo en número durante estos años.

Agradezco también al Dr. Javier Arroyo, profesor del Dpto. de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda y por su disposición a atender cualquier duda que me ha surgido durante este tiempo.

During my PhD work I had the opportunity to spend a great time in Hungary, in the Dpt. of Applied Biotechnology and Food Science, at Budapest University of Technology and Economics. I want to thank Professor Kati Réczey and all members of this group: Dóra, Zsófi, Zsuzsa, Nórá, Zsolti, Bálint, Miki and Mateo; I learnt a lot from you. Köszönöm!

Y finalmente, quiero agradecer a los que habéis hecho que este tiempo en Madrid haya sido una etapa dura, por teneros lejos; pero también a los que habéis conseguido que estén siendo unos años llenos de cosas buenas. Gracias por acompañarme, por aguantarme y porque las 200 páginas que siguen a ésta os dan exactamente igual.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
ABREVIATURAS	1
RESUMEN / ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 La biomasa como fuente de energía renovable	11
1.1.1 Contexto general.....	11
1.1.2 Biocombustibles.....	12
1.1.3 Etanol como biocarburante.....	14
1.2 Biomasa lignocelulósica: composición y estructura	16
1.2.1 Celulosa	18
1.2.2 Hemicelulosa	20
1.2.3 Lignina.....	24
1.2.4 Otros componentes.....	26
1.2.5 Estructura y disposición de los componentes de la biomasa lignocelulósica.....	27
1.3 Producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica	30
1.3.1 Pretratamiento	31
1.3.1.1 Tipos de pretratamiento.....	33
1.3.1.2 Pretratamiento por explosión por vapor (EV).....	37
1.3.1.3 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.....	39
1.3.2 Producción enzimática.....	41
1.3.2.1 Microorganismos productores de celulasas y hemicelulasas. <i>Trichoderma reesei</i> RUTC30.....	42
1.3.2.2 Enzimas de <i>Trichoderma reesei</i>	43
1.3.2.3 Condiciones de cultivo.....	44
1.3.3 Hidrólisis enzimática	48
1.3.3.1 Enzimas implicadas en la HE de biomasa lignocelulósica.....	50
1.3.3.2 Factores que influyen en la HE	52
1.3.4 Fermentación	61
1.4 Integración de las etapas del proceso	63
1.4.1 Hidrólisis y fermentación separadas (HFS).....	64
1.4.2 Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).....	65
1.4.3 Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS).....	66
1.4.4 Bioproceso consolidado (BPC).....	66

2. OBJETO E INTERÉS DEL TEMA	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1 Materia prima	77
3.2 Pretratamiento por explosión por vapor (EV)	77
3.3 Preparación de hojas de paja de trigo pretratado	78
3.4 Producción de enzimas celulolíticas	80
3.4.1 Microorganismo y preparación del inóculo.....	80
3.4.2 Fuentes de carbono empleadas en la producción de enzimas.....	81
3.4.3 Producción enzimática.....	81
3.5 Enzimas	82
3.6 Determinación de actividades enzimáticas	83
3.6.1 Actividad sobre papel de filtro.....	83
3.6.2 Actividad sobre Avicel.....	84
3.6.3 Actividad endoglucanasa.....	84
3.6.4 Actividad β -glucosidasa	85
3.6.5 Actividad xilanasa	86
3.6.6 Actividad β -xilosidasa	86
3.6.7 Actividad α -L-arabinofuranosidasa.....	86
3.6.8 Determinación del contenido en proteína.....	87
3.6.9 Determinación del grado de sinergia.....	87
3.7 Ensayos de hidrólisis enzimática (HE)	88
3.7.1 Microensayos enzimáticos.....	88
3.7.2 Ensayos en matraz	89
3.8 Ensayos de fermentación	89
3.8.1 Microorganismos y preparación del inóculo	89
3.8.2 Ensayos de fermentación y sacarificación y fermentación simultáneas	90
3.9 Determinaciones analíticas	91
3.9.1 Composición de la materia prima y del material pretratado.....	91
3.9.2 Determinación de azúcares y productos de degradación	92
3.9.3 Determinación de la concentración de etanol	93
3.10 Cálculo de rendimientos	93
3.11 Análisis estadístico	94

4. RESULTADOS	97
4.1 Materia prima	97
4.2 Pretratamiento por explosión por vapor	98
4.3 Producción de enzimas celulolíticas	102
4.3.1 Efecto del control del pH en la producción enzimática de <i>T. reesei</i> RUTC30	103
4.3.2 Producción de enzimas utilizando paja de trigo pretratada como fuente de carbono	105
4.3.2.1 Evaluación de la producción enzimática sobre RSI y MPC de paja de trigo como fuentes de carbono	106
4.3.2.2 Evaluación del prehidrolizado de paja de trigo pretratada por EV como fuente de carbono para la producción de enzimas.....	109
4.3.3 Efecto del contenido en celulosa y hemicelulosa de la fuente de carbono en la producción de enzimas	116
4.3.3.1 Producción de enzimas	116
4.3.3.2 Ensayos de HE	119
4.4 Caracterización de preparados y componentes enzimáticos	123
4.5 Microensayos enzimáticos para el estudio de la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada	128
4.5.1 Composición de las hojas de paja de trigo pretratada	129
4.5.2 Microensayos enzimáticos para el estudio de la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada	130
4.5.2.1 Pérdidas por evaporación en los ensayos en microplaca	130
4.5.2.2 Efecto del volumen de ensayo	131
4.5.2.3 Efecto de las condiciones de secado del sustrato en la HE.....	132
4.5.2.4 Material pretratado completo como medio de HE	133
4.6 Evaluación de nuevos preparados celulolíticos mediante microensayos enzimáticos	136
4.6.1 Ensayos de HE a la misma actividad sobre papel de filtro	136
4.6.2 Ensayos de HE a la misma carga de proteína	138
4.7 Aplicación de preparados enzimáticos en la producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada por explosión por vapor	141

4.8 Efecto de distintas estrategias de suplementación enzimática en la hidrólisis enzimática y la producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada por explosión por vapor	145
4.8.1 Efecto de la suplementación con xilanasas comerciales en la HE de paja de trigo pretratada.....	145
4.8.1.1 Efecto de la suplementación con las xilanasas NS 50014 y NS 50030 en la HE utilizando RSI como sustrato	146
4.8.1.2 Efecto de la suplementación con la xilanasas NS 50030 en la HE de paja de trigo pretratada a alta carga de enzima y baja carga de enzima	147
4.8.1.3 Efecto de la suplementación con la xilanasas NS 50030 sobre la producción de etanol en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)	151
4.8.2 Efecto de la suplementación con endoxilanasas (XInC y XInA) y α -L-arabinofuranosidasa (AF) en la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada.....	153
4.8.2.1 Caracterización de XInC, XInA y AF	154
4.8.2.2 Estudio de la adición de diferentes dosis de XInC, XInA y AF en la HE	155
4.8.2.3 Efecto de la combinación de AF y XInC en la HE de paja de trigo pretratada (MPC) a diferente severidad	161
4.8.2.4 Efecto de la suplementación con AF y XInC en la HE y SFS con alta concentración de sólidos.....	169
4.8.3 Efecto de la suplementación enzimática con celulasas recombinantes.....	173
4.8.3.1 Suplementación con celobiohidrolasas (CBH) recombinantes ...	173
4.8.3.2 Suplementación con endoglucanasa recombinante.....	174
4.8.4 Efecto de la adición de expansinas en la hidrólisis enzimática	175
4.9 Estrategias de adición de xilanasas en la HE y en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas	179
4.9.1 Efecto en la HE de diferentes estrategias de suplementación con XInC.....	179
4.9.2 Integración de XInC en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas	187
4.9.2.1 Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).....	188
4.9.2.2 Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS)	189
4.9.3 Estrategias de suplementación con los preparados comerciales Cellic CTec y Cellic Htec.....	194

5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	197
6. BIBLIOGRAFÍA.....	203
7. ANEXOS.....	223
Artículo I	
Artículo II	
Artículo III	
Artículo IV	
Artículo V	

ABREVIATURAS

AF: α -L-arabinofuranosidasa.

AFEX: pretratamiento por explosión por vapor con amoníaco (“ammonia fiber explosion/expansion”).

BCA: ácido bicinconínico.

BPC: bioproceso consolidado.

BSA: albúmina sérica bovina.

CBH: celobiohidrolasa.

CMC: carboximetilcelulosa.

DNS: ácido dinitrosalicílico.

EG: endoglucanasa.

ETBE: etil ter-butyl éter.

EV: explosión por vapor.

DP: grado de polimerización.

HE: hidrólisis enzimática.

HFS: hidrólisis y fermentación separadas.

HMF: hidroximetilfurfural.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

MPC: material pretratado completo.

p/p: relación peso/peso.

p/v: relación peso/volumen.

rpm: revoluciones por minuto.

RSI: residuo sólido insoluble.

SCFS: sacarificación y co-fermentación simultáneas.

SF: Solka Floc.

SFS: sacarificación y fermentación simultáneas.

ST: sólidos totales.

UI: unidades internacionales.

UPF: unidades sobre papel de filtro.

XIn: xilanasa.

ρ NPG: ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosido.

ρ NPX: ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosido.

ρ NPA: ρ -nitrofenil- α -D-arabinofuranósido.

RESUMEN / ABSTRACT

Los biocarburantes (bioetanol y biodiésel) son una de las pocas alternativas renovables para la sustitución de los combustibles de origen fósil en el sector del transporte a corto plazo y la única cuyos productos pueden integrarse fácilmente en los actuales sistemas de distribución. Por ello, su desarrollo es una de las prioridades en las políticas energéticas de Unión Europea, cuyo objetivo es reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y aumentar la seguridad de suministro, reduciendo la dependencia del petróleo.

En la actualidad, para la producción de etanol a escala industrial se utiliza biomasa amilácea o azucarada, que son materias primas ligadas al sector de la alimentación. Por el contrario, la biomasa lignocelulósica es generalmente residual, de bajo coste, abundante y ampliamente distribuida, por lo que la producción de etanol a partir de este tipo de materias primas representa una alternativa prometedora para sustituir al etanol de primera generación. Concretamente la paja de trigo, empleada en esta Tesis doctoral, es un residuo lignocelulósico muy abundante en Europa, de bajo coste y con un alto contenido en carbohidratos, por lo que es una de las materias primas con mayor potencial para ser aplicada en la producción de etanol.

Aunque se han estudiado diferentes tecnologías para la producción de etanol de lignocelulosa, los bioprocesos basados en hidrólisis enzimática y fermentación se muestran como una de las opciones más prometedoras para su desarrollo industrial. Las características estructurales de la biomasa lignocelulósica hacen que sea un sustrato recalcitrante al ataque enzimático, por lo que es necesaria una etapa de pretratamiento anterior a la hidrólisis enzimática y a la fermentación. El objetivo del pretratamiento es alterar la estructura de la lignocelulosa y aumentar la accesibilidad de las fibras al ataque enzimático.

Tras el pretratamiento se realiza la hidrólisis enzimática de los sustratos pretratados, considerada una de las etapas que más influyen en el precio final del bioetanol, y por tanto uno de los mayores obstáculos para su comercialización. Aunque en los últimos años las más importantes compañías biotecnológicas han desarrollado productos con características mejoradas y han reducido su coste de producción, se continúa investigando para mejorar los cócteles enzimáticos, con el objetivo de conseguir un proceso más eficiente. En esta Tesis Doctoral se han

estudiado diferentes alternativas para mejorar el proceso de hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada.

El pretratamiento utilizado en este trabajo es la explosión por vapor, que se ha mostrado como un método efectivo para aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático y mejorar los rendimientos del proceso de producción de etanol a partir de este tipo de biomásas. Tras el pretratamiento se obtiene un sustrato (material pretratado completo, MPC) que contiene una fracción insoluble (RSI) rica en celulosa y lignina, con cierto contenido en hemicelulosa insoluble, y una fracción líquida o prehidrolizada, que contiene azúcares hemicelulósicos solubilizados y productos de degradación. En la mayoría de los procesos desarrollados hasta el momento, el RSI se separa de la fracción soluble antes de someterlo a la hidrólisis enzimática. La utilización del MPC para la producción de etanol presenta ventajas, ya que evita el paso de filtrado y aumenta la cantidad total de azúcares disponibles, sin embargo su utilización plantea algunos desafíos, puesto que la presencia de productos de degradación puede inhibir las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación. A lo largo de este trabajo los cócteles enzimáticos se han evaluado utilizando tanto el RSI y el MPC como sustratos.

Una de las estrategias para reducir los costes de la etapa de hidrólisis enzimática es la utilización de fuentes de carbono apropiadas, y de bajo coste, en la producción de las enzimas necesarias en el proceso. La paja de trigo pretratada, además de sustrato para la producción de etanol, también se ha utilizado como fuente de carbono en la producción de enzimas con el hongo *Trichoderma reesei* RUTC30. Se estudió el efecto que el contenido y proporción de hemicelulosa y celulosa de la paja de trigo utilizada como fuente de carbono tiene sobre la composición de los cócteles enzimáticos producidos. El prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por explosión por vapor, generalmente considerado un subproducto del proceso, también se utilizó como fuente de carbono, mostrando ventajas en la producción de enzimas, especialmente por la inducción de la producción de enzimas xilanasas. Esta parte del trabajo se realizó en el Dpto. de Biotecnología Aplicada de la Universidad Tecnológica y Económica de Budapest (Hungría).

Además de las enzimas producidas en este trabajo, se estudiaron diferentes preparaciones comerciales recientemente desarrolladas por compañías como “Novozymes” o “Genencor”, que se caracterizaron en cuanto a sus actividades enzimáticas y contenido en proteínas. Para evaluar el efecto de las preparaciones y

mezclas enzimáticas sobre un sustrato lignocelulósico real, se desarrolló una metodología de microensayo enzimático que permite estudiar la efectividad de las enzimas utilizando como sustratos tanto el MPC como el RSI de paja de trigo pretratada. Estas enzimas también se han ensayado utilizando alta carga de sustrato, obteniéndose mejores resultados que con los preparados enzimáticos disponibles actualmente en el mercado.

La compleja disposición y estructura de los distintos componentes en los materiales pretratados requiere para su completa degradación no sólo enzimas que hidrolicen la celulosa. La aplicación de enzimas accesorias con otras actividades, como las hemicelulasas, puede tener un gran potencial para aumentar la producción total de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos pretratados utilizando menores cargas de enzima totales.

En este contexto, se estudió la suplementación con preparaciones comerciales con actividad xilanasa como NS 50030, NS 50014 y Cellic HTec, que mostraron su potencial para mejorar la producción de glucosa y xilosa. Se evaluó también la suplementación con enzimas recombinantes: endoxilanasas, α -L-arabinofuranosidasas, endoglucanasas, celobiohidrolasas y proteínas expansinas. La adición de enzimas endoxilanasas y α -L-arabinofuranosidasas mostró un efecto sinérgico y positivo en la hidrólisis enzimática, y también en la producción de etanol mediante procesos de SFS.

Una vez establecido que las enzimas accesorias pueden incrementar la producción de azúcares fermentables, incluso en materiales pretratados con menor severidad, se estudiaron diferentes estrategias de adición de xilanasas en procesos de hidrólisis enzimática, de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y de sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS), con el objetivo de aumentar la producción de etanol. Los procesos de SCFS utilizando la levadura modificada genéticamente *Saccharomyces cerevisiae* F12 mostraron los mejores resultados, mostrando las ventajas de la co-fermentación tanto de glucosa como de xilosa.

RESUMEN / ABSTRACT

Biofuels (bioethanol and biodiesel) are one of the few renewable alternatives for the short-term substitution of fossil fuels in the transportation sector and the only products which can be easily integrated into current fuel distribution systems. Biofuels represent a top priority in the European Union energy policies to reduce greenhouse gas emissions and improve energy security.

Current production of industrial scale bioethanol is based on starch and sugars, which generates a debate about its sustainability. Lignocellulosic biomass includes waste or inexpensive materials which are widely distributed, therefore ethanol production from lignocellulose is a promising alternative to substitute first generation ethanol. Wheat straw was employed in this Doctoral Thesis because it is a lignocellulosic waste material, very abundant in Europe and with high carbohydrate content. For these reasons, it is an appropriate raw material to be applied in ethanol production.

Among different technologies studied for ethanol production from lignocellulose, bioprocesses based on enzymatic hydrolysis and fermentation are the most promising options to be developed at industrial scale. However, the recalcitrance of lignocellulosic substrates prevents the enzymatic attack and a pretreatment step prior to enzymatic hydrolysis and fermentation is required. The aim of the pretreatment is to modify the lignocellulose structure and enhance the accessibility of the fibers.

The enzymatic hydrolysis of pretreated substrates is considered one of the most influential factors in the final cost of ethanol and one of the main bottlenecks for its commercialization. In the last years, the main biotechnology companies have developed improved enzyme products and reduce the production costs. Notwithstanding, significant research efforts continue to improve the enzymatic cocktails and subsequently the enzymatic hydrolysis process. The present Doctoral Thesis addresses different alternatives to improve the enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw by using new and improved enzyme mixtures.

In this work, it has been used the steam explosion pretreatment, which it has been shown as an effective method to enhance enzyme accessibility and improve ethanol production yields using herbaceous biomass. After pretreatment the whole slurry can be separated in an insoluble fraction (WIS), containing cellulose, lignin and some hemicellulose; and a prehydrolyzate containing solubilised hemicellulosic sugars

and degradation products. In most processes developed to date, the WIS fraction is used for enzymatic hydrolysis. The utilization of the whole slurry for ethanol production involves some advantages since avoids a filtration step and increases total amount of fermentable sugars. However, the use of the whole slurry is challenging because contains degradation products which can inhibit enzymatic hydrolysis and fermentation steps. In this work, the whole slurry and the WIS fraction were used as substrates to evaluate the enzymatic mixtures.

One of the strategies to reduce enzymatic hydrolysis costs is the application of low-cost carbon sources for the production of the enzymes involved in the ethanol production process. Pretreated wheat straw has been used as carbon source for enzyme production using the fungus *Trichoderma reesei* RUTC30. It was studied the effect of the cellulose and hemicellulose content of the carbon sources on the enzymatic complexes composition. The prehydrolyzate obtained after steam explosion, which is generally considered a process by-product, was also used as carbon source for enzyme production, showing interesting advantages, especially the induction of xylanase production. These experiments were carried out in the Applied Biotechnology and Food Science Dpt., at the Budapest University of Technology and Economics (Hungary).

Different commercial enzymatic preparations recently developed by Novozymes or Genencor were also studied and characterized according to their enzymatic activities and protein content. To evaluate the effect of the enzymatic mixtures using a real lignocellulosic substrate it was developed an enzymatic microassay, which resulted very adequate to study the enzymes using both the whole slurry and WIS as substrates. These enzymes were also assayed at high solids content, improving the performance of former enzymatic preparations generally applied in ethanol production.

Complex structure and distribution of the different components in pretreated lignocellulosic substrates requires for its complete degradation not only cellulases. Application of accessory enzymes, such as hemicellulases, has a great potential to increase the production of total fermentable sugars using lower enzyme loadings. In this context, it was studied the supplementation of cellulases with commercial xylanases such as NS 50030, NS 50014 and Cellic HTec, which showed a positive effect on glucose and xylose production. Supplementation with recombinant enzymes (endoxylanases, α -L-arabinofuranosidases, endoglucanases, cellobiohydrolases and expansins) was also evaluated by their effect on the enzymatic hydrolysis of pretreated

wheat straw. Endoxylanases and α -L-arabinofuranosidases showed a synergistic effect, improving the enzymatic hydrolysis step and the ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process.

Once observed the benefits of accessory enzymes, even with pretreated substrates at lower severity, different strategies of xylanase supplementation during enzymatic hydrolysis, SSF and simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) processes were studied. SSCF using the genetically modified strain *Saccharomyces cerevisiae* F12 resulted in the highest ethanol production, showing the advantages of co-ferment glucose and xylose.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La biomasa como fuente de energía renovable

1.1.1 Contexto general

El proceso de industrialización en el siglo XVIII y el posterior desarrollo económico y de la sociedad de consumo han conllevado un aumento de la demanda energética mundial basado fundamentalmente en la utilización de combustibles fósiles. La emisión de gases contaminantes derivados de la explotación masiva de estos recursos fósiles ha provocado importantes perjuicios para el medio ambiente. Uno de los más evidentes es el aumento de las concentraciones de CO₂ en la atmósfera, que se ha estimado en aproximadamente un 30% desde 1750 (IPCC, 2001). Actualmente, es ampliamente aceptado por la comunidad científica que los cambios en la composición de la atmósfera provocados por las acciones humanas pueden tener un efecto enorme en los ciclos climáticos y biológicos. Los efectos negativos provocados por la utilización de combustibles fósiles, unidos al previsible agotamiento de sus reservas, han suscitado el interés por desarrollar fuentes de energía alternativas y renovables.

Las energías renovables son inagotables, reducen las emisiones de CO₂ y de otros gases de efecto invernadero y no generan residuos de difícil tratamiento. Además, desde el punto de vista económico y social, permiten reducir la dependencia energética de los combustibles fósiles y de los países que los producen, y favorecen la diversificación de las fuentes de energía. Ante esta perspectiva, los organismos nacionales e internacionales han promovido planes para la sustitución paulatina de las fuentes de energía no renovables. Concretamente la directiva de la UE (Directiva 2009/28/CE, 2009) relativa al fomento y uso de energía procedente de fuentes renovables ha establecido para el 2020 una participación de las energías renovables de un 20% en el consumo de energía primaria de la UE. En España, el Plan de Energía Renovables (PER) prevé que en 2020 la participación de las renovables sea del 22,7% sobre la energía final.

En este contexto, la biomasa constituye una de las fuentes de energía claves para reducir la dependencia de los recursos energéticos no renovables, como el petróleo, el carbón o el gas. La mineralización de los combustibles fósiles es un proceso geológico incluido en el ciclo a largo plazo del carbono. La explotación por

parte del ser humano de estos recursos en una escala temporal muy inferior a la de su formación implica que sean considerados como fuentes de energía agotables y no renovables. Por el contrario, el aprovechamiento energético de la biomasa devuelve a la atmósfera tanto CO₂ como ha sido fijado anteriormente por las plantas, por lo que teóricamente las emisiones netas de carbono son nulas (Gómez y col., 2008). La figura 1.1 esquematiza la integración de la biomasa y de los combustibles fósiles en el ciclo del carbono.

La biomasa presenta ventajas adicionales frente a otras fuentes de energía renovables, ya que constituye una de las pocas alternativas para el sector del transporte y favorece el desarrollo agrícola y rural. Además, permite cierto grado de almacenamiento y la revalorización energética de residuos. La biomasa ha sido la mayor fuente de energía para el ser humano y actualmente, su contribución al abastecimiento energético mundial se estima entre un 10 y un 14% (McKendry, 2002).

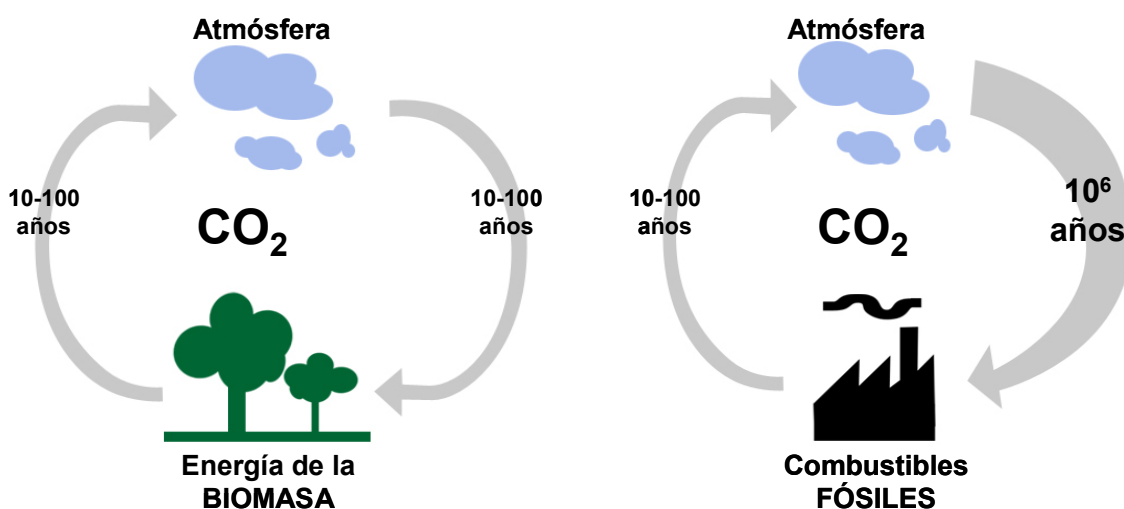


Figura 1.1 Combustibles fósiles y biomasa en el ciclo del carbono.

1.1.2 Biocombustibles

En términos energéticos la biomasa se define como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, potencialmente utilizable como fuente de energía. En el contexto de la energía, generalmente se definen cuatro tipos de biomasa según su composición: (1) la biomasa azucarada (remolacha, caña

de azúcar, etc.), (2) biomasa amilácea (granos de cereal, patata, etc.), (3) biomasa oleaginosa (semillas de colza, palma, girasol, etc.) y (4) biomasa lignocelulósica. En este último grupo se incluye la madera, los residuos agrícolas y forestales, algunos subproductos industriales, los cultivos energéticos y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

Los biocombustibles engloban todos aquellos combustibles generados a partir de biomasa. Según su naturaleza, se distingue entre combustibles sólidos, líquidos y gaseosos, que por sus diferentes características pueden ser utilizados para la producción de calor, electricidad y como combustibles en el transporte. En la figura 1.2 se resumen los tipos de biomasa y los tipos de biocombustibles que pueden obtenerse a partir de ellas, lo que muestra la amplia versatilidad de la biomasa como fuente de energía. Los biocombustibles sólidos proceden generalmente de biomasa lignocelulósica y son utilizados en procesos termoquímicos para producción de calor y electricidad. Los biocombustibles gaseosos o biogás pueden ser utilizados en motores para transporte, o en turbinas para producción eléctrica. Los biocombustibles líquidos se pueden aplicar para producción de calor y electricidad, y también como combustibles para el transporte. Tanto los biocombustibles gaseosos como los líquidos suelen agruparse con el término biocarburantes debido a su aplicación en motores de combustión interna. Los principales biocombustibles líquidos son el biodiésel, producido fundamentalmente mediante la transformación de aceites vegetales y el bioetanol, obtenido mediante fermentación de azúcares. El bioetanol y el biodiésel suponen hoy en día la principal alternativa renovable para la sustitución total o parcial de gasolinas y diésel, respectivamente.

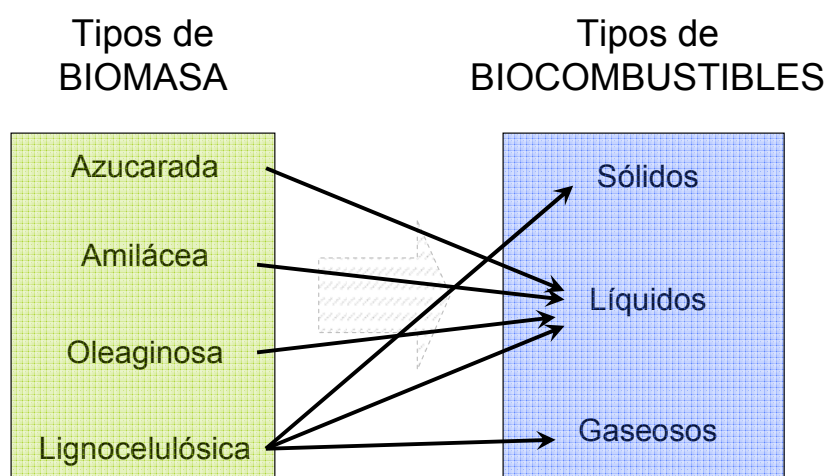


Figura 1.2. Tipos de biocombustibles producidos a partir de distintos de biomasa.

Actualmente, el 98% de los combustibles para el transporte proceden del petróleo por lo que la dependencia de fuentes de energía no renovables en este sector es casi total. Además, se ha estimado que el 25-30% de las emisiones de CO₂ antropogénicas en países industrializados procede del transporte (Gómez y col., 2008). Ante esta situación, diversas instituciones han promovido la sustitución de los carburantes de origen fósil por otros de naturaleza renovable. La directiva de energías renovables de la UE, anteriormente mencionada, establece bajo una serie de criterios de sostenibilidad una participación de los biocombustibles y otros carburantes renovables de un 10% dentro del sector transporte para el año 2020. Esta directiva establece además la elaboración por parte de cada Estado Miembro de un Plan de Acción Nacional en materia de Energías Renovables (PANER) para conseguir los objetivos nacionales fijados en la propia Directiva (PANER, 2010). En España, el Real Decreto 1738/2010 fijó una obligatoriedad de consumo mínimo de biocarburantes de 5,9% para 2011, con revisiones anuales hasta alcanzar 6,0 y 6,1% en 2012 y 2013, respectivamente. A principios de 2011, y debido al aumento inesperado del precio del crudo, el objetivo para ese año se aumentó del 5,9% hasta el 7%, con porcentajes mínimos obligatorios para bioetanol y biodiésel. Las políticas de promoción de los biocarburantes han conllevado que, actualmente, España se encuentre entre los países con mayor capacidad de producción de bioetanol y de biodiésel, con 0,46 Mt y 4 plantas; y 4,21 Mt y 46 plantas, respectivamente.

1.1.3 Etanol como biocarburante

El origen del uso de etanol como carburante se remonta al siglo XIX, en los inicios del transporte motorizado. Aunque el posterior desarrollo de la industria petrolífera relegó su utilización y la de otros carburantes de origen vegetal, el etanol fue el combustible empleado en el primer motor de combustión interna desarrollado por Nicholas Otto y también en el primer automóvil de cuatro tiempos fabricado por Henry Ford. Durante el siglo XX, la alta disponibilidad de petróleo condicionó el desarrollo de combustibles alternativos como el etanol. La crisis del petróleo en los 70 evidenció la dependencia de los países exportadores y resurgieron las iniciativas para desarrollar y promover otros tipos de combustibles. Ya en el siglo XXI, la producción mundial de bioetanol a partir de biomasa azucarada y amilácea aumentó notablemente, llegándose a triplicar entre 2000 y 2007 (Sims y col., 2008).

En la actualidad el bioetanol es un producto sustitutivo de la gasolina que se puede emplear directamente (E100), mezclado en distintas proporciones con la gasolina o como aditivo mediante su transformación a etil ter-butyl éter (ETBE). La sustitución de la gasolina con etanol en bajas proporciones; 5, 10, 15% (combustibles E5, E10 y E15), no requiere, en principio, modificaciones en motores de explosión, por lo que las especificaciones europeas y nacionales de calidad de las gasolinas tienden a admitir bajas proporciones de etanol en las mezclas. Las mezclas con mayores proporciones de etanol, como el E85 (85% de etanol) se pueden utilizar en vehículos modificados denominados FFV ("Flexible Fuel Vehicle") (Ballesteros, 2006).

Gran parte de la producción actual de bioetanol se basa en el uso de materias primas azucaradas y amiláceas, principalmente caña de azúcar (Cardona y Sánchez, 2007), maíz y trigo (Murphy y Power, 2008; Solomon y col., 2007). La producción de bioetanol a partir de este tipo de materias primas se conoce como etanol de primera generación y está respaldada por una tecnología solvente y madura. Además, estudios de ciclo de vida han mostrado una reducción de las emisiones de entre el 30 y el 50% respecto a los combustibles fósiles (Lechón y col., 2005). El principal inconveniente de la producción de etanol de primera generación es el elevado coste de las materias primas ligadas al sector alimentario, lo que además plantea un conflicto ético al utilizarse con fines energéticos.

El etanol de segunda generación utiliza biomasa lignocelulósica como materia prima. La biomasa lignocelulósica incluye materiales residuales no alimentarios, abundantes y baratos, y cultivos energéticos, por lo que su utilización contribuye tanto a aumentar la sostenibilidad como a disminuir el coste del proceso de producción de bioetanol (Ballesteros, 2006; Sims y col., 2010). De hecho, la producción potencial mundial de etanol a partir de estas materias primas se ha estimado en 16 veces la producción actual con almidón o azúcares (Kim y Dale, 2004). El Consejo Mundial de la Energía estimó que la revalorización energética del 5% de la biomasa mundial (13500 Mt) y su conversión a etanol satisfaría el 26% de la demanda energética para el transporte (World Energy Council, 2011). Además, se ha calculado que la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos en lugar de maíz disminuye entre 3 y 4 veces las emisiones de gases de efecto invernadero (Wyman, 2001), e incluso podría alcanzarse un balance neto nulo de emisiones. Actualmente, aunque no existen todavía plantas industriales de producción, varias compañías y centros de investigación han desarrollado plantas a escala piloto y de demostración con materiales como paja de trigo, bagazo de maíz y madera. En España, Abengoa

Bioenergía Nuevas Tecnologías ha desarrollado la primera planta de demostración a partir de paja de trigo.

1.2 Biomasa lignocelulósica: composición y estructura

La producción de bioetanol de segunda generación utiliza biomasa lignocelulósica como materia prima. La biomasa lignocelulósica engloba gran parte del material vegetal abundante y barato no aprovechable para la alimentación y que en muchos casos se genera como residuo en otros sectores. Incluye diversos tipos de materiales con alto contenido en carbohidratos (55-75%), por lo que son susceptibles de ser utilizados para la producción de etanol (Laureano-Pérez y col., 2005; Wyman, 1996). Además, la variabilidad de las materias primas lignocelulósicas permite su aplicación para la obtención de otros productos con valor añadido, como otros biocombustibles (hidrógeno, biogás...), compuestos orgánicos, sustancias derivadas de la lignina, etc. (Howard y col., 2003; Kaparaju y col., 2009). Según Cardona y Sánchez la biomasa lignocelulósica se puede clasificar en 6 grupos (Cardona y Sánchez, 2007).

- Residuos agrícolas: paja de cereal, bagazo de caña de azúcar, etc.
- Maderas duras: angiospermas como álamo, chopo, etc.
- Maderas blandas: gimnospermas como pino, abeto, píceas, etc.
- Residuos celulósicos: residuos de papel, residuos de industrias de la madera y el papel, etc.
- Biomasa herbácea: Alforfalfa, alpiste, pastos, etc.
- Residuos sólidos urbanos (RSU).

La biomasa lignocelulósica también puede clasificarse según su origen (Castells, 2005):

- Biomasa natural: producida en ecosistemas naturales.
- Biomasa residual: aquella que se produce como consecuencia de las actividades forestales, agrícolas, ganaderas, industriales o derivadas de otras actividades humanas, como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos o los fangos procedentes del tratamiento de aguas residuales.
- Cultivos energéticos: aquellos vegetales que se cultivan para su aprovechamiento como recurso energético.

En la tabla 1.1 se resume la composición de algunas de las materias primas lignocelulósicas potencialmente utilizables en la producción de etanol.

Tabla 1.1. Composición de materias primas lignocelulósicas utilizadas para la producción de bioetanol.

Materia prima	Glucano	Xilano	Arabinano	Galactano	Manano	Lignina	Referencia
Maderas blandas							
Píceas	49,9	5,3	1,7	2,3	12,3	28,7	Söderström y col., 2003
Pino	41,9	5,5	1,7	2,9	11,7	28,6	Tian y col., 2010
Maderas duras							
Sauce	43,0	14,9	1,2	2,0	3,2	26,6	Sassner y col., 2006
Chopo	43,5	15,5	1,5	2,3	2,5	26,2	Negro y col., 2003
Abedul	49,9	18,5	-		1,2	22,8	Hayn y col., 1993
Otras							
Paja de trigo	40,7	23,7	1,3	2,6	-	17,0	Tomás-Pejó y col., 2009b
Paja de cebada	33,1	20,2	3,8	0,9	-	16,1	García-Aparicio y col., 2006
Bagazo de maíz	37,2	21,1	1,7	1,2	-	26,0	Öhgren y col., 2006b
Residuo de cañamo	40,1	18,4	-	0,3	0,9	21,7	Barta y col., 2010
Ramón de olivo	25,0	9,8	2,1	1,4	0,7	18,8	Cara y col., 2007
Fracción orgánica RSU	37,5-43,9	5,0-5,8	-	-	-	21,9-29,1	Ballesteros y col., 2010

Una de las materias primas lignocelulósicas más abundantes en Europa es la paja de trigo, que presenta un alto contenido en carbohidratos, y por tanto es una opción viable que ha sido ampliamente estudiada en procesos de producción de etanol (Talebnia y col., 2010). Se ha estimado que por cada kilogramo de grano de trigo se genera 1,1 de paja (Bamaga y col., 2003), y según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAOSTAT, 2009) se produjeron en el mundo alrededor de 680 Mt de trigo en 2009, lo que supondrían 750 Mt de paja de trigo disponibles. En Europa la producción de paja de trigo se ha estimado en 170 Mt (Tabka y col., 2006). Kim y Dale estimaron que, considerando la paja de trigo utilizada para alimento animal y para mantenimiento de suelos, alrededor de 354 Mt podrían destinarse globalmente a usos energéticos (2004).

Los tres componentes fundamentales de las paredes celulares vegetales, y por tanto de la biomasa lignocelulósica son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Además, otros compuestos presentes en menores proporciones son la pectina, los extractivos y las cenizas.

1.2.1 Celulosa

La celulosa es el componente principal de la pared celular vegetal y la macromolécula más abundante de La Tierra, con una producción anual estimada de 10^{11} toneladas (Brown, 2003). Aunque es característica de las plantas, otros organismos como bacterias, cianobacterias, hongos, algas verdes e incluso algunos animales también son capaces de sintetizarla de forma natural (Nobles y col., 2001; Zogaj y col., 2001).

La celulosa es un homopolímero lineal formado por monómeros de glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4). Se trata de un polisacárido de alto peso molecular que puede presentar un grado de polimerización (DP) de hasta 15.000, dependiendo del origen, y una longitud de 4-7 micras (Sjöstrom, 1993). La unidad estructural de la celulosa es la celobiosa, que está compuesta por dos unidades de D-glucopiranosas unidas mediante un enlace O-glucosídico β (1 \rightarrow 4). La figura 1.3 muestra la estructura fundamental de la celulosa.

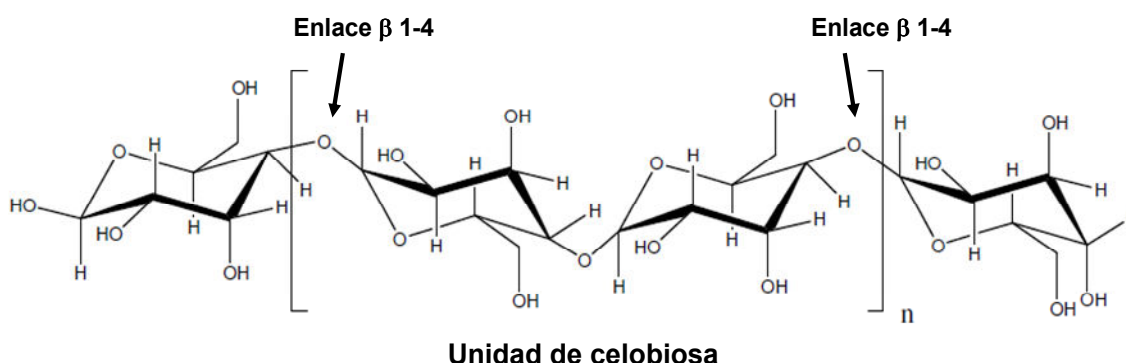


Figura 1.3. Estructura de la celulosa: enlace β (1 \rightarrow 4) entre dos unidades de D-glucosa que constituyen la celobiosa, unidad repetitiva en la molécula de celulosa.

La ciclación tipo piranosa de la glucosa ocurre como consecuencia de un enlace covalente intramolecular entre el grupo carbonilo del carbono 1 (C1) y el oxígeno de un grupo OH del carbono 5 (C5). Este enlace se conoce como enlace hemiacetal y como consecuencia se genera un átomo de carbono (C1) asimétrico adicional en la glucosa, llamado anomérico, que presenta poder reductor.

El enlace O-glucosídico se produce entre el carbono anomérico del primer monosacárido y un grupo hidroxilo del siguiente. Al formarse el enlace se incorpora una molécula de agua, por lo que la reacción ha de ocurrir necesariamente en medio acuoso. En el caso de la celulosa, el enlace se produce entre el carbono anomérico (C1) de la primera glucosa y el grupo hidroxilo del carbono en posición 4 (C4) de la siguiente molécula de glucosa. De esta forma, se conserva el grupo hidroxilo de un carbono anomérico libre y por tanto la cadena de celulosa aumenta su longitud añadiendo unidades de glucosa y conservando un extremo reductor y un extremo no reductor. Cuando un C anomérico forma parte de un enlace glicosídico, ya no puede actuar como reductor. Por lo tanto, los disacáridos que tienen un C anomérico libre, como es el caso de la celobiosa, son reductores y los que tienen los dos C anoméricos formando el enlace glucosídico, como la sacarosa, no son reductores (Fengel y Wegener, 1989).

En la celulosa, las cadenas de glucosa están fuertemente unidas entre sí formando agregaciones fibrilares que son estabilizadas lateralmente por fuerzas de “van der Waals” y por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo de moléculas adyacentes. Estas fibrillas o protofibrillas se empaquetan entre sí formando unidades mayores denominadas microfibrillas, que a su vez dan lugar a las fibras que constituyen la estructura cristalina de la celulosa. La figura 1.4 ilustra la estructura y conformación de la macromolécula de celulosa.

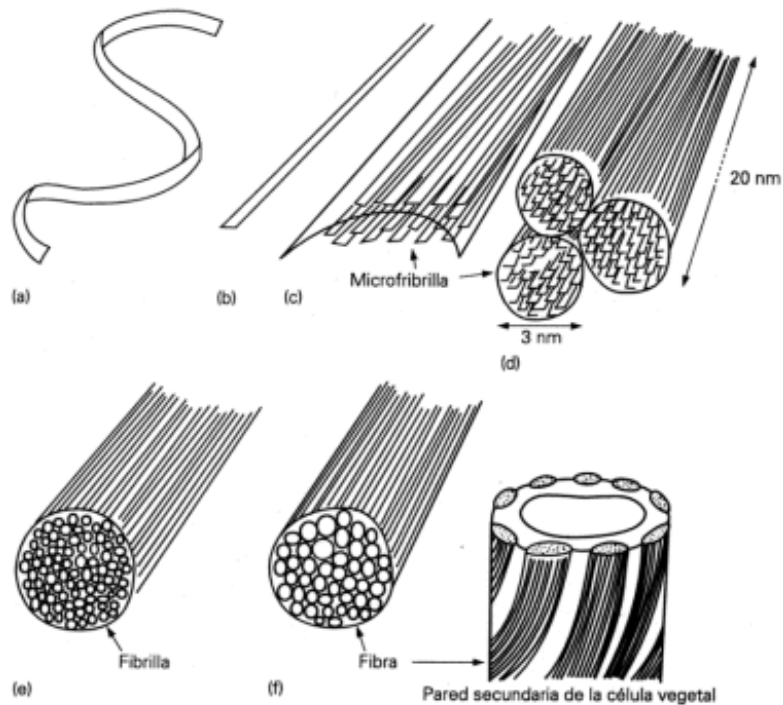


Figura 1.4. Estructura y disposición de la celulosa en pared vegetal. El polímero de celulosa lineal (a) tiende a extenderse totalmente (b) y asociarse para formar microfibrillas (c) que a su vez se alinean con otras (d y e) y dan lugar a una fibra de celulosa (f). Fuente: Genoma Sur.

Las regiones en las que la celulosa presenta una estructura ordenada se denominan cristalinas y aquellas cuya estructura es menos ordenada se denominan amorfas. La celulosa nativa, es decir la sintetizada por seres vivos, se encuentra en dos formas cristalinas clasificadas como celulosa I y celulosa II (Brown, 2003). La celulosa I es la más comúnmente encontrada en la naturaleza y en ella las cadenas de glucosa se encuentran ordenadas y orientadas paralelamente. En el caso de la celulosa II, solamente sintetizada por algunas algas y bacterias, las cadenas se ordenan de forma antiparalela. Además de estas conformaciones, se han descrito otros cristales polimórficos designados como celulosa III₁ y III₂, IV₁ y IV₂, y X, que se obtienen a partir de la celulosa I tras ser sometida a diferentes tratamientos.

1.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa forma parte, como la celulosa, de la pared vegetal de las plantas y es el segundo compuesto orgánico más abundante. Su función en la

estructura de la pared vegetal está relacionada fundamentalmente con la interacción entre la lignina y la celulosa (Sun y col., 1998).

Estructuralmente, las hemicelulosas son heteropolisacáridos compuestos por diferentes unidades de monosacáridos: pentosas, hexosas y ácidos urónicos. Estos monómeros se unen entre sí por enlaces glucosídicos dando lugar a estructuras ramificadas y en general, amorfas. La hemicelulosa está constituida por una cadena principal de un único azúcar (homopolímero), o de dos o más azúcares (heteropolímero). Estas cadenas de azúcares presentan generalmente ramificaciones cortas, en muchos casos de un único azúcar. Su grado de polimerización varía entre 70 y 200 según la especie vegetal (Fengel y Wegener, 1989). Debido a su estructura ramificada, la hemicelulosa es más soluble que la celulosa y por tanto más fácilmente hidrolizable.

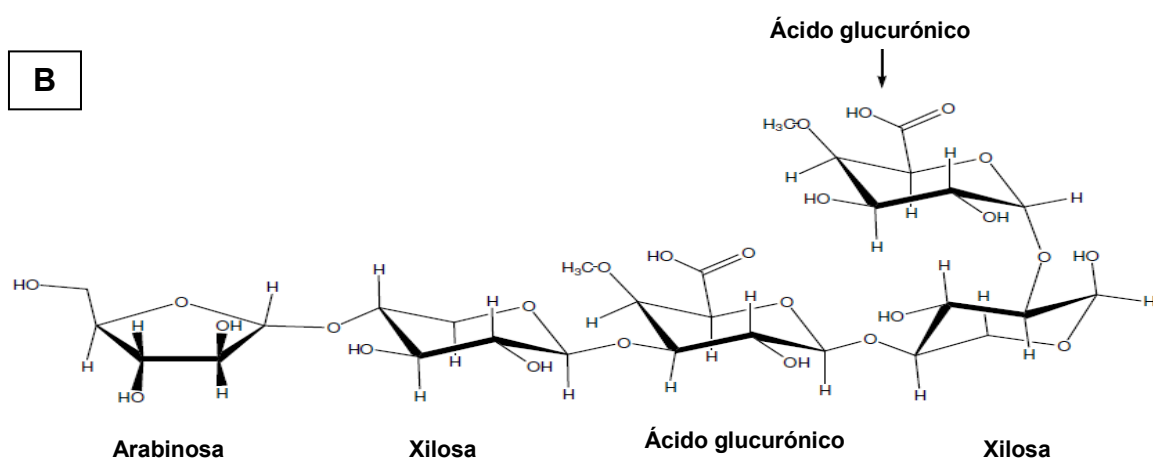
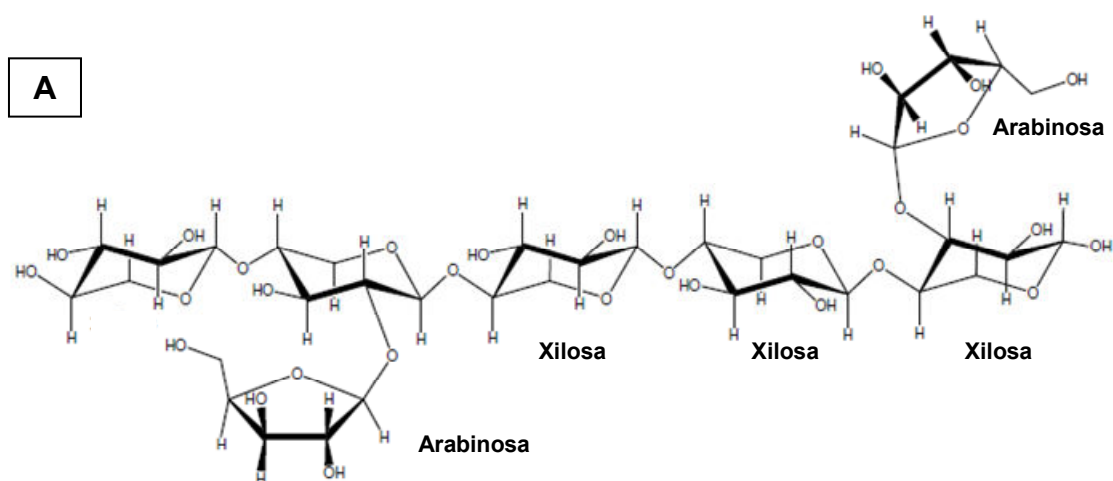
La hemicelulosa se clasifica generalmente en función del monómero predominante en la cadena principal. De esta forma, se pueden distinguir xilanos, mananos, glucanos y galactanos (Carpita y Gibeaut, 1993; Brett, y Waldron, 1996). Las combinaciones de distintos monómeros en la cadena principal y sus sustituciones permiten establecer diferentes grupos tales como: glucuronoxilanos, glucanos, arabinoxilanos, glucomananos, galactoglucomananos, xiloglucanos, arabinogalactanos, etc. En la figura 1.5 se muestran tres ejemplos de estructuras hemicelulósicas.

Los **xilanos** son el tipo más abundante entre las hemicelulosas. Su cadena principal está compuesta por unidades de β -1,4 xilopiranosas, generalmente monosustituidas con residuos de arabinosa (arabinoxilano, figura 1.5.A) o ácido glucurónico (glucuronoxilano figura 1.5.B). También se pueden encontrar sustituciones de galactosa o manosa en menor proporción.

Entre los **mananos** se distinguen dos grupos principales: glucomananos y galactomananos. La cadena principal de los glucomananos está formada por unidades de glucosa y manosa, y no presenta ramificaciones ni sustituyentes. Los galactomananos están compuestos por una cadena principal de mananos con unidades sustituidas de galactosa. Este tipo de moléculas forman parte del endospermo donde desempeñan una función de reserva. En algunas plantas también pueden ser sustituidas por unidades de glucosa formando los galactoglucomananos (figura 1.5.C).

Los **glucanos** no celulósicos están formados por unidades de glucosa unidas mediante enlaces β -1,3 y β -1,4, y ejercen su función durante el crecimiento celular. Los xiloglucanos presentan una cadena principal de unidades de glucosa con sustituciones de xilosa. Este tipo de hemicelulosas forman parte de la pared celular primaria, por lo que están presentes en todas las plantas.

Entre los **galactanos** destacan los arabinogalactanos, que se componen de cadenas de galactosa sustituidas con residuos de arabinosa o con pequeños oligómeros de arabinosa y galactosa.



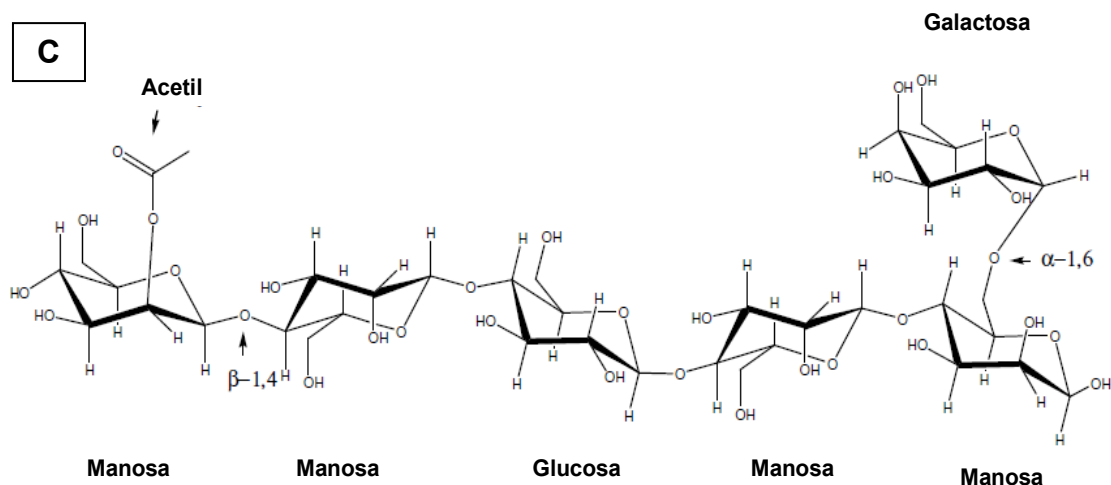


Figura 1.5. Estructura de tres tipos de hemicelulosas:
(A) arabinoxilano, (B) arabinoglucuronoxilano, (C) galactoglucomanano.

La estructura de la hemicelulosa presenta, en comparación con la celulosa, enormes variaciones en cuanto a su composición y su disposición entre los distintos tipos de biomásas (Puls, 1997). Las composiciones mostradas en la tabla 1.1 reflejan las diferencias entre tipos de maderas y materiales herbáceos. En las maderas duras el xilano y el glucuronoxilano son los polímeros más abundantes, están frecuentemente sustituidos por grupos acetilo y pueden representar hasta un 30% del peso total (Dahlman y col., 2003; Fengel y Wegener, 1989;). En las maderas blandas, los polímeros más abundantes son el galactoglucomanano y el arabinoglucuronoxilano, por lo que contienen generalmente una mayor proporción de unidades de manosa, arabinosa y galactosa en comparación con las maderas duras (Dahlman y col., 2003).

Los residuos agrícolas y los materiales herbáceos presentan una fracción hemicelulósica similar a la encontrada en las maderas duras, pero con un menor contenido de grupos acetilo. Concretamente en la paja de trigo, el polímero cuantitativamente más importante es el xilano (Sun y Tomkinson, 2002). Suele estar frecuentemente sustituido por unidades de α -L-arabinofuranosas, formando el arabinoxilano, uno de los polímeros más abundantes en este tipo de materiales (entre un 20 y un 40%). Otros sustituyentes encontrados en menor proporción en la cadena de xilosas son la galactosa, los grupos acetilo, el ácido glucurónico o el ácido 4-O-metil-glucurónico (Sun y col., 2005a-b). Todos estos sustituyentes, a pesar de ser

componentes minoritarios, tienen un papel importante, ya que forman uniones de tipo éter y de tipo éster entre la lignina y la hemicelulosa (figura 1.6).

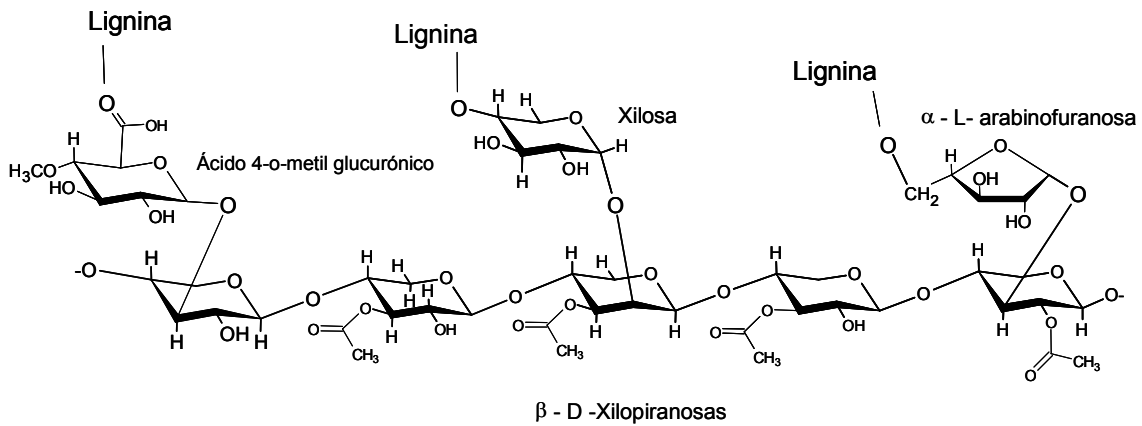


Figura 1.6. Estructura simplificada de la hemicelulosa de la paja de trigo.

1.2.3 Lignina

La lignina es uno de los componentes mayoritarios de la pared vegetal secundaria. Actúa como puente de unión entre los otros componentes polisacáridos de la pared celular (celulosa y hemicelulosa), y confiere rigidez y resistencia a la estructura vegetal. La lignina tiene un papel importante en la protección del tejido vegetal ante los factores ambientales y ante la infección de microorganismos. Además, la lignina participa en el transporte interno de nutrientes y metabolitos.

En cuanto a composición y estructura, la lignina es un polímero muy distinto a la celulosa y a la hemicelulosa. Se trata de un polímero tridimensional amorfo con alto peso molecular, cuyas subunidades o monómeros básicos son los alcoholes cinamílicos p -cumárico, coniferílico y sinapílico. Estos alcoholes son, respectivamente, los precursores de las unidades p -hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), que se unen de forma desordenada mediante enlaces éter y carbono-carbono y constituyen la estructura de la lignina. Como se observa en la figura 1.7, las subunidades muestran diferentes patrones de metoxilación en su anillo aromático, que condicionan los tipos de enlaces formados entre ellas. Mientras que las unidades H no están metoxiladas, las unidades G y S presentan uno y dos grupos metoxilos unidos al grupo fenólico, respectivamente.

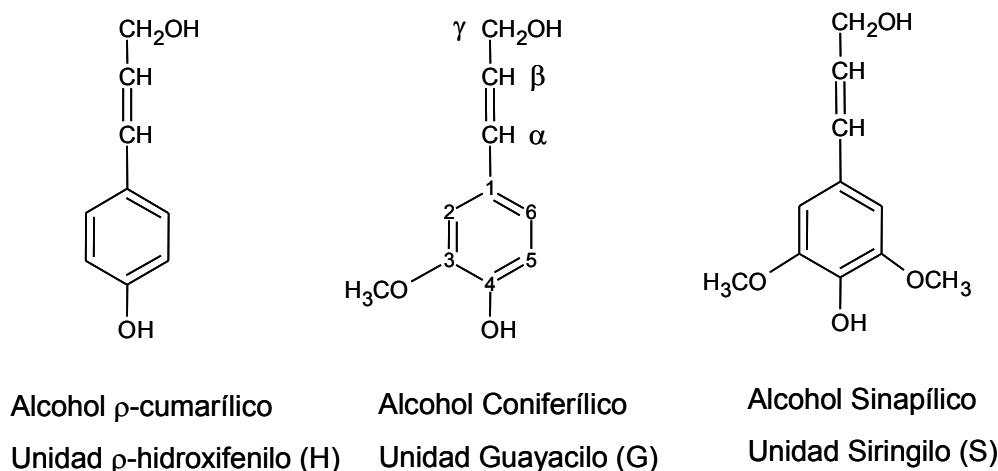


Figura 1.7. Unidades estructurales de la lignina.

Existen diferencias en el contenido y estructura de la lignina entre diferentes materiales vegetales. Las maderas blandas presentan un mayor contenido en lignina, y está constituida principalmente por unidades G, mientras que las maderas duras contienen menos lignina, y está formada mayoritariamente por unidades H y S.

La lignina de los materiales herbáceos ha sido menos estudiada que en el caso de las maderas. La principal característica que la distingue es la presencia en su estructura de las tres unidades H, G y S. Según Buranov y Mazza la lignina de la paja de trigo contiene unas proporciones aproximadas de unidades H, G y S de 5, 49 y 46%, respectivamente (2008). Un modelo aproximado de su estructura se muestra en la figura 1.8. Además de las subunidades principales que forman la estructura de la lignina, otros intermediarios cinámicos más minoritarios como el ácido ferúlico, diferúlico o p-cumárico posibilitan la asociación hemicelulosa-lignina mediante enlaces con sustituyentes monoméricos como la arabinosa o el ácido glucurónico (figura 1.6) (Lam y col., 2001). Generalmente, el contenido en lignina de la paja de trigo y otros materiales herbáceos varía entre un 15 y un 25% (Laureano-Pérez y col., 2005; Tomás-Pejó y col., 2008).

El contenido en lignina y su asociación con otros componentes de la lignocelulosa tiene una gran influencia en los procesos de fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica. La lignina es insoluble en ácido, pero soluble en medio básico concentrado y en solventes orgánicos. La extracción de lignina utilizando estos solventes posibilita su revalorización mediante la obtención de productos de interés.

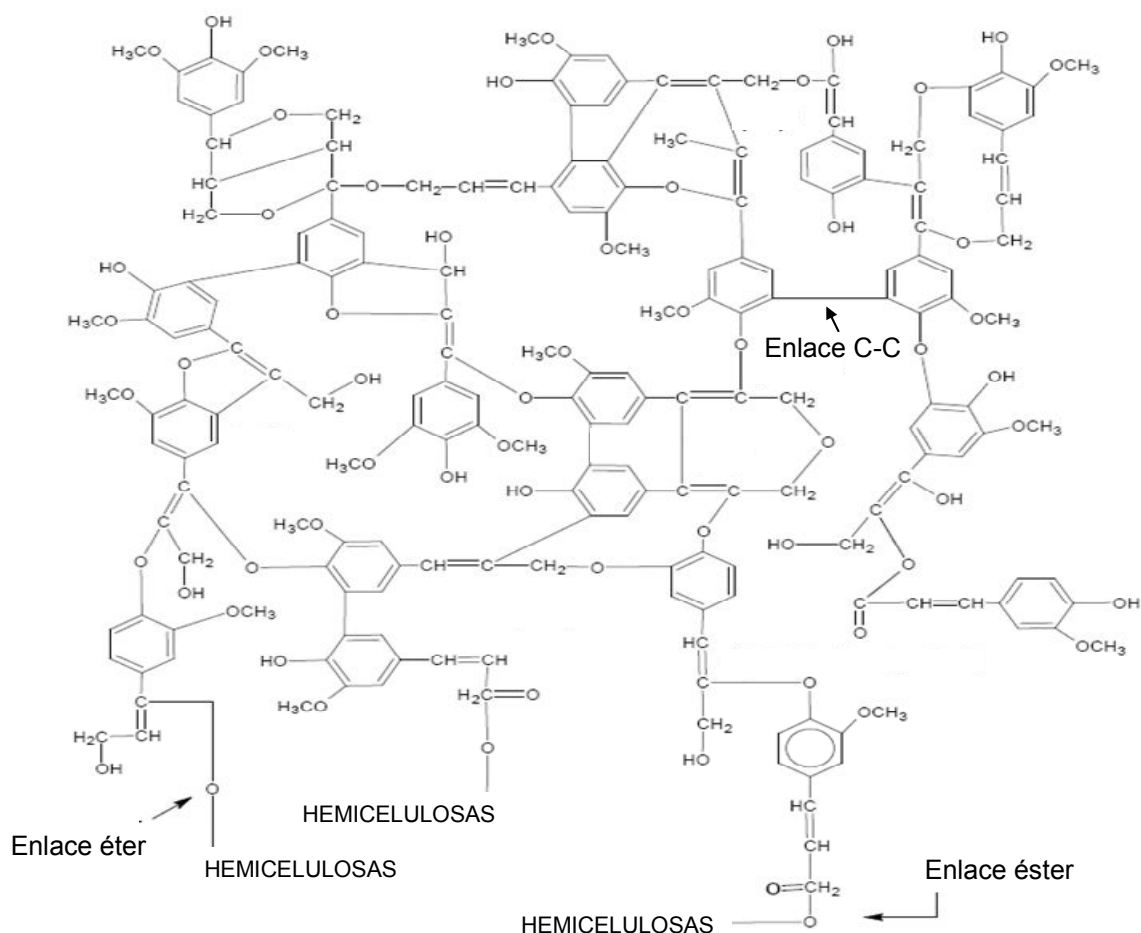


Figura 1.8. Modelo de la estructura de la lignina de la paja de trigo (Iiyama y col., 1990; Sun y col., 1997).

1.2.4 Otros componentes

Además de los componentes descritos anteriormente, la biomasa lignocelulósica contiene otros componentes en menor proporción.

Las **pectinas** son un grupo de polisacáridos característicos de las paredes celulares (pared primaria y lámina media) de las dicotiledóneas, especialmente en los frutos. En otro tipo de materiales, como maderas o plantas herbáceas, son componentes minoritarios. Su función está relacionada con la porosidad de la pared celular y la regulación del pH y del balance iónico. Estructuralmente, las pectinas están formadas por ácido galacturónico y menores proporciones de ramnosa, arabinosa y galactosa. Se distinguen dos grupos principales, el ácido poligalacturónico y los ramnogalacturonanos. El ácido poligalacturónico es un homopolisacárido formado por unidades de ácido galacturónico. Los ramnogalacturonanos son heteropolímeros más

complejos formados por cadenas de ácido galaturónico con ramificaciones de ramnosa, arabinosa y galactosa (Brett, y Waldron, 1996; Carpita y Gibeaut, 1993).

Los **extractivos** engloban un grupo heterogéneo y estructuralmente variado de componentes minoritarios de la biomasa lignocelulósica. En este grupo se incluyen diferentes compuestos orgánicos, tales como: grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Estos componentes, poco significativos cuantitativamente, tienen funciones esenciales para el funcionamiento de los organismos vegetales. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o forman parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Asimismo, son los responsables del color, olor y resistencia al marchitamiento de las plantas.

Las **cenizas** están compuestas por una variedad de compuestos inorgánicos que incluyen sales (carbonatos, silicatos, fosfatos, etc.) de calcio, potasio, magnesio, etc., sílice y metales pesados.

1.2.5 Estructura y disposición de los componentes de la biomasa lignocelulósica

La pared celular es el componente estructural típico de las células vegetales. Aunque en los tejidos de las distintas especies existen muchos tipos de células diferenciadas con características y estructura definidas, se puede describir un modelo general de la estructura de las paredes celulares vegetales. Todas las células sintetizan los componentes necesarios y los depositan en una serie de capas que van formando la estructura completa de la pared. Generalmente, se distinguen tres capas: **lámina media, pared primaria y pared secundaria**, cuya disposición se muestra en la figura 1.9.

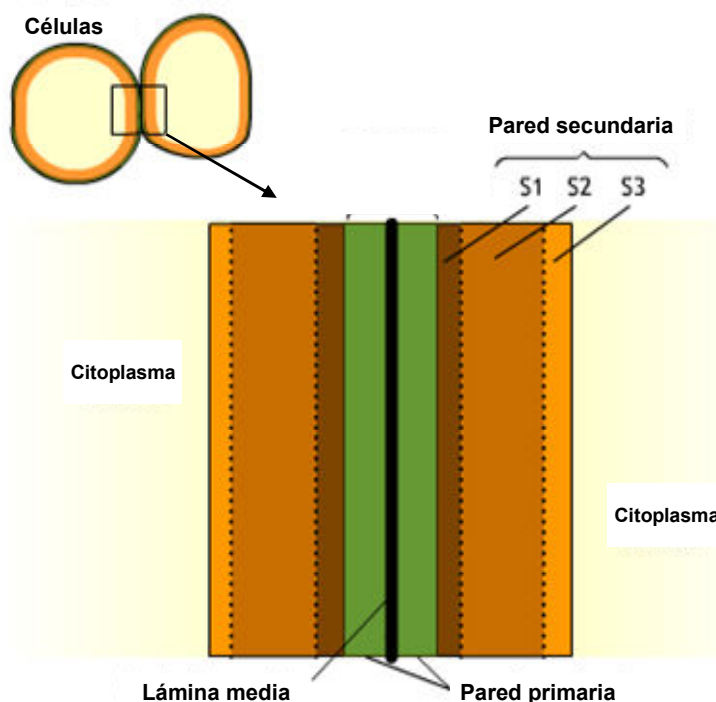


Figura 1.9. Disposición de las capas de la pared celular vegetal. Fuente: Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina) (adaptado).

La **lámina media** es una fina capa rica en pectinas que se deposita inicialmente. Se trata por tanto de la capa que queda en el exterior, en contacto con las células adyacentes. La **pared primaria** se forma durante el crecimiento celular, se deposita a continuación de la lámina media y puede tener un grosor de 0,1-1 micras. Está compuesta fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas (Bidlack y col., 1992). Aunque es similar en casi todas las células vegetales, se han descrito dos tipos de pared primaria. La de tipo 1, típica de gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, es rica en pectina y xiloglucano. La pared primaria de tipo 2 es característica de las gramíneas y contiene glucanos y arabinoxilanos (Brett y Waldron, 1996).

Hay células vegetales que solamente presentan pared primaria y lámina media, sin embargo algunas sintetizan una tercera capa, la **pared secundaria**, más gruesa y rígida que la pared primaria, y mucho más variable química y estructuralmente. La pared secundaria deriva de la pared primaria y su característica diferencial es la inclusión de lignina en la matriz de polisacáridos (Bidlack y col., 1992). Así pues, celulosa, hemicelulosa y lignina son sus tres componentes fundamentales, los cuales se asocian para formar la compleja matriz estructural de la pared secundaria. La

celulosa es el componente homogéneo, cristalino y fibroso que aporta flexibilidad y robustez; la lignina impregna y cubre las fibras de celulosa; y la hemicelulosa interacciona en las uniones entre la celulosa y la lignina (Brett y Waldron, 1996). En la figura 1.10 se ilustra la disposición y organización de los distintos componentes en la pared celular secundaria, que es la capa de la pared vegetal más gruesa y cuantitativamente más importante. En la pared secundaria se pueden distinguir tres capas: S1, S2 y S3. En la capa S1 las fibras de celulosa se encuentran distribuidas desordenadamente, mientras que en la capa S2, la más gruesa de todas, las fibras de celulosa se disponen paralelamente. La tercera capa S3 es la más interna y está en contacto con el citoplasma.

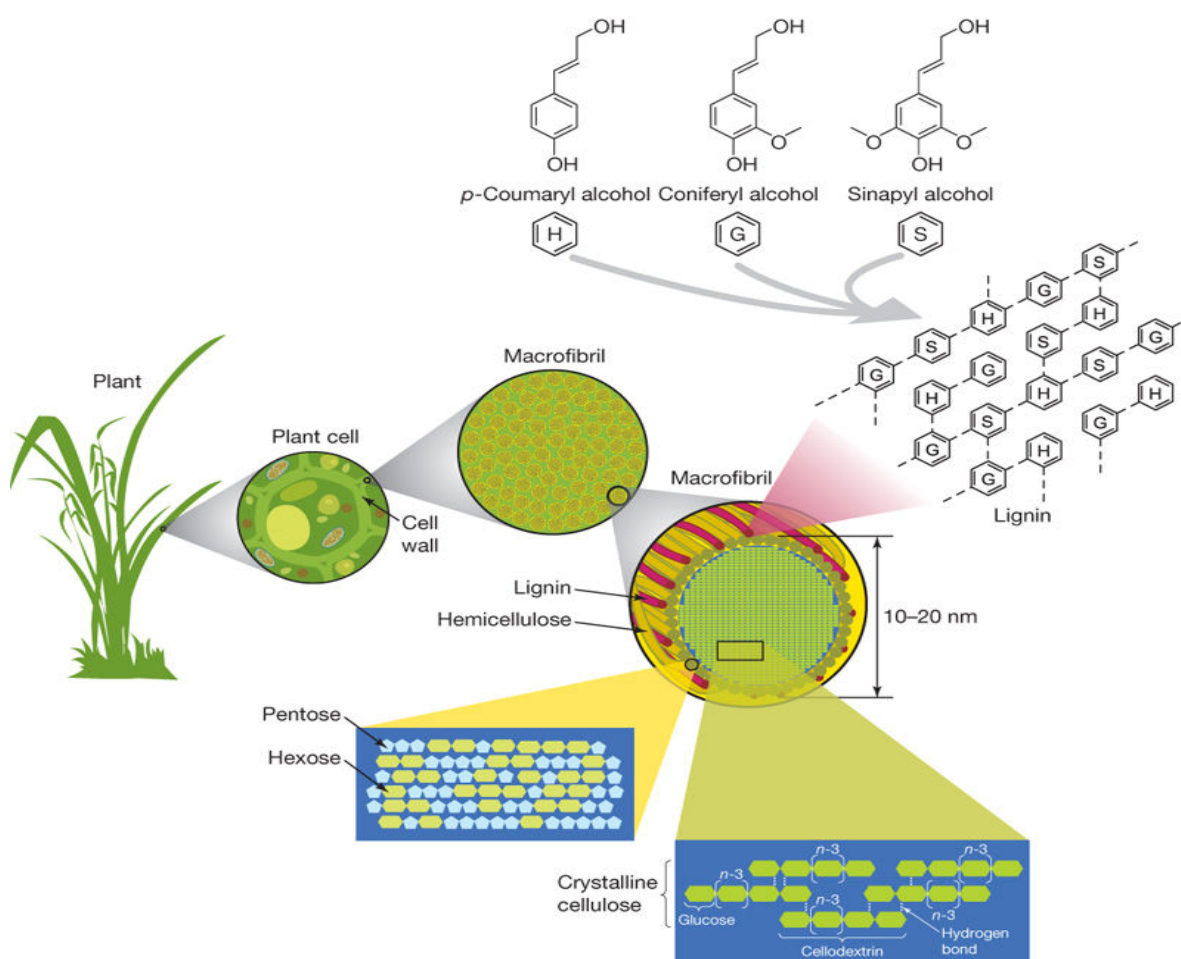


Figura 1.10. Estructura y disposición de la celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared celular secundaria (Rubin, 2008).

Las uniones y la fuerte asociación entre los distintos componentes son importantes para estabilizar la estructura de la pared y las responsables de la recalcitrancia característica del material lignocelulósico. Por un lado, la celulosa se une a la hemicelulosa mediante puentes de hidrógeno (Fengel y Wegener, 1989), mientras que las cadenas de hemicelulosa se pueden unir a zonas menos polimerizadas de la lignina mediante enlaces éster y éter. Como se mencionó anteriormente, las uniones lignina-hemicelulosa se realizan mediante intermediarios cinamílicos como el ácido ferúlico, diferúlico y ρ -cumárico, que enlazan con sustituciones monoméricas de la cadena de xilano. (Lam y col., 2001; Sun y col., 2005a). En el caso de un material herbáceo como la paja de trigo, estos enlaces entre la lignina y la hemicelulosa se producen, como se muestra en la figura 1.6, a través de los residuos de arabinosa o ácido glucurónico de la cadena de xilano.

1.3 Producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica se basa en la obtención de azúcares fermentables a partir de los polisacáridos que componen los tejidos vegetales. Generalmente se han estudiado dos métodos o vías para conseguir la hidrólisis completa de los carbohidratos: la **hidrólisis ácida**, que utiliza catalizadores ácidos, y la **hidrólisis enzimática** (HE), que se realiza mediante catalizadores enzimáticos. En los procesos basados en hidrólisis ácida se pueden utilizar distintos catalizadores ácidos (sulfúrico, clorhídrico, etc.) concentrados o diluidos. Aunque es un proceso rápido y efectivo, la vía ácida presenta importantes desventajas. La utilización de ácidos concentrados requiere una gran cantidad de catalizadores, cuyo coste de recuperación es alto, y una etapa de neutralización previa a la fermentación. Además, puede provocar corrosión en los reactores. En el caso de los ácidos diluidos las cantidades utilizadas son menores, pero se requieren temperaturas relativamente altas, lo que provoca una mayor corrosión de los equipos y mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos (Galbe y Zacchi, 2002; Olsson y col., 2005).

Aunque la utilización de catalizadores ácidos puede ser interesante en determinados procesos, la vía enzimática se considera, desde un punto de vista tecnológico y económico, la opción más prometedora para la producción de etanol de

lignocelulosa. La aplicación de enzimas incluye varias ventajas: son específicas del sustrato, no producen compuestos inhibidores, requieren condiciones suaves de pH y temperatura y permiten obtener elevados rendimientos de hidrólisis. El proceso de producción de etanol basado en la HE consta generalmente de las siguientes etapas: pretratamiento, producción de enzimas, HE, fermentación y destilación (figura 1.11), que serán detalladas a lo largo de este apartado. Estas etapas pueden realizarse mediante distintas configuraciones de proceso y niveles de integración para mejorar los rendimientos globales, como se explicará en el apartado 1.4.

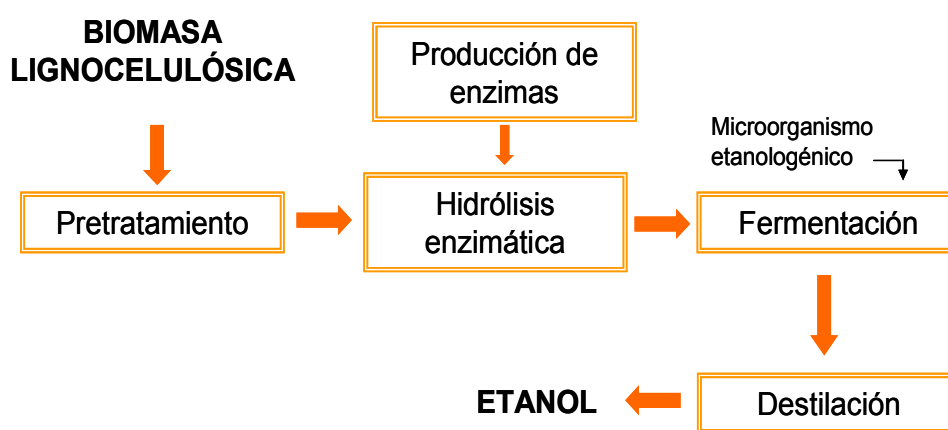


Figura 1.11. Esquema del proceso de producción de etanol de lignocelulosa mediante hidrólisis enzimática.

1.3.1 Pretratamiento

En el proceso de producción de etanol vía enzimática la resistencia a la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica hace necesaria una etapa previa o pretratamiento, cuyo objetivo fundamental es alterar la estructura de la lignocelulosa y aumentar su digestibilidad en la etapa de HE (figura 1.12). La efectividad del pretratamiento de la materia prima determina la eficiencia global del proceso de producción de etanol, por lo que el desarrollo de tecnologías eficaces tiene gran potencial para mejorar la productividad y los costes del proceso (Mosier y col., 2005). Además, el pretratamiento de la biomasa representa una de las etapas más costosas. Lynd estimó el coste del pretratamiento en aproximadamente un tercio del coste total de la producción de etanol (1996), mientras que Mosier y col. lo identificaron como el

segundo factor económicamente más relevante tras el coste de la materia prima (2005).

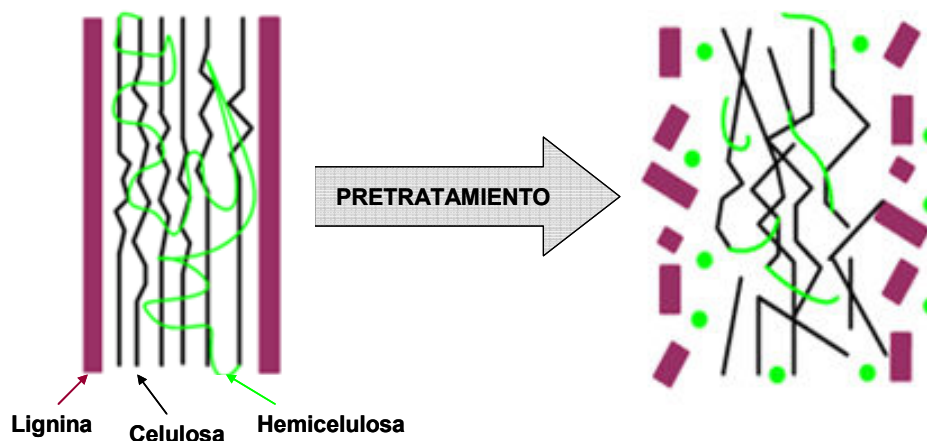


Figura 1.12. Mecanismo de acción del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Se han estudiado distintos tipos de pretratamiento que comparten como objetivo el aumento de la accesibilidad de las enzimas a las fibras de celulosa y hemicelulosa. Las condiciones óptimas de pretratamiento varían para los distintos tipos de biomasa debido a las diferencias tanto en su composición como en la disposición de sus componentes en la pared celular (Mosier y col., 2005). En general, se han descrito una serie de factores o requisitos a tener en cuenta en el desarrollo y selección de pretratamientos adecuados (Yang y Wyman, 2008):

- Versatilidad del pretratamiento para utilizar distintos tipos de biomásas.
- Alta digestibilidad del sólido pretratado, especialmente de las fibras de celulosa (cristalinidad, área superficial accesible (ASA), grado de polimerización...).
- Mínima degradación de azúcares procedentes tanto de la celulosa como de la hemicelulosa.
- Mínima producción de compuestos tóxicos durante el pretratamiento.
- La reducción del tamaño de partícula de la biomasa debe ser minimizada debido a su coste energético.
- El pretratamiento debe realizarse en reactores de bajo coste y de tamaño apropiado.

- Se debe evitar la formación de residuos sólidos derivados de los reactivos utilizados.
- El pretratamiento debe ser efectivo al utilizar material con baja humedad.
- Obtención de altas concentraciones de azúcares tras el pretratamiento y la HE.
- Compatibilidad del pretratamiento con la etapa de fermentación.
- Recuperación de la lignina, que puede posibilitar la obtención de productos con valor añadido.
- Requerimientos energéticos mínimos.

1.3.1.1 Tipos de pretratamiento

La gran variedad de materias primas lignocelulósicas y de sus características físico-químicas requiere pretratamientos idóneos para cada tipo de biomasa (Gírio y col., 2010; Yang y Wyman, 2008). Durante los últimos años, se han estudiado muchos pretratamientos con características muy distintas, que han sido típicamente clasificados, según su naturaleza, en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. El artículo I, incluido como anexo en esta Tesis, resume las principales tecnologías de pretratamiento aplicadas en la producción de etanol y los factores principales que influyen en ellos.

- Pretratamientos biológicos

La hemicelulosa y la lignina pueden actuar limitando el acceso de las enzimas celulolíticas a las fibras de celulosa. Los pretratamientos biológicos utilizan microorganismos para degradar la lignina y/o la hemicelulosa y, como consecuencia, aumentan la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Los microorganismos más utilizados son los hongos de podredumbre blanca, parda o blanda, que producen grandes cantidades de enzimas implicadas en la degradación de la lignocelulosa. La degradación de la lignina se produce a través de enzimas oxidativas como lacasas o peroxidasas, generalmente producidas por hongos de podredumbre blanca como *Phanerochaete* spp., *Pleurotus* spp. o *Cyathus* spp. La acción de enzimas hemicelulasas puede ser beneficiosa en un pretratamiento biológico, mientras que los hongos productores de enzimas celulolíticas consumen preferentemente la celulosa, por lo que no son apropiados para un pretratamiento biológico (Sánchez, 2009).

Las ventajas de los pretratamientos biológicos son su bajo coste de inversión y energético, el mínimo requerimiento de reactivos químicos y las suaves condiciones a las que se realiza el proceso. Como principal desventaja destaca que se trata de un proceso largo con el que se obtienen relativamente bajos rendimientos de HE (Sun y Cheng, 2002).

- Pretratamientos físicos

Los pretratamientos físicos se basan en la transformación del material mediante fuerzas de impacto y cizalla. El más utilizado es la **molienda**, que se basa en la reducción del tamaño de partícula de la biomasa para aumentar su área superficial, desestructurar las fibras y consecuentemente mejorar la etapa posterior de HE. El tamaño final de partícula varía entre 0,2 y 2 mm, pudiéndose utilizar distintos tipos de procesos de molienda: molino de bolas, de martillos, de rodillos, etc... (Tahezadeh y Karimi, 2008). Aunque el coste del proceso depende del tipo de biomasa y del tamaño final de partícula, en general, los requerimientos energéticos de la molienda son altos y dificultan la viabilidad económica del proceso (Hendriks y Zeeman, 2009).

La **extrusión** es un novedoso y prometedor pretratamiento físico, que también puede combinarse con la aplicación de reactivos químicos. En la extrusión, la biomasa se somete a un proceso combinado de calentamiento, mezclado y cizalladura que provoca modificaciones en la estructura de la lignocelulosa y finalmente consigue aumentar la accesibilidad de los carbohidratos a las enzimas (Karunanithy y col., 2008).

- Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos utilizan diferentes reactivos para modificar la estructura y composición de la biomasa lignocelulósica. Los principales agentes químicos utilizados son ozono, ácidos, álcalis, líquidos iónicos, compuestos oxidantes y solventes orgánicos.

El **pretratamiento con ácido diluido** es el pretratamiento químico más ampliamente utilizado. Se basa principalmente en la solubilización de la hemicelulosa para mejorar la accesibilidad de la celulosa. Se ha estudiado sobre un amplio rango de materias primas lignocelulósicas y se realiza generalmente durante períodos cortos a altas temperaturas, o bien durante períodos largos a menores temperaturas. Uno de

los inconvenientes de este pretratamiento es la producción de compuestos tóxicos procedentes de la degradación de los azúcares hemicelulósicos (Saha y col., 2005). Aunque los ácidos sulfúrico y clorhídrico han sido los reactivos más utilizados, otros ácidos orgánicos como el maleico o el fumárico han sido también estudiados (Kootstra y col., 2009).

El efecto de reactivos alcalinos en la biomasa lignocelulósica es el fundamento de los **pretratamientos básicos**. A diferencia de los pretratamientos ácidos, el pretratamiento básico aumenta la digestibilidad de la celulosa mediante la solubilización de la lignina y apenas afecta la fracción hemicelulósica (Carvalho y col., 2008). Este tipo de pretratamiento se puede realizar a temperatura ambiente, pero en ese caso el tiempo de proceso aumenta respecto a otros pretratamientos. Aunque pueden producirse compuestos de degradación, se ha descrito que los reactivos básicos causan menor degradación de azúcares que los ácidos (Kumar y col., 2009). Este tipo de pretratamientos se ha mostrado más efectivo sobre materiales herbáceos que sobre maderas. Los hidróxidos de sodio, calcio, potasio y amónico son los compuestos alcalinos más utilizados (Kumar y col., 2009).

El pretratamiento con **organosolventes** utiliza disolventes orgánicos como el metanol, etanol, acetona o etilenglicol para solubilizar la lignina y mejorar la HE de la celulosa. La principal ventaja respecto a otros pretratamientos químicos es la recuperación de lignina relativamente pura como subproducto (Zhao y col., 2009). Los mayores inconvenientes del pretratamiento con organosolventes son el alto coste de los reactivos orgánicos y la necesidad de recuperarlos y reciclarlos para no inhibir las etapas de HE y fermentación (Sun y Cheng, 2002). Otro pretratamiento basado en la deslignificación es la **ozonólisis** que se basa en el potente efecto oxidante del ozono para tratar la biomasa lignocelulósica (García-Cubero y col., 2009).

La aplicación de **líquidos iónicos** en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es una alternativa novedosa para mejorar la producción de etanol. Los líquidos iónicos son sales compuestas de cationes orgánicos grandes y aniones inorgánicos pequeños que se mantienen en estado líquido a bajas temperaturas. Las propiedades como solvente de los líquidos iónicos pueden ajustarse de tal forma que la lignina y los carbohidratos pueden ser solubilizados simultáneamente. Además, presenta la ventaja de no producir compuestos tóxicos (Yang y Wyman, 2008).

- Pretratamientos físico-químicos

Los pretratamientos físico-químicos han sido ampliamente utilizados en la producción de etanol de lignocelulosa. Entre todos ellos destacan el pretratamiento por explosión por vapor (EV), el pretratamiento con agua caliente en fase líquida, la explosión por vapor con amoníaco (AFEX, “ammonia fiber explosion/expansion”) y la oxidación húmeda. El **pretratamiento por EV** se ha mostrado muy efectivo con distintas materias primas, por lo que en esta Tesis doctoral se ha utilizado como pretratamiento de la paja de trigo. Las características de este pretratamiento serán discutidas con mayor detalle a continuación, en el apartado 1.3.1.2.

El **pretratamiento con agua caliente en fase líquida** consiste en someter a la biomasa a la acción del agua caliente en un reactor presurizado durante un período determinado de tiempo. El agua sometida a presión se mantiene en estado líquido a temperaturas entre 160 y 240 °C, penetra en la biomasa y altera su estructura. Con este pretratamiento, que se puede realizar también en dos fases y no requiere catalizador, se recupera una alta proporción de los azúcares hemicelulósicos y se generan concentraciones bajas de productos de degradación (Hendriks y Zeeman, 2009; Pérez y col., 2007).

En el pretratamiento **AFEX** la biomasa se trata con amoníaco (NH_3) a temperaturas entre 60 y 100 °C y alta presión durante un período variable de tiempo. Análogamente al pretratamiento por EV, una vez transcurrido el tiempo de proceso se produce una rápida descompresión en el reactor que provoca la expansión del gas amoníaco y la desestructuración física del material lignocelulósico. Se ha observado que durante el pretratamiento AFEX se rompen enlaces lignina-carbohidratos, se reduce la cristalinidad de la celulosa y se produce poca cantidad de compuestos inhibidores (Laureano-Pérez y col., 2005). En cambio, apenas se solubiliza la lignina y la hemicelulosa, por lo que la aplicación de enzimas hemicelulasas puede ser necesaria en la etapa de HE. Este pretratamiento se ha mostrado eficaz para materiales herbáceos, sin embargo muestra una efectividad limitada sobre biomásas con alto contenido en lignina, como las maderas blandas (Teymouri y col., 2005). Otra posibilidad de pretratamiento con amonio es la percolación reciclada de amoníaco (ARP), que utiliza amoníaco acuoso a través de un reactor tipo flujo y permite reciclar el amoníaco (Kim y col., 2008).

La **oxidación húmeda** es un pretratamiento físico-químico en el que se utiliza oxígeno o aire como catalizadores. La biomasa se somete a la acción del agua a elevadas temperaturas en presencia de oxígeno o aire añadido como sobrepresión en el reactor. También se puede combinar con la adición de compuestos alcalinos para aumentar la solubilización de la lignina. En general, la oxidación húmeda se ha mostrado como un pretratamiento efectivo para solubilizar la hemicelulosa y la lignina en una única etapa y no produce una gran cantidad de inhibidores. El coste de los catalizadores representa la principal desventaja del proceso (Palonen y col., 2004).

En la tabla 1.2 se resumen las tecnologías de pretratamiento de biomasa lignocelulósica más utilizadas con sus principales ventajas y desventajas.

Tabla 1.2. Resumen de las ventajas y desventajas principales de los pretratamientos más utilizados en la producción de bioetanol a partir de lignocelulosa.

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Biológico	-Degrada lignina y hemicelulosa -Bajo coste energético	-Baja tasa de HE
Molienda	-Aumenta ASA y disminuye cristalinidad de la celulosa	-Alto consumo energético
Ácido diluido	-Solubilización de hemicelulosa	-Generación de tóxicos a altas temperaturas
Organosolventes	-Solubilización de lignina y hemicelulosa	-Alto coste de los solventes y/o necesidad de reciclado
Explosión por vapor	-Solubilización de la hemicelulosa y transformación de la lignina -Relativo bajo coste	-Parcial degradación de la hemicelulosa y generación de tóxicos
AFEX	-Aumento ASA -Baja formación de tóxicos	-No efectivo para biomásas con alto contenido en lignina -Alto coste del amoníaco
Oxidación húmeda	-Retira la lignina -Baja formación de tóxicos -Bajo coste energético (reacción exotérmica)	-Alto coste de los catalizadores

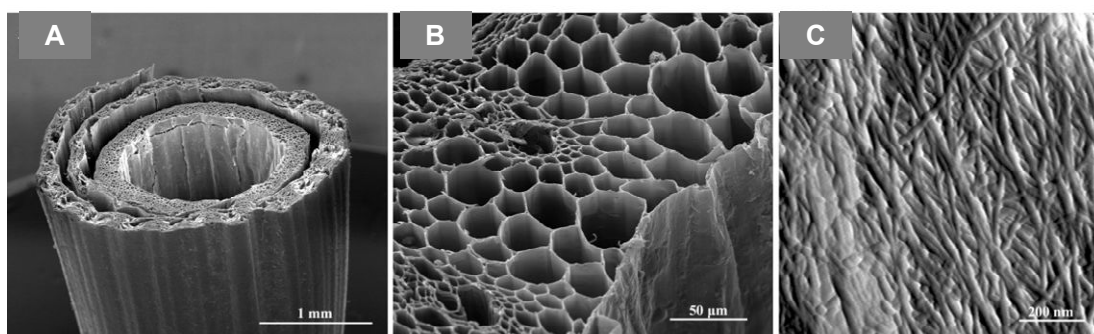
1.3.1.2 Pretratamiento por explosión por vapor (EV)

El **pretratamiento por EV** es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa se somete a la acción de vapor saturado a alta presión durante un tiempo de residencia variable, tras el que se produce una brusca descompresión en el reactor (Brownell y Saddler, 1984). Por las características del pretratamiento y de la biomasa lignocelulósica la EV combina efectos mecánicos y químicos. Por un lado, la rápida

despresurización provoca la súbita evaporación del agua interfibrilar, creando fuerzas de cizalla que separan las fibras físicamente, especialmente las zonas de celulosa amorfa. El efecto químico se debe a la hidrólisis de los grupos acetilo que forman parte, en proporción variable, de la hemicelulosa de la biomasa lignocelulósica. Al hidrolizarse como consecuencia del pretratamiento, los grupos acetilo forman ácido acético, que disminuye ligeramente el pH ejerciendo un efecto de autohidrólisis de la hemicelulosa. La lignina apenas se solubiliza durante el pretratamiento por EV, sin embargo se produce cierta redistribución de los polímeros que ha sido descrita, junto con la solubilización de la hemicelulosa, como los factores más importantes en el aumento de la digestibilidad de las fibras (Hsu, 1996; Kristensen y col., 2008).

En la figura 1.13 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía de fuerza atómica (AMF) de paja de trigo sin tratar y tras ser pretratada por EV.

Paja de trigo sin tratar:



Paja de trigo pretratada por EV:

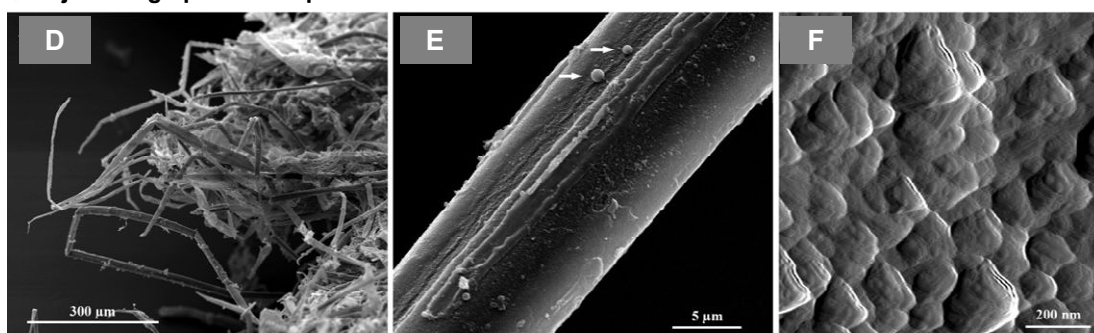


Figura 1.13. Imágenes de MEB (A, B, D y E) y AMF (C y F) de paja de trigo sin tratar (A, B y C) y pretratada por EV (D, E y F). La figura A muestra la paja de trigo sin tratar. A mayor aumento (B) se identifican las células individuales de la pared celular. En la figura C se intuyen las fibras de celulosa parcialmente recubiertas por polímeros no celulósicos. Como consecuencia del pretratamiento por EV, las fibras se separan y desordenan (D). En la figura E se muestra una fibra individual con depósitos de polímeros de la pared celular y en la figura F se observan los depósitos globulares característicos de la lignina que ocultan las microfibrillas de celulosa (Kristensen y col., 2008).

El pretratamiento por EV ha sido ampliamente utilizado para varios tipos de materias primas como paja de trigo (Ballesteros y col., 2006), paja de cebada (García-Aparicio y col., 2007), bagazo de maíz (Öhgren y col., 2006a-b), ramón de olivo (Cara y col., 2007) y chopo (Oliva y col., 2003). Este pretratamiento se ha mostrado menos efectivo sobre maderas blandas, ya que contienen más lignina y menos grupos acetilo, lo que disminuye el efecto de autohidrólisis. En estos casos la adición de un catalizador ácido suele ser adecuada para complementar el pretratamiento por EV (Galbe y Zacchi, 2002).

Los factores más influyentes en la efectividad del pretratamiento por EV son el tamaño de partícula de la materia prima, la temperatura y el tiempo de residencia. La combinación de estos factores determina la severidad del pretratamiento y, consecuentemente, las características del material pretratado obtenido. En general, condiciones más severas de pretratamiento aumentan la digestibilidad del sustrato pretratado, mientras que una menor severidad minimiza la degradación de azúcares y la formación de tóxicos.

Las principales ventajas del pretratamiento por EV son la posibilidad de emplear tamaños de partícula relativamente grandes, la no necesaria adición de catalizadores ácidos, la alta recuperación de azúcares, el aumento de la digestibilidad del sustrato pretratado, y su viabilidad para ser desarrollado a gran escala. Entre sus desventajas destacan la degradación parcial de azúcares hemicelulósicos y por consiguiente, la acumulación de compuestos potencialmente inhibidores de las etapas de HE y fermentación.

1.3.1.3 Compuestos tóxicos generados en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica

Las severas condiciones a las que se realizan los pretratamientos de las materias primas lignocelulósicas pueden provocar la degradación de la lignina y de azúcares, celulósicos y/o hemicelulósicos, formándose compuestos tóxicos o inhibidores que tienen un efecto negativo en las etapas posteriores de HE y fermentación (Cantarella y col., 2004; García-Aparicio y col., 2006; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b). En la figura 1.14 se muestra un esquema de la formación de compuestos de degradación. La gran influencia que estos productos pueden tener en el proceso global de la producción de etanol hace que sean considerados un factor fundamental en la selección del pretratamiento.

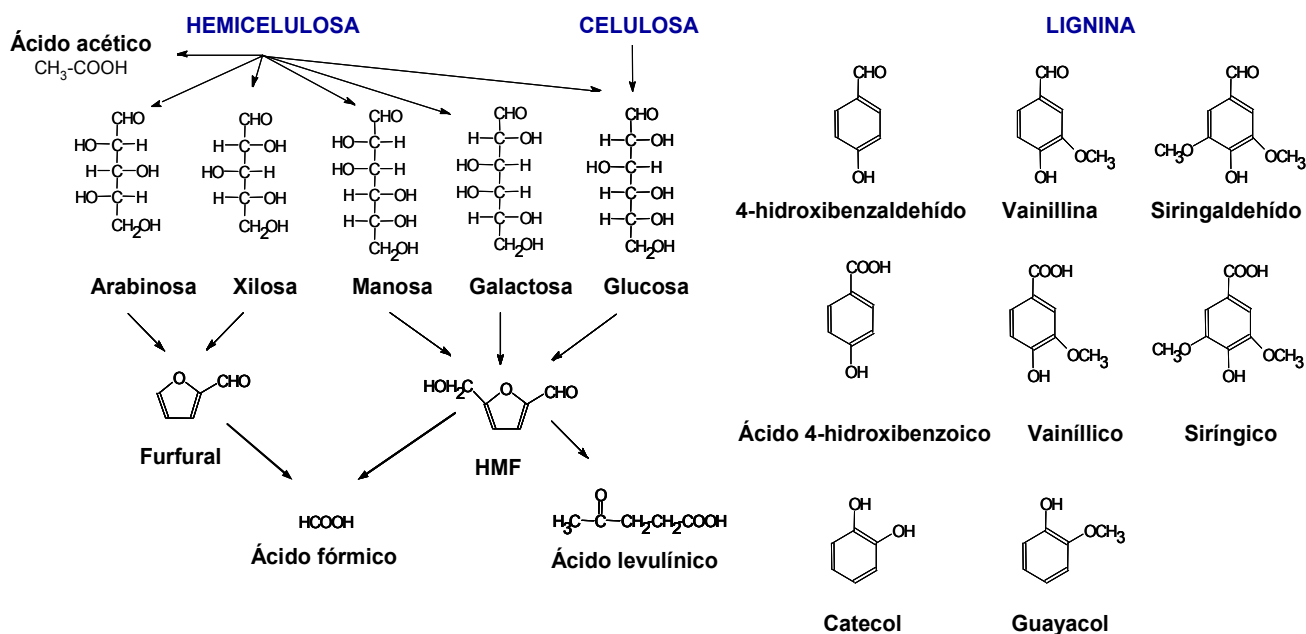


Figura 1.14. Principales productos de degradación originados durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica.

La naturaleza y concentración de los compuestos de degradación dependen de la materia prima, del tipo de pretratamiento y de las condiciones del mismo. En cuanto a su origen, estos compuestos se pueden dividir en tres grupos: derivados furánicos, ácidos alifáticos y derivados fenólicos. Los principales **derivados furánicos** son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), que proceden de la degradación de las pentosas y las hexosas, respectivamente. Aunque la mayoría de los microorganismos fermentadores son capaces de metabolizar los furanos y reducir su toxicidad, altas concentraciones de estos compuestos pueden aumentar la fase de latencia del microorganismo y disminuir la productividad del proceso de producción de etanol (Klinke y col., 2004; Oliva y col., 2003).

Los **ácidos alifáticos** generados durante el pretratamiento son principalmente el ácido acético, procedente de los grupos acetilo de la hemicelulosa, y el ácido fórmico, que se produce por la degradación del furfural y el HMF. El HMF también puede transformarse en ácido levulínico, presente generalmente en menores concentraciones. Estos ácidos débiles pueden atravesar en sus formas protonadas las membranas de los microorganismos y acidificar el citoplasma, causando daño celular (Almeida y col., 2007).

Como consecuencia de la solubilización parcial o degradación de la lignina durante el pretratamiento se generan una amplia variedad de **compuestos fenólicos**. En los materiales herbáceos los derivados fenólicos más abundantes son el 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, acetosiringona, ácido siríngico, ácido vainillico, guayacol, catecol, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cumárico y ácido ferúlico. Aunque estos compuestos suelen encontrarse en menores concentraciones pueden afectar a las enzimas y a la integridad de las membranas celulares de los microorganismos (Klinke y col., 2002; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a-b).

Para minimizar la gran influencia que los productos de degradación tienen en el proceso de producción de etanol se han estudiado varias alternativas. Por un lado, es importante la elección del pretratamiento y de las condiciones a las que se realiza, ya que influyen enormemente sobre la concentración final de este tipo de compuestos. En general, una reducción de la severidad de las condiciones disminuye la concentración de tóxicos. También se han estudiado distintos procesos o mecanismos de destoxificación, que pueden reducir significativamente la concentración de inhibidores. Los métodos físico-químicos incluyen la evaporación, que elimina compuestos volátiles, tratamientos con zeolitas o la adición de reactivos básicos, que aumentan el pH y provocan la precipitación de compuestos tóxicos solubles (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b). Otra posibilidad es la aplicación de enzimas con actividad ligninolítica, que pueden actuar sobre compuestos derivados de la lignina reduciendo su concentración en el medio (Jurado y col., 2009). Además de los métodos para eliminar los inhibidores, la aplicación de levaduras u otros microorganismos con elevada tolerancia a tóxicos o que hayan sido sometidos a procesos de adaptación puede resultar de gran interés para mejorar los rendimientos del proceso (Almeida y col., 2007; Tomás-Pejó y col., 2010).

1.3.2 Producción de enzimas

Tras el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica las enzimas catalizan reacciones de hidrólisis hasta la completa degradación de la celulosa y hemicelulosa en monosacáridos fermentables (Sun y Cheng., 2002). La producción de las enzimas implicadas en el proceso es una de las etapas que más influyen en el coste final del etanol.

1.3.2.1 Microorganismos productores de celulasas y hemicelulasas.

***Trichoderma reesei* RUTC30**

Un gran número de organismos en la naturaleza son capaces de producir enzimas celulolíticas como parte de su metabolismo. Entre ellos se distinguen hongos de podredumbre blanca, de podredumbre blanda y anaeróbicos; bacterias aeróbicas y anaeróbicas e incluso algunas especies de insectos. Entre los hongos, predominan los organismos aeróbicos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Schizophyllum*, *Monilia*, *Humicola*, etc., mientras que en bacterias se incluyen los géneros *Thermobifida*, *Erwinia*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Thermomonospora*, *Bacteriodes*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Acetovibrio*, *Actinomycetes*, *Microbispora*, *Bacillus* etc. Su actividad descomponiendo los componentes vegetales forma parte del ciclo del carbono, por lo que su función en la naturaleza es fundamental.

Algunos de estos organismos producen sistemas celulolíticos con propiedades interesantes desde el punto de vista de la producción de etanol. Las enzimas termoestables muestran ventajas en la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos debido a su mayor estabilidad y actividad específica, lo que disminuiría las cargas de enzimas. También pueden aportar una mayor flexibilidad en las configuraciones del proceso (Viikari y col., 2007). Entre las bacterias, algunos géneros como *Clostridium* sintetizan complejos enzimáticos extracelulares denominados celulosomas, con capacidad para degradar la celulosa y la hemicelulosa (Bayer y col., 2004).

No obstante, los organismos más utilizados para aplicaciones industriales han sido los hongos filamentosos, que son capaces de producir enzimas en grandes cantidades y extracelularmente, por lo que son más fácilmente recuperables del medio (Persson y col., 1991). Concretamente, el microorganismo más estudiado y aplicado para la producción industrial de enzimas celulolíticas es el hongo de podredumbre blanda de la familia ascomicetos *Trichoderma reesei* (forma anamorfa de *Hypocrea jecorina*), que fue descubierto durante la Segunda Guerra Mundial tras observar la degradación que producía sobre los materiales textiles. *T. reesei* secreta enzimas extracelularmente con altas tasas de producción.

Tras años de estudio e investigación en desarrollo de cepas, la Universidad de Rutgers aisló una cepa mutante hipercelulolítica, identificada como *T. reesei* RUTC30,

ampliamente utilizada desde entonces (Persson y col., 1991). Normalmente, el sistema celulolítico de *Trichoderma* está sujeto a represión por catabolito, es decir, cuando el medio contiene fuentes de carbono fácilmente metabolizables, como glucosa, la expresión de genes necesarios para la utilización de otras fuentes de carbono, como la celulosa, está reprimida. *T. reesei* RUTC30 es una cepa mutante *cre1*, que carece de este sistema de represión y por lo tanto la presencia de monosacáridos no reprime la producción de enzimas celulolíticas (Ilmén y col., 1996; Montenecourt y Eveleigh, 1979).

La utilización de *T. reesei* RUTC30 también presenta ciertos inconvenientes, ya que la actividad específica de las enzimas es relativamente baja y la proporción en el cóctel de β -glucosidasa es inferior a la óptima. Además, las enzimas se producen en una fase tardía de la fermentación y el control del pH a lo largo del proceso resulta crítico (Wyman, 1996).

Actualmente, la mayor parte de las preparaciones celulolíticas comercializadas proceden de fermentaciones con *T. reesei*. Sin embargo, continúan múltiples líneas de investigación para mejorar la producción enzimática, como la aplicación de medios de cultivo de bajo coste, el desarrollo de mutantes hiperproductores y la manipulación genética de las cepas (proteasa-deficientes, producción heteróloga, etc...). Otras investigaciones más novedosas, como la búsqueda de nuevos microorganismos productores mediante metagenómica aportan resultados prometedores (Jacobsen y col., 2005; Kuznetsova y col., 2005). Estas investigaciones no sólo persiguen el aumento de la producción de enzimas, sino también la obtención de mezclas equilibradas de los componentes celulolíticos, mayor tolerancia a tóxicos, termoestabilidad y eficacia hidrolítica mejorada sobre sustratos lignocelulósicos pretratados.

1.3.2.2 Enzimas de *Trichoderma reesei*

T. reesei es capaz de secretar diferentes enzimas celulolíticas incluyendo al menos cinco endoglucanasas (EG), dos celobiohidrolasas (CBH), dos β -glucosidasas, xilanasas, una β -xilosidasa, tres arabinofuranosidasas y otras glicosil hidrolasas posiblemente implicadas en la degradación de la lignocelulosa (Foreman y col., 2003; Martínez y col., 2008; Nagendran y col., 2009). También se han detectado otros tipos de actividad no celulolítica como las “swolleninas”, que podrían actuar alterando la

estructura de la celulosa (Saloheimo y col., 2002). La enzima β -glucosidasa queda unida al micelio del hongo, y por tanto es difícilmente recuperable durante la producción enzimática industrial. Por este motivo, en la mayoría de estudios de HE con materiales celulósicos la actividad β -glucosidasa se suplementa al cóctel producido por *T. reesei*. Del total de proteína secretada por el hongo, alrededor del 50-60% es CBH I y alrededor de un 25% corresponde a CBH II, por lo que la actividad celobiohidrolasa representa la actividad principal del cóctel secretado por *T. reesei*. Alrededor de un 15% corresponde a actividad endoglucanasa (Penttilä y col., 1991).

1.3.2.3 Condiciones de cultivo

La composición del medio de cultivo y las condiciones en las que se lleva a cabo la fermentación tienen una gran influencia en la producción enzimática, por lo que su optimización tiene gran potencial para mejorar el proceso de producción de enzimas (Domingues y col., 2000; Tanguy y col., 1981). La cantidad y el tipo de fuente de carbono utilizada, el pH, la agitación, las condiciones de luz y oscuridad, la morfología del hongo o la inducción del metabolismo son algunos de los factores que influyen en la producción de enzimas (Domingues y col., 2000; Gyalai-Korpos y col., 2010).

- Inducción de la producción de enzimas

Hongos como *T. reesei* son capaces de producir constitutivamente cierta cantidad de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas. La acción de estas enzimas genera productos de hidrólisis que, ante la ausencia de azúcares simples, inducen y aumentan la expresión y producción enzimática, que a su vez puede ser frenada mediante represión por catabolito (Suto y Tomita, 2001). Aunque el mecanismo natural de inducción no ha sido totalmente definido hasta el momento, se han estudiado diferentes compuestos que podrían ser aplicables para aumentar la producción enzimática con *T. reesei* RUTC30, que carece de represión por catabolito. Además de la propia celulosa, xilooligosacáridos, disacáridos como celobiosa, sofrosa y lactosa o monosacáridos como sorbosa y xilosa se han descrito como posibles inductores de la expresión de celulasas, xilanasas y demás enzimas glicosil hidrolasas (Mohagheghi y col., 1988; Nogawa y col., 2001; Sternberg y Mandels, 1979; Warzywoda y col., 1992).

Aunque habitualmente el almidón y sus derivados no se reconocen por su efecto inductor también han sido estudiados en la producción de celulasas (Chen y Wayman, 1992). Durante la hidrólisis ácida o enzimática del almidón se pueden formar compuestos como la soforosa, que tienen un efecto inductor en la producción de enzimas. También se ha observado el efecto positivo del almidón nativo cuando se añade en el medio de cultivo junto a fuentes de carbono celulósicas (Wayman y Chen, 1992).

- Fuentes de carbono para la producción de enzimas

Los hongos productores de enzimas requieren una fuente de carbono para su crecimiento y metabolismo. La producción de exoenzimas permite la hidrólisis de sustratos externos cuyos productos solubles pueden ser absorbidos por el hongo. Como se ha mencionado, los sistemas celulolíticos de la mayoría de las cepas de *Trichoderma* están reprimidos por catabolito, lo que implica que la presencia en el medio de azúcares fácilmente metabolizables como glucosa o xilosa, reprime la expresión de genes necesarios para la utilización de fuentes de carbono alternativas. La cepa RUTC30, así como otras cepas hiperproductoras, no presentan represión por catabolito, por lo que produce enzimas en presencia de glucosa (Bhat y Bhat, 1997).

Se han estudiado una gran variedad de fuentes de carbono para la producción enzimática. Entre ellas, la celulosa comercial purificada (Solka Floc, Avicel) ha sido descrita en muchos trabajos como un buen inductor de la producción de enzimas (Hayward y col., 2000; Olsson y col., 2003). Sin embargo, la aplicación como fuente de carbono en un proceso a gran escala de celulosa purificada o de sustratos solubles, como lactosa o soforosa, sería poco viable económicamente.

Los materiales lignocelulósicos, como los residuos forestales y agrícolas, son abundantes y contienen alta proporción de carbohidratos, por lo que son una alternativa de bajo coste como fuente de carbono en la producción a gran escala de enzimas celulolíticas (Jorgensen y Olsson, 2006; Juhász y col., 2005b; Olsson y col., 2003). Además, la materia prima lignocelulósica también es el sustrato del proceso de producción de etanol, por lo que la producción enzimática a partir de la misma materia prima es una posibilidad interesante para ser integrada en el proceso de producción de etanol. Inicialmente, el material lignocelulósico necesita ser pretratado para aumentar la accesibilidad de las fibras al ataque enzimático. Parte de este material pretratado podría desviarse como fuente de carbono para la producción de

enzimas (Jorgensen y Olsson, 2006). Además, se ha observado que el cultivo del hongo sobre el mismo sustrato utilizado en el proceso de producción de etanol induce una determinada proporción de actividades enzimáticas más adecuada para la hidrólisis de ese mismo sustrato (Juhász y col., 2005b).

Otra posibilidad interesante es la utilización de la fracción líquida o prehidrolizado obtenido tras pretratamientos como la EV como medio de cultivo para la producción de enzimas. El prehidrolizado contiene cierta cantidad de azúcares procedentes de la solubilización de la hemicelulosa durante el pretratamiento que podrían ser utilizados por *T. reesei* u otros organismos como fuente de carbono (Lo y col., 2005).

En esta Tesis se han estudiado distintas posibilidades para aplicar la paja de trigo pretratada por EV como fuente de carbono para la producción enzimática con *T. reesei* RUTC30.

Por otro lado, la separación de las enzimas del medio de cultivo puede suponer costes adicionales que afecten la economía del proceso de producción de etanol. La utilización del cultivo completo tras la fermentación con *T. reesei* en los procesos de HE y fermentación alcohólica es una posibilidad interesante para reducir los costes, ya que se eliminan las etapas de extracción de las enzimas. También puede aportar ventajas adicionales, evitando la pérdida de enzimas que permanecen unidas al micelio del hongo (fundamentalmente β -glucosidasa) y aumentando la presencia de nutrientes en el medio (Kovács y col., 2009b). Otra ventaja de reducir las etapas de extracción de las enzimas respecto a la utilización de enzimas comerciales es el efecto negativo observado en algunos casos de los conservantes y estabilizantes sobre el microorganismo fermentador (Golias y col., 2000; Szczodrac y Targonski, 1987; Tomás-Pejó y col., 2009a).

Existen múltiples ejemplos de aplicación de materiales lignocelulósicos como fuente de carbono en fermentaciones para producción de enzimas. Juhász y col. utilizaron sauce, píceas y bagazo de maíz pretratados por EV, alcanzándose con bagazo de maíz los mejores resultados (1,2 UPF/ml), y mejorando incluso los obtenidos con celulosa purificada Solka Floc (1,1 UPF/ml) (2005b). Szengyel y col. utilizaron chopo pretratado, obteniendo actividades de 0,8 UPF/ml y 0,2 UI/ml de β -glucosidasa (2000). También se ha estudiado la paja de trigo pretratada mediante oxidación húmeda como fuente de carbono en la producción de enzimas utilizando

diferentes hongos, obteniéndose la actividad más alta con la cepa *Penicillium brasilianum* (1,34 UPF/ml) (Thygesen y col., 2003). Kovács y col. obtuvieron con paja de trigo pretratada por EV 0,36 UPF/g y 70 UI endoglucanasa/g con la cepa *Trichoderma atroviride* TUB F-1663 (2009a). Entre la gran variedad de estudios de producción enzimática existen diferencias en los métodos de determinación enzimática empleados, así como en las condiciones de cultivo y la concentración de sustrato utilizados, por lo que la comparación de los resultados disponibles en la bibliografía es complicada. En general, las posibilidades de materias primas aplicables como fuente de carbono, así como los pretratamientos empleados son muy diversas.

- Efecto de la composición del sustrato

La composición de la fuente de carbono utilizada por el microorganismo afecta significativamente a la producción de celulasas y hemicelulasas, ya que ciertos polisacáridos y monosacáridos inducen la expresión de unas u otras enzimas. De esta forma, la proporción de enzimas secretada por el hongo depende fuertemente de la fuente de carbono utilizada. Se ha observado que, por lo general, la presencia de xilano en el medio de cultivo aumenta la producción de enzimas xilanolíticas (Jorgensen y Olsson, 2006; Juhász y col., 2005b; Olsson y col., 2003; Sipos y col., 2009). Concretamente Sipos y col. mostraron que la producción de xilanasa es proporcional al contenido de xilano, no observando esta correlación en el caso de la β -xilosidasa. Kovács y col. sí detectaron una clara relación entre el contenido de xilano y la actividad tanto xilanasa como β -xilosidasa (2009a).

- Efecto de la concentración de sustrato

En general, el aumento en la concentración de la fuente de carbono conlleva un aumento la actividad enzimática obtenida. En cultivos de *T. reesei* se ha mostrado un aumento proporcional de la actividad celulasa y endoglucanasa hasta los 40-50 g/l de sustrato (Deshpande y col., 2008; Hendy y col., 1984; Olsson y col., 2003; Wyman, 1996), aunque en algunos trabajos se ha observado una disminución de los rendimientos en base a gramo de sustrato al aumentar la concentración (Juhász, 2005), posiblemente debido a problemas de aireación, mezclado y formación de espumas. Para aumentar la producción enzimática y reducir estos problemas se puede optar por un sistema de adición de sustrato por pulsos (“fed-batch”), ya que mejora el mezclado, reduce los costes de aireación y agitación y se consiguen rendimientos actividad/g sustrato más altos (Wyman, 1996). Por lo general, la

concentración óptima de sustrato varía entre 20-50 g/l dependiendo de la fuente de carbono y las cepas utilizadas (Liming y Xueliang, 2004).

- Efecto del pH

El pH del medio afecta significativamente el crecimiento y la producción enzimática en cultivos de *T. reesei*, por lo que es necesario el control del pH a lo largo de la fermentación. El pH óptimo para la producción enzimática con *T. reesei* RUTC30 se sitúa en torno a 5,6-6 (Tangnu y col., 1981). Juhász y col. no observaron diferencias en la producción de celulasas en un rango de pH entre 4 y 6; sin embargo la producción de β -glucosidasa extracelular aumentó cuando el pH se acercó a 5,8-6 (Juhász y col., 2004).

Juhász y col. observaron el efecto positivo de controlar el pH utilizando tampón Tris-maleato, el cual ha sido utilizado en este trabajo en las fermentaciones para producción de enzimas. Mostraron también que concentraciones crecientes de este tampón alargaron la fase de latencia del microorganismo, aunque las producciones enzimáticas finales no fueron afectadas. Además se detectó mayor producción de β -glucosidasa respecto a otros métodos de control de pH, lo que indicaría la inducción por parte de algún componente del propio tampón (Juhász y col., 2005a).

- Efecto de la temperatura

Trichoderma spp. así como otros géneros de hongos celulolíticos son organismos mesofílicos, por lo que las fermentaciones para producción de celulasas se realizan generalmente a una temperatura entre 28 y 32 °C. (Juhász y col., 2005a; Sipos y col., 2009; Thygesen y col., 2003).

1.3.3 Hidrólisis enzimática

En el proceso de producción de etanol lignocelulósico, tras el pretratamiento de la biomasa la celulosa y la hemicelulosa se hidrolizan en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas catalíticas. En esta etapa influyen muchos factores como el tipo de sustrato y su concentración en el medio, la composición y dosis del sistema enzimático, y las condiciones del proceso (temperatura, tiempo de reacción, pH...). En general, la recalcitrancia característica de la lignocelulosa a la hidrólisis

hace que esta etapa, junto con la propia producción de las enzimas, se considere uno de los pasos limitantes en la producción de etanol. Algunos estudios han llegado a señalar el coste de las enzimas como el mayor obstáculo para la comercialización del etanol de lignocelulosa (Cherry y Fidantsef, 2003; Galbe y Zacchi, 2002).

Para mejorar la eficiencia de la HE de materiales lignocelulósicos se han llevado a cabo distintas estrategias, que se pueden agrupar en dos categorías. Por un lado, se investiga en la mejora de la producción de las enzimas, reduciendo sus costes mediante la mejora de cepas y la aplicación de medios de cultivo y sustratos alternativos. Por otro lado, resulta de crucial interés la mejora de los complejos enzimáticos en cuanto a su composición, posibilidad de reciclaje, versatilidad, actividad específica, estabilidad, compatibilidad con la etapa de fermentación, etc. El objetivo final es disminuir los costes de la HE, reduciendo las dosis enzimáticas y optimizando los rendimientos (Himmel y col., 2007; Merino y Cherry, 2007; Tu y col., 2007).

En este contexto, se han realizado en los últimos años importantes inversiones en I+D para promover el desarrollo de cócteles enzimáticos mejorados. Concretamente, el Dpto. de Energía de EEUU (DOE) financió en 2001 a las compañías productoras de enzimas “Genencor” y “Novozymes” con 17 y 15 millones de dólares, respectivamente, con la previsión de reducir el coste de las enzimas para la producción de etanol a partir de bagazo de maíz entre 20 y 30 veces. En 2008 el mismo organismo refinanció a varias compañías con 33,8 millones de dólares para continuar los esfuerzos en la mejora de enzimas (Banerjee y col., 2010).

A pesar de las características mejoradas de los cócteles enzimáticos recientemente comercializados por compañías como “Genencor” o “Novozymes”, la etapa de HE continúa siendo un factor clave en la viabilidad económica de la producción de etanol de lignocelulosa. Como se comentó en el apartado anterior, *T. reesei* es el organismo más utilizado industrialmente en la producción de enzimas. Este hongo expresa gran variedad de enzimas hidrolíticas, incluyendo las actividades principales implicadas en la hidrólisis de la celulosa. Sin embargo, también expresa otras actividades en muy bajo nivel, cuyo efecto sobre la HE es difícil de evaluar. La estructura compleja de la lignocelulosa y la diversidad de pretratamientos utilizados requiere cócteles con composiciones enzimáticas específicas y equilibradas, por lo que evaluar la efectividad de algunas de las actividades no expresadas o expresadas en un nivel bajo por *T. reesei* tiene gran potencial para mejorar la HE.

La aplicación de distintas enzimas accesorias a las celulasas en la HE de materiales lignocelulósicos permitiría la obtención de cócteles optimizados para cada tipo de biomasa y pretratamiento (Banerjee y col., 2010). Mientras que las actividades principales para la degradación de la celulosa son bien conocidas, otras actividades como xilanasas, xilosidasas, arabinofuranosidasas, esterases o lacasas ofrecen la posibilidad de atacar enlaces específicos de la estructura lignocelulósica y mejorar la eficacia del proceso (Berlin y col., 2007). Otra ventaja de suplementar los cócteles enzimáticos con actividades específicas es la posibilidad de reducir la severidad de los pretratamientos, lo que se considera un factor importante para disminuir su coste energético.

Para la obtención de cócteles mejorados se han planteado distintas estrategias. La producción de las enzimas accesorias se puede realizar seleccionando secuencias conocidas y expresándolas en levaduras o plantas, o bien buscando nuevas secuencias que puedan codificar enzimas con características mejoradas. Una vez seleccionadas, estas enzimas accesorias pueden suplementarse a la mezcla de actividades principales para estudiar posibles mejoras en la degradación de los carbohidratos (Merino y Cherry, 2007; Wilson, 2009). Para evaluar adecuadamente los cócteles enzimáticos y la suplementación con actividades accesorias es necesario emplear métodos de selección apropiados que utilicen sustratos lignocelulósicos reales. En esta Tesis, se ha desarrollado y validado un microensayo enzimático que utiliza un sustrato homogéneo de paja de trigo pretratada como sustrato (apartado 4.5). En términos generales, es importante considerar que las tasas y la eficacia de la conversión de materiales lignocelulósicos a azúcares fermentables depende de una serie de factores relacionados entre sí, como son la materia prima, el pretratamiento, la participación de una gran variedad de actividades enzimáticas y la definición de azúcar fermentable (Banerjee y col., 2010).

En los apartados siguientes de este capítulo se describen las principales enzimas implicadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica, así como los factores fundamentales que influyen en la etapa de HE.

1.3.3.1 Enzimas implicadas en la HE de biomasa lignocelulósica

Como se ha señalado anteriormente, las enzimas implicadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica son muy abundantes y variadas. Las enzimas glicosil

hidrolasas constituyen un amplio grupo de enzimas caracterizadas por su capacidad para catalizar la hidrólisis de enlaces glicosídicos de los polisacáridos. Este grupo incluye las enzimas comúnmente agrupadas e identificadas como celulasas y hemicelulasas, implicadas en la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, respectivamente. Las glicosil hidrolasas se clasifican con un código numérico según su sustrato y modo de acción, tal y como recomienda la “Enzyme Commission (EC)”. Asimismo, las enzimas glicosil hidrolasas también se han clasificado mediante un sistema que tiene en cuenta su estructura y mecanismo molecular, y las divide en distintas familias y clanes (Henrissat y Davies, 1997) (<http://www.cazy.org/>).

Además de las enzimas que actúan sobre los carbohidratos, existen otras actividades, como las implicadas en la degradación de la lignina o en los enlaces lignina-carbohidratos, e incluso proteínas sin actividad catalítica pero con influencia en la estructura de la pared vegetal.

Celulasas

Las celulasas incluyen una serie de actividades enzimáticas cuya acción conjunta conduce a la despolimerización de la celulosa en sus monómeros constituyentes, es decir, en moléculas de glucosa. La celulosa es el polímero más abundante y ordenado en la biomasa lignocelulósica, por lo que las celulasas constituyen la actividad principal en los cócteles enzimáticos. De hecho, como se mencionó en el apartado 1.3.2.2, más del 90% de la proteína secretada por *T. reesei* son enzimas con actividad celulasa. El sistema celulolítico de *T. reesei* y de otros hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa. Las **endoglucanasas** (EG, EC 3.2.1.4) hidrolizan aleatoriamente enlaces glicosídicos β -1,4 internos de la cadena de celulosa, mientras que las **celobiohidrolasas** (CBH) o exoglucanasas (EC 3.2.1.91) liberan unidades de celobiosa de la cadena de celulosa desde sus extremos terminales. Dentro de las CBH se distinguen las CBH I, que actúan desde el extremo reductor de la cadena de celulosa y las CBH II, que liberan celobiosa desde el extremo no reductor. Un tipo menos común de CBH son las glucohidrolasas o exoglucanohidrolasas, que liberan monómeros de glucosa desde los extremos de la cadena de celulosa. La **β -glucosidasa**, aunque no es estrictamente una enzima celulasa, es un elemento fundamental, ya que cataliza la hidrólisis de la celobiosa en dos moléculas de glucosa (Himmel y col., 1996; Kubicek, 1992; Våljamaä, 2002).

La figura 1.15 muestra el modelo tradicional que describe el mecanismo de degradación de la celulosa. Los distintos componentes actúan sinérgica y secuencialmente para liberar los monómeros de glucosa. Inicialmente, las EG actúan sobre la celulosa, preferentemente en las regiones amorfas, generando nuevos extremos sobre los que pueden actuar las CBH. La β -glucosidasa hidroliza la celobiosas y los celooligosacáridos para formar glucosa. Este modelo simplificado ha intentado ser completado por diferentes autores para esclarecer ciertos aspectos de la hidrólisis de la celulosa, como la pérdida de sinergismo conforme transcurre la HE. El “modelo de obstáculo” sugiere que las CBH pueden quedar bloqueadas por cadenas de celulosa libres adyacentes. Debido a la fuerte unión de los dominios de unión con la cadena de celulosa, las enzimas no pueden liberarse y quedan unidas de manera improductiva (Eriksson y col., 2002).

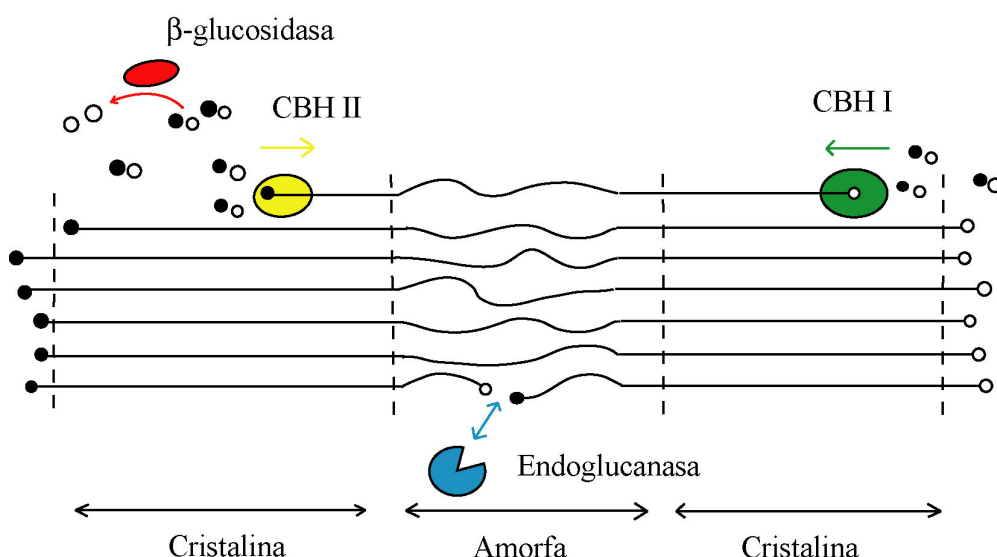


Figura 1.15. Esquema del mecanismo sinérgico de los componentes celulolíticos.

La mayor parte de las celulasas producidas por microorganismos comparten una estructura en la que se distinguen un **dominio catalítico** y un **dominio de unión a carbohidratos**, enlazados entre sí por un péptido de unión. El dominio de unión a carbohidratos no tiene una función catalítica y está implicado en la aproximación e identificación del sustrato. Los dominios catalíticos son los encargados propiamente de la reacción catalítica y muestran gran variabilidad entre diferentes enzimas, lo que puede estar relacionado con su distinto modo de acción. Por ejemplo, las CBH presentan un dominio catalítico con una estructura de túnel, mientras que el dominio

catalítico de las EG presenta una estructura de surco (Henriksson y col., 1996). La estructura tridimensional de ambas enzimas se muestra en la figura 1.16.

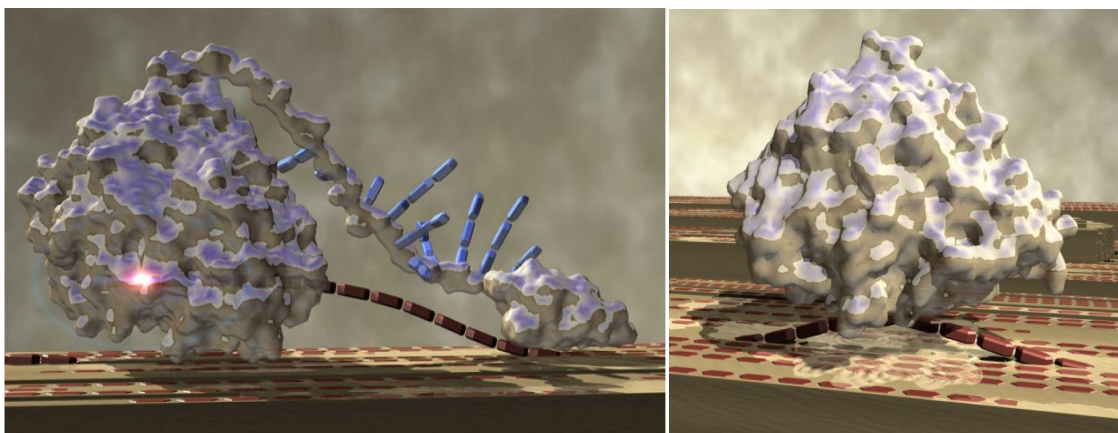


Figura 1.16. Estructura tridimensional de una celobiohidrolasa (izquierda), con el dominio catalítico en forma de túnel y de la endoglucanasa (derecha), con su dominio catalítico en forma de surco.
Fuente: NREL.

Hemicelulasas

Las hemicelulasas constituyen un grupo de enzimas relacionadas con la degradación de la hemicelulosa. La composición y estructura de las hemicelulasas es mucho más variable que la de la celulosa, por lo que la cantidad de enzimas que pueden estar implicadas en su degradación es también mucho más variada. Distintas especies de hongos, levaduras y bacterias producen enzimas hemicelulolíticas; y en general, la mayoría de organismos productores de celulasas producen también cierta cantidad de enzimas hemicelulasas.

En el grupo de las hemicelulasas se incluyen enzimas glicosil hidrolasas, que catalizan los enlaces glicosídicos de los polisacáridos que componen la hemicelulosa y también enzimas esterases, que catalizan enlaces éster que forman los sustituyentes de la hemicelulosa.

Debido a la variabilidad de los sustratos que hidrolizan, las hemicelulasas son frecuentemente clasificadas según el tipo de hemicelulosa o de enlace que catalizan. Así pues, se distinguen xilanasas, mananasas, xilosidasas, arabinasas, galactosidasas, etc. Además, también se pueden clasificar de acuerdo a sus

características moleculares en las distintas familias de glicosil hidrolasas (<http://www.cazy.org/>).

Concretamente las endoxilanasas, que son las enzimas con actividad hemicelulasa más frecuentemente utilizadas, se han clasificado en distintas familias de glicosil hidrolasas atendiendo a su hidrofobicidad, estructura tridimensional y a su similitud en la secuencia de aminoácidos. Aunque normalmente se incluyen en las familias 10 y 11, también se han registrado enzimas con actividad endoxilanasas en las familias 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 y 62 de las glicosil hidrolasas (Collins y col., 2005). En general, las endoxilanasas de la familia 10 son activas sobre xilano y sobre pequeños oligómeros de xilosa y de glucosa, mientras que las endoxilanasas de la familia 11 son específicas de sustratos con xilosa (Vries y Visser, 2001). En *T. reesei* se han detectado producciones en baja proporción de endoxilanasas de la familia 5, de la familia 10 y de la familia 11.

En los materiales herbáceos, como la paja de trigo, el arabinoxilano es la hemicelulosa más abundante. La degradación del arabinoxilano tiene un mecanismo complejo debido a la heterogeneidad propia del sustrato. La variedad de enzimas implicadas se muestra en la figura 1.17. Las endoxilanasas hidrolizan al azar enlaces interiores de la cadena de xilano generando xilooligosacáridos de distinto tamaño. La enzima β -xilosidasa hidroliza la xilobiosa y los extremos de los xilooligosacáridos para liberar monómeros de xilosa. Para catalizar la hidrólisis de los sustituyentes laterales de la cadena de xilano son necesarias otras enzimas, como las arabinofuranosidasas, glucuronosidasas y galactosidasas, que hidrolizan las sustituciones de arabinosa, ácido glucurónico y galactosa, respectivamente. Por su parte, las acetil y feruloil esterasas catalizan la ruptura de los enlaces éster que unen los grupos acetilo y el ácido ferúlico con componentes de la cadena de hemicelulosa (Saha, 2003).

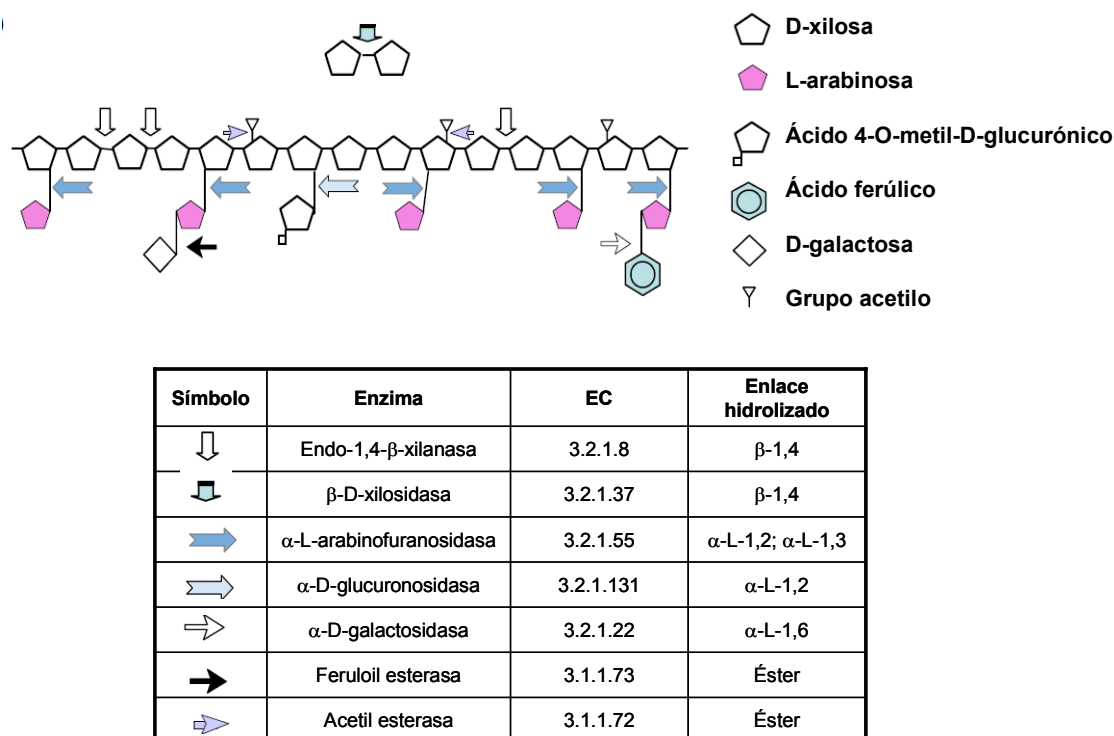


Figura 1.17. Enzimas implicadas en la degradación del arabinoxilano. Modificado de (Aro y col., 2005).

En la degradación de la hemicelulosa se han observado también efectos sinérgicos entre las diferentes actividades implicadas. En el arabinoxilano, la hidrólisis del xilano se ve facilitada por la acción de las enzimas que liberan las sustituciones laterales, ya que aumentan la accesibilidad de la cadena de xilano (Pan y col., 2006; Raweesri y col., 2008). Además, a través de las sustituciones laterales de la hemicelulosa se forman enlaces con intermediarios cinamílicos de la lignina, por lo que enzimas como las arabinofuranosidasas o las feruloil esterasas contribuyen a la disociación del complejo lignina-carbohidratos y pueden mejorar la eficacia de la HE de algunos materiales lignocelulósicos (Faulds y col., 2006; Raweesri y col., 2008; Selig y col., 2008; Tabka y col., 2006).

Globalmente, la degradación de la matriz hemicelulósica permite aumentar la accesibilidad de las fibras de celulosa a las enzimas celulolíticas, por lo que este tipo de enzimas tiene gran potencial para mejorar la eficacia del proceso de HE. Por otro lado, el desarrollo de microorganismos con capacidad para fermentar a etanol no sólo la glucosa sino también pentosas, como la xilosa, contribuye a aumentar el interés por estudiar la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa.

Enzimas implicadas en la degradación de la lignina

Algunos microorganismos, principalmente hongos, han desarrollado un sistema enzimático extracelular, inespecífico y de naturaleza oxidativa para la degradación de la lignina. Este sistema incluye enzimas peroxidasas, oxidasas y lacasas, además de compuestos de bajo peso molecular que pueden actuar como mediadores redox. En la degradación de la lignina se produce una oxidación de las unidades del polímero hasta formar radicales libres, los cuales pueden sufrir una serie de complejas reacciones químicas que derivan en la parcial despolimerización y mineralización de la lignina (Baldrian, 2006; Hammel, 1997).

Aunque la lignina no contiene elementos fermentables, supone una barrera física que puede impedir el acceso de las enzimas celulolíticas, que también pueden quedar inespecíficamente unidas a ella (Chang y Holtzapfle, 2000). Además, los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica a menudo producen la degradación de componentes fenólicos de la lignina, que pueden ser tóxicos para los microorganismos fermentadores. En este contexto, los tratamientos con enzimas ligninolíticas tienen potencial para mejorar la eficacia del proceso, bien como biopretratamiento para reducir el contenido de lignina (Sánchez, 2009) o como método de destoxificación de los medios de HE y fermentación (Jurado y col., 2009).

Proteínas sin actividad catalítica

Otras proteínas no catalíticas como “swolleninas” (de origen fúngico) o expansinas (de origen vegetal) han sido identificadas por su influencia en la desestructuración de las paredes vegetales. Aunque no muestran actividad catalítica, la capacidad de estas enzimas para debilitar la estructura vegetal y modificar las fibras de celulosa resulta interesante por su posible aplicación en la bioconversión de materiales lignocelulósicos (Cosgrove, 2000; Saloheimo y col., 2002). Cosgrove (2000) propuso un modelo de acción de las expansinas en la pared celular descrito en la figura 1.18.

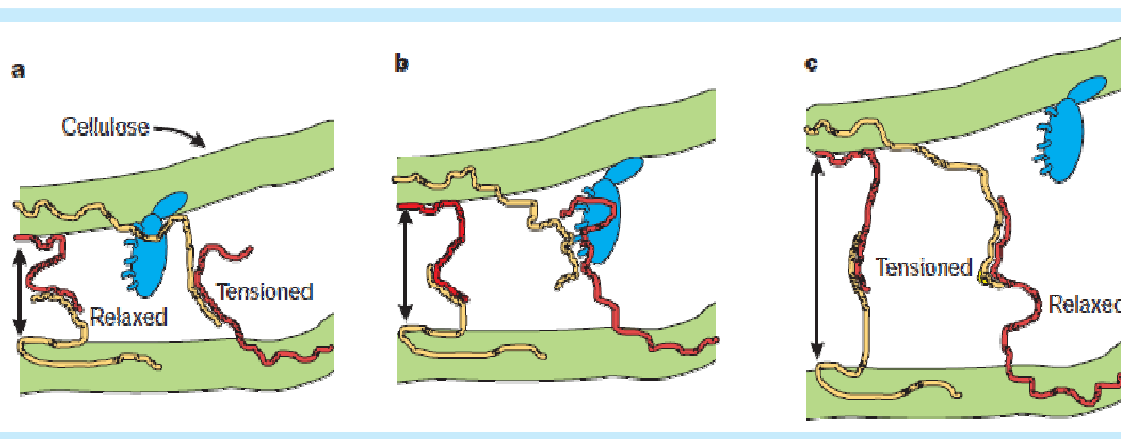


Figura 1.18. (Cosgrove, 2000). Modelo de mecanismo de acción de las expansinas. Las microfibrillas de celulosa están conectadas entre sí mediante otras cadenas otros polisacáridos (fibras amarilla y roja) que pueden conectar entre sí y con las cadenas de celulosa. Según el modelo, la expansina (azul) afectaría el enlace de estos polisacáridos con la superficie de la celulosa (a), o bien el enlace entre ellos (b). La acción de la expansina provoca un desplazamiento de los polímeros de la pared celular (c) y una disminución de los puntos de unión del conjunto del polímero (comparar b y c).

1.3.3.2 Factores que influyen en la HE

Además de las enzimas implicadas, existen varios factores que influyen en la eficacia del proceso de HE de sustratos lignocelulósicos. Estos factores pueden dividirse en dos grupos; los relacionados propiamente con el mecanismo enzimático y los relacionados con las características del sustrato (estructura, concentración...) (Zhu y col., 2008).

Factores relacionados con mecanismo enzimático

En el mecanismo y cinética de la HE de los carbohidratos de la biomasa lignocelulósica, y concretamente de la celulosa, influyen diversos factores que pueden estar relacionados entre sí y que deben tenerse en cuenta para aumentar la eficacia del proceso (Esteghlalian y col., 2001; Kumar y col., 2009). Dentro de estos factores se incluyen los siguientes:

- Sinergia y pérdida de sinergia de los componentes enzimáticos a lo largo de la reacción, incluyendo las de enzimas accesorias.
- Influencia del pH y temperatura en la estabilidad y óptimo de la actividad enzimática (Zhang y col., 2010).

- Disminución de la reactividad del sustrato como consecuencia de la retirada inicial del material más fácilmente hidrolizable.

- Unión no productiva de las enzimas a la lignina.

- Inhibición por producto final. La glucosa y especialmente la celobiosa ejercen un efecto de inhibición por producto final sobre las enzimas endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas (Gruno y col., 2004; Xiao y col., 2004). Además, la xilosa y los xilooligómeros procedentes de la hemicelulosa, también han sido descritos por su efecto inhibitorio sobre las celulasas (García-Aparicio y col., 2006; Qing y col., 2010; Xiao y col., 2004).

- Efecto negativo de los productos de degradación de la lignina y de los carbohidratos en la HE (Cantarella y col., 2004; García-Aparicio y col., 2006).

Factores relacionados con el sustrato

Además de los factores relativos al mecanismo enzimático, las tasas y los rendimientos de la HE de materiales lignocelulósicos dependen de factores relacionados con el sustrato. Uno de los factores más importantes es la concentración de sustrato. La obtención de altas concentraciones de azúcares en el proceso de HE requiere altas concentraciones de sustrato en los medios de hidrólisis, lo que puede provocar problemas de interacción de las enzimas y el sustrato e inhibición por producto final.

Los factores relacionados propiamente con la estructura y características del sustrato están relacionados con el tipo de pretratamiento, que afecta a la estructura y composición del material (Mansfield y col., 1999). Los principales son:

- Cristalinidad y grado de polimerización (DP) de la celulosa.

En el proceso de HE la celulosa amorfa y con bajo DP es más fácilmente hidrolizable que la celulosa cristalina, por lo que la cristalinidad y el DP de la celulosa se consideran dos de los factores que más influyen en la digestibilidad de sustratos celulósicos (Zhang y Lynd, 2004). Generalmente, el efecto de los pretratamientos provoca una disminución de la cristalinidad, sin embargo se ha observado también que el efecto de algunos pretratamientos puede afectar en mayor grado a la celulosa amorfa y globalmente aumentar la cristalinidad. Otros estudios consideran la cristalinidad de la celulosa como un factor especialmente influyente en las etapas

iniciales de la HE, mientras que el contenido en lignina y hemicelulosa son los factores principales en las etapas finales (Laureano-Pérez y col., 2005).

- Tamaño de poro y área superficial accesible.

Uno de los objetivos fundamentales de los pretratamientos consiste en aumentar la accesibilidad de los sustratos a las enzimas. La reacción enzimática requiere la adsorción de las enzimas a las fibras, por lo que la relación entre el área superficial accesible, el tamaño del poro y el tamaño de las enzimas resulta crucial. La disminución del tamaño de partícula del sustrato es una posibilidad para aumentar el área superficial accesible, y por lo tanto la accesibilidad de las enzimas (Chandra y col., 2007).

- Contenido en lignina y hemicelulosa.

La matriz formada por la lignina y hemicelulosa en la estructura de la lignocelulosa bloquea y dificulta el acceso de las enzimas a las fibras de celulosa, por lo que la presencia de estos componentes se considera uno de los factores más influyentes en la HE (Mansfield y col., 1999).

La **lignina** actúa como una barrera física y protege las fibras de celulosa del ataque enzimático (Chang y Holtzapple, 2000). Además, las enzimas celulolíticas pueden unirse de forma inespecífica a la lignina, reduciendo las tasas de HE (Esteghlalian y col., 2001).

Para reducir el efecto negativo de la lignina se han estudiado diversos métodos de deslignificación de la biomasa que se han mostrado eficaces, como los pretratamientos con organosolventes, extracciones alcalinas o tratamientos con enzimas oxidativas (lacasas, etc.). Además de eliminar la barrera física, la deslignificación reduce las uniones inespecíficas y no productivas de las celulasas con la lignina. También disminuye el bloqueo estérico mediante el aumento del área superficial interna y del tamaño de los poros. (Berlin y col., 2006; Öhgren y col., 2007a; Pan y col., 2004). Aunque la deslignificación se ha mostrado como un proceso eficaz para mejorar la HE, también puede acarrear ciertas desventajas como la necesidad de añadir etapas suplementarias y la posible disminución o pérdida de carbohidratos asociados a la lignina.

Otra alternativa para reducir la adsorción inespecífica de las celulasas es la aplicación de aditivos como proteínas (BSA), polietilenglicol o “Tween” (Sipos y col., 2010; Yang y Wyman, 2006). Estos compuestos pueden unirse inespecíficamente a la lignina, evitando así las uniones inespecíficas de las celulasas y mejorando el proceso de HE. La utilización de aditivos significa un coste adicional, por lo que los beneficios de su utilización deben compensar este coste.

La **hemicelulosa**, como la lignina, puede dificultar la accesibilidad de las enzimas a las fibras de celulosa. Uno de los efectos de muchos de los pretratamientos empleados para la producción de etanol, como la EV, es la retirada o solubilización parcial de la fracción hemicelulosa, lo que mejora la accesibilidad de la celulosa y globalmente la digestibilidad de los sustratos (Chandra y col., 2007). Algunos autores han observado la disminución de enlaces carbonil éster tras el pretratamiento de la materia prima, lo que indica la ruptura de enlaces de la hemicelulosa con la lignina (Laureano-Pérez y col., 2005).

Aunque la recuperación de la hemicelulosa en los sustratos pretratados afecta negativamente la HE, también puede resultar una opción interesante para aumentar la producción de azúcares fermentables. En estos casos, los cócteles enzimáticos deben ser específicamente adaptados con actividades adecuadas para conseguir la hidrólisis no solamente de la celulosa sino también de la hemicelulosa. En este sentido, la aplicación de enzimas con actividades hemicelulasas se ha mostrado eficaz para degradar la hemicelulosa y mejorar la HE (García-Aparicio y col., 2007; Kumar y col., 2009a-b).

Por otro lado, los grupos acetilo que forman parte de la hemicelulosa de algunos materiales lignocelulósicos también se han estudiado por su efecto negativo al impedir el acceso de las enzimas celulolíticas. La retirada durante el pretratamiento o mediante enzimas específicas de estos grupos acetilo ha mostrado ventajas en los rendimientos de HE (Pan y col., 2006).

1.3.4 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso de conversión bioquímica en el que los azúcares monoméricos se transforman en etanol y CO₂. Estequiométricamente, las hexosas, como la glucosa o manosa, se transforman en dos moléculas de etanol y dos moléculas de CO₂.



Por su parte, las pentosas, como la xilosa y arabinosa, se pueden fermentar a etanol con un balance en el que tres moléculas de pentosas se transforman en cinco de etanol y cinco de CO₂.



Globalmente a partir de un gramo tanto de hexosas como de pentosas se produce estequiométricamente 0,51 gramos de etanol y 0,49 gramos de CO₂.

Aunque distintos tipos de levaduras y bacterias son capaces de fermentar azúcares, el microorganismo más comúnmente empleado en la producción de etanol-combustible es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es capaz de fermentar todo tipo de hexosas con altos rendimientos y presenta además alta tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento de la materia prima. Sin embargo, la principal limitación de *S. cerevisiae* para la producción de etanol es su incapacidad para fermentar las pentosas que forman parte de la estructura de la hemicelulosa.

Los residuos agrícolas, como la paja de trigo, contienen una proporción significativa de azúcares hemicelulósicos, principalmente xilosa. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar la xilosa supondría importantes mejoras en el rendimiento global de la producción de bioetanol. En la naturaleza, solamente algunas bacterias entéricas y ciertas levaduras como *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis* han sido identificadas por su capacidad de fermentar la xilosa, aunque con rendimientos relativamente bajos. Además, muchos de estos microorganismos no muestran alta tolerancia al etanol y a los tóxicos (Hahn-Hägerdal y col., 2007).

En general, las características principales a tener en cuenta en la elección de un microorganismo fermentador para un proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa son: obtención de altos rendimientos de etanol, altas productividades, alta tolerancia a tóxicos y capacidad de fermentación de las pentosas.

Una alternativa para posibilitar la fermentación de xilosa u otras pentosas es la manipulación genética. Bacterias como *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* o *Klebsiella oxytoca* han sido modificadas para dirigir los flujos metabólicos hacia la producción de etanol, o bien para incluir enzimas implicadas en el metabolismo de las pentosas (Golias y col., 2002; Ingram y col., 1998; Wang y col., 2008).

La levadura *S. cerevisiae* también ha sido modificada genéticamente con el objetivo de mejorar su productividad de etanol. Esta cepa es capaz de integrar la xilulosa en su metabolismo fermentativo, pero no la xilosa. Por lo tanto, las principales estrategias para obtener cepas capaces de co-fermentar glucosa y xilosa han consistido en la introducción de genes que codifican enzimas implicadas en la isomerización de la xilosa a xilulosa. Estos genes han sido seleccionados a partir de levaduras o bacterias con capacidad para fermentar las pentosas (Eliasson y col., 2000; Karhumaa y col., 2007). Aunque los transportadores de membrana son funcionales para la absorción tanto de glucosa como de xilosa, normalmente muestran más afinidad por la glucosa. Por lo tanto, otra estrategia para favorecer la fermentación de pentosas es la modificación de los genes que intervienen en la síntesis de transportadores de membrana (Chu y Lee, 2007).

1.4 Integración de las etapas del proceso

En los apartados anteriores se han descrito las etapas de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, así como los factores que más influyen en su optimización y posibles mejoras. Cada una de las distintas etapas; pretratamiento, producción de enzimas, HE y fermentación, tiene una gran influencia sobre las demás, por lo que el proceso global de producción de etanol debe considerar la integración de todas las etapas de la manera más eficiente posible.

El pretratamiento de la materia prima es el primer paso de la producción de etanol de lignocelulosa. Tras pretratamientos como la EV se obtiene un material pretratado completo (MPC) compuesto por una fracción sólida o residuo sólido insoluble (RSI), rico en celulosa y lignina; y una fracción líquida o prehidrolizado, que contiene fundamentalmente azúcares hemicelulósicos y compuestos de degradación. Aunque el MPC se puede filtrar y lavar para eliminar los compuestos tóxicos, esta separación implica una pérdida de azúcares, un aumento de los requerimientos de agua en el proceso y la necesidad de incluir una etapa adicional de filtrado. Por lo tanto, la utilización del MPC en las etapas de HE y producción de etanol mediante fermentación puede resultar una opción más adecuada.

Las etapas de HE y fermentación alcohólica de los sustratos pretratados, junto con la producción de las enzimas, pueden alcanzar distintos niveles de integración de proceso que presentan distintas ventajas y desventajas. En general, la integración de las etapas tiene gran potencial para aumentar los rendimientos y la velocidad de producción, y reducir la inversión de equipamiento y el coste de operación. En la figura 1.19 se muestra un esquema de las principales configuraciones estudiadas para la producción de etanol, desde la separación de las etapas mediante procesos de sacarificación y fermentación separadas (HFS) hasta la integración de todas las etapas en un proceso único o “bioproceso consolidado” (BPC). En niveles intermedios de integración se encuentran los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y los procesos de sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS) (Olsson y col., 2005; Tomás-Pejó y col., 2008a).

En un proceso integrado, el recurso lignocelulósico ofrece además la posibilidad de un aprovechamiento completo, de tal forma que la producción de etanol como principal producto se puede complementar con la obtención de subproductos o residuos con valor añadido. El concepto de biorrefinería integra procesos de

producción de combustibles, energía y productos químicos a partir de la biomasa, por lo que el proceso global puede aumentar su eficiencia y rentabilidad.

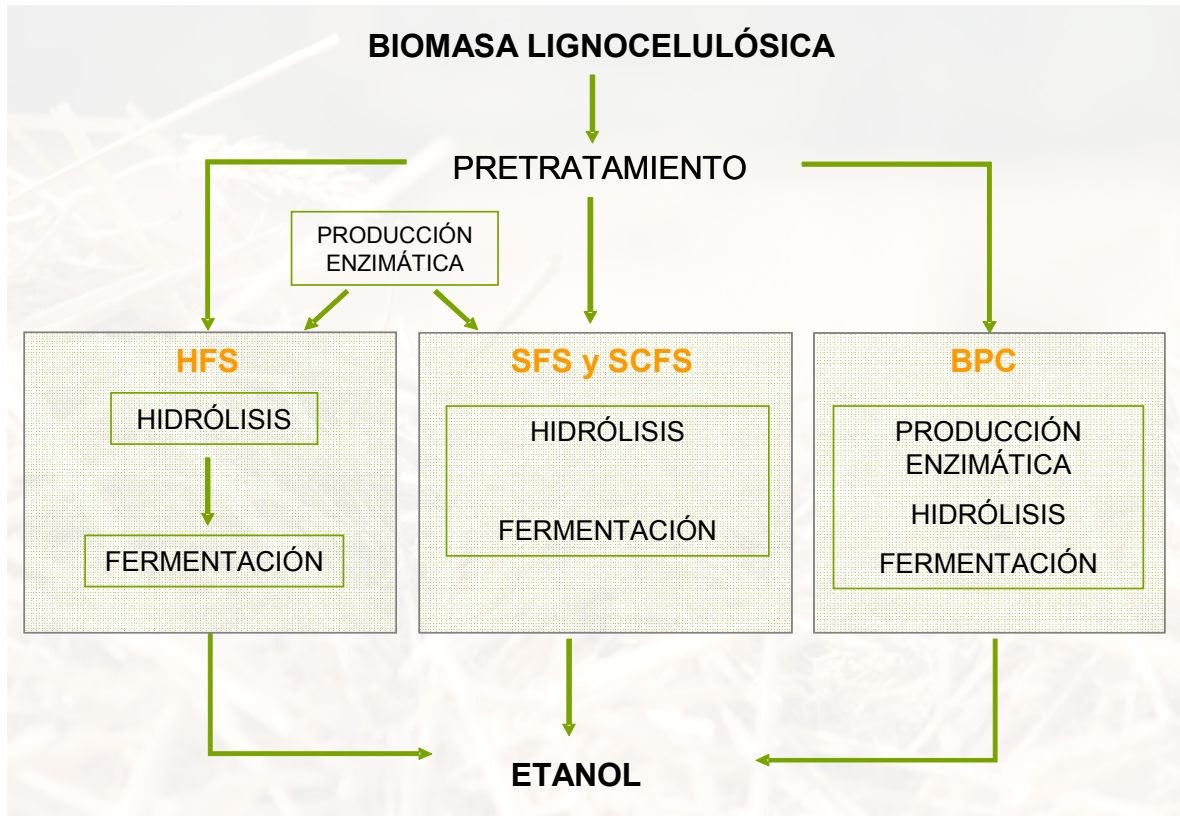


Figura 1.19. Integración de las etapas del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

1.4.1 Hidrólisis y fermentación separadas (HFS)

En un proceso de HFS las etapas de HE y fermentación se realizan de forma separada y secuencial, es decir, una vez completada la etapa de HE el medio rico en glucosa se fermenta por medio de levaduras u otros microorganismos. La principal ventaja de este proceso es la posibilidad de realizar cada etapa bajo sus condiciones óptimas de temperatura, pH o agitación. De este modo, la HE se lleva a cabo a temperaturas alrededor de 50 °C y pH alrededor de 5, que son condiciones óptimas para las enzimas. Tras la HE, la temperatura se puede disminuir hasta 30-37 °C, en cuyo rango se encuentra el óptimo para la mayoría de los microorganismos fermentadores (Olsson y col., 2005).

La principal desventaja de la HFS es la acumulación durante la hidrólisis de glucosa y celobiosa, que tienen un efecto inhibitor por producto final sobre las celulasas y por tanto pueden disminuir los rendimientos de la HE (Xiao y col., 2004). Una posibilidad para reducir el efecto inhibitor de la glucosa en procesos de HFS es la retirada *in situ* de la glucosa mediante un proceso de diálisis (Andric y col., 2010).

1.4.2 Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

La HE y la fermentación alcohólica pueden formar parte de un proceso integrado en el que las mezclas enzimáticas y el microorganismo fermentador actúan simultáneamente. En este proceso de SFS, los azúcares liberados por la acción catalítica de las enzimas pueden ser fermentados directamente a etanol, por lo que se minimiza la inhibición por producto final de la glucosa y se consiguen mayores rendimientos de HE, que se reflejan en productividades volumétricas de etanol más altas y en la reducción del tiempo del proceso (Alfani y col., 2000; Ballesteros y col., 2004; Olsson y col., 2006).

Los principales inconvenientes del proceso de SFS están relacionados con las diferentes condiciones óptimas de pH y temperatura de las enzimas y los microorganismos, lo que generalmente exige determinar condiciones de compromiso entre ambos procesos. En este sentido, la posibilidad de utilizar microorganismos termotolerantes, como la levadura *Kluyveromyces marxianus*, es una alternativa interesante (Ballesteros y col., 2001; Kádár y col., 2004; Tomás-Pejó y col., 2009b).

Desde el punto de vista de su aplicación a mayor escala, uno de los objetivos principales de los procesos de producción de etanol, es reducir los costes de la destilación y evaporación (Sun y Cheng, 2002). Para ello, se requiere utilizar altas concentraciones de sólidos que permitan obtener altas concentraciones de azúcares y de etanol en los medios. Sin embargo, la elevada viscosidad de los sustratos lignocelulósicos pretratados puede condicionar el mezclado de los medios en los reactores a altas concentraciones. Una de las alternativas para reducir la viscosidad del medio y permitir al utilización de mayores concentraciones de sustrato es incluir una etapa de prehidrólisis o presacarificación previa a la SFS. El efecto de la enzimas previo a inocular con el microorganismo fluidifica el medio y permite alcanzar mayores cargas de sustrato. Además, esta etapa de presacarificación se puede realizar al óptimo de temperatura de las enzimas y permite un mejor control de pH (Jorgensen y

col., 2007; Rosgaard y col., 2007; Tomás-Pejó y col., 2009b). Otra posibilidad para aumentar las concentraciones de sólidos es la aplicación de procesos por pulsos o “fed-batch”, en los que el sustrato se añade en diferentes tiempos durante la HE o SFS (Rudolf y col., 2005).

1.4.3 Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS)

La gran proporción de pentosas en la estructura de las materias primas lignocelulósicas ha generado gran interés por desarrollar configuraciones de proceso en las que se incluye la fermentación de xilosa y/o arabinosa para mejorar la producción de etanol. El proceso de SCFS consiste en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas en el que todos los azúcares, tanto celulósicos como hemicelulósicos son susceptibles para su fermentación a etanol. El requisito indispensable en este proceso es la aplicación de microorganismos con capacidad para co-fermentar tanto hexosas, (glucosa, manosa...), como pentosas (xilosa, arabinosa...).

Por otro lado, los azúcares hemicelulósicos pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre las celulasas (Qing y col., 2010; Xiao y col., 2004), por lo que el consumo de las pentosas, además de contribuir a la producción de etanol, reduciría este efecto negativo en la HE. Recientemente se han propuesto distintas configuraciones de SCFS con el objetivo de optimizar la conversión tanto de glucosa como de xilosa (Jin y col., 2010; Li y col., 2010b).

1.4.4 Bioproceso consolidado (BPC)

El BPC conlleva la integración de todas las etapas biológicas necesarias para la transformación de la biomasa lignocelulósica en etanol. Se basa en la utilización de uno o varios microorganismos, que son capaces de producir las enzimas necesarias, hidrolizar los sustratos y fermentar los azúcares en un mismo reactor y sin adición de enzimas exógenas. Las bacterias celulolíticas del género *Clostridium* han sido las más estudiadas para su aplicación en BPCs. Estas bacterias utilizan la celulosa como fuente de carbono y son capaces de fermentar la glucosa y la xilosa para producir etanol y otros productos. Su metabolismo se basa en un sistema enzimático

extracelular o celulosoma capaz de hidrolizar la celulosa (Cardona y Sánchez, 2007; Lynd y col., 2005).

A pesar de las ventajas y el potencial de este tipo de procesos, en la actualidad no existen microorganismos que reúnan todas las características requeridas para un BPC efectivo. Las estrategias de mejora están orientadas a la manipulación de microorganismos con el fin de optimizar o dirigir su metabolismo hacia la fermentación alcohólica, o bien aumentar su expresión y producción de enzimas celulolíticas (Lynd y col., 2005; Van Zyl y col., 2007).

2. OBJETO E INTERÉS DEL TEMA

2. OBJETO E INTERÉS DEL TEMA

El presente trabajo doctoral se enmarca dentro de las actividades de investigación de la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT, basadas en la producción de bioetanol-combustible como alternativa renovable a los combustibles de origen fósil en el sector del transporte. La Tesis Doctoral se ha realizado con una beca FPI, habiendo desarrollado parte del trabajo experimental en el Dpto. de Biotecnología Aplicada de la Universidad Tecnológica y Económica de Budapest, en Hungría. Además, parte de la experimentación y de los resultados obtenidos se han llevado a cabo en el marco del proyecto Cenit I+DEA, coordinado por Abengoa Nuevas Tecnologías.

La producción actual de etanol se denomina de primera generación y utiliza materias primas azucaradas y amiláceas, ligadas al sector de la alimentación. La utilización de biomasa lignocelulósica, que es abundante y de bajo coste, representa la mejor alternativa para la producción industrial de bioetanol en el futuro cercano. Entre las distintas tecnologías que existen para la producción de etanol a partir de lignocelulosa, los procesos basados en hidrólisis enzimática de los carbohidratos que componen la materia prima aparecen como la opción más prometedora para su aplicación a escala industrial.

La paja de trigo, materia prima empleada en este trabajo, es un residuo lignocelulósico muy abundante, de bajo coste y con un alto contenido en carbohidratos, por lo que es una materia prima interesante y con gran potencial para ser utilizada en la producción de etanol.

Su compleja estructura y composición hace de la biomasa lignocelulósica un sustrato recalcitrante al ataque enzimático. Para alterar la estructura del material y aumentar la accesibilidad de las fibras de celulosa al ataque enzimático se realiza un pretratamiento de la materia prima. En este trabajo, se ha utilizado el pretratamiento por explosión por vapor, ya que se ha mostrado como un método efectivo y apropiado en los procesos de producción de etanol a partir de este tipo de biomásas. En este tipo de pretratamientos se necesitan condiciones severas de temperatura (200-230 °C) para alterar la estructura de la fibra lignocelulósica y aumentar la efectividad del ataque enzimático. Con las temperaturas más altas se hidroliza la mayor parte de la hemicelulosa y se alteran las uniones lignina-carbohidratos, haciendo la celulosa más accesible. Además del coste energético que supone la utilización de altas

temperaturas de pretratamiento, con estas condiciones también se producen reacciones de degradación de azúcares y otros productos solubilizados que son inhibidores de las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación. En esta trabajo, se ha estudiado la posibilidad de combinar pretratamientos menos severos y suplementación de los cócteles enzimáticos con enzimas accesorias para alcanzar los rendimientos obtenidos con pretratamientos de alta severidad.

Tras el pretratamiento se obtiene un sustrato (material pretratado completo, MPC) que contiene una fracción insoluble (RSI) rica en celulosa y lignina, con cierto contenido en hemicelulosa insoluble; y una fracción líquida o prehidrolizado, que contiene azúcares hemicelulósicos solubilizados y productos de degradación. En un proceso industrial sería deseable la utilización del MPC, puesto que evita el paso de filtrado y aumenta la cantidad total de azúcares disponibles.

Entre todas las etapas que forman parte del proceso de producción de etanol de lignocelulosa, la hidrólisis enzimática de los carbohidratos que componen los materiales pretratados supone uno de los principales obstáculos para la comercialización del bioetanol de lignocelulosa. En los últimos años, las principales compañías biotecnológicas han desarrollado preparados enzimáticos mejorados con el objetivo de reducir el coste del proceso. No obstante, continúan las investigaciones desde distintos ámbitos para mejorar la eficacia de los cócteles enzimáticos. Uno de las estrategias con mayor potencial es la aplicación de enzimas accesorias y específicas que suplementen y mejoren la acción de las celulasas. La compleja estructura de la lignocelulosa requiere para su completa degradación otras actividades como hemicelulasas o ligninasas, cuya aplicación tiene gran potencial para optimizar la obtención de azúcares a partir de sustratos pretratados, permitiendo además reducir las cargas de enzima. Para el estudio de los componentes y preparados enzimáticos sobre sustratos reales es importante la utilización de métodos de ensayo y selección adecuados.

Otra posibilidad para reducir los costes es la mejora de la producción de las enzimas, utilizando microorganismos hiperproductores y medios de cultivo que utilicen fuentes de carbono apropiadas y de bajo coste.

Tras el pretratamiento y la hidrólisis enzimática, se lleva a cabo la fermentación con microorganismos, principalmente levaduras. Generalmente, estos microorganismos son capaces de fermentar las hexosas, pero no las pentosas presentes en

el medio. Teniendo en cuenta el alto contenido en pentosas (principalmente xilosa) en algunos materiales lignocelulósicos, como la paja de trigo, la aplicación de microorganismos capaces de co-fermentar todos los azúcares es una de las posibilidades más claras de aumentar la producción de etanol.

El objetivo general de esta investigación es el estudio de diferentes preparaciones enzimáticas y la formulación de cócteles mejorados como alternativas para mejorar el proceso de hidrólisis enzimática, y por lo tanto la producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada por explosión por vapor. El trabajo incluye los siguientes estudios:

- Evaluación del pretratamiento por explosión por vapor de la paja de trigo como etapa previa en el proceso de producción de etanol.
- Evaluación de la producción de enzimas con *Trichoderma reesei* RUTC30 utilizando como fuente de carbono la paja de trigo pretratada y estudio del efecto del contenido en celulosa y hemicelulosa de la fuente de carbono en la composición del cóctel enzimático.
- Desarrollo de un método de microensayo enzimático adecuado para el estudio de mezclas enzimáticas sobre paja de trigo pretratada (RSI y MPC) como sustrato.
- Caracterización de preparados enzimáticos comerciales y evaluación de su efecto en procesos de hidrólisis enzimática y fermentación.
- Estudio del efecto de la adición de xilanasas comerciales en el proceso de hidrólisis enzimática y producción de etanol.
- Estudio del efecto en la hidrólisis enzimática y en la producción de etanol de la suplementación de los cócteles celulolíticos con enzimas recombinantes: endoxilanasas, α -L-arabinofuranosidasas, celobiohidrolasas, endoglucanasas y expansinas.
- Estudio de estrategias de adición de xilanasas en la hidrólisis enzimática y en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas y de sacarificación y co-fermentación simultáneas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

La materia prima lignocelulósica utilizada en esta Tesis ha sido paja de trigo (*Triticum aestivum*), que fue suministrada por el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER). La biomasa se molió a 10 mm con un molino de cuchillas y se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización. Se determinó su composición en componentes estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina), cenizas y extractivos, según se describe en el apartado 3.9.1.

3.2 Pretratamiento por explosión por vapor (EV)

La paja de trigo molida, con una humedad entre 5-8%, se sometió a un pretratamiento por explosión por vapor (EV) en una unidad piloto en discontinuo situada en CIEMAT. La instalación está basada en la tecnología “Masonite”, aplicada en la producción industrial de pastas de papel (Marchessault y col., 1983). El equipo consta de un generador de vapor, un reactor de 10 l de capacidad y un ciclón de descarga (figura 3.1). El generador suministra vapor saturado al interior del reactor, donde la biomasa se somete a condiciones controladas de temperatura, presión y tiempo de residencia. Tras una rápida despresurización, el material pretratado se recoge en el ciclón de descarga.

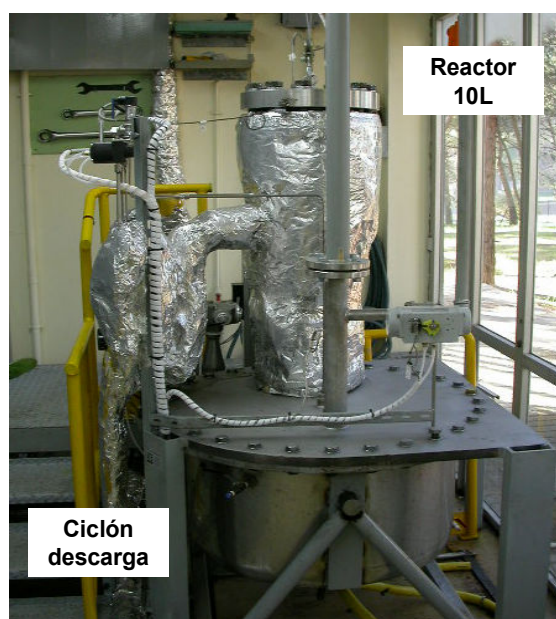


Figura 3.1. Planta piloto de explosión por vapor en las instalaciones de CIEMAT.

Se han seleccionado dos condiciones de pretratamiento según estudios de optimización desarrollados anteriormente en CIEMAT, en los que se consideró como factores principales la recuperación de azúcares y los rendimientos de hidrólisis enzimática (HE) obtenidos (Ballesteros y col., 2006). El pretratamiento se realizó a 210 °C y 220 °C, manteniendo el tiempo de residencia en 2,5 min. Como se muestra en la figura 3.2, tras el pretratamiento se recoge el material pretratado completo (MPC), que se separa mediante filtración a vacío en una fracción sólida o residuo sólido insoluble (RSI) y en una fracción líquida o prehidrolizado. El MPC se caracterizó en cuanto a su composición, contenido en sólidos totales y contenido en sólidos insolubles. La composición del RSI se determinó según se describe en el apartado 3.9.1, mientras que en el prehidrolizado se analizó la concentración de azúcares y compuestos de degradación (apartado 3.9.2). Tanto el MPC como el prehidrolizado y el RSI se han utilizado en esta Tesis como sustratos en los diferentes ensayos de producción enzimática, HE y fermentación.

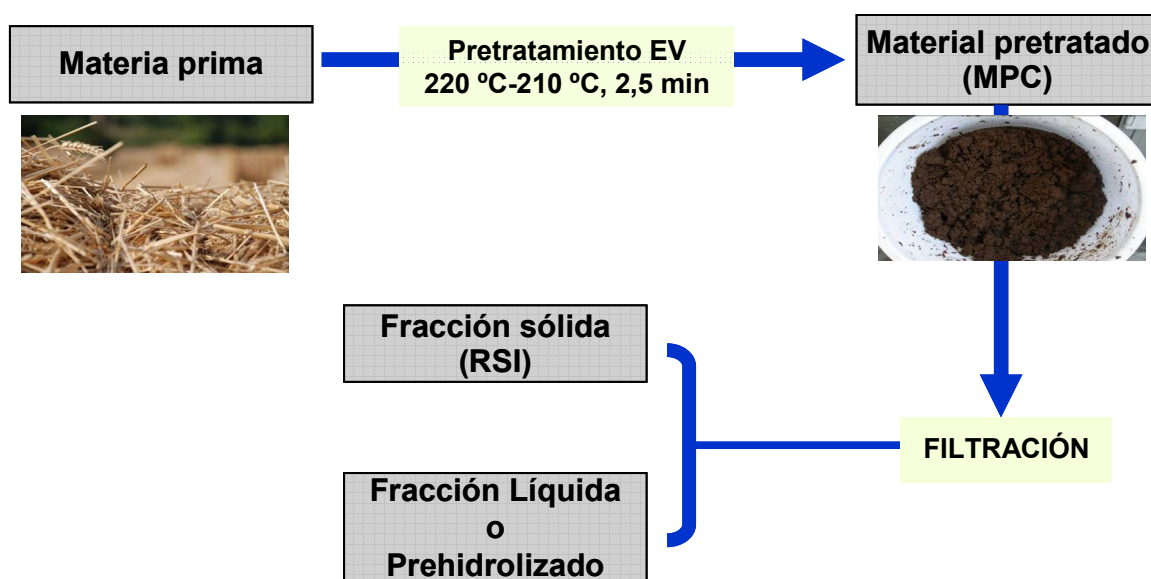


Figura 3.2. Esquema de obtención de MPC, RSI y el prehidrolizado tras el pretratamiento por explosión por vapor de la paja de trigo.

3.3 Preparación de hojas de paja de trigo pretratada

Se elaboraron hojas a partir de paja de trigo pretratada por EV para obtener un sustrato lignocelulósico homogéneo que pueda ser utilizado en los ensayos de HE a

microescala. La figura 3.3 muestra un esquema del proceso de formación de las hojas, que se llevó a cabo en el Dpto. de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid. Se utilizaron aproximadamente 60 g de RSI (humedad, 80%), que se diluyeron en agua hasta obtener una suspensión con una consistencia del 1% (p/v). Esta mezcla se homogeneizó en un desintegrador ISP (Mod. 692) por un total de 37500 revoluciones. Para la preparación de cada hoja se aplicaron 400 g de esta suspensión en un aparato estándar formador de hojas (ENJO 39.71, Papelquimia S.A.) según las normas Tappi T205 SP-02 y T218 SP-02 (Tappi, 2006). Finalmente, las hojas se prensaron durante 5 min y se secaron a temperatura ambiente. Su composición se determinó con el mismo procedimiento utilizado para el RSI del material pretratado (apartado 3.9.1).

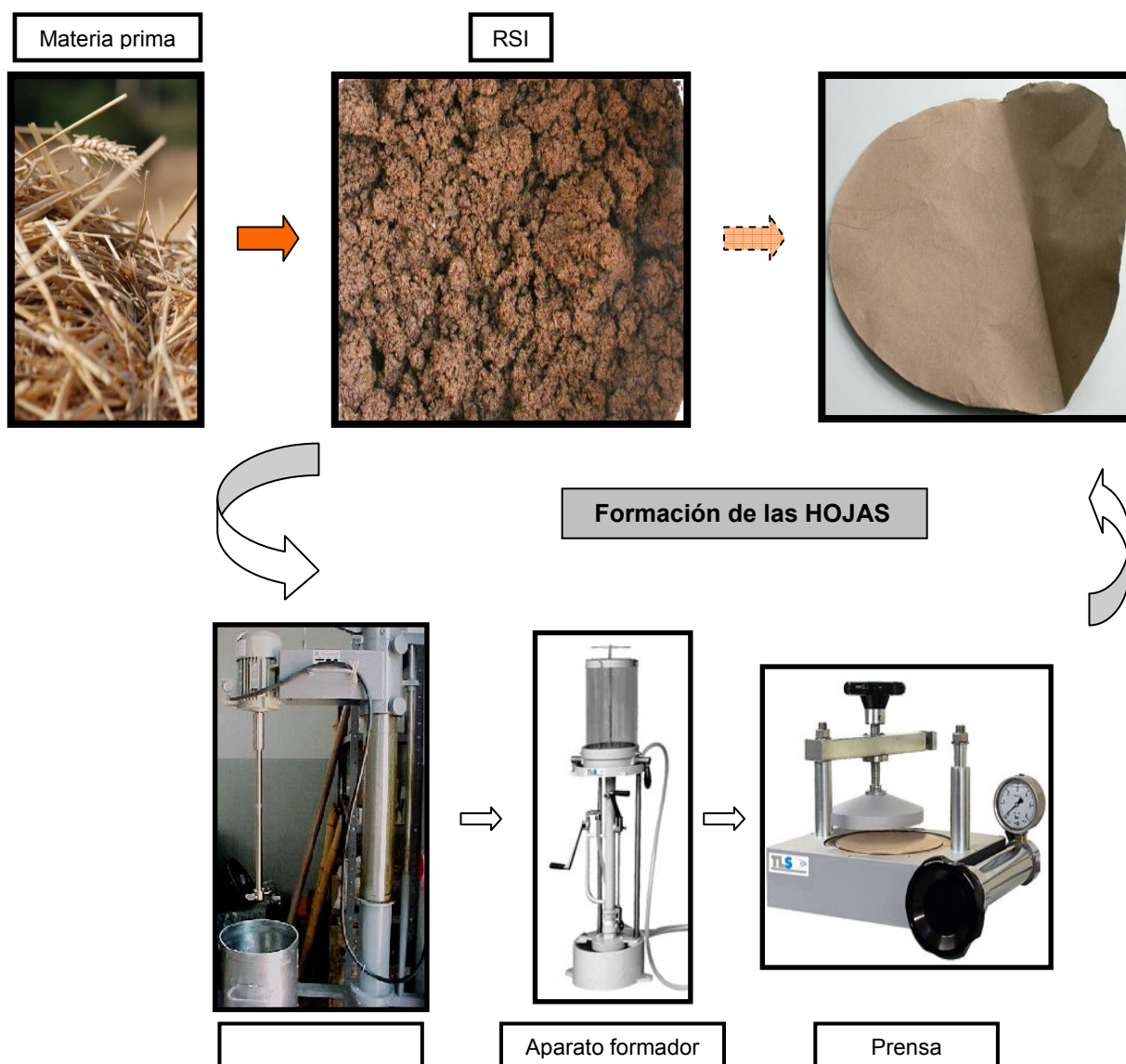


Figura 3.3. Esquema de preparación de hojas a partir de paja de trigo pretratada.

3.4 Producción de enzimas celulolíticas

3.4.1 Microorganismo y preparación del inóculo

La cepa utilizada para la producción de enzimas celulolíticas fue el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* RUTC30 (ATCC56765). Antes de su utilización el microorganismo se mantuvo durante 7-14 días en medios de cultivo sólidos compuestos de 20 g/l de extracto de malta, 20 g/l de agar, 5 g/l de glucosa y 1 g/l de peptona.

Para la preparación del preinóculo se aplicó una suspensión de esporas de *T. reesei* RUT C30 obtenidas a partir de los cultivos en medio sólido. El preinóculo se creció en matraces de 1 l de capacidad con 150 ml de medio "Mandels" modificado (tabla 3.1). Este medio aporta las fuentes de nitrógeno y fósforo, así como minerales necesarios para el crecimiento del hongo y la producción de enzimas (Mandels y Webber, 1969). Como fuente de carbono en el preinóculo se utilizó Solka Floc 200 FCC (SF, Internacional Fiber Corporation) o lactosa (Ref. 61339 Sigma-Aldrich), a una concentración de 10 g/l. Cuando se utilizó SF el preinóculo se mantuvo durante 96 h, mientras que con lactosa se mantuvo durante 72 h. En ambos casos la temperatura se fijó entre 28-30 °C y la agitación a 300 rpm. Al final del proceso el crecimiento del hongo se comprobó midiendo la acidificación del medio (pH entre 2,3-2,9).

Tabla 3.1. Medio Mandels modificado. Composición calculada para una concentración de sustrato (fuente de carbono) de 10 g/l.

Componentes (g/l)		Componentes (mg/ml)	
Carbamida	0,40	FeSO ₄	6,60
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,87	MnSO ₄ H ₂ O	2,10
KH ₂ PO ₄	2,67	ZnSO ₄ 7 H ₂ O	1,90
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,53	CoCl ₂	26,70
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,81		
Extracto de levadura	0,33		
Peptona	1,00		

3.4.2 Fuentes de carbono empleadas en la producción de enzimas

Como fuentes de carbono en las fermentaciones para la producción de enzimas se utilizaron celulosa comercial Solka Floc y paja de trigo pretratada por EV (MPC, RSI y prehidrolizado).

El prehidrolizado de la paja de trigo contiene compuestos inhibidores o tóxicos procedentes del pretratamiento. Para reducir su concentración, se tomaron 250 ml y se evaporaron al vacío a una temperatura de 50 °C durante 10 min para eliminar los compuestos volátiles, que se recogieron en el líquido condensado. El volumen inicial se redujo en 60 ml, por lo que se añadió agua destilada para recuperar el volumen inicial. Posteriormente, la solución se llevó a 35 °C y se añadió $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con agitación continua hasta alcanzar un pH 10. Una vez alcanzado el pH la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h para precipitar los compuestos inhibidores. Finalmente, el prehidrolizado detoxificado se llevó a pH 5,8 y se centrifugó para retirar cualquier precipitado.

3.4.3 Producción enzimática

Para iniciar la fermentación se añadió un 10% (v/v) de inóculo en matraces de 1 l con 150 ml de medio "Mandels" modificado y la correspondiente fuente de carbono. Además, el medio fue suplementado con tampón maleato (0,1 M de Trizma y 0,1 M de ácido maleico). El pH se ajustó a 5,8 utilizando NaOH y H_2SO_4 (10% (p/v)). En algunas fermentaciones se utilizaron como fuente de nitrógeno las vinazas procedentes de procesos de destilación de almidón, que fueron suministradas por la compañía Roal Oy (Finlandia). Las vinazas presentaron además cierto contenido en carbohidratos, concretamente un 18,6% de glucano y un 14,6% de xilano.

Las fermentaciones con *T. reesei* RUTC30 transcurrieron a 28-30 °C y 300 rpm durante 7-10 días. Se tomaron muestras diariamente, se centrifugaron 5 min a 3500 rpm y el sobrenadante se recogió para el análisis de azúcares reductores, actividades enzimáticas y contenido en proteínas. La concentración de azúcares reductores se determinó por el método DNS, mientras que las actividades celulasa y β -glucosidasa se midieron sobre papel de filtro y ρ NPG, respectivamente. El contenido de proteína durante las fermentaciones para producción de enzimas se determinó por el método "Bradford". Los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó el promedio de los parámetros medidos.

3.5 Enzimas

Las diferentes preparaciones enzimáticas estudiadas a lo largo de esta Tesis se muestran en la tabla 3.2. Compañías como “Novozymes” (Dinamarca) y “Genencor” (EEUU) han desarrollado distintas preparaciones enzimáticas para su aplicación en la producción de etanol a partir de lignocelulosa. Los preparados celulolíticos NS 50013, NS 50073, NS 50031, NS 22074, Cellic CTec, Accellerase 1000 y Accellerase 1500 proceden de *Trichoderma* spp, mientras que NS 50010 (“Novozymes”) proviene de *Aspergillus niger* y presenta fundamentalmente actividad β -glucosidasa. Las preparaciones NS 50030, NS 50014 y Cellic HTec, también de “Novozymes”, son preparaciones con actividad hemicelulasa de origen fúngico. Concretamente NS 50030 y NS 50014 proceden de *Aspergillus oryzae*.

También se han utilizado en este trabajo enzimas específicas obtenidas por recombinación genética, que han sido estudiadas como suplementos de los cócteles celulolíticos comerciales.

- Las **xilanasas A y C** (XlnA, y XlnC) son endoxilanasas de *Aspergillus nidulans* expresadas y producidas heterológamente por *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control de un promotor constitutivo (Fernández-Espinar y col., 1992; Pérez-González y col., 1996;).
- **α -L-arabinofuranosidasa (AF)** es una enzima de *Aspergillus niger* también producida por *S. cerevisiae* (Sánchez-Torres y col., 1996).
- **Celobiohidrolasas.** Se estudiaron dos β -celobiohidrolasas: H3AcP1 y P3D1-P2E3 obtenidas mediante técnicas de metagenómica a partir de heces de lombriz de tierra y expresadas en *S. cerevisiae*.
- **Endoglucanasa EGL**, obtenida mediante técnicas de metagenómica a partir de heces de lombriz de tierra y expresada en *S. cerevisiae*.
- **Expansinas:** estas enzimas fueron producidas mediante agroinfección transitoria sobre hojas de *Nicotiana benthamiana*. La expansina no tiene actividad hidrolítica pero puede actuar mejorando el efecto de las enzimas celulolíticas (Cosgrove, 2000).

Tabla 3.2. Resumen de enzimas utilizadas, procedencia y actividad principal.

Enzima	Actividad principal	Procedencia
NS 50013	Celulasa	Novozymes
NS 50010	β -glucosidasa	Novozymes
NS 50073	Celulasa	Novozymes
NS 50031	Celulasa	Novozymes
NS 22074	Celulasa	Novozymes
Cellic CTec	Celulasa	Novozymes
Accellerase 1000	Celulasa	Genencor
Accellerase 1500	Celulasa	Genencor
NS 50014	Xilanasa	Novozymes
NS 50030	Xilanasa	Novozymes
Cellic HTec	Xilanasa	Novozymes
XIn A y C	Endoxilanasa	Biópolis
AF	α -L-arabinofuranosidasa	Biópolis
CBH H3AcP1	Celobiohidrolasa	Biópolis
CBH P3D1-P2E3	Celobiohidrolasa	Biópolis
EGL	Endoglucanasa	Biópolis
Expansinas	-	Calantia

3.6 Determinación de actividades enzimáticas

3.6.1 Actividad sobre papel de filtro

La actividad sobre papel de filtro indica la capacidad celulolítica de una enzima, ya que refleja la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática utilizando celulosa purificada como sustrato, concretamente papel de filtro “Whatman” nº 1 (Ghose, 1987). La determinación de la actividad sobre papel de filtro se expresó como “unidades de papel de filtro por mililitro de preparación enzimática” (UPF/ml). La unidad sobre papel de filtro se define como una unidad internacional (UI), es decir como la formación de 1 μ mol de azúcares reductores liberados por minuto. Para la determinación de la actividad se incubaron las enzimas adecuadamente diluidas en tampón citrato 0,05 M, pH 5 con una tira de papel “Whatman” nº 1 a 50 °C durante 1 h. Tras el tiempo de incubación se añadieron 3 ml de reactivo DNS y la mezcla se llevó a ebullición durante 5 min. En la reacción con el DNS el grupo aldehído o cetona de los azúcares se oxida

pasando a grupo ácido mientras que el ácido 3,5-dinitro salicílico se reduce a ácido 3-amino-5 nitro salicílico (Miller, 1959). Una vez enfriadas las soluciones se diluyeron con 20 ml de agua destilada, midiendo la densidad óptica de la disolución a 540 nm (espectrofotómetro V-530, “software” JASCO). Para determinar la concentración de azúcares reductores se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de glucosa.

3.6.2 Actividad sobre Avicel

Avicel es un sustrato que puede ser utilizado para determinar actividad celobiohidrolasa (exoglucanasa), ya que tiene bajo grado de polimerización (DP) y baja accesibilidad (Zhang y col., 2006). La actividad enzimática se midió a 50 °C utilizando 10 mg/ml de Avicel (Avicel PH-101, Ref 11365, Sigma) en tampón citrato 0,05 M pH 5. Para ello, se añadieron 0,8 ml de sustrato y 0,2 ml de la enzima convenientemente diluida. La reacción se produjo en agitación continua (1000 rpm, incubador tubos “eppendorf”, “ThermoStar”), puesto que Avicel es insoluble en agua y precipita. La reacción se detuvo introduciendo los tubos en hielo y tras precipitar el Avicel durante 2 minutos o centrifugar en frío, se midieron los azúcares reductores en el sobrenadante por el método de “Somogyi-Nelson”. La actividad enzimática se evaluó a diferentes tiempos para comprobar la linealidad de la reacción y se expresó en UI/ml.

En la determinación de azúcares reductores mediante el método “Somogyi-Nelson” se utilizó también una recta patrón con glucosa. A cada muestra se le añadió inicialmente el reactivo I (“Somogyi”) y la mezcla se incubó durante 15 min a 100 °C. Tras enfriar, se añadió el reactivo II (“Nelson”), se diluyó con agua en proporción 1:12 y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

3.6.3 Actividad endoglucanasa

La actividad endoglucanasa se determinó utilizando carboximetilcelulosa (CMC) de baja viscosidad (Ref. C5678500G, Sigma) como sustrato. CMC presenta un alto DP por lo que se le considera un sustrato similar a la celulosa amorfa y adecuado para determinar la actividad endoglucanasa. Se añadieron 0,9 ml de CMC (20 mg/ml) y 0,1 ml de enzima convenientemente diluida en tampón citrato 0,05 M, pH 5. La mezcla se incubó a 50 °C y 500 rpm, y se fijaron diferentes tiempos de reacción para comprobar la linealidad. Tras finalizar la reacción se midieron los azúcares reductores

liberados por el método “Somogyi-Nelson” (al añadir el reactivo “Nelson” es necesario centrifugar la mezcla 5 min, 1500 rpm antes de medir la absorbancia). La actividad se expresó en UI/ml de preparación enzimática.

3.6.4 Actividad β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se ha determinado utilizando dos métodos distintos. En uno de ellos se utilizó el sustrato natural de esta enzima, la celobiosa (Ref. 22150, Fluka), y en el otro un sustrato sintético análogo a la celobiosa, el p -nitrofenil- β -D-glucopiranosido (p NPG) (Ref. N7006, Sigma). En ambos casos la actividad β -glucosidasa se expresó como UI/ml. En general en este trabajo, la actividad β -glucosidasa se refiere a la actividad sobre celobiosa, excepto cuando quede expresamente especificado en el texto que la actividad fue determinada sobre p NPG.

- Actividad sobre celobiosa

La actividad se midió a 50 °C utilizando una solución de celobiosa 0,015 M diluida en tampón citrato 0,05 M, pH 5. Una mezcla de 1 ml de celobiosa y 1 ml de la enzima, adecuadamente diluida, se incubaron durante 30 min (Ghose, 1987). Para detener la reacción la mezcla se mantuvo 5 min a 100 °C, tras lo que se midió la concentración de glucosa mediante un ensayo enzimático (Test enzimático de determinación de glucosa GAHK20, ref. G3293, Sigma). El método enzimático se basa en la formación de NADH mediante la acción de dos enzimas: una hexoquinasa que fosforila la glucosa liberando ADP, y una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que oxida la glucosa fosforilada, formándose una cantidad equimolar de NADH que se detecta a una longitud de onda de 340 nm. La concentración de NADH formado es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

- Actividad sobre p NPG

La actividad β -glucosidasa se determinó incubando en tampón citrato 0,05 M pH 5, 0,1 ml de p NPG (2 mg/ml) con 0,1 ml de enzima durante 10 min a 50 °C y 400 rpm (Bailey y Nevalainen, 1981). Tras el tiempo de incubación se añadieron 500 μ l de carbonato sódico 2% para detener la reacción y acentuar la coloración del p -nitrofenol que se produce durante la reacción catalizada por la β -glucosidasa. La concentración de p -nitrofenol es proporcional a la absorbancia determinada a una longitud de onda de 410 nm. La actividad se calculó mediante la expresión mostrada en la figura 3.4.

$$\text{mUI/ml} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\xi) \times 10^6}{t \text{ incubación (min)}} \times 7 \times \text{dilución de enzima}$$

Figura 3.4. Fórmula cálculo actividad enzimática. ΔAbs : Absorbancia. ξ : Coeficiente Extinción Molar, $\xi_{410}(\rho\text{-nitrofenol}) = 15200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.6.5 Actividad xilanasa

La actividad xilanasa se determinó utilizando 30 mg/ml de xilano de abedul (Ref. 95588, Sigma) en tampón citrato 0,05 M, pH 5 (Bailey y col., 1991). Se incubaron 0,2 ml de sustrato y 0,8 ml de enzima convenientemente diluida durante 15 min a 50 °C y 800 rpm, y tras terminar la reacción, la concentración de azúcares reductores se midió por el método "Somogyi-Nelson". La actividad se expresó en UI/ml.

3.6.6 Actividad β -xilosidasa

Para determinar la actividad β -xilosidasa se incubaron 0,1 ml de enzima con 0,1 ml del sustrato ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosido (ρ NPX) (Ref. N2132, Sigma) utilizando tampón citrato 0,05 M, pH 5 (Poutanen y col., 1987). La reacción transcurrió durante 30 min a 50 °C y 400 rpm, tras lo que se añadieron 500 μ l de carbonato sódico 2%. Se midió la absorbancia del ρ -nitrofenol liberado a 410 nm y la actividad (UI/ml) se calculó según la fórmula mostrada en la figura 3.4.

3.6.7 Actividad α -L-arabinofuranosidasa

Para la determinación de la actividad α -L-arabinofuranosidasa se utilizó como sustrato 0,1 ml de ρ -nitrofenil- α -D-arabinofuranósido (ρ NPA) (Ref. 73616 Fluka-Sigma) y se incubó con 0,1 ml de enzima (Poutanen y col., 1987). La reacción se realizó en tampón citrato 0,05 M pH 5 durante 15 min a 50 °C y 400 rpm, tras lo que se añadieron 500 μ l de carbonato sódico 2%. Se midió la absorbancia del ρ -nitrofenol liberado a 410 nm y se calculó la actividad como UI/ml (figura 3.4).

3.6.8 Determinación del contenido en proteína

Se han utilizado dos métodos de determinación de proteínas, el método “Bradford” utilizando el reactivo “Coomassie Blue G250” (Bradford, 1976) y el método BCA (ácido bicinconínico, “Protein Assay Kit”, ref. 23225-23227, Pierce). En ambos casos se utilizó la proteína albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. En las preparaciones que contienen sustancias que pueden interferir en la cuantificación de proteína se utilizó previamente un complemento del método BCA que reduce la concentración de estas sustancias (Compat-Able Protein Assay Preparation Reagent Set, Ref. 23215, Pierce).

Excepto cuando explícitamente se indique en el texto, para determinar el contenido en proteínas de las preparaciones enzimáticas se utilizó el método BCA.

3.6.9 Determinación del grado de sinergia

El **grado de sinergia** de dos enzimas se calculó considerando las mejoras aportadas individualmente por cada enzima respecto a la mejora de la suplementación conjunta. El grado de sinergia en cuanto a producción de glucosa de las enzimas xilanasas C (XInC) y α -L-arabinofuranosidasa (AF) en el apartado 4.8.2 se calculó con la expresión:

$$\text{Grado de sinergia} = \left(\left(\frac{\text{XInC+AF} - 1}{(\text{XInC}) + (\text{AF})} \right) - 1 \right) \times 100$$

“XInC+AF” es la producción de glucosa con la suplementación con XInC y AF; “XInC”, con la suplementación solo con XInC; y “AF”, con la suplementación solo con AF. El mismo cálculo se realizó para determinar el grado de sinergia de las celulasas y las expansinas en el apartado 4.8.4.

3.7 Ensayos de hidrólisis enzimática (HE)

Los ensayos de hidrólisis enzimática (HE) se realizaron bajo distintas condiciones dependiendo del objetivo del estudio. Se utilizaron dos tipos de ensayos de HE; microensayos enzimáticos, cuyo método ha sido validado en esta Tesis (apartado 4.5) y ensayos estándar en matraces “erlenmeyer”. En ambos casos las mezclas de las enzimas y el sustrato se realizaron en un medio tampón citrato 0,05 M a pH 5 (tampón acetato 0,05 M a pH 4,8 en apartado 4.3.2.2) y se incubaron a una temperatura de 50 °C. El sustrato se añadió según su contenido en sólidos totales (ST), o bien según su contenido en sólidos insolubles (RSI). La carga de sustrato se ajustó en porcentaje peso/peso (p/p), quedando especificado en el texto cuando se realizó en peso/volumen (p/v).

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado durante un tiempo máximo de 72-96 h. Se tomaron muestras periódicamente, las cuales se incubaron a 100 °C durante 5 min para inactivar las enzimas. Tras centrifugar 5 min a 13200 rpm, los sobrenadantes se recogieron y filtraron para determinar la concentración de azúcares por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, apartado 3.9.2). Los resultados presentados corresponden a los valores medios de los triplicados.

3.7.1 Microensayos enzimáticos

Los microensayos enzimáticos se realizaron en tubos “ependorf” de 2 ml y microplacas de 48 pocillos. En 0,5 ml de tampón citrato 0,05 M pH 5 se incubaron las hojas de paja de trigo (apartado 3.3) junto con las enzimas utilizadas en cada caso. La hoja de paja de trigo pretratada se añadió manualmente en cada tubo o pocillo en forma de discos perforados, cada uno de ellos con una masa de $2,3 \pm 0,1$ mg. Para favorecer la agitación se añadió una pequeña bola metálica en cada tubo o pocillo. El ensayo se realizó en un incubador de placas (ThermoStar, amplitud de agitación: 3 mm, figura 3.5) a 50 °C y 800 rpm. Las microplacas se sellaron con un adhesivo (NUNC, ref. 236707) para minimizar las pérdidas por evaporación durante la HE. En los experimentos con MPC como medio de HE se añadió en cada ensayo, junto con los discos de paja pretratada, el prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV en la misma proporción que en el MPC original.

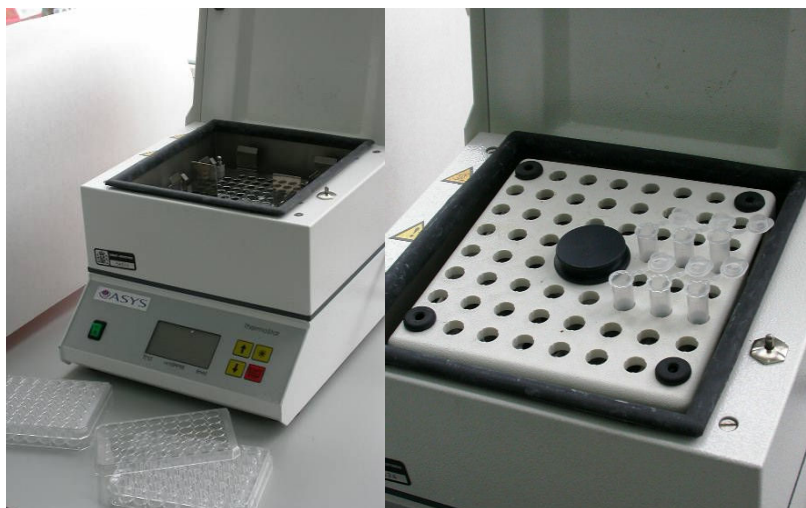


Figura 3.5. Incubador de microplacas y tubos “eppendorf”.

3.7.2 Ensayos de HE en matraz

Se realizaron en matraces “erlenmeyer” de 100 ml en un incubador orbital (CERTOMAT IS, amplitud de agitación; 25 mm) a 50 °C y 150 rpm en tampón citrato 0,05M, pH 5. Como sustratos se han utilizado tanto el RSI como el MPC obtenidos tras el pretratamiento por EV en concentraciones variables según los diferentes ensayos (1-20% sólidos totales). Las enzimas utilizadas se añadieron al medio de HE en las dosis definidas para cada ensayo.

3.8 Ensayos de fermentación

3.8.1 Microorganismos y preparación del inóculo

Se utilizaron dos cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en los ensayos de fermentación: “Ethanol Red” y F12. *S. cerevisiae* “Ethanol Red” es una cepa suministrada por la compañía “Fermentis” capaz de fermentar la glucosa a etanol. *S. cerevisiae* F12 fue suministrada por la Prof.^a Lisbeth Olsson (Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Chalmers, Suecia). Esta cepa ha sido modificada genéticamente con dos genes de la levadura *Pichia stipitis* implicados en las rutas metabólicas de la xilosa, por lo que es capaz de co-fermentar a etanol tanto glucosa como xilosa (Sonderegger y Sauer, 2003).

En el caso de la cepa “Ethanol Red” el preinóculo se preparó a partir de la levadura liofilizada utilizando como medio de cultivo 30 g/l de glucosa, 5 g/l de extracto levadura, 2 g/l NH_4Cl , 1 g/l KH_2PO_4 y 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El cultivo se mantuvo durante 16 h a 32 °C y 150 rpm en un incubador orbital. Los preinóculos con la cepa F12 se prepararon tomando una colonia individual de los cultivos en placas de agar-YPD e inoculando matraces con medio de cultivo “Delft”. Este medio contiene 20 g/l de glucosa, 20 g/l de xilosa, 7,5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ml/l de solución con elementos traza y 1 ml/l de solución con vitaminas. Tras el tiempo fijado el cultivo de preinóculo se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Las células contenidas en el “pellet” se pesaron y diluyeron en función del tamaño de inóculo fijado para iniciar las fermentaciones.

3.8.2 Ensayos de fermentación y de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado en matraces de 100 ml con 25-50 ml de tampón citrato 0,05 M pH 5. Se realizaron ensayos de fermentación con una etapa previa de presacarificación a 50 °C, ensayos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y ensayos de sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS), en los que se utilizó como fuente de carbono distintas concentraciones de MPC y RSI procedentes del pretratamiento por EV de la paja de trigo. Para iniciar las fermentaciones se añadió a los matraces un tamaño de inóculo de 1-2 g/l y el proceso transcurrió durante 72-144 h a 32-35 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras a lo largo de la fermentación para determinar la concentración de etanol y de azúcares en el medio por cromatografía de gases y cromatografía líquida (HPLC), respectivamente (apartado 3.9.2 y 3.9.3).

En el caso de las fermentaciones con *S. cerevisiae* “Ethanol Red” se añadieron al medio 2,5 g/l de extracto levadura, 2 g/l NH_4Cl , 1 g/l KH_2PO_4 y 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. En el estudio de estrategias de adición de xilanasas (apartado 4.9) los medios de SFS (con “Ethanol Red”) y SSCF (con la cepa F12) se suplementaron con 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 ml/l de solución con elementos traza y 1 ml/l de solución con vitaminas.

3.9 Determinaciones analíticas

3.9.1 Composición de la materia prima y del material pretratado

La composición química de la paja de trigo se determinó según los métodos analíticos estándar para determinación de carbohidratos estructurales, cenizas y lignina en biomasa lignocelulósica (LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-005, LAP-010) desarrollados por el “National Renewable Energies Laboratory” de EEUU (NREL, 2007). En la figura 3.6 se muestra el esquema seguido para el análisis de composición tanto de la materia prima como de la fracción sólida del material pretratado (RSI), exceptuando en este caso la determinación de extractivos.

La metodología LAP-002 se utiliza para la determinación de carbohidratos estructurales y se basa en el contenido de azúcares monoméricos. Se realiza una hidrólisis completa de los polisacáridos mediante un proceso de hidrólisis ácida en dos fases, la primera con ácido sulfúrico concentrado (72%) a 37 °C y la segunda con ácido diluido (4%) a 121 °C. Los azúcares en el hidrolizado se cuantifican mediante HPLC, y se asume que la glucosa procede de la celulosa y que la xilosa, arabinosa, manosa y galactosa proceden de la hemicelulosa. Para ello se aplica un factor de corrección de 1,1 para las hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y de 1,13 para las pentosas (xilosa y arabinosa) que tiene en cuenta la molécula de agua que se desprende al formarse el enlace glucosídico.

La lignina ácido soluble en el hidrolizado se mide por espectroscopía UV a 205 nm (LAP-003) y la ácido insoluble se calcula gravimétricamente sobre el residuo obtenido tras la hidrólisis completa con ácido sulfúrico (LAP-004). El contenido en cenizas totales se determina por calcinación a 550 °C (LAP-005), mientras que en la determinación de extractivos se lleva a cabo una doble extracción con agua y etanol (LAP-010).

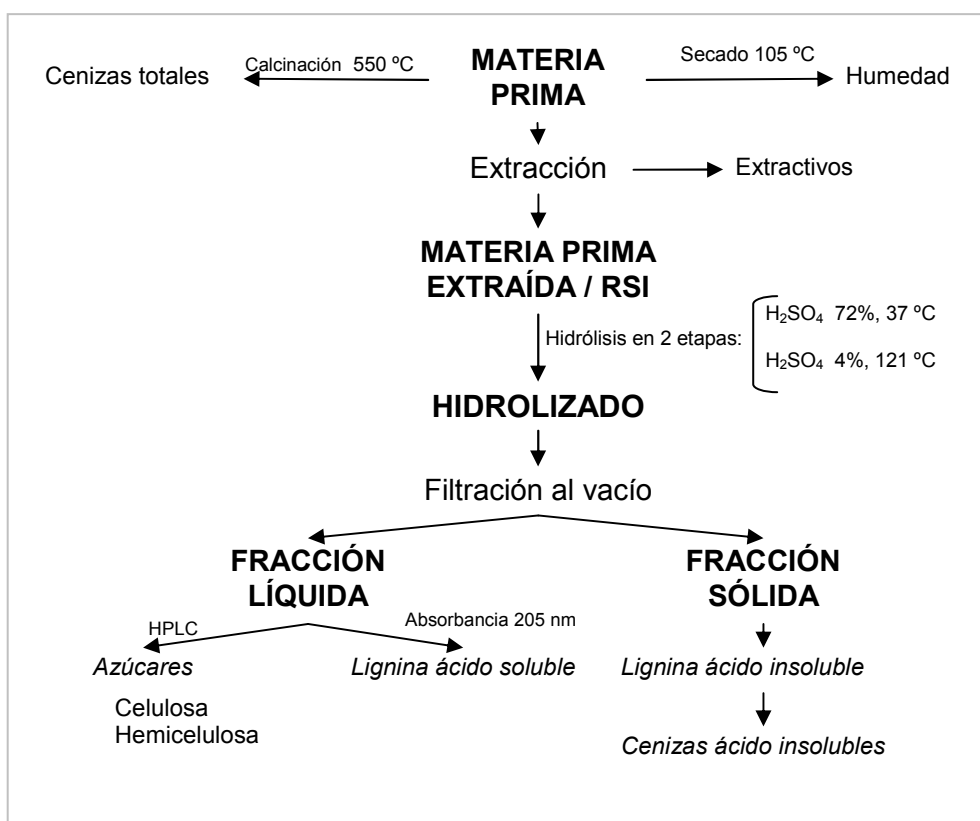


Figura 3.6. Esquema de los métodos para el análisis de composición del material lignocelulósico.

En el prehidrolizado se analizó la composición en azúcares y productos de degradación generados durante el pretratamiento. Para la determinación de azúcares se tomó una alícuota, en la que se determinó por HPLC la concentración de azúcares monoméricos. Tras una hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% (v/v) a 121 °C durante 30 min se determinó el contenido en azúcares totales. La diferencia entre las dos concentraciones (totales y monoméricos) indica la concentración de azúcares en forma oligomérica en el prehidrolizado.

3.9.2 Análisis de azúcares y productos de degradación

La concentración de azúcares y de los ácidos fórmico y acético se determinó mediante HPLC con un cromatógrafo de líquidos "Waters" equipado con un detector de índice de refracción 2414. Para la determinación de azúcares se utilizó una columna de análisis de carbohidratos "Transgenomic CarboSep" CHO-682 a una temperatura de 80 °C con agua desionizada como fase móvil y un flujo de 0,5 ml/min. La concentración de los ácidos acético y fórmico se cuantificó con una columna de exclusión iónica "Aminex" HPX-87H (BioRad Labs, Hercules, EEUU) a una

temperatura de 65 °C con ácido sulfúrico 0,05 M como fase móvil y un flujo de 0,6 ml/min.

Los compuestos de degradación furfural, hidroximetilfurfural, vainillina, 4-hidroxibenzaldehído, ácido ferúlico y ácido cumárico se determinaron con un cromatógrafo de líquidos “Agilent” (Waldbronn, Alemania) equipado con una columna de exclusión iónica “Aminex” HPX-87H (BioRad Labs, Hercules, EEUU) y un detector “Agilent 1050 photodiode-array” (Waldbronn, Alemania). El análisis se realizó con una fase móvil de 89% ácido sulfúrico 0,05 M - 11% acetonitrilo a 65 °C y un flujo de 0,7 ml/min.

3.9.3 Determinación de la concentración de etanol

La concentración de etanol se analizó mediante cromatografía de gases con un aparato “Hewlett Packard” 5890 serie II equipado con un inyector automático “Agilent” serie 6890 (T^a: 150 °C) y un detector de ionización de llama (FID, T^a: 150 °C). Se utilizó una columna “Carbowax” 20 M (2 m x 1/8 in) a una temperatura de 85 °C, con helio como gas portador y un flujo de 30 ml/min.

3.10 Cálculo de rendimientos

El **rendimiento de HE** se determinó teniendo en cuenta el contenido de azúcares (glucosa o xilosa) potencial en los sustratos empleados. Cuando se utilizó el RSI como sustrato el rendimiento se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento HE} = \frac{\text{Azúcares obtenidos en HE}}{\text{Azúcares potenciales en RSI}} \times 100$$

En el caso de la utilización de MPC como sustrato se tuvo en cuenta el contenido de azúcares en forma oligomérica al inicio del ensayo, por lo que los rendimientos se calcularon generalmente de esta forma:

$$\text{Rendimiento HE} = \frac{\text{Azúcares obtenidos en HE}}{\text{Azúcares potenciales en RSI} + \text{Azúcares solubles en forma oligomérica}} \times 100$$

Excepcionalmente, en los resultados presentados en el apartado 4.5 (validación del microensayo enzimático) los rendimientos de HE sobre el MPC no contemplaron los azúcares oligoméricos, por lo que se calcularon según el contenido en azúcares del RSI.

Los **rendimientos de fermentación** y de los procesos de SFS y SCFS se calcularon considerando un rendimiento teórico de HE del 100% y el rendimiento de fermentación de la levadura. El rendimiento teórico de fermentación de la cepa *S. cerevisiae* "Ethanol Red" se determinó experimentalmente sobre un medio sintético con 30 g/l de glucosa, siendo de 0,46 g etanol/g glucosa. Para la cepa *S. cerevisiae* F12 se asumieron rendimientos de fermentación de 0,46 y 0,26 g etanol/g para glucosa y xilosa, respectivamente (Sonderegger y col., 2004).

$$\text{Rendimiento Etanol "Ethanol Red"} = \frac{\text{Etanol obtenido}}{\text{Glucosa en material pretratado} \times 0,46} \times 100$$

$$\text{Rendimiento Etanol F12} = \frac{\text{Etanol obtenido}}{(\text{Glucosa en material pretratado} \times 0,46) + (\text{Xilosa en material pretratado} \times 0,26)} \times 100$$

3.11 Análisis estadístico

En la validación de los microensayos enzimáticos se utilizó el programa SPSS 11.5 para elaborar análisis de varianza (ANOVA) e identificar posibles diferencias entre las condiciones estudiadas. El test ANOVA detecta diferencias entre las medias de varios grupos. El nivel de confianza para identificar diferencias estadísticamente significativas fue de 95,0%. El programa "Statgraphics Plus 5.0" se utilizó también para análisis estadísticos de los resultados. El test "Tukey HSD" se realizó para detectar diferencias significativas entre distintos tratamientos con un nivel de confianza de 95%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Materia prima

La composición química de la biomasa lignocelulósica es un factor importante que afecta significativamente la producción de etanol. En la tabla 4.1 se muestra la composición de la paja de trigo empleada en este trabajo. La celulosa y la hemicelulosa son los componentes mayoritarios con un 40,2% y un 25,7%, respectivamente, por lo que el contenido total en carbohidratos estructurales, que pueden ser hidrolizables y posteriormente fermentables, supone un 65,9% del peso seco de la paja de trigo. El alto contenido en carbohidratos hace de la paja de trigo un sustrato apropiado para la producción de etanol. El contenido en hemicelulosa de la paja de trigo varía generalmente entre un 20 y un 30% del peso total, por lo que su transformación en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas hemicelulolíticas y la posterior transformación de los azúcares en etanol puede aumentar notablemente los rendimientos globales del proceso.

Aunque la proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina puede variar según la variedad del trigo, el fertilizante utilizado o el contenido en minerales del suelo (Öhgren y col., 2006b), la composición de la paja de trigo utilizada en este trabajo fue similar a la determinada en anteriores trabajos con paja de trigo procedente de la misma zona geográfica (Ballesteros y col., 2006; Pérez y col., 2008; Tomás-Pejó y col., 2008b).

Como se muestra en la tabla 4.1 la hemicelulosa de la paja de trigo está compuesta fundamentalmente por xilosa y menores cantidades de arabinosa, galactosa y manosa. Las moléculas de xilosa forman cadenas de xilano que están monosustituidas por unidades de otros azúcares como arabinosa o galactosa. Estos sustituyentes monoméricos de la hemicelulosa forman enlaces éster con intermediarios de la lignina, como los ácidos ρ -cumárico y ferúlico, a través de los cuales se establecen las principales uniones a la lignina (Sun y col., 1999).

El contenido en lignina (19,3%) fue similar al encontrado en otras biomásas herbáceas como la paja de cebada o el bagazo de maíz (García-Aparicio y col., 2006; Öhgren y col., 2005). Aunque en el caso de los materiales herbáceos la estructura química de la lignina y las interacciones de sus componentes no son del todo conocidas, se han estimado proporciones aproximadas de unidades ρ -hidroxifenilo, siringilo y guayacilo de 5, 46 y 49%, respectivamente (Buranov y Mazza, 2008).

Los extractivos (resinas, grasas, ceras, ácidos grasos, etc...) suponen un porcentaje considerable de la materia prima, un 14,3%, mientras que el alto contenido en cenizas (4,8%) puede explicarse por el uso de fertilizantes durante el cultivo (Olanders y Steenari, 1995).

Tabla 4.1. Composición de la paja de trigo (% peso seco).

Celulosa	40,2 ± 2,2
Hemicelulosa	25,7 ± 1,9
Xilosa	22,4 ± 1,1
Galactosa	1,0 ± 0,1
Arabinosa	2,1 ± 0,4
Manosa	0,2 ± 0,1
Lignina ácido soluble	1,7 ± 0,3
Lignina ácido insoluble	17,6 ± 1,2
Cenizas	4,8 ± 0,4
Extractivos	14,3 ± 0,8

4.2 Pretratamiento por explosión por vapor (EV)

La primera etapa en un proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de lignocelulosa es el pretratamiento de la materia prima. El objetivo del pretratamiento es alterar la estructura de la fibra lignocelulósica, de tal forma que las enzimas puedan acceder a la celulosa y hemicelulosa y catalizar su hidrólisis para obtener azúcares fermentables. En este trabajo se ha empleado el pretratamiento por explosión por vapor (EV), que combina efectos mecánicos y químicos. La biomasa se somete dentro del reactor a la acción del vapor saturado directo. En condiciones de alta temperatura y presión se produce la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa y la formación de ácido acético, que disminuye el pH y favorece una reacción química de autohidrólisis. Además de este efecto, la brusca despresurización del reactor provoca un cambio de estado del agua dentro de las fibras, que causa una alteración física de las mismas.

Tras el pretratamiento se obtiene el **material pretratado completo (MPC)**, en el que puede separarse una fracción líquida y una sólida. La fracción sólida o **residuo sólido insoluble (RSI)** contiene principalmente celulosa y lignina, así como proporciones menores de hemicelulosa. La hemicelulosa es más lábil y fácilmente

hidrolizable que la celulosa, por lo que se solubiliza en proporción variable durante el pretratamiento. Por lo tanto, **la fracción líquida o prehidrolizado** contiene, además de otros compuestos solubles, los componentes solubilizados de la hemicelulosa tanto en forma oligomérica como en forma de azúcares libres.

En función de las condiciones del pretratamiento; temperatura, tiempo de residencia, tamaño de partícula o humedad, el material pretratado presenta una composición diferente (Ballesteros y col., 2002; Kabel y col., 2006; Negro y col., 2003). En general, una mayor severidad del pretratamiento (mayor temperatura y tiempo de residencia) tiene un efecto más agresivo sobre la estructura de la lignocelulosa, produce una mayor solubilización de la hemicelulosa y mejora la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Sin embargo, condiciones excesivamente altas de temperatura, presión y tiempo de residencia, provocan degradación de los carbohidratos y de la lignina, generando pérdida de azúcares y un aumento en la concentración de compuestos que son inhibidores de las enzimas y/o microorganismos en las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a-b). Por lo tanto, para evaluar y determinar las condiciones óptimas del pretratamiento se deben tener en cuenta diversos factores como la composición del RSI, el rendimiento de hidrólisis enzimática (HE) del RSI, la recuperación de azúcares solubles y la concentración de productos tóxicos o inhibidores generados en el prehidrolizado.

En esta Tesis, con objeto de obtener materiales pretratados con distinta composición de sólidos solubles e insolubles, y estudiar el efecto de la suplementación de las celulasas con enzimas accesorias sobre la HE, se han utilizado dos temperaturas de pretratamiento: 210 °C y 220 °C, manteniendo en ambos casos un tiempo de residencia de 2,5 min. La composición de los diferentes lotes de materiales pretratados empleados se resume en la tabla 4.2. El material pretratado I corresponde al pretratamiento realizado a 220 °C y 2,5 min, mientras que los materiales pretratados II, III y IV fueron sometidos a pretratamientos a 210 °C y 2,5 min. La concentración de sólidos totales y de sólidos insolubles en el material pretratado a 220 °C fue de 23% y 15,7%, respectivamente. En los materiales pretratados a 210 °C, la concentración de sólidos totales varió entre 28-31% y la de sólidos insolubles entre 19 y 23%.

En todos los casos, el pretratamiento por EV produjo una solubilización parcial de la hemicelulosa, por lo que aumentó la proporción de celulosa y lignina en el RSI. El contenido en celulosa de la materia prima fue de 40,2%, mientras que en el RSI el contenido de celulosa varió entre 49,7 y 66,4%. Se observó también que las

condiciones más severas de pretratamiento (220 °C, 2,5 min) provocaron una mayor solubilización de la hemicelulosa, cuya proporción en el RSI (3,7%) fue menor que en los RSI pretratados a 210 °C (7,8-12,1%). La proporción de celulosa en el RSI pretratado a 220 °C fue de 66,6% mientras que en los RSI pretratados a 210 °C varió entre 49,7 y un 59,4%.

La fracción líquida o prehidrolizado contiene fundamentalmente los azúcares solubilizados de la fracción hemicelulósica (mayoritariamente en forma oligomérica) y los productos de degradación originados durante el pretratamiento (tabla 4.2). Con el pretratamiento a 220 °C se recogieron 341 ml de prehidrolizado por cada 100 g de materia prima, mientras que con el pretratamiento a 210 °C se recogieron entre 203 y 257 ml por 100 g materia prima. Por lo general, con el pretratamiento menos severo a 210 °C se recupera más glucosa y xilosa soluble en forma oligomérica. Además, en los materiales pretratados a 210 °C también se detectaron cantidades mayores de arabinosa, galactosa y manosa en forma oligomérica.

Además de los azúcares solubles, el compuesto encontrado en mayor concentración en el prehidrolizado fue el ácido acético, originado a partir de la hidrólisis de los grupos acetilo de la fracción hemicelulósica. Como muestra la tabla 4.2, el pretratamiento a 220 °C produjo 2,18 g/100 g materia prima de ácido acético, mientras que en los pretratamientos a 210 °C el contenido fue menor, variando entre 0,81 y 1,65 g por cada 100 g de materia prima. En el pretratamiento menos severo (210 °C) se solubilizó menos hemicelulosa, lo que conllevó una menor hidrólisis de los grupos acetilo y por lo tanto menor contenido de ácido acético soluble. De esta forma, el pH del prehidrolizado fue más alto (3,5-3,7) en comparación con el prehidrolizado a 220 °C (3,2), lo que explicaría el contenido mayor de azúcares en forma oligomérica obtenido en los ensayos a 210 °C.

El furfural y el HMF proceden de la degradación de la xilosa y la glucosa, respectivamente. Se determinaron rangos de concentración de 0,14-0,62 g de furfural y 0,04-0,20 g de HMF por cada 100 g de materia prima. En todos los casos, el HMF se encontró en menor concentración debido a que en la hemicelulosa de los materiales herbáceos las hexosas (glucosa) son minoritarias. El furfural y el HMF pueden continuar degradándose y formar ácido fórmico, que se determinó en una concentración de 0,34-0,89 g/100 g materia prima. Además, se produjeron pequeñas cantidades (<0,01 g/100 g materia prima, no mostrado) de productos de degradación de la lignina como vainillina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y 4-hidroxibenzaldehído.

Como se observa en la tabla 4.2, en general, la formación de compuestos de degradación fue superior durante el pretratamiento más severo, a 220 °C y 2,5 min, en comparación con los pretratamientos a 210 °C y 2,5 min.

Los productos de degradación detectados han sido identificados previamente en rangos de concentración similares en prehidrolizados a partir de paja de trigo (Tomás-Pejó y col., 2008b), paja de cebada (García-Aparicio y col., 2006) o bagazo de maíz (Öhgren y col., 2005) pretratados por EV.

Tabla 4.2. Composición de la paja de trigo pretratada por explosión por vapor: Residuo sólido insoluble (RSI) y prehidrolizado.

Condiciones pretratamiento	Material pretratado 220 °C, 2,5 min		Material pretratado 210 °C, 2,5 min					
	I		II		III		IV	
% Recuperación glucosa MPC	100		91,5		87,5		78,1	
% Recuperación xilosa MPC	29		67,1		57,7		48,5	
RSI (g/100 g material pretrado)								
Celulosa	66,4		59,4		55,9		49,7	
Hemicelulosa	3,7		8,8		7,8		12,1	
Xilano	3,6		8,6		7,7		10,5	
Arabinano	0,1		0,2		0,1		0,4	
Otros	-		-		-		1,2	
Lignina	29,4		29,1		29,6		31,8	
Cenizas	4,1		4,3		4,9		4,3	
Prehidrolizado (g/100 g material prima)								
Azúcares								
	Monóm.	Olig.	Monóm.	Olig.	Monóm.	Olig.	Monóm.	Olig.
Glucosa	0,24	0,92	0,23	1,50	0,23	1,29	0,26	0,41
Xilosa	1,50	6,55	1,09	10,1	1,42	8,07	0,55	4,20
Arabinosa	0,14	0,13	0,20	0,28	0,16	0,16	0,20	0,10
Galactosa	0,07	0,13	0,05	0,28	0,07	0,20	0,10	0,18
Manosa	-	0,13	0,03	0,10	0,05	0,10	0,06	-
Productos de degradación								
Furfural	0,62		0,39		0,36		0,14	
HMF	0,14		0,20		0,20		0,04	
Ácido fórmico	0,89		0,69		0,81		0,34	
Ácido acético	2,18		1,39		1,65		0,81	

Para valorar la eficacia del pretratamiento se realizó un ensayo estándar de HE utilizando la fracción sólida (RSI) a una concentración de 10% (p/p) y las enzimas NS 50013 y NS 50010 en una dosis de 15 UPF y 15 UI β -glucosidasa/g celulosa, respectivamente. Con los distintos RSI pretratados a 210 °C se obtuvo un rendimiento de HE en base a glucosa de 74,0-81,3%, mientras que con el RSI pretratado a 220 °C el rendimiento fue de 84,9%. Como cabía esperar, el pretratamiento más severo permitió alcanzar rendimientos de HE ligeramente superiores. No obstante, con ambas condiciones de pretratamiento se obtuvieron rendimientos relativamente altos, lo que demuestra la efectividad de la explosión por vapor como pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para facilitar el acceso de la celulosa al ataque enzimático.

4.3 Producción de enzimas celulolíticas

El coste de la producción de los catalizadores enzimáticos y, en general, del proceso de HE de la biomasa lignocelulósica es una de las etapas que más contribuye al precio final del bioetanol, y por lo tanto supone uno de los principales obstáculos para su producción comercial. En la última década las principales industrias biotecnológicas han avanzado en el desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos más eficientes y a menor coste, así como en la investigación de organismos con mejores capacidades de producción de enzimas celulolíticas. A pesar de estos avances, es necesario seguir progresando en la reducción del coste de producción de los preparados enzimáticos. Una de las opciones más interesantes es la optimización de la producción de enzimas mediante la utilización de medios de cultivo de bajo coste y apropiados para la inducción de cócteles enzimáticos equilibrados.

El hongo *Trichoderma reesei* es la principal fuente industrial de enzimas celulolíticas. Este microorganismo es capaz de secretar altos niveles de celulasas y degradar eficientemente los polisacáridos contenidos en la pared vegetal, por lo que se ha utilizado tradicionalmente para la producción de enzimas en sectores como la industria alimentaria o papelera. La producción de celulasas por *T. reesei* se realiza generalmente mediante fermentaciones en estado líquido o sumergidas, durante las que el hongo excreta las enzimas hidrolíticas al medio de cultivo.

Los materiales lignocelulósicos pretratados, además de materia prima para la producción de etanol, pueden ser una alternativa interesante y barata como fuente de

carbono para la producción de las enzimas necesarias en el proceso de producción de etanol. Además, existe cierta evidencia en la bibliografía de que la utilización de un determinado sustrato como fuente de carbono puede inducir la producción de un cóctel enzimático con características especialmente apropiadas para la HE de ese mismo sustrato (Juhász y col., 2005b). En esta Tesis, además de estudiar el comportamiento de los preparados celulolíticos desarrollados industrialmente por compañías como “Novozymes” o “Genencor” (en los siguientes apartados), se ha estudiado la posibilidad de utilizar la paja de trigo pretratada por EV como fuente de carbono en la producción de enzimas con el *T. reesei* RUTC30. Las mezclas enzimáticas obtenidas se evaluaron utilizando como sustrato en la HE paja de trigo pretratada por EV.

4.3.1 Efecto del control del pH en la producción enzimática de *T. reesei* RUTC30

El pH del medio de cultivo es uno de los factores determinantes en el crecimiento y producción enzimática de *T. reesei* RUTC30 (Juhász y col., 2004). Con objeto de determinar el efecto del pH sobre la producción de enzimas celulolíticas, se realizaron varias fermentaciones utilizando 10 g/l de Solka Floc (SF) como fuente de carbono. A pesar de ser comercializada como celulosa purificada, SF contiene, según los análisis realizados, un 77,9% de celulosa y un 12,9% de hemicelulosa (90,8% de carbohidratos), una composición similar a la determinada por otros autores (Juhász y col., 2005b).

Se realizaron tres tipos de ensayo: un ensayo control sin ajuste de pH, un ensayo con ajuste diario de pH y un ensayo utilizando tampón maleato (0,1 M). Como se muestra en la figura 4.1, en el ensayo control el pH disminuyó a lo largo de la fermentación hasta estabilizarse en torno a un valor de 3,3. La disociación del sulfato amónico, utilizado como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo puede provocar la liberación de protones causante de la bajada de pH (Juhász y col., 2004). En las fermentaciones en las que el pH se corrigió diariamente, éste disminuyó tras el ajuste diario hasta los 4 días de fermentación. A partir de ese momento, se mantuvo constante alrededor de 6. En los ensayos con tampón maleato el pH se mantuvo estable en torno a 5,8-6,0 durante todo el proceso.

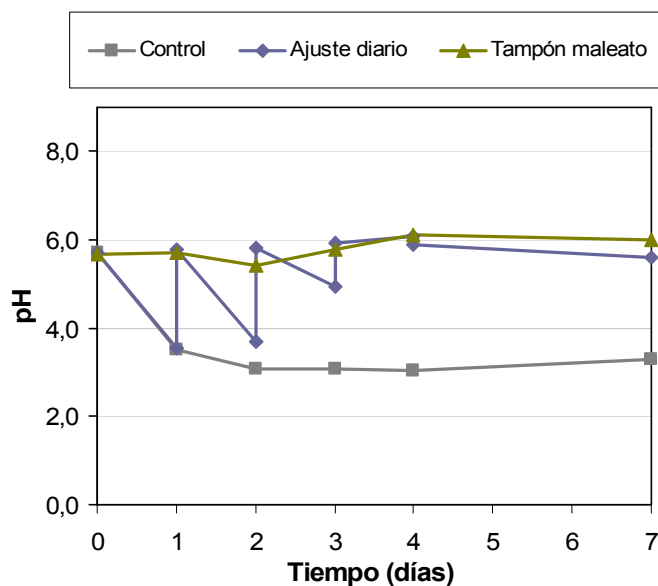


Figura 4.1. Variación del pH a lo largo de la fermentación con *T. reesei* RUTC30. Fuente de carbono: SF, 10 g/l.

En la figura 4.2, se muestran las actividades enzimáticas y el contenido en proteínas (determinado por el método “Bradford”) durante las distintas fermentaciones. La inestabilidad del pH afectó negativamente al crecimiento y al metabolismo secundario del hongo, lo que conllevó una menor producción de enzimas extracelulares cuando el pH se controló. La actividad celulasa sobre papel de filtro fue considerablemente mayor cuando se utilizó tampón maleato en el medio de fermentación, alcanzándose una actividad máxima de 2,0 UPF/ml. En los ensayos en los que el pH se ajustó diariamente, la actividad celulasa fue más baja que en los ensayos con tampón maleato, ya que tras el ajuste diario el pH disminuyó rápidamente. No obstante, en estos ensayos la actividad al final de la fermentación también fue ligeramente superior a la obtenida en el ensayo control, sin ajuste de pH. Según se observa en la figura 4.2, hasta los dos días de fermentación no hay efecto del control del pH sobre la producción de proteína. Sin embargo, a partir de ese momento la concentración de proteína y las actividades enzimáticas aumentan significativamente en el ensayo con tampón maleato, en el que el pH se mantiene en torno a 6.

La producción de β -glucosidasa (determinada sobre pNPG) también fue más alta en los ensayos con tampón maleato. La máxima producción se alcanzó a las 48-72 h del proceso, aunque hay que tener en cuenta que cierta proporción de esta enzima queda unida al micelio del hongo, y por tanto no se detecta en el

sobrenadante. La producción de β -glucosidasa en la fermentación sin ajuste de pH fue muy baja, lo que sugiere que la expresión de esta enzima es especialmente sensible a las variaciones de pH. En vista de los resultados obtenidos, en ensayos posteriores se utilizó tampón maleato en las fermentaciones con *T. reesei* RUTC30.

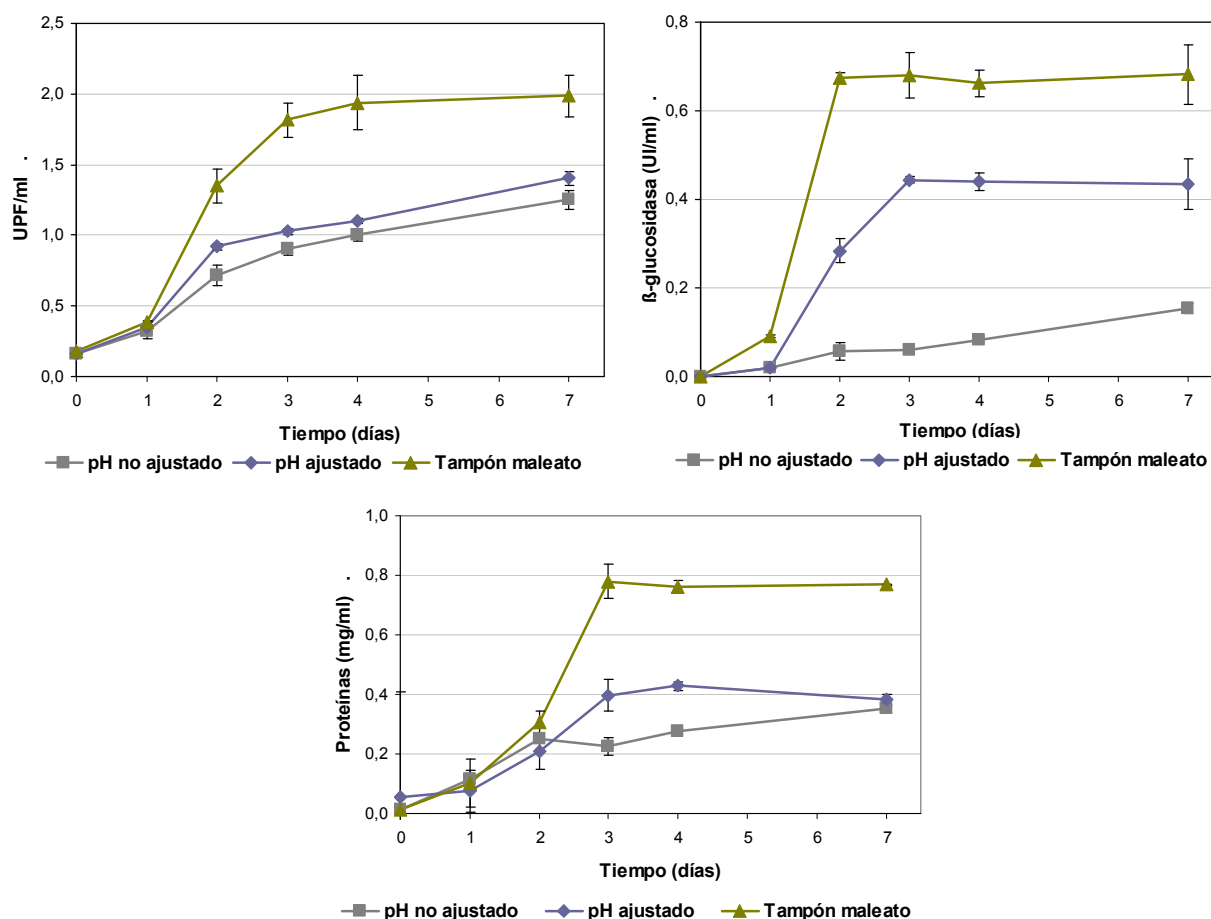


Figura 4.2. Efecto del control del pH sobre la actividad sobre papel de filtro (UPF/ml), actividad β -glucosidasa (UI/ml) y contenido en proteína (mg/ml) a lo largo de la fermentación con *T. reesei* RUTC30. Fuente de carbono: SF, 10 g/l.

4.3.2 Producción de enzimas utilizando paja de trigo pretratada como fuente de carbono

La utilización de paja de trigo pretratada por EV puede ser una alternativa interesante y de bajo coste como fuente de carbono para la producción de enzimas celulolíticas en cultivos con *T. reesei* RUTC30. Como se ha explicado en el apartado 4.2, tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo se obtiene un material pretratado (MPC) que puede separarse en un residuo sólido insoluble (RSI), compuesto

principalmente por celulosa y lignina; y un prehidrolizado que contiene azúcares hemicelulósicos solubilizados y productos de degradación. El RSI es un sustrato rico en celulosa y no contiene compuestos de degradación que pueden ser tóxicos para el hongo. Por su parte, el MPC contiene oligómeros solubles procedentes de la hemicelulosa, que pueden actuar como inductores de la expresión de proteínas en *T. reesei*. En estos experimentos, se estudió el potencial tanto del RSI como del MPC de paja de trigo pretratados a 220 °C y 2,5 min (material pretratado I, tabla 4.2) como fuentes de carbono para la producción enzimática.

4.3.2.1 Evaluación de la producción enzimática sobre RSI y MPC de paja de trigo como fuentes de carbono

El MPC y el RSI de paja de trigo pretratada se utilizaron como fuentes de carbono en fermentaciones con *T. reesei* RUT C30 en una concentración de 10 g/l de carbohidratos. Como control se utilizó Solka Floc (SF) a la misma concentración. La figura 4.3 muestra las actividades enzimáticas y el contenido en proteínas determinados a lo largo de los 7 días de fermentación. Se observó que, tanto las actividades enzimáticas (papel de filtro y β -glucosidasa) como el contenido en proteínas, fueron más altos cuando se utilizó SF como fuente de carbono. SF es un sustrato rico en carbohidratos (90,8%), con apenas contenido en lignina. Resultados similares se han obtenido en otros trabajos, que han mostrado el potencial de SF y otras celulosas purificadas como eficientes inductores de la producción de enzimas por *T. reesei* (Hayward y col., 2000; Olsson y col., 2003; Sipos y col., 2009).

En los tres ensayos la actividad sobre papel de filtro se estabilizó a partir del tercer día de incubación. Sin embargo, la actividad β -glucosidasa muestra una tendencia creciente entre el día 4 y 7, especialmente en la fermentación en la que se utilizó SF como fuente de carbono. Este aumento puede estar relacionado con la utilización de tampón maleato. Juhász y col. estudiaron la producción de β -glucosidasa con *T. reesei* utilizando tampón maleato y observaron un aumento en el contenido en proteínas y actividad β -glucosidasa entre los días 4 y 7. Estos autores explicaron este aumento por el posible efecto inductor de algún componente del tampón maleato (Juhász y col., 2005a).

En los ensayos con RSI como fuente de carbono se alcanzaron mayores producciones de proteína y actividades celulasa y β -glucosidasa que con el MPC

(figura 4.3 y tabla 4.3). Como se ha explicado anteriormente, durante el pretratamiento por EV se generan compuestos de degradación de los azúcares y de la lignina que son potencialmente tóxicos para los microorganismos (tabla 4.2) (Oliva y col., 2003; Palmqvist y col., 2000a-b). La presencia de estos compuestos en el MPC puede afectar el crecimiento de *T. reesei* y, consecuentemente, disminuir la producción de enzimas. Estos resultados indican que, en este caso, el efecto tóxico de los productos de degradación tuvo una influencia mayor en la producción de enzimas que el posible efecto inductor de los oligómeros solubles presentes en el MPC.

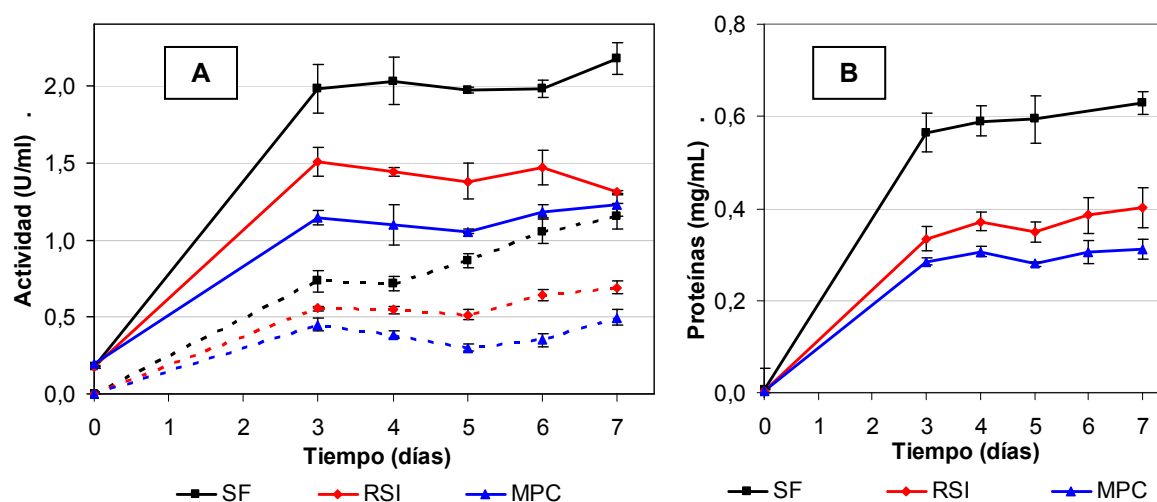


Figura 4.3. Fermentación con *T. reesei* utilizando diferentes fuentes de carbono (10 g/l): SF, Solka Floc; RSI, residuo sólido insoluble y MPC, material pretratado completo. A: Actividades enzimáticas sobre papel de filtro (UPF/ml, línea continua) y β -glucosidasa (UI/ml, línea discontinua). B: Contenido en proteínas (mg/ml).

Tabla 4.3. Actividades de los extractos producidos tras 7 días (168 h) de fermentación con *T. reesei* RUTC30. Fuentes de carbono: SF (Solka Floc), RSI (residuo sólido insoluble) y MPC (material pretratado completo); 10 g/l.

Preparación enzimática	Celulasa (UPF/ml)	β -glucosidasa (ρ NPG, UI/ml)	Contenido proteínas (mg/ml)	Actividad específica	
				Celulasa (UPF/mg proteína)	β -glucosidasa (UI/mg proteína)
SF	2,2	1,2	0,63	3,49	1,90
RSI	1,3	0,7	0,40	3,25	1,75
MPC	1,2	0,5	0,31	3,87	1,61

- Hidrólisis enzimática

Con objeto de establecer si la producción de enzimas sobre un determinado sustrato supone alguna mejora en la HE de ese mismo sustrato, las enzimas producidas en las fermentaciones con *T. reesei* RUTC30 sobre MPC y RSI como fuentes de carbono se evaluaron en ensayos de HE utilizando como sustratos tanto el MPC como el RSI de paja de trigo pretratada a 220 °C y 2,5 min. Las enzimas se añadieron a una dosis de 20 UPF/g celulosa y la carga de sustrato en la HE fue de 1,3% de sólidos insolubles (RSI) (p/p). Aunque el balance óptimo de actividad β -glucosidasa y actividad celulasa requerido puede variar dependiendo de la materia prima o el pretratamiento utilizado, se considera que una proporción 1:1 es la más apropiada para la hidrólisis de la celulosa (Juhász y col., 2005a). Según los datos mostrados en la tabla 4.3, las enzimas producidas en estos ensayos presentaron una proporción significativamente menor de actividad β -glucosidasa (entre 0,4-0,6), por lo que en los ensayos de HE se suplementaron con 15 UI β -glucosidasa/g celulosa (NS 50010).

En general, tanto en los ensayos con RSI como con MPC como sustratos se obtuvieron altos rendimientos de HE con las enzimas producidas, lo que muestra el potencial de utilizar fuentes de carbono de bajo coste para reducir el coste del proceso de HE (figura 4.4). Con RSI como sustrato se alcanzaron a las 72 h rendimientos de glucosa en torno al 95% con ambas enzimas, mientras que en los ensayos utilizando el MPC los rendimientos fueron de alrededor de 81%. El efecto inhibitorio que los productos de degradación, y principalmente los azúcares solubles presentes en el MPC tienen sobre las celulasas explica el menor rendimiento. Este efecto también ha sido observado previamente por otros autores (Cantarella y col., 2004; García-Aparicio y col., 2006).

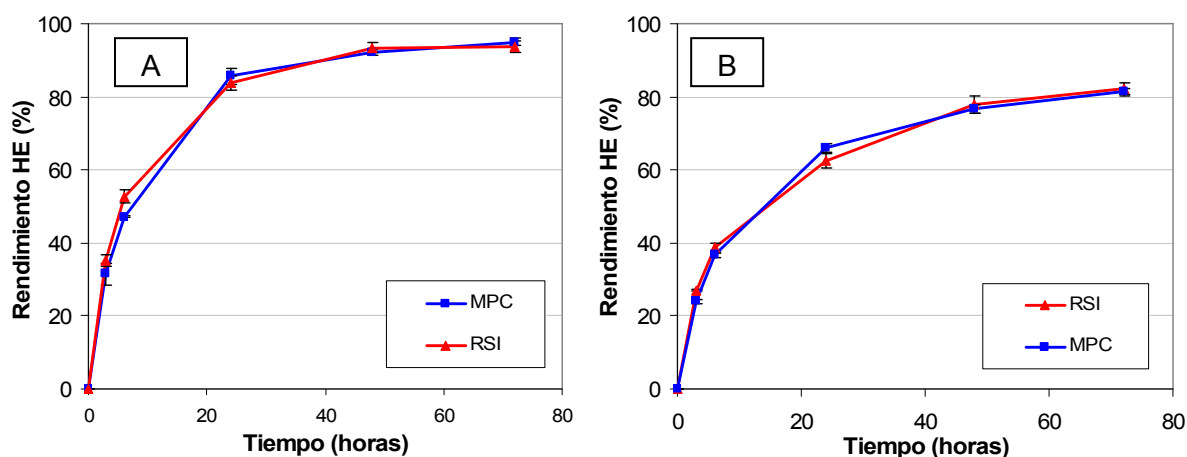


Figura 4.4. Rendimiento de HE utilizando las enzimas RSI y enzimas MPC. Dosis celular: 20 UPF/g celulosa. A. Sustrato RSI (residuo sólido insoluble). B. Sustrato MPC (material pretratado completo). 1,3% RSI (p/p).

No se observó mejor comportamiento en los ensayos de HE al utilizar las enzimas que habían sido producidas sobre el mismo sustrato. En este caso, la utilización de uno u otro sustrato (RSI o MPC) como fuente de carbono en la producción de enzimas no conllevó ventajas significativas en la etapa de HE. Tanto la concentración de proteína como la actividad celulosa y β -glucosidasa fueron menores en los ensayos de fermentación con *T. reesei* en los que se utilizó MPC como fuente de carbono, por lo que la eliminación o reducción de las concentraciones de los compuestos tóxicos podría ser una opción interesante para mejorar la producción de enzimas.

4.3.2.2 Evaluación del prehidrolizado de paja de trigo pretratada por EV como fuente de carbono para la producción de enzimas

La fracción soluble o prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo contiene azúcares solubles procedentes de la hemicelulosa (principalmente xilosa) y compuestos procedentes de la degradación de los azúcares y la lignina que, como se ha observado en el apartado anterior, pueden resultar tóxicos o inhibidores para los microorganismos. En los procesos convencionales de producción de etanol con levaduras no fermentadoras de pentosas, el prehidrolizado apenas aporta azúcares fermentables y suele ser considerado un subproducto del proceso. Por lo tanto, una posibilidad interesante para aprovechar estos azúcares solubles es la utilización del prehidrolizado como fuente de carbono para la producción enzimática.

En este estudio se utilizó el prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo a 210 °C y 2,5 min (material pretratado III), cuya composición se muestra en las tablas 4.4 y 4.5. Los resultados obtenidos en estos ensayos se publicaron en el artículo II, incluido como anexo en esta Tesis.

Como fuente de nitrógeno en las fermentaciones se añadieron vinazas (procedentes de procesos de destilación) en una concentración de 5 g/l. También se añadieron 0,83 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KH_2PO_4 en los ensayos con un contenido en carbohidratos menor de 15 g/l, y 1,66 g/l cuando la concentración fue mayor de 15 g/l.

Inicialmente, el hongo se incubó utilizando como medio de fermentación el prehidrolizado sin diluir y en diluciones 1:2 y 1:4. Durante los 11 días de fermentación no se observó consumo de azúcares reductores, incluso con la dilución más alta, lo que indica ausencia de crecimiento debido a que la toxicidad del medio fue superior a la tolerada por el hongo. Como ya se detectó en el experimento anterior en el que se utilizó el MPC, la presencia de tóxicos en la fracción soluble tiene un efecto negativo en el metabolismo del hongo, que a las concentraciones presentes en el prehidrolizado, inhibe su crecimiento. Szengyel y Zacchi estudiaron el efecto del ácido acético y el furfural en la producción de enzimas por *T. reesei* con sauce pretratado como fuente de carbono, no observando un efecto negativo hasta concentraciones de 3 g/l de ácido acético y de 1,2 g/l de furfural (Szengyel y Zacchi, 2000). Aunque estas concentraciones son mayores a las observadas en el prehidrolizado diluido 1:4, en este caso no se observó crecimiento del microorganismo, lo que sugiere un efecto inhibitorio de otros compuestos presentes en el líquido.

Para disminuir la toxicidad del prehidrolizado se llevó a cabo un proceso de destoxificación en dos pasos: evaporación e incremento de pH con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (apartado 3.4.2). Los compuestos volátiles se retiraron parcialmente mediante evaporación, encontrándose un 61, 10 y 4% de la concentración inicial de furfural, ácido acético y fórmico, respectivamente, en el líquido condensado (tabla 4.5).

Tras el doble proceso de destoxificación el furfural y el HMF procedentes de la degradación de los azúcares fueron prácticamente eliminados. Por el contrario, se observó un aumento en la concentración de ácido acético y la concentración de ácido fórmico no varió de forma significativa (tabla 4.5). La evaporación y adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no afecta generalmente la concentración de ácidos alifáticos, aunque bajo condiciones muy severas de tratamiento su concentración puede aumentar (Horváth y col., 2005).

La concentración de ácido ferúlico, que procede de la degradación de derivados de la lignina aumentó de 0,04 a 0,49 g/l tras la destoxificación. En el prehidrolizado original, a un pH de 3,4, las moléculas de ácido ferúlico pueden formar polímeros que no se identifican en los cromatogramas. Al aumentar el pH durante el proceso de destoxificación y ajustarlo finalmente a pH 5,8, estos polímeros pueden hidrolizarse, aumentando la concentración de monómeros. Otra consecuencia de la destoxificación fue la ligera disminución en el contenido total de glucosa y xilosa en el prehidrolizado, lo que sugiere cierta degradación de los azúcares durante el proceso (tabla 4.4).

Tabla 4.4. Concentración de azúcares (g/l) en el prehidrolizado antes y después del proceso de destoxificación.

	Sin tratar		Destoxificado	
	Monómeros (g/l)	Total (g/l)	Monómeros (g/l)	Total (g/l)
Glucosa	0,6 ± 0,1	7,2 ± 0,7	2,1 ± 0,2	7,1 ± 0,3
Xilosa	5,5 ± 0,2	40,5 ± 3,1	6,4 ± 0,2	37,6 ± 3,3
Otros (arabinosa, galactosa y manosa)	2,6 ± 0,3	4,5 ± 0,6	2,4 ± 0,1	4,8 ± 0,1

Tabla 4.5. Efecto de la destoxificación en la concentración de tóxicos (g/l) en el prehidrolizado.

Compuesto	Sin tratar	Condensado (60 ml)	Después de evaporación ¹	Después de Ca(OH) ₂ -pH 10 ²
Furfural	2,1 ± 0,5	5,3 ± 0,8	0,5 ± 0,0	0,0
HMF	0,7 ± 0,0	0,0	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,1
Ácido acético	8,8 ± 0,8	3,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	12,4 ± 1,7
Ácido fórmico	7,2 ± 0,9	1,1 ± 0,1	6,3 ± 0,0	6,8 ± 2,2
Ácido ferúlico	0,04 ± 0,0	n.d.	n.d.	0,49 ± 0,0

¹ volumen original (250 ml) recuperado con agua destilada.

² ajustado a pH 5,8.

n.d: no determinado.

El prehidrolizado destoxificado y diluido 1:4 (LIQ) se utilizó como fuente de carbono en fermentaciones con *T. reesei* RUTC30. Se observó un consumo de azúcares reductores y se obtuvo una actividad celulasa de 1,18 UPF/ml tras 11 días de proceso. La concentración de compuestos inhibidores se determinó al final de la

fermentación. Todos ellos, incluidos los ácidos alifáticos, desaparecieron prácticamente en la fermentación con el líquido diluido 1:4, demostrando la capacidad de *T. reesei* de consumir ácido acético en medios con bajo nivel de tóxicos (Szenygyel y Zacchi, 2000). En este caso, se observó también consumo de ácido fórmico por parte del hongo.

Una vez comprobada la efectividad del proceso de destoxificación del prehidrolizado se realizaron fermentaciones con *T. reesei* utilizando como fuentes de carbono el prehidrolizado destoxificado y diluido (LIQ), el prehidrolizado destoxificado y diluido más el RSI (LIQRSI) y el RSI. La composición de los diferentes medios estudiados se muestra en la tabla 4.6. Las preparaciones enzimáticas obtenidas tras los 11 días de fermentación se identificaron según la fuente de carbono utilizada para su producción.

Tabla 4.6. Composición de los medios de fermentación (g/l) utilizadas en las fermentaciones con *T. reesei* RUTC30.

Abrev.	Fuente de carbono	Glucano ^a	Xilano ^a	Otros ^b	Monómeros ^c	Total
LIQ	Prehidrolizado 1:4	2,2	8,5	0,6	2,7	14,0
LIQRSI	LIQ + 14,3 g/l RSI	10,4	9,4	0,6	2,7	23,1
RSI	14,3 g/l RSI	8,2	0,9	-	-	9,1

Se incluye el contenido en carbohidratos de las vinazas (5 g/l).

^a incluye oligómeros (de glucosa o xilosa).

^b oligómeros de galactosa y manosa en el prehidrolizado.

^c incluye glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa en el prehidrolizado.

En la figura 4.5 se muestra la actividad celulasa y la concentración de azúcares reductores a lo largo de las fermentaciones. A pesar de la destoxificación, la presencia de productos tóxicos en el prehidrolizado prolongó la fase de latencia del microorganismo, de tal forma que con RSI (sin tóxicos en el medio) las producciones máximas de actividad celulasa se alcanzaron a los 7 días, mientras que en los ensayos LIQ y LIQRSI el máximo se alcanzó a los 11 días. En los ensayos con prehidrolizado, la concentración de azúcares reductores aumentó durante los primeros 2 días debido a la presencia de enzimas en el inóculo que hidrolizan los oligómeros solubles. No obstante, la presencia de tóxicos retrasa su consumo y por tanto la producción de celulasas. En la fermentación con RSI no se detectaron azúcares reductores en el medio, ya que el hongo es capaz de utilizar inmediatamente los azúcares liberados.

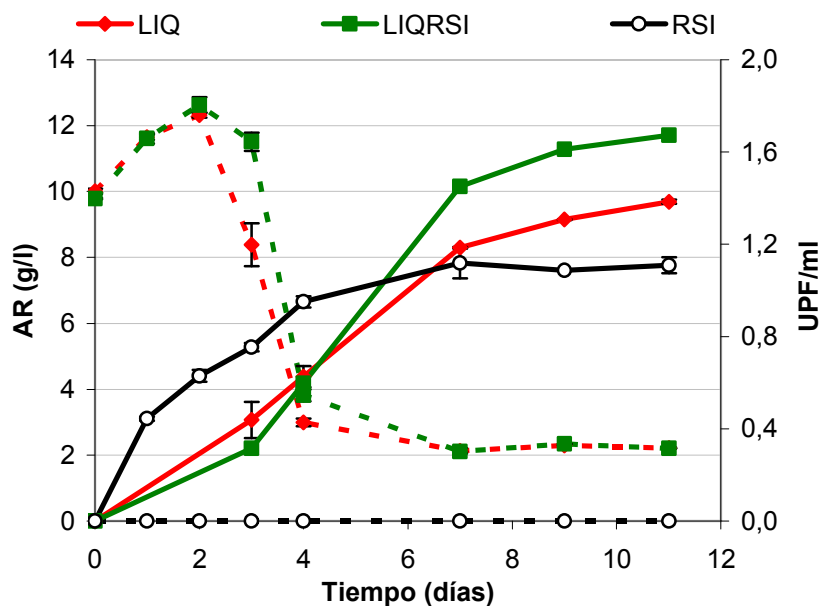


Figura 4.5. Fermentación con *T. reesei* RUTC30 utilizando diferentes fuentes de carbono. Actividad celulasa sobre papel de filtro (UPF/ml; línea continua) y concentración de azúcares reductores (AR, g/l; línea discontinua). Fuentes de carbono: LIQ (prehidrolizado destoxificado y diluido 1:4) , LIQRSI (prehidrolizado destoxificado y diluido 1:4 + RSI) y RSI.

La distinta naturaleza y proporción de los carbohidratos presentes en los materiales utilizados como fuentes de carbono dio lugar a diferencias en la producción de enzimas. El prehidrolizado contiene básicamente xilosa y glucosa libre y en forma oligomérica, mientras que el RSI sólo contiene polímeros insolubles. Tras 11 días de fermentación las productividades volumétricas más altas se alcanzaron en el medio LIQRSI, que tiene el mismo contenido de celulosa y xilano insolubles que el RSI, y además los azúcares solubles (tabla 4.7 y figura 4.5). La reducción de tóxicos en el prehidrolizado no sólo permitió su utilización como fuente de carbono, sino que mejoró la producción de enzimas al suplementarse como fuente de carbono al RSI.

En la tabla 4.7 también se muestran los rendimientos de actividad celulasa sobre papel de filtro en cuanto al contenido en carbohidratos totales en el medio. El rendimiento más alto se obtuvo en la fermentación de referencia con RSI y sin tóxicos en el medio, seguidamente del medio con prehidrolizado sin suplementar (LIQ), por lo que en la fermentación con LIQRSI, el aumento en la concentración de carbohidratos no conllevó un aumento en el rendimiento.

Tabla 4.7. Concentración de proteína, actividades y rendimientos (actividad sobre papel de filtro (UPF) por gramo de carbohidratos (CH) utilizado) tras 11 días de fermentación con *T. reesei* RUTC30 y diferentes fuentes de carbono: LIQ (prehidrolizado destoxificado y diluido 1:4) , LIQRSI (prehidrolizado destoxificado y diluido 1:4 + RSI) y RSI.

	Proteína (g/l)	β -gluc (UI/ml)	Xilanasa (UI/ml)	UPF (UPF/ml)	Rendimiento (UPF/g CH)	β -gluc/UPF
LIQ	0,58 \pm 0,03	0,88 \pm 0,02	127 \pm 4	1,38 \pm 0,01	98,6	0,64
LIQRSI	0,69 \pm 0,02	0,91 \pm 0,06	130 \pm 5	1,67 \pm 0,04	72,3	0,55
RSI	0,44 \pm 0,06	0,88 \pm 0,01	49 \pm 6	1,11 \pm 0,04	122,1	0,79

Son destacables los resultados de actividad xilanasa obtenidos en estos ensayos. Esta actividad fue considerablemente más alta en las fermentaciones con prehidrolizado respecto a la utilización de RSI como única fuente de carbono. Como se muestra en la tabla 4.7, en LIQ y LIQRSI se determinó una actividad xilanasa entre 2 y 3 veces superior a la obtenida en la fermentación referencia con RSI. El contenido en xilano insoluble de RSI y LIQRSI es idéntico, por lo que la presencia de xilooligómeros en el prehidrolizado indujo la expresión de xilanasas, resultando un cóctel enzimático con mayor proporción de enzimas capaces de hidrolizar la hemicelulosa. Además, también ha sido descrito el efecto inductor de otros azúcares como la arabinosa, que es el azúcar en mayor concentración tras la glucosa y la xilosa en el prehidrolizado, por lo que podría contribuir a la producción de xilanasas (Xiong y col., 2004).

La reducción de la toxicidad del prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo permitió su utilización como fuente de carbono en la producción de enzimas con *T. reesei* RUTC30. Esta reducción de la toxicidad también permitió aumentar la producción de enzimas al utilizarse en combinación con el RSI de paja de trigo como fuente de carbono, lo que demuestra el efecto inductor de los oligómeros solubles, especialmente en la producción de enzimas xilanasas. La presencia de actividades hemicelulasas junto con las celulasas en los cócteles enzimáticos puede mejorar la HE de sustratos lignocelulósicos, por lo que la utilización del prehidrolizado obtenido en el pretratamiento como medio para la producción de enzimas puede conllevar ventajas significativas en la composición final del preparado enzimático.

- Hidrólisis enzimática

Las preparaciones enzimáticas LIQ y LIQRSI se evaluaron en ensayos de HE utilizando como sustrato el RSI de paja de trigo pretratada a 210 °C y 2,5 min en una concentración de 2% ST (p/p), en tampón acetato 0,05 M a pH 4,8. Las dosis de enzima se ajustaron a 20 UPF/g celulosa y en este caso, las preparaciones LIQ y LIQRSI no se suplementaron con actividad β -glucosidasa. Las actividades presentes en los preparaciones enzimáticas a una dosis de 20 UPF se muestran en la tabla 4.8, y en la figura 4.6 se muestran los perfiles de HE (glucosa, celobiosa y xilosa). Se obtuvieron altos rendimientos en glucosa tanto con LIQRSI y LIQ, alcanzando un 77 y un 76%, respectivamente. Debido a la alta proporción de actividad xilanasa en LIQ y LIQRSI, la conversión de xilano también alcanzó rendimientos elevados, con un 81 y 85%, respectivamente.

Tabla 4.8. Actividades enzimáticas de las preparaciones LIQ y LIQRSI utilizadas en los ensayos de HE a una dosis de 20 UPF/g celulosa.

Preparación enzimática	Volumen (ml)	UPF	Proteína (mg)	β -glucosidasa (UI)	Xilanasa (UI)
LIQ	14,5	20	8,4	12,8	1840
LIQRSI	12,0	20	8,3	10,9	1557

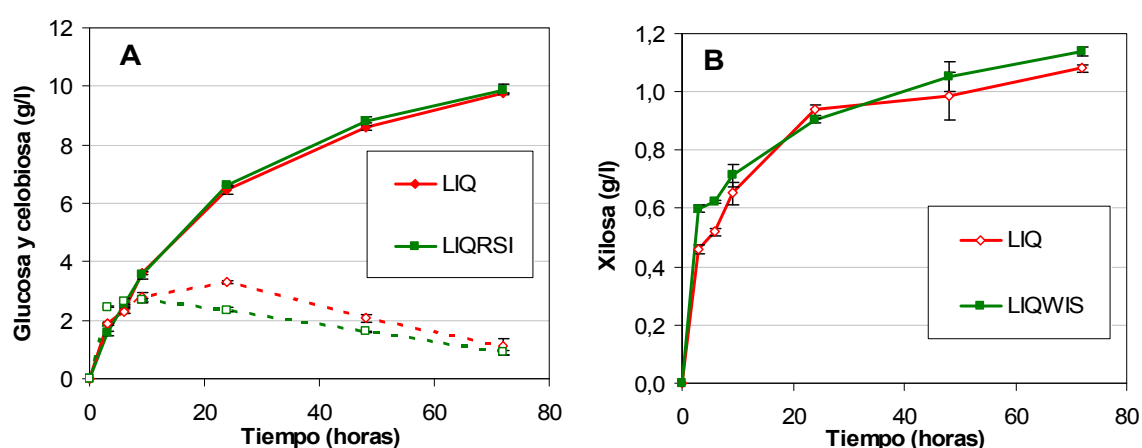


Figura 4.6. Cinética de producción de azúcares durante la HE utilizando como sustrato RSI de paja de trigo pretratada por EV a 210 °C y 2,5 min, 2% ST (p/p). Dosis enzimáticas: 20 UPF/g celulosa. A: Producción de glucosa (g/l, línea continua), celobiosa (g/l, línea discontinua). B: Producción de xilosa (g/l).

4.3.3 Efecto del contenido en celulosa y hemicelulosa de la fuente de carbono en la producción de enzimas

Como se ha observado en el apartado anterior, además de las celulasas y β -glucosidasas, *T. reesei* puede expresar en menor cantidad enzimas con otras actividades, como las hemicelulasas, que tienen un papel importante en la degradación de la lignocelulosa. También se ha mostrado que la composición de la fuente de carbono utilizada por *T. reesei* afecta significativamente a la producción de enzimas, ya que ciertos polisacáridos y monosacáridos inducen la expresión de unas u otras enzimas. Por lo tanto, el nivel de expresión de algunas de estas actividades puede tener relación con la composición y características de la fuente de carbono utilizada.

Con el fin de estudiar si sustratos con distinta composición de celulosa y hemicelulosa producen cócteles enzimáticos con diferente composición se realizaron fermentaciones con *T. reesei* RUTC30 utilizando como fuente de carbono dos materiales pretratados con distinta severidad (220 °C y 210 °C), y por lo tanto de composición diferente. El RSI de paja de trigo pretratado en estas condiciones se utilizó en una concentración de sustrato de 40 g/l, considerada óptima por algunos autores para ensayos de producción enzimática (Liming y Xueliang, 2004; Olsson y col., 2003; Wyman, 1996). La fermentación con *T. reesei* RUTC30 se llevó a cabo durante 10 días. La concentración de sales fue el doble de la mostrada en la tabla 3.1 y tras 7 días se añadieron nuevamente 3,74 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 5,34 g/l de KH_2PO_4 . Las enzimas producidas se evaluaron en ensayos de HE sobre los mismos sustratos empleados como fuentes de carbono.

4.3.3.1 Producción de enzimas

La composición del RSI de paja de trigo pretratada por EV a 220 °C y 2,5 min (RSI 220); y 210 °C y 2,5 min (RSI 210) (materiales pretratados I y II, tabla 4.2) se muestra en la tabla 4.9. Como referencia se utilizó también SF como fuente de carbono en la fermentación. Para comparar el contenido relativo de hemicelulosa y celulosa de los tres sustratos utilizados, en la tabla 4.9 se muestra también la composición de los tres sustratos sin tener en cuenta el contenido en lignina.

Tabla 4.9. Composición relativa de celulosa y hemicelulosa: Solka Floc (SF), RSI 210 (210 °C, 2,5 min) y RSI 220 (210 °C, 2,5 min).

Composición (% p/p)	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Composición relativa	
				Celulosa	Hemicelulosa
SF	77,9	12,9	0,3	85,8	14,2
RSI 210	59,4	8,8	29,1	87,1	12,8
RSI 220	66,4	3,7	29,4	94,7	5,3

La figura 4.7 muestra la concentración de azúcares reductores, las actividades enzimáticas y el contenido en proteínas determinados a lo largo de las fermentaciones con las tres fuentes de carbono utilizadas. En todos los casos la concentración de azúcares reductores aumentó al comienzo de la fermentación debido a la acción de las enzimas presentes en el inóculo. Esta concentración fue disminuyendo conforme el hongo crece, hasta prácticamente agotarlos a partir del 4^o-6^o día. Este período coincide con el aumento de la expresión y producción de enzimas celulolíticas, lo que muestra la capacidad de *T. reesei* RUTC30 para activar su sistema celulolítico en presencia de glucosa en el medio.

La mayor actividad celulasa y β -glucosidasa fue determinada en el extracto producido en el ensayo con SF como sustrato, con el que se alcanzaron 4,4 UPF/ml y 3,4 UI β -glucosidasa/ml al final del proceso. Como ya fue observado en el ensayo anterior, la celulosa purificada y con bajo contenido en lignina actúa como un inductor eficiente para la producción enzimática. Aunque las actividades muestran tendencias crecientes a los 10 días, un experimento anterior con las mismas condiciones mostró que las actividades y la producción de proteína no aumentaban a partir del día 10-11, en los que se alcanzó el máximo de producción.

Con el sustrato RSI 220 como fuente de carbono, con mayor contenido de celulosa (66,4%) y menos hemicelulosa (3,7%) se alcanzaron actividades enzimáticas y contenido de proteína más elevadas que en la fermentación con RSI 210, con menor contenido en celulosa, 59,4%, y un 8,8% de hemicelulosa. Concretamente al final de la fermentación se obtuvieron 3,9 UPF/ml y 2,0 UI β -glucosidasa/ml con RSI 220; y 3,6 UPF/ml y 1,1 UI β -glucosidasa/ml con RSI 210. Los resultados muestran que un mayor contenido de celulosa en el medio tiene un mayor efecto inductor en la producción de celulasas y β -glucosidasa. Además, la mayor severidad del pretratamiento aumenta la accesibilidad de la celulosa, lo que favorecería la inducción de la producción

enzimática. Los rendimientos a los 10 días en cuanto a actividad sobre papel de filtro por gramo de carbohidratos aplicado fueron de 100,9, 107,5 y 121,5 UPF/g con RSI 210, RSI 220 y SF, respectivamente.

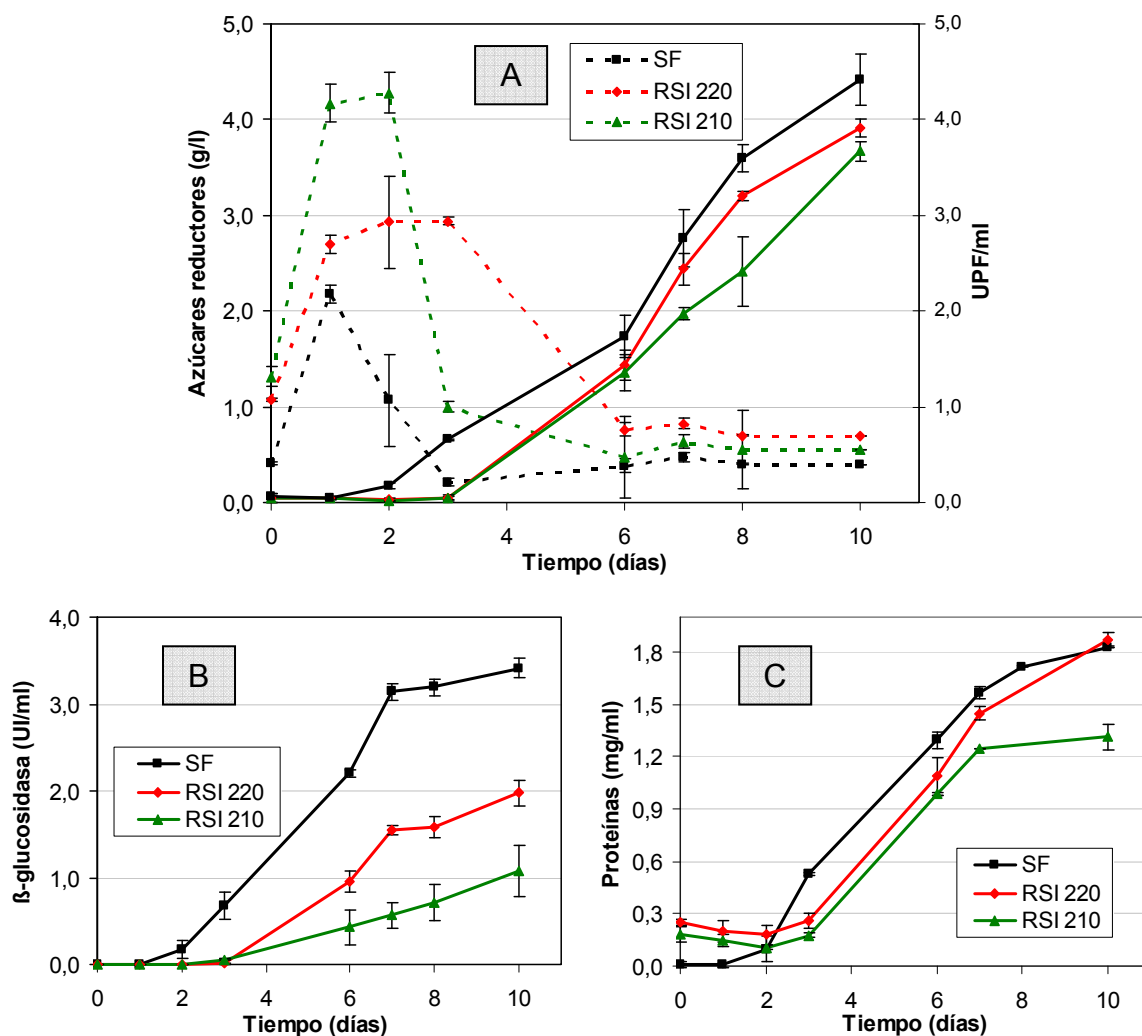


Figura 4.7. Fermentación con *T. reesei* RUTC30 utilizando diferentes fuentes de carbono: SF (Solka Floc), RSI 220 y RSI 210. A. Concentración de azúcares reductores (g/l, línea discontinua) y actividad sobre papel de filtro (UPF/ml, línea discontinua). B. Actividad β-glucosidasa (UI/ml). C. Contenido en proteínas (mg/ml).

La mayor actividad xilanasa al final del proceso se obtuvo en los ensayos con SF como fuente de carbono (138,9 UI/ml), mientras que con RSI de paja de trigo esta actividad fue menor. Juhász y col. también encontraron mayor actividad xilanasa al utilizar SF como fuente de carbono en comparación con otros materiales lignocelulósicos (Juhász y col., 2005b). A pesar de ser comercializada como celulosa

purificada, SF es, entre los tres utilizados, el sustrato con una concentración relativa de hemicelulosa (xilano) más alta, con un 12,9%. Por su parte, el RSI 210 presentó un contenido de hemicelulosa, principalmente xilano, de 8,8% y el RSI 220, de 3,7% (tabla 4.9). Aunque entre los distintos RSI de paja de trigo pretratada apenas se detectaron diferencias en la producción volumétrica de xilanasa, las actividades específicas sí indicaron una relación entre la cantidad de xilano contenido en la fuente de carbono y la producción de xilanasa (tabla 4.10).

También se determinaron otras actividades hemicelulasas como la β -xilosidasa y la α -L-arabinofuranosidasa (AF). Estas actividades, al igual que la actividad xilanasa, aumentaron conforme mayor contenido en hemicelulosa presentó la fuente de carbono utilizada (tabla 4.10). En general, el sustrato RSI 210, con mayor contenido en hemicelulosa, indujo la expresión de un cóctel enzimático con una proporción de actividades hemicelulasas mayor que el cóctel producido con el sustrato con mayor contenido en celulosa (RSI 220).

Tabla 4.10. Actividades específicas (UI/mg proteína) de las enzimas con actividad hemicelulosa de las distintas preparaciones obtenidas a partir de cultivos con *T. reesei* con diferentes fuentes de carbono: SF (Solka Floc), RSI 210 y RSI 220.

Fuente de carbono	Proteínas (mg/ml)	Xilanasa (UI/mg)	β -xilosidasa (UI/mg)	AF (UI/mg)
SF	1,83	76,0	1,78	0,90
RSI 210	1,31	30,5	0,45	0,46
RSI 220	1,86	20,6	0,28	0,21

4.3.3.2 Ensayos de HE

Las enzimas producidas sobre SF y sobre el RSI de paja de trigo pretratada a 210 °C (enzimas RSI 210) y 220 °C (enzimas RSI 220) se evaluaron en ensayos de HE. Como sustratos se utilizaron los mismos que fueron utilizados para la producción de enzimas con *T. reesei* a una concentración de 7% ST (p/p). Se utilizó una dosis enzimática baja (5 UPF/g celulosa) para poder detectar el efecto de las demás actividades presentes en las preparaciones y se suplementaron con 10 UI β -glucosidasa/g celulosa de NS 50010. En la tabla 4.11 se resumen las distintas

actividades correspondientes a la dosis de 5 UPF/g celulosa de las preparaciones estudiadas. Aunque la dosis de actividad celulosa (5 UPF/g celulosa) fue la misma para todas las enzimas, se observa en la tabla que las demás actividades se encuentran en proporciones distintas. Las enzimas producidas sobre SF mostraron mayor actividad β -glucosidasa, xilanasa, β -xilosidasa y α -L-arabinofuranosidasa (AF). Por su parte, las enzimas RSI 210 mostraron una proporción de actividades hemicelulasas superior a las enzimas RSI 220 (tabla 4.10 y 4.11).

Tabla 4.11. Actividades de las distintas preparaciones correspondientes a una dosis de 5 UPF/g celulosa en el ensayo de HE. SF: enzimas producidas sobre SF como fuente de carbono; RSI 210 y RSI 220: enzimas producidas sobre RSI 210 y RSI 220 como fuentes de carbono.

Actividades	Enzimas		
	SF	RSI 210	RSI 220
Celulasa (UPF/g)	5	5	5
β -glucosidasa (UI/g) *	10 (+3,9)	10 (+1,5)	10 (+2,5)
Xilanasa (UI/g)	157,5	56,8	46,5
β -xilosidasa (UI/g)	3,70	0,83	0,67
AF (UI/g)	1,79	0,83	0,49

* Actividad β -glucosidasa: incluye la actividad aportada por NS 50010 y la aportada por cada preparación (entre paréntesis).

En la figura 4.8 se muestra la producción de glucosa y xilosa con los distintos preparados enzimáticos durante las 72 h de HE en los ensayos con **RSI 210 como sustrato**. Los rendimientos de HE más altos se obtuvieron con las enzimas SF, que presentaron mayores actividades β -glucosidasa, xilanasa, β -xilosidasa y AF, lo que explica la mayor producción de glucosa y xilosa. Con las enzimas producidas sobre RSI, se obtuvieron mejores resultados utilizando las producidas sobre el mismo sustrato empleado en el ensayo de HE, en este caso RSI 210, cuyo contenido en hemicelulosa fue de 8,8%. Como se muestra en la tabla 4.11 la mezcla enzimática RSI 210 aportó al ensayo actividades hemicelulasas (xilanasa, β -xilosidasa y AF) más altas que las enzimas RSI 220, lo que explica su mejor comportamiento en la hidrólisis de este sustrato. La producción de glucosa y xilosa con RSI 210 aumentó en un 13,9 y un 5,2%, respectivamente, respecto a la enzima RSI 220. En la tabla 4.12 se resumen los rendimientos de HE obtenidos con las diferentes preparaciones. En las condiciones de

ensayo estudiadas, la producción de enzimas utilizando como fuente de carbono el mismo sustrato empleado en la HE mejoró la producción de glucosa y xilosa.

En los ensayos de HE utilizando el **sustrato RSI 220**, con menor proporción de hemicelulosa (3,7%), y por lo tanto mayor contenido en celulosa, la producción de glucosa es mayor que con el RSI pretratado a 210 °C (RSI 210) (figura 4.8). Esto se debe a que la mayor severidad del pretratamiento produce un sustrato con una celulosa más accesible al ataque enzimático. Por otro lado, la producción de xilosa en estos ensayos fue significativamente más baja, debido a que el contenido en hemicelulosa es menor.

Como en el experimento anterior, las enzimas producidas sobre SF mejoraron el rendimiento de HE durante las 72 h de HE respecto a las demás enzimas (73,7% rendimiento de HE). Las enzimas SF presentaron mayor actividad β -glucosidasa y además mayores actividades hemicelulasas. En este caso, no se observaron diferencias en la producción de glucosa y xilosa entre las enzimas RSI 210 y RSI 220. Debido al bajo contenido en hemicelulosa de este sustrato (RSI 220), la mayor actividad xilanasa, β -xilosidasa o AF presentes en las enzimas RSI 210 no conllevó mejoras en la producción de azúcares fermentables.

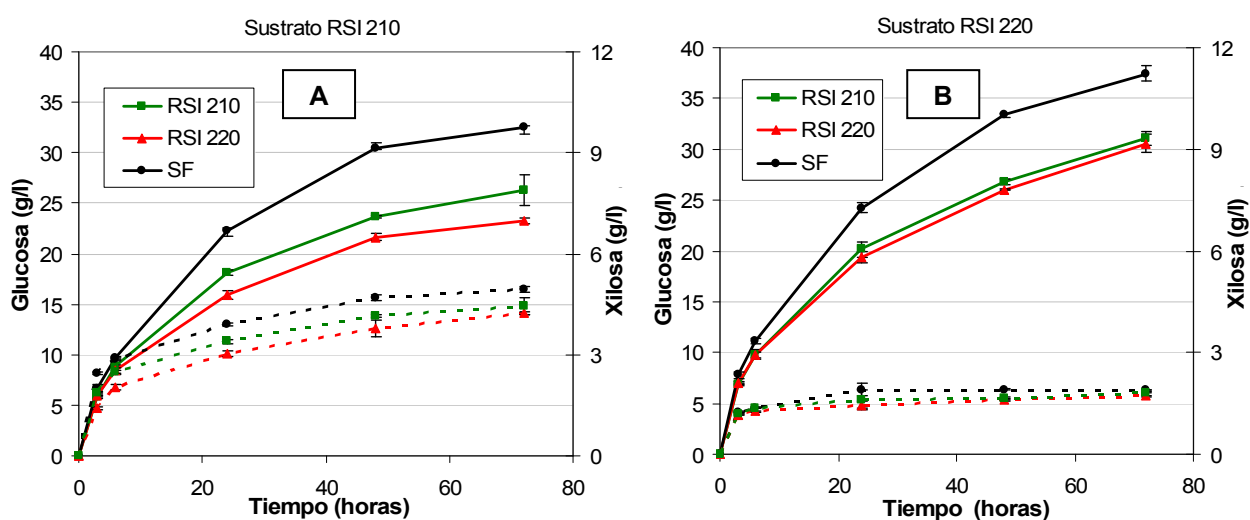


Figura 4.8. Producción de glucosa (g/l, líneas continuas) y xilosa (g/l, líneas discontinuas) durante las 72 h de HE con las enzimas producidas sobre SF, RSI 210 y RSI 220 como fuentes de carbono. Dosis enzima: 5 UPF/g celulosa, 10 UI β -glucosidasa/g celulosa (NS 50010). Sustratos HE: RSI 210 (A) y RSI 220 (B).

Tabla 4.12. Rendimientos HE en glucosa y xilosa (%) a las 72 h con las enzimas SF, RSI 210 y RSI 220. Sustratos HE: RSI 210 y RSI 220.

Sustrato →	RSI 210 (210 °C, 2,5 min)			RSI 220 (220 °C, 2,5 min)			
	Enzimas →	SF	RSI 210	RSI 220	SF	RSI 210	RSI 220
Rendimiento HE 72 h (glucosa)		71,0	57,5	50,8	73,7	61,0	60,2
Rendimiento HE 72 h (xilosa)		82,1	74,0	70,4	93,8	90,9	87,5

Según los resultados obtenidos en estos ensayos, puede concluir que la producción volumétrica de enzimas celulolíticas por *T. reesei* RUTC30 fue mayor utilizando como fuente de carbono sustratos con alto contenido en celulosa como SF o el RSI 220. Los resultados obtenidos también mostraron que la composición de la fuente de carbono tiene influencia en la composición del cóctel enzimático, por lo que la aplicación en las fermentaciones de fuentes de carbono adecuadas puede mejorar el comportamiento de los preparados enzimáticos en la HE de un determinado sustrato. En este caso, la aplicación de una fuente de carbono con mayor contenido en hemicelulosa (RSI 210) produjo un cóctel enzimático con una proporción de actividades hemicelulasas más alta, cuyo efecto positivo quedó reflejado en ensayos de HE. De hecho, el rendimiento de HE en glucosa con las enzimas RSI 210 utilizando el sustrato RSI 210 fue de 57,5%, comparable a los obtenidos con un RSI pretratado a mayor severidad, 220 °C (61,1-60,2%). La presencia de enzimas con actividades accesorias a las celulasas resulta de gran relevancia para mejorar la producción de azúcares en el proceso de HE de la biomasa lignocelulósica.

4.4 Caracterización de preparados y componentes enzimáticos

Además de estudiar la producción de enzimas en el laboratorio con el hongo *T. reesei* RUTC30, se han utilizado diferentes preparados enzimáticos para evaluar su potencial en la HE de una biomasa lignocelulósica, como la paja de trigo. Las preparaciones enzimáticas utilizadas en esta Tesis se caracterizaron en cuanto a su contenido en proteínas y a sus diferentes actividades enzimáticas. Los resultados de estas determinaciones se recogen en la tabla 4.13. Como puede observarse, las distintas preparaciones presentan distintas actividades individuales y contenido de proteínas, por lo que su acción hidrolítica sobre los carbohidratos de los sustratos lignocelulósicos puede variar.

NS 50013 es una preparación enzimática de “Novozymes” tradicionalmente utilizada en los estudios de producción de etanol a partir de materiales celulósicos. Se trata de un complejo celulolítico producido por *T. reesei* con actividad celobiohidrolasa y endoglucanasa, pero baja actividad β -glucosidasa. NS 50010 es una preparación también de “Novozymes” y producida por *Aspergillus niger*. Presenta fundamentalmente actividad β -glucosidasa, por lo que se ha utilizado típicamente para suplementar el complejo NS 50013 (Ballesteros y col., 2010; García-Aparicio, 2011; Tomás-Pejó y col., 2009b). Además de sus actividades principales, estos complejos muestran cierta proporción de otras actividades como xilanasa, β -xilosidasa o α -L-arabinofuranosidasa.

En los últimos años, el interés por avanzar y mejorar los procesos de obtención de etanol a partir de lignocelulosa ha impulsado la producción de nuevos complejos celulolíticos a partir de cepas mejoradas, tanto mediante procedimientos clásicos de mutagénesis y selección, como mediante la utilización de métodos avanzados de manipulación genética. Como consecuencia de estos avances las principales industrias biotecnológicas están desarrollando nuevas preparaciones con características mejoradas. NS 50073, NS 50031, NS 22074 y Cellic CTec (“Novozymes”), así como Accellerase 1000 y Accellerase 1500 (“Genencor”) son preparados celulolíticos recientemente desarrollados, todas ellos producidos por distintas cepas de *Trichoderma* spp. Las ventajas más evidentes de estas preparaciones, algunas de ellas comerciales, son su alto contenido en proteínas por unidad de volumen y su elevada actividad β -glucosidasa, que evita la suplementación de esta actividad de los cócteles utilizados en los procesos de producción de etanol.

Como en el caso de NS 50013 y NS 50010, además de su actividad celulasa y β -glucosidasa, estos preparados presentaron cierta proporción de actividades xilanasas, β -xilosidasa o α -L-arabinofuranosidasa, que pueden tener un papel importante en la hidrólisis de los sustratos lignocelulósicos.

Aunque como se ha señalado, y así se muestra en la tabla 4.13, hongos como *T. reesei* producen algunas enzimas con actividades hemicelulasas, su proporción en los cócteles puede resultar poco equilibrada o inferior a la óptima. Por ello, también se están desarrollando preparaciones con actividades específicamente hemicelulasas, que suplementadas a los cócteles celulolíticos, pueden mejorar la hidrólisis de los carbohidratos y aumentar los rendimientos de HE de materiales lignocelulósicos. Las enzimas NS 50030 (*Aspergillus oryzae*), NS 50014 y Cellic HTec (todas ellas de “Novozymes”) son preparaciones hemicelulolíticas que presentan fundamentalmente actividad xilanasas y apenas celulasa o β -glucosidasa.

El contenido en proteínas de todas las preparaciones enzimáticas es muy diferente y dificulta su comparación, por lo que también se calcularon las actividades específicas, que se muestran en la tabla 4.14. En las preparaciones Accellerase 1000 y 1500 se utilizó previamente a la determinación de proteínas un complemento del método BCA que reduce la concentración de sustancias que pueden interferir en la cuantificación: “Compat-Able Protein Assay Preparation Reagent Set” (Ref. 23215, Pierce). Se observa que las preparaciones comerciales más recientes, como Accellerase 1000-1500 y Cellic CTec mostraron, en general, mayores actividades específicas.

Tabla 4.13. Caracterización de las preparaciones enzimáticas.

Preparación enzimática	Contenido proteínas (mg/ml) (BCA)	Celulasa (UPF/ml)	Celulasa (Avicel, UI/ml)	Endoglucanasa (UI/ml)	Xilanasa (UI/ml)	β-glucosidasa		β-xilosidasa (UI/ml)	α-L-arabinofuranosidasa (UI/ml)
						Celobiosa (UI/ml)	ρNPG (UI/ml)		
NS 50013	140,2± 5,1	62,3± 6,3	73,8± 3,0	662,3± 59,3	121,7± 24,7	10,8± 1,9	38,1± 4,0	45,1± 4,8	19,3± 4,9
NS 50010	188,7± 8,1	<0,5	n.d.	10,8± 1,4	40,6± 4,6	809,4± 84,5	595,7± 55,8	10,7± 2,3	2,4± 0,4
NS 50013 + NS 50010 (10-0,8 (v/v))	155,3	75,8	n.d.	n.d.	n.d.	88,3	n.d.	n.d.	n.d.
NS 50073	273,5± 10,1	51,7± 8,3	78,0± 6,5	1082,8± 101,0	178,7± 27,9	1687,3± 146,3	1151,7± 109,7	69,1± 2,5	n.d.
NS 50031	451,7± 15,2	276,7± 36,2	250,4± 16,4	1731,8± 255,1	671,0± 211,3	614,6± 72,4	521,7± 16,1	34,9± 4,9	29,6± 1,4
NS 22074	201,0± 14,1	108,4± 19,6	144,8± 8,3	912,0± 83,9	195,5± 6,3	1543,0± 4,2	716,9± 34,5	40,0± 3,0	23,3± 1,8
Cellic CTec	193,3± 19,4	117,5± 7,1	n.d.	1405,0± 41,7	187,8± 11,7	1110,6± 86,1	n.d.	63,6± 1,1	34,3± 6,0
Cellic HTec	39,3± 2,7	0,2± 0,0	n.d.	n.d.	442,5± 12,9	n.d.	n.d.	60,3± 2,3	n.d.
Accellerase 1000	90,4± 0,9	55,7± 4,6	56,0± 1,1	682,6± 125,9	193,6± 21,9	142,7± 17,0	415,2± 62,2	8,5± 1,1	0,6± 0,0
Accellerase 1500	114,0± 5,6	56,9± 1,6	n.d.	n.d.	74,9± 11,9	149,0± 15,6	437,7± 13,4	7,0± 1,1	1,8± 0,2
NS 50030	19,0± 0,6	<0,5	n.d.	n.d.	532,4± 38,2	<0,5	n.d.	41,0± 0,2	4,2± 0,2
NS 50014	9,2± 0,1	<0,5	n.d.	n.d.	1391,6± 232,4	<0,5	n.d.	<0,1	<0,1

n.d.: no determinado

Tabla 4.14. Actividades específicas (UI/mg proteína).

Preparación enzimática	Celulasa (UPF)	Celulasa (Avicel)	Endoglucanasa	β -glucosidasa (celobiosa)	Xilanasa	β -xilosidasa	α -L-arabinofuranosidasa
NS 50013	0,44	0,53	4,73	0,08	0,87	0,34	0,14
NS 50010	n.d.	n.d.	0,06	4,29	0,22	0,06	0,01
NS 50013 + NS 50010	0,49	n.d.	n.d.	0,57	n.d.	n.d.	n.d.
NS 50073	0,19	0,29	3,96	6,17	0,65	0,25	n.d.
NS 50031	0,61	0,55	3,83	1,36	1,49	0,07	0,07
NS 22074	0,54	0,72	4,63	7,66	0,97	0,20	0,12
Cellic CTec	0,61	n.d.	n.d.	5,7	0,97	0,33	0,18
Cellic HTec	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,3	n.d.	n.d.
Accellerase 1000	0,62	0,62	7,55	1,58	2,14	0,09	0,01
Accellerase 1500	0,50	n.d.	n.d.	1,31	0,66	0,06	0,02
NS 50030	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28,02	2,20	0,22
NS 50014	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	151,3	<0,01	<0,01

n.d: no determinado

Además de las enzimas producidas por “Novozymes” y “Genencor”, en esta Tesis también se han utilizado enzimas específicas obtenidas por recombinación genética, que han sido estudiadas en combinación con cócteles celulolíticos comerciales, como se expondrá en el apartado 4.8. En la tabla 4.15 se muestra el contenido en proteínas y actividades principales de las enzimas recombinantes. Como se resume en el apartado 3.5, XInC y XInA son enzimas con actividad endoxilanasas y AF es una enzima α -L-arabinofuranosidasa. CBH H3AcP1 y CBH P3D1-P2E3 son celobiohidrolasas y EGL es una endoglucanasa. Además de las enzimas hidrolíticas, también se estudió el efecto que sobre la HE tienen las proteínas denominadas expansinas, que mostraron un contenido de proteínas de 3,3 mg por ml de extracto, pero ninguna actividad catalítica.

Tabla 4.15. Contenido en proteínas y actividades enzimáticas (UI) determinados por gramo de cultivo liofilizado.

Preparación enzimática	Contenido proteínas (BCA) (mg/g)	Celulasa (UPF/g)	Xilanasa (UI/g)	β -glucosidasa (celobiosa) (UI/g)	β -xilosidasa (mUI/g)	α -L-arabinofuranosidasa (mUI/g)
XlnA	398,6 \pm 10,3	<0,1	828,1 \pm 30,2	<0,1	n.d.	n.d.
XlnC	15,7 \pm 1,4	<0,1	732,6 \pm 34,1	<0,1	775,0 \pm 22,2	19,6 \pm 1,1
AF	15,8 \pm 0,6	<0,1	0,1	0,2 \pm 0,0	276,0 \pm 17,3	5300 \pm 57

Preparación enzimática	Contenido proteínas (BCA) (mg/g)	Celulasa (UPF/g)	Celobiohidrolasa *	Celulasa (Avicel, UI/g)	Endoglucanasa (UI/g)	β -glucosidasa (ρ NPG) (UI/g)
EGL	6,2 \pm 2,6	n.d.	n.d.	n.d.	3,62 \pm 0,1	n.d.
CBH H3AcP1	403,1 \pm 10,3	n.d.	10,8	1,9 \pm 0,1	n.d.	3,3 \pm 0,5
CBH P3D1-P2E3	433,8 \pm 11,4	n.d.	580,0	0,3 \pm 0,0	n.d.	3,3 \pm 0,2
Expansina	3,3 \pm 0,1 (mg/ml)	<0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Determinada sobre ρ -nitrofenil- β -D-celobiósido por Biópolis S.L.

n.d: no determinado.

4.5 Microensayos enzimáticos para el estudio de la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada

Como se explicó anteriormente, la producción de las enzimas celulolíticas y la etapa de hidrólisis enzimática (HE) son dos de los procesos que más influyen en la rentabilidad de la producción de bioetanol a partir de lignocelulosa. Aunque durante los últimos años se han realizado avances muy significativos que han incrementado la efectividad de los preparados enzimáticos y sus costes de producción, todavía se requieren mejoras en la formulación de los complejos enzimáticos, que permitan reducir sus costes de producción y alcanzar la mayor cantidad de azúcares fermentables. Una vía interesante para mejorar la economía del proceso consiste en identificar y mejorar los componentes individuales de las preparaciones enzimáticas y suplementar con enzimas accesorias las actividades en las que son deficitarias.

Las actividades de los cócteles celulolíticos suelen evaluarse sobre sustratos purificados comerciales como el papel de filtro o “Avicel” (Boisset y col., 2001; Medve y col., 1998). Sin embargo, es generalmente aceptado que las actividades sobre estos sustratos tipo aportan solo una estimación de la capacidad de las enzimas para hidrolizar sustratos lignocelulósicos. A diferencia del papel de filtro o el “Avicel” la biomasa lignocelulósica contiene además de celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya proporción en el sustrato influye significativamente en la HE (Mansfield y col., 1999; Öhgren y col., 2007a).

Por lo tanto, es necesario evaluar las mezclas enzimáticas sobre sustratos lignocelulósicos reales y mediante la aplicación de técnicas de ensayo apropiadas (Banerjee y col., 2010). Con este objetivo, se ha desarrollado en esta Tesis un microensayo enzimático que permite la evaluación de componentes y mezclas enzimáticas sobre un sustrato lignocelulósico real (resultados publicados en artículo III, incluido como anexo en esta Tesis).

Los microensayos enzimáticos son una herramienta muy interesante para evaluar nuevas combinaciones de enzimas puesto que permiten evaluar un gran número de mezclas enzimáticas en poco tiempo. Además, las enzimas recombinantes que se producen actualmente sólo a escala de laboratorio se obtienen en pequeñas cantidades, por lo que la aplicación de ensayos a microescala, en volúmenes de ensayo muy pequeños, resulta apropiada para analizar su efecto en la HE. Berlin y col. desarrollaron un microensayo enzimático utilizando hojas elaboradas a partir de

Tulípero de Virginia (*Liriodendron tulipifera*) pretratado con organosolventes, que contenía fundamentalmente celulosa, y apenas hemicelulosa y lignina (Berlin y col., 2005). En este trabajo, el sustrato de paja de trigo pretratada utilizado contiene una proporción significativa de hemicelulosa y lignina, por lo que se ha estudiado la presencia de estos componentes en la efectividad de las diferentes enzimas para hidrolizar la celulosa.

Ante necesidad de evaluar de forma rápida y adecuada los cócteles enzimáticos se han propuesto recientemente otras novedosas metodologías automatizadas de selección enzimática utilizando sustratos como paja de trigo y píceas micronizadas (Navarro y col., 2010), planta de tabaco (Gómez y col., 2010) o bagazo de maíz pretratado con amonio (AFEX) (Chundawat y col., 2008).

4.5.1 Composición de las hojas de paja de trigo pretratada

Uno de los problemas que condiciona la utilización de sustratos lignocelulósicos pretratados en volúmenes de ensayo pequeños es su elevada heterogeneidad, que dificulta la repetibilidad de los ensayos. La elaboración de hojas con paja de trigo pretratada permite evaluar las enzimas sobre un sustrato lignocelulósico real que presenta una composición homogénea, por lo que resulta idóneo para su aplicación en microensayos enzimáticos. Como se describe en el apartado 3.3, para obtener un sustrato homogéneo se elaboraron hojas de paja de trigo a partir de la fracción insoluble (RSI) pretratada por explosión por vapor (EV) a 220 °C y 2,5 min (material pretratado I).

La composición de las hojas de paja de trigo y del RSI pretratado empleado para su elaboración se comparó para detectar posibles alteraciones en el sustrato durante el proceso de formación de las hojas. La tabla 4.16 muestra la composición de ambos sustratos, no observándose diferencias significativas entre la composición del RSI y de las hojas. Tanto el contenido en celulosa, 66,4% en el RSI y 66,5% en las hojas, como el contenido en hemicelulosa, lignina y cenizas fue muy similar. Por lo tanto, la preparación de las hojas no alteró la composición del material pretratado y se consideró un material adecuado para ser utilizado como sustrato en el microensayo. Para comprobar la composición homogénea de todas las hojas se confirmó que el peso de todas ellas fue similar y estable, y se tomaron muestras por triplicado de diferentes hojas y de diferentes zonas de las mismas. Estas muestras se analizaron en

cuanto a su composición, no encontrándose diferencias significativas. Para su utilización en los microensayos enzimáticos se cortaron pequeños discos de hoja de paja de trigo pretratada al tamaño deseado.

Tabla 4.16. Composición de RSI y hojas de paja de trigo pretratada por EV, 220 °C, 2,5 min.

Componente	RSI (material pretratado I) (%, p/p)	Hojas (%, p/p)
Celulosa	66,4 ± 4,2	66,5 ± 0,1
Hemicelulosa	3,7 ± 0,8	4,4 ± 0,1
Lignina	29,4 ± 4,3	28,1 ± 1,5
Cenizas	4,1 ± 0,5	4,6 ± 0,5

4.5.2 Validación del microensayo enzimático

4.5.2.1 Pérdidas por evaporación en los ensayos en microplaca

Los ensayos de HE se realizaron a 50 °C, temperatura óptima para las enzimas utilizadas, por lo que podrían producirse pérdidas de volumen por evaporación que influirían en los resultados. En los ensayos en microplacas, además de sellarlas con un adhesivo durante todo el proceso de HE se calcularon las pérdidas por evaporación experimentalmente. Para ello, se aplicó una concentración conocida de glucosa (10 g/l) en los pocillos y se midieron los cambios en la concentración a lo largo del proceso de incubación. El factor de corrección determinado para los distintos tiempos estudiados se muestra en la tabla 4.17 y se tuvo en cuenta al analizar los resultados de los experimentos. Debido a su gran influencia en los resultados, las posibles pérdidas por evaporación deben ser recalculadas cuando se modifiquen las condiciones de ensayo (temperatura, agitación, etc.)

Tabla 4.17. Factor de corrección por pérdidas por evaporación en los ensayos de HE en microplaca.

Tiempo incubación (h)	Concentración glucosa determinada (g/l)	Factor corrección (%)
3	10	0,0
6	10,01	0,1
24	10,14	1,4
48	10,68	6,4
72	11,00	9,1

4.5.2.2 Efecto del volumen de ensayo

En general, la reducción del volumen en los ensayos a microescala permite estudiar condiciones de ensayo distintas en menos tiempo, disminuyendo las cantidades requeridas de enzimas y otros reactivos. Sin embargo, un volumen de ensayo pequeño puede dificultar la mezcla de los componentes y afectar las interacciones enzima-sustrato. Para evaluar el efecto de la reducción del volumen de ensayo se llevaron a cabo experimentos en microplacas y tubos “eppendorf” (volumen ensayo, 0,5 ml) y en matraces “erlenmeyer” de 100 ml (volumen ensayo, 25 ml). En todos ellos se utilizó como sustrato las hojas de paja de trigo en una concentración de 1% de sólidos totales (ST) (p/v) y una mezcla de las enzimas NS 50013 y NS 50010 en una dosis de 15 UPF y 15 UI β -glucosidasa/g celulosa, respectivamente. La figura 4.9 muestra que los perfiles de producción de glucosa en los tres ensayos fueron muy similares, obteniéndose rendimientos de HE a las 72 h de entre 85 y 89%. La producción de xilosa (no mostrada) también fue muy similar entre los distintos ensayos. Un análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas entre las medias de las variables estudiadas con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, se concluyó que la reducción del volumen de ensayo de 25 ml a 0,5 ml no afectó los rendimientos de HE.

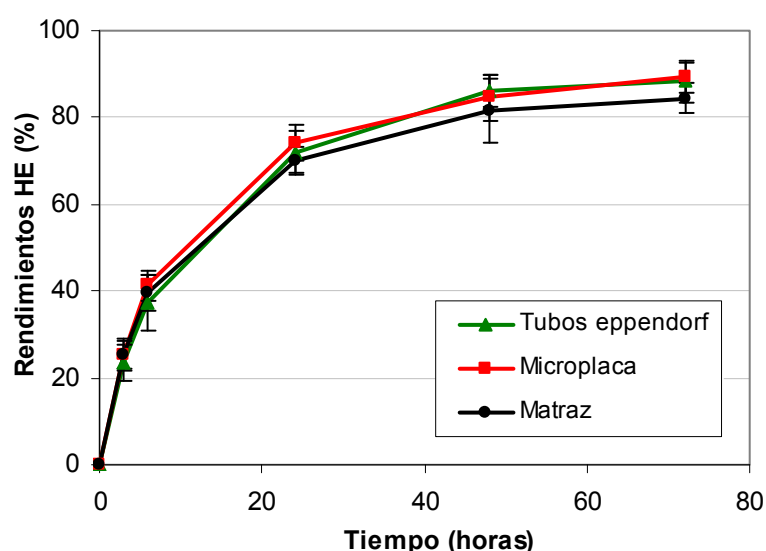


Figura 4.10. Efecto del volumen de ensayo en los rendimientos de HE utilizando hojas de paja de trigo como sustrato (50 °C, 1% ST (p/v)). Dosis enzimática: 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010).

4.5.2.3 Efecto de las condiciones de secado del sustrato en la HE

Para la validación del microensayo enzimático resulta necesario comparar los resultados de HE obtenidos con las hojas elaboradas a partir del RSI de paja pretratada y los obtenidos en ensayos en matraz con RSI como sustrato.

Aunque el RSI utilizado para elaborar las hojas no se secó previamente, en el proceso de formación de las hojas existe una etapa final de secado a temperatura ambiente. Existe cierta evidencia en la bibliografía de que en los materiales pretratados no secados los capilares mantienen la humedad y los poros superficiales permanecen abiertos, favoreciendo la accesibilidad enzimática (Esteghlalian y col., 2001). Por el contrario, el proceso de secado elimina el agua interfibrilar aumentando la unión entre las fibras adyacentes y disminuyendo la superficie accesible para las enzimas (Hendriks y Zeeman, 2009).

Para evaluar el efecto de la etapa de secado en la formación de las hojas se realizaron ensayos de HE utilizando como sustratos RSI sin secar (80% humedad) y RSI secado a temperatura ambiente (6% humedad). Ambos materiales procedían del mismo lote de paja de trigo pretratada utilizada para la formación de las hojas, por lo que su composición es la misma (material pretratado I). Los resultados de los ensayos en matraz se compararon con los obtenidos en los microensayos con las hojas como sustrato. En todos los ensayos la concentración de sustrato fue de 1% ST (p/v) y las dosis de enzima 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI β -glucosidasa/g celulosa (NS 50010). En la figura 4.10 se muestran los rendimientos de HE (glucosa) obtenidos. En los ensayos en matraz, se observó el efecto negativo del secado, ya que al inicio de la HE la producción de glucosa con RSI secado fue ligeramente inferior a la obtenida con el RSI sin secar. Los rendimientos obtenidos con las hojas como sustrato también fueron ligeramente menores a los de los ensayos con RSI húmedo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas a partir de las 24 h, obteniéndose al final del proceso resultados muy similares. El análisis ANOVA no detectó diferencias significativas y tampoco se observaron diferencias en la producción de xilosa o celobiosa (no mostrado en la figura). De hecho, la celobiosa fue detectada en muy baja concentración debido a la relativamente alta dosis de β -glucosidasa (15 UI/g celulosa) empleada en los ensayos.

A la vista de los resultados obtenidos se pudo concluir que la formación de hojas a partir de paja de trigo pretratada por EV no implicó alteraciones significativas

en las propiedades del sustrato y por tanto, se pueden considerar un sustrato adecuado para su aplicación en ensayos de HE.

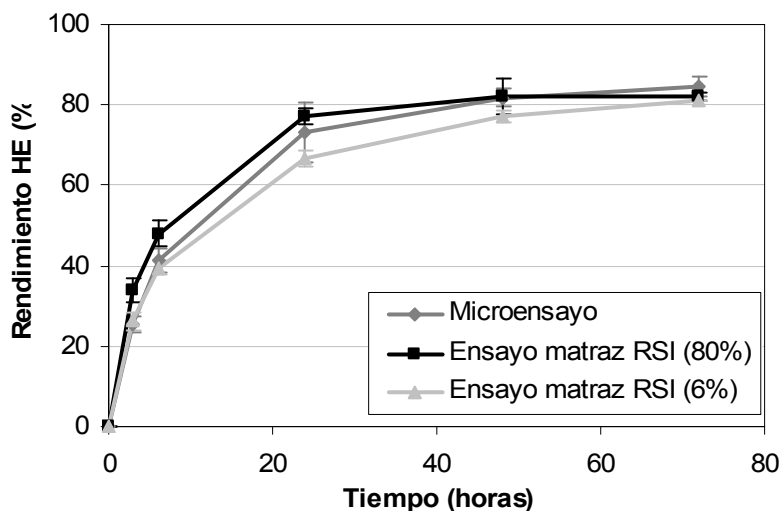


Figura 4.10. Rendimientos de HE en ensayos en matraz y en microensayos utilizando como sustratos RSI con diferente grado de humedad y hojas de paja de trigo (1% ST (p/v)). Dosis enzimática: 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010).

4.5.2.4 Material pretratado completo como medio de HE

Además de estudiar la efectividad de los nuevos preparados enzimáticos sobre el RSI del material pretratado, es interesante determinar su comportamiento sobre el material pretratado completo (MPC). La utilización del MPC como sustrato en lugar del RSI ofrece la posibilidad de mejorar la eficiencia global del proceso de producción de etanol debido a la cantidad de azúcares potencialmente fermentables. Además, la utilización del MPC evita la etapa de filtrado y disminuye el gasto de agua en el proceso. El inconveniente principal de utilizar el MPC es su contenido en compuestos de degradación solubles formados durante el pretratamiento que pueden actuar como inhibidores de la HE y la fermentación (Cantarella y col., 2004; García-Aparicio y col., 2006).

En este contexto, es necesario evaluar el efecto de los azúcares solubles y de los compuestos inhibidores sobre las mezclas enzimáticas, por lo que el microensayo enzimático se adaptó para utilizar también el MPC como medio de HE. Como en el

caso de la utilización del RSI, para validar el microensayo con MPC los resultados se compararon con ensayos estándar en matraz. Con el fin de obtener una proporción de sólidos solubles e insolubles igual que en el MPC original, en el microensayo enzimático se añadió, además de los discos de paja de trigo pretratada, un volumen de prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV en la misma proporción en la que se encuentra en el MPC.

En este caso, para considerar el efecto de los compuestos inhibitorios se utilizaron dos concentraciones distintas de sustrato en los ensayos: 1,5 y 3,8% ST (p/v) (figuras 4.11 y 4.12, respectivamente). Las dosis de enzima fueron las utilizadas anteriormente: 15 UPF de NS 50013 y 15 UI β -glucosidasa de NS 50010 por gramo de celulosa.

En los ensayos de HE con el MPC destaca la mayor concentración en el medio de xilosa respecto a los ensayos con RSI, debido su solubilización durante el pretratamiento. Los rendimientos de HE (glucosa y xilosa) mostrados en las figuras 4.11 y 4.12 apenas mostraron diferencias en ninguno de los casos entre los ensayos a microescala y los ensayos en matraz, lo que muestra la validez del microensayo enzimático al utilizar el MPC como sustrato. Para confirmar los resultados, se realizó un análisis ANOVA, que no detectó diferencias significativas entre las condiciones ensayadas.

Los resultados obtenidos permiten validar la aplicación del método de microensayo para estudiar preparaciones enzimáticas utilizando el MPC como medio de HE. Este procedimiento no ha sido descrito en la bibliografía previamente, por lo que supone una contribución novedosa respecto a otros procedimientos de microensayo enzimático desarrollados hasta el momento.

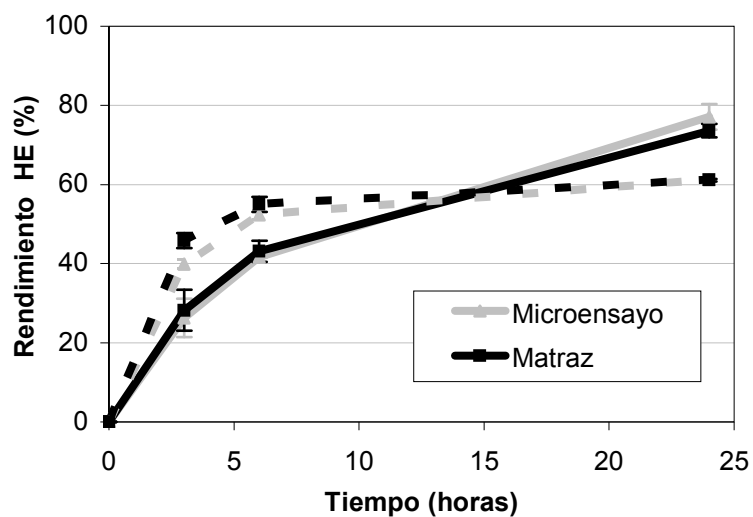


Figura 4.11. Rendimientos HE (glucosa, línea continua y xilosa, línea discontinua). Sustrato MPC, 1,5% ST (p/v), 50 °C. Dosis enzimática: 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010).

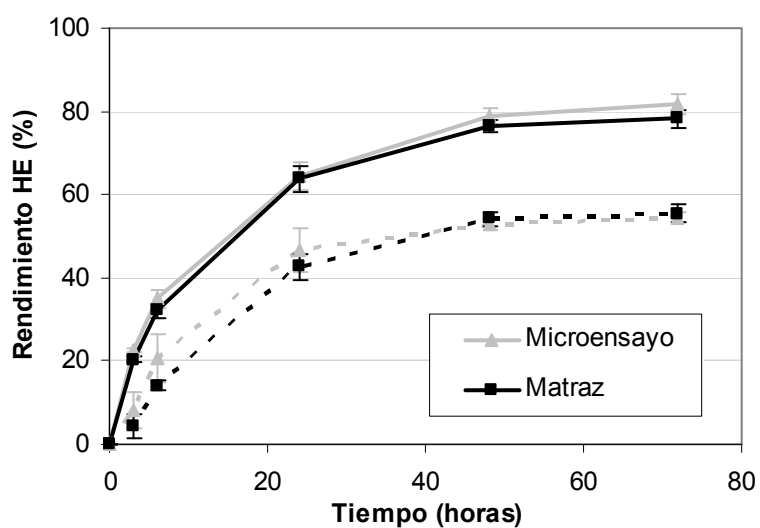


Figura 4.12. Rendimientos HE (%), glucosa, línea continua y xilosa, línea discontinua). Sustrato MPC, 3,8% ST (p/v), 50 °C. Dosis enzimática: 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010).

4.6 Evaluación de nuevos preparados celulolíticos mediante microensayos enzimáticos

Como ya se ha explicado anteriormente, el coste de las enzimas es uno de los principales obstáculos para la comercialización del etanol de lignocelulosa por lo que muchas investigaciones se han centrado en los últimos años en la mejora de los complejos enzimáticos, tanto en sus características hidrolíticas, como en sus costes de producción (Cherry y Fidantsef, 2003). En esta Tesis, algunas de las preparaciones recientemente producidas por compañías biotecnológicas como “Novozymes” o “Genencor” han sido evaluadas en ensayos de HE sobre un sustrato lignocelulósico como la paja de trigo pretratada por EV.

Las preparaciones enzimáticas NS 50031, NS 50073, Accellerase 1000, NS 22074 y la mezcla NS 50013-NS 50010 se evaluaron mediante microensayos enzimáticos utilizando hojas de paja de trigo pretratada (RSI, material pretratado I). Las actividades enzimáticas determinadas en estas preparaciones se muestran en las tablas 4.13 y 4.14. Como puede observarse, las distintas preparaciones enzimáticas presentan un contenido en proteínas muy diferente. En este estudio, para comparar la efectividad de los distintos cócteles enzimáticos y la influencia de otras actividades presentes en las preparaciones se han realizado ensayos utilizando las enzimas a la misma dosis de actividad celulasa (15 UPF/g celulosa). Además, se realizó un ensayo en el que las distintas enzimas se compararon utilizando como dosis la misma carga de proteína. Todos los ensayos se realizaron a una concentración de RSI de 1,3% ST (p/p) a 50 °C durante 72 h.

4.6.1 Ensayos de HE a la misma actividad sobre papel de filtro

La mezcla de NS 50013 y NS 50010 ha sido ampliamente utilizada en la bibliografía para ensayos de HE para producción de etanol, por lo que se utilizó como mezcla control. El volumen utilizado de cada preparación y las demás actividades enzimáticas aplicadas en los ensayos se muestran en la tabla 4.18.

Tabla 4.18. Volumen y actividades enzimáticas (UI/g celulosa) de las distintas preparaciones correspondientes a una actividad sobre papel de filtro de 15 UPF/g celulosa.

	Enzimas				
	NS 50013 + NS 50010	NS 50073	NS 50031	Accellerase 1000	NS 22074
Volumen (μl)	0,847	1,230	0,224	1,140	0,586
Celulasa (UPF/g)	15	15	15	15	15
Proteína (mg/g)	28,8	79,3	23,9	24,3	27,8
β-glucosidasa (UI/g)	17,6	489,5	32,5	38,4	234,3
Endoglucanasa (UI/g)	156,3	314,1	91,5	183,5	141,7
Celulasa (Avicel) (UI/g)	17,2	22,6	13,2	15,1	22,0
Xilanasa (UI/g)	23,0	58,8	36,3	27,6	27,0
β-xilosidasa (UI/g)	8,5	20,0	1,8	2,3	6,1
α-L Arabinofuranosidasa (UI/g)	3,6	n.d.	1,6	0,5	3,5

Como se observa en la figura 4.13, los perfiles de hidrólisis con las diferentes enzimas fueron similares, alcanzándose concentraciones entre 7,8 y 8,3 g/l de glucosa al final del proceso. No obstante, con el preparado NS 22074 se obtuvieron concentraciones más altas en las primeras horas de hidrólisis, alcanzándose a las 24 h un rendimiento en glucosa del 84%, cercano al máximo obtenido a las 72 h (89%). A la dosis empleada en los ensayos, NS 22074 aportó una actividad β-glucosidasa de 234,3 UI/g celulosa, claramente más alta que el resto de enzimas estudiadas, exceptuando NS 50073 (489,5 UI/g, tabla 4.18). Con NS 50073, también se obtuvieron rendimientos altos de producción de glucosa, lo que confirmó la importancia de la actividad β-glucosidasa y el efecto inhibitor por producto final que la celobiosa puede ejercer sobre las celulasas. Sin embargo, debido a la baja actividad celulasa específica de esta preparación la carga de proteína necesaria para alcanzar estos rendimientos fue muy alta (79,3 mg proteína/g celulosa), lo que limita sus posibilidades de aplicación.

Los diferentes preparados fueron añadidos en la misma dosis de actividad sobre papel de filtro, y sin embargo mostraron diferentes cinéticas de producción de glucosa. Estos resultados confirman que las actividades sobre sustratos tipo, como el papel de filtro, no definen el potencial real de las enzimas para hidrolizar un material

lignocelulósico como la paja de trigo, y por tanto la necesidad de evaluar las enzimas sobre sustratos pretratados reales.

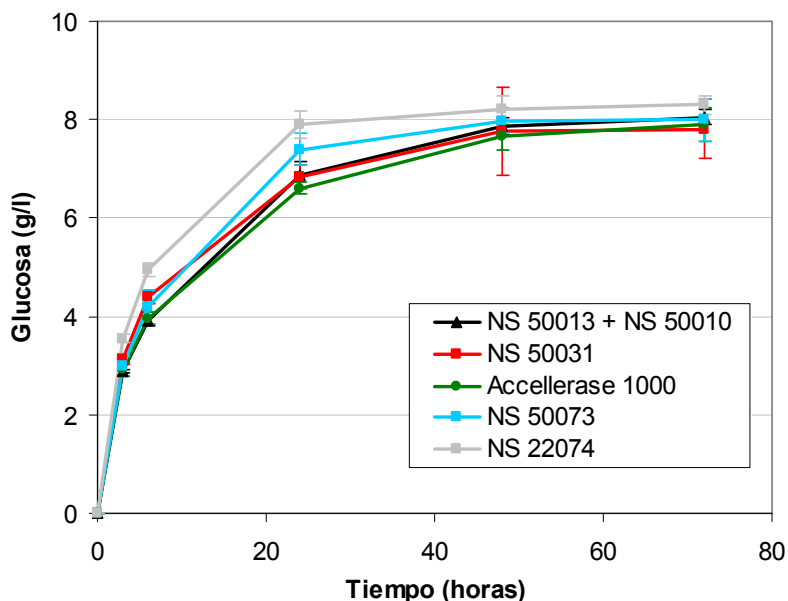


Figura 4.13. HE. Producción de glucosa con las diferentes preparaciones enzimáticas. Dosis: 15 UPF/g celulosa. Sustrato RSI, 1,3% ST (p/p).

4.6.2 Ensayos de HE a la misma carga de proteína

El contenido en proteínas de las preparaciones enzimáticas es un factor importante para su evaluación y valoración como producto comercial, por lo que las diferentes enzimas se estudiaron en un ensayo a la misma carga de proteína. Una dosis de 15 UPF/g celulosa de la preparación NS 50013, suplementada con 15 UI β -glucosidasa/g celulosa de la preparación NS 50010, equivale a 36 mg proteína/g celulosa. Por tanto, los diferentes preparados enzimáticos se compararon utilizando esta misma carga de proteína, lo que implicó diferentes dosis de actividad sobre papel de filtro aplicadas. En la tabla 4.19 se resumen las distintas actividades correspondientes a la dosis de 36 mg/g celulosa para cada uno de los preparados.

Tabla 4.19. Volumen y actividades enzimáticas (UI/g celulosa) de las distintas preparaciones correspondientes a una carga de proteína de 36 mg/g celulosa.

	Enzimas				
	NS 50013 + NS 50010	NS 50073	NS 50031	Accellerase 1000	NS 22074
Volumen (μl)	1,076	0,58	0,34	1,70	0,76
Proteína (mg/g)	36	36	36	36	36
Celulosa (UPF/g)	19,2	6,0	22,8	22,3	19,4
β-glucosidasa (UI/g)	22,4	230,8	49,3	57,2	276,0
Endoglucanasa (UI/g)	156,0	148,0	138,8	273,7	166,9
Celulasa (Avicel) (UI/g)	17,0	10,7	20,0	22,4	27,1
Xilanasa (UI/g)	28,7	24,4	41,8	73,7	35,0
β-xilosidasa (UI/g)	10,8	9,5	2,8	3,4	7,2
α-L Arabinofuranosidasa (UI/g)	4,6	n.d.	2,4	0,7	4,2

La figura 4.14 muestra la cinética de producción de glucosa a lo largo de 72 h de HE. A la misma carga de proteína todas las enzimas evaluadas excepto el preparado NS 50073, que tiene baja actividad celulasa, mejoran la producción de glucosa respecto a la mezcla control.

Los resultados indican, como en el ensayo anterior, que una mayor actividad sobre papel de filtro no implica necesariamente mejores rendimientos de HE de la paja de trigo pretratada, lo que demuestra que esta actividad no refleja totalmente el potencial de los preparados enzimáticos para hidrolizar materiales lignocelulósicos. La enzima NS 22074 presentó una actividad específica sobre papel de filtro más baja que los preparados Accellerase 1000 y NS 50031, y sin embargo resultó la más eficiente en cuanto a producción de glucosa (figura 4.14). Con NS 22074 se alcanzó, a las 24 h de proceso, prácticamente el máximo de producción de glucosa con un rendimiento del 92%, mientras que a las 72 h la mayor producción de glucosa se obtuvo con las preparaciones NS 22074 y Accellerase 1000. Otras actividades presentes en la preparación NS 22074, como sus elevada actividad β-glucosidasa (7,66 UI/mg proteína) y celobiohidrolasa (sobre Avicel) (0,72 UI/mg proteína) explicarían estos resultados (tabla 4.13).

Con Accellerase 1000 y NS 50031 se obtuvieron producciones de glucosa similares a las 24 h. A partir de ese momento, mientras que con NS 50031 apenas cambia la concentración de glucosa en el medio, con Accellerase 1000 la producción aumenta hasta las 72 h. Con la dosis de 36 mg/g celulosa ambas enzimas presentan una actividad sobre papel de filtro muy similar, pero Accellerase 1000 muestra actividades endoglucanasa, y β -glucosidasa más elevadas, lo que puede explicar la diferencia en la cinética de producción de glucosa. NS 22074 también mostró mayores actividades endoglucanasa, celobiohidrolasa (Avicel) y β -glucosidasa que NS 50031.

La enzima NS 50073 mostró una actividad celulasa específica claramente más baja que el resto de los preparados, por lo que la producción de glucosa fue menor, y sólo al final de la HE se alcanzaron rendimientos similares a los obtenidos con la mezcla control. También presentó una actividad β -glucosidasa específica muy alta, por lo que prácticamente no se acumuló celobiosa durante la HE.

El material pretratado utilizado en estos ensayos no contiene gran cantidad de hemicelulosa (4,4%, tabla 4.16), por lo que la producción de xilosa fue baja y apenas se encontraron diferencias entre las enzimas estudiadas. No obstante, existen evidencias en la bibliografía de que la acción de las xilanasas aumenta la accesibilidad de las celulasas y mejora la HE, aún cuando el contenido de hemicelulosa es bajo (García Aparicio y col., 2007). De esta forma, la mayor actividad xilanasas específica presente en NS 50031, Accellerase 1000 y NS 22074 contribuiría al aumento de rendimiento en glucosa observado en la figura 4.14. La enzima NS 22074 presentó además mayor actividad β -xilosidasa y α -L-arabinofuranosidasa (AF) en comparación con NS 50031 y Accellerase 1000.

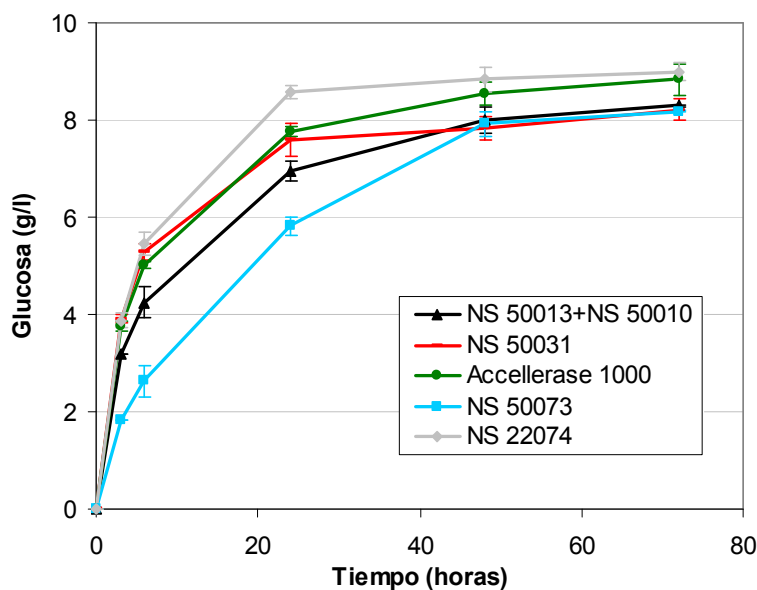


Figura 4.15. HE. Producción de glucosa con las diferentes preparaciones enzimáticas. Dosis: 36 mg proteína/g celulosa. Sustrato RSI, 1,3% ST (p/p).

4.7 Aplicación de preparados enzimáticos en la producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada por explosión por vapor

En los procesos comerciales de producción de etanol a partir de lignocelulosa es necesaria la utilización de altas cargas de sustrato que permitan alcanzar altas concentraciones de azúcares y de etanol. De hecho, para realizar una destilación viable económicamente es necesario obtener tras la fermentación una concentración mínima de etanol de 4% (p/p) (~40 g/l) (Ballesteros y col., 2004; Wingren y col., 2003). El principal inconveniente de incrementar la carga de sólidos en la HE es la disminución proporcional de los rendimientos del proceso, lo que contrarresta las ventajas de utilizar altas concentraciones de sustrato. Por ello, es necesario estudiar el comportamiento de los distintos preparados enzimáticos en ensayos con alta consistencia.

Según los resultados obtenidos en los ensayos a microescala, se han seleccionado las preparaciones enzimáticas Accellerase 1000 y NS 22074, que se han evaluado a diferentes dosis en ensayos con alta carga de sólidos (16,7% ST (p/p)). En este estudio, se utilizó como sustrato RSI de paja de trigo pretratada por EV suministrado por Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, que presentó una composición de 55,5% de celulosa, 5,0% de hemicelulosa y 34% de lignina.

NS 22074 y Accellerase 1000 se evaluaron en ensayos de HE durante 72 h, tras las que se redujo la temperatura a 32 °C y se inició la fermentación, de tal forma que el proceso transcurrió hasta un total de 144 h. Se utilizaron cuatro dosis de enzima distintas: 9, 19, 29 y 37 mg proteína/g celulosa, que corresponden aproximadamente a 5, 10, 15 y 20 UPF/g celulosa, respectivamente.

En la figura 4.15 se muestran las cinéticas de producción de glucosa durante las 72 h de HE empleando las diferentes dosis de enzima. Con las dosis más altas (37 mg), la producción de glucosa máxima a las 72 h fue de 91 g/l con NS 22074 y 93 g/l con Accellerase 1000, alcanzando rendimientos de 74,5% y 76,2% del teórico, respectivamente. Con el preparado Accellerase 1000 se observa una relación directa entre la carga de enzima y la producción de glucosa. Sin embargo, con NS 22074 la producción de glucosa fue similar a las 72 h con las dosis de enzima más altas (37, 29 y 19 mg). Con la dosis más baja (9 mg/g celulosa), la producción de glucosa fue significativamente menor. En los ensayos con 19 mg proteína, la producción de glucosa es inferior a la de los ensayos con mayor carga de enzima hasta las 48 h de proceso, igualándose la glucosa obtenida al final de HE. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los ensayos mostrados en el apartado anterior (4.6.1 y 4.6.2), con baja consistencia de sólidos, se observa una clara disminución en el rendimiento de HE debido al aumento en la concentración de sustrato.

Los rendimientos específicos a las 72 h, expresados como gramo de glucosa producida/g proteína en el ensayo fueron similares con las dos enzimas a las dosis más altas de 29 y 37 mg proteína, sin embargo a menores cargas de enzima (9 y 19 mg) el rendimiento fue significativamente más alto con NS 22074 (tabla 4.20). Cabe destacar que con NS 22074 se obtuvieron rendimientos cercanos al máximo a las 48 h y con 19 mg/g celulosa de enzima; que corresponde a 10 UPF/g celulosa. Esta carga de enzima es más baja que la utilizada generalmente en la HE de materiales lignocelulósicos pretratados (15 UPF/g celulosa), así que con estas condiciones se conseguiría reducir las dosis y el tiempo del proceso.

Como se observó en el apartado anterior, aunque la actividad específica sobre papel de filtro es ligeramente superior en el caso del preparado Accellerase 1000, NS 22074 mostró mayores actividades sobre Avicel, y especialmente β -glucosidasa (tabla 4.13 y 4.14), lo que puede explicar los mejores rendimientos obtenidos con esta preparación. Además, las actividades específicas α -L-arabinofuranosidasa y β -xilosidasa también fueron más altas en NS 22074 (tabla 4.14).

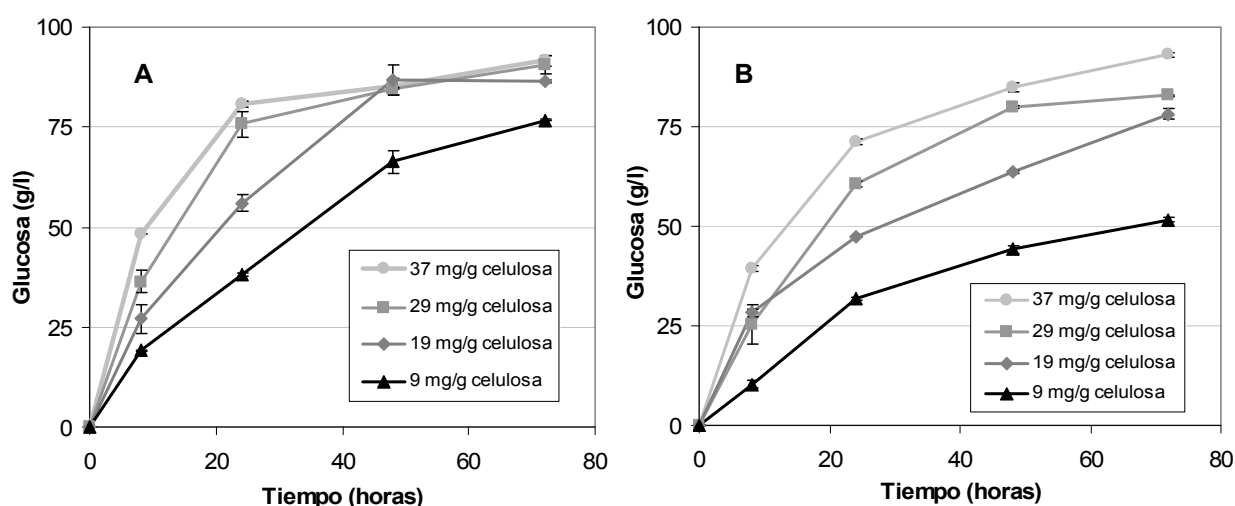


Figura 4.15. HE. Producción de glucosa utilizando diferentes dosis de enzima NS 22074 (A). Accellerase 1000 (B). Condiciones de hidrólisis: 50 °C, 150 rpm. Sustrato RSI, 16,7% ST (p/p).

Tabla 4.20. Rendimientos específicos (g glucosa/g proteína) de HE a las 72 h de HE con las enzimas NS 22074 y Accellerase 1000.

Enzima	Dosis (mg/g celulosa)			
	9	19	29	37
NS 22074	76,8	50,0	28,1	22,3
Accellerase 1000	51,7	37,0	25,7	22,7

Con objeto de estudiar la producción de etanol en estos ensayos, tras las 72 h de HE se disminuyó la temperatura a 32 °C, se añadieron las sales y se inóculo con 1 g/l de levadura *S. cerevisiae* "Ethanol Red". En la figura 4.16 se muestran los resultados de producción de etanol hasta las 72 h de fermentación (144 h de proceso) con las distintas dosis de NS 22074 y Accellerase 1000. La producción de etanol cuando se utilizó NS 22074 varió entre 41 y 46 g/l, con un rendimiento en etanol de 81,9%. No se observaron diferencias en la producción de etanol entre las distintas dosis de enzima empleadas, excepto a la dosis más baja, con la que la producción de etanol fue ligeramente inferior. Cuando se utilizó Accellerase 1000, las diferencias en la producción de azúcares tras 72 h de HE con las diferentes cargas de enzima también se reflejaron en la producción de etanol, que varió entre 26 y 44 g/l a las 144 h de proceso. El rendimiento máximo de etanol con la dosis de 37 mg fue de 78,3%.

En todos los ensayos se obtuvieron rendimientos teóricos de proceso (HE + fermentación) superiores a los obtenidos en la etapa de HE. La transformación de la glucosa en etanol por la acción de la levadura reduce la inhibición por producto final de la glucosa sobre las celulasas, incrementándose los rendimientos.

En este caso y bajo las condiciones de alta carga de sustrato estudiadas se obtuvieron altos rendimientos de HE y fermentación, alcanzándose concentraciones de etanol superiores a 40 g/l (necesarias para una destilación económicamente viable) tanto con Accellerase 1000 (44 g/l) como NS 22074 (46 g/l). Aunque los rendimientos máximos obtenidos con ambas enzimas fueron similares, la utilización de la enzima NS 22074 permitió obtener concentraciones de etanol superiores a 40 g/l, incluso con la dosis de enzima más baja utilizada (9 mg/g celulosa, 41,5 g/l de etanol).

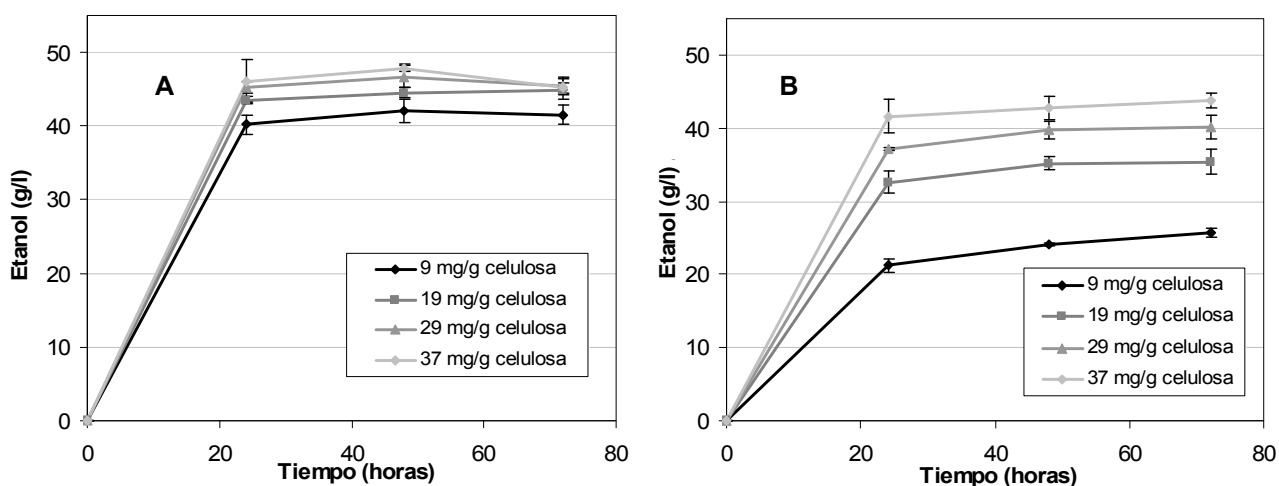


Figura 4.16. Producción de etanol durante 72 h de fermentación con *S. cerevisiae* "Ethanol Red" (1 g/l) y tras 72 h de HE (tiempo total del proceso: 144 h) empleando diferentes concentraciones de enzima NS 22074 (A) y Accellerase 1000 (B). Sustrato: RSI de paja de trigo pretratado, 16,7% ST (p/p).

4.8 Efecto de distintas estrategias de suplementación enzimática en la hidrólisis enzimática y la producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada por explosión por vapor

Debido a la compleja composición y estructura de la biomasa lignocelulósica, la formulación de complejos enzimáticos adecuados para la degradación de los carbohidratos que contiene, es una de las vías de investigación más interesantes para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática (HE) y reducir los costes de producción del etanol.

En este apartado, se ha estudiado la suplementación de los cócteles celulolíticos con distintas actividades enzimáticas, y se evaluó su potencial para aumentar la producción de azúcares fermentables durante la HE de paja de trigo por explosión por vapor (EV). Por un lado, se han estudiado preparaciones comerciales con actividad hemicelulasa, que muestran distintas actividades, principalmente xilanasas. Además, se ha evaluado el potencial para mejorar la capacidad hidrolítica de los preparados celulolíticos comerciales de otras enzimas recombinantes con actividades específicas: endoxilanasas, una α -L-arabinofuranosidasa, dos celobiohidrolasas, una endoglucanasa y proteínas expansinas.

4.8.1 Efecto de la suplementación con xilanasas comerciales en la HE de paja de trigo pretratada

La presencia de hemicelulosa en el sustrato se considera uno de los factores que más influye en la HE de la biomasa lignocelulósica. La matriz que forman las cadenas de hemicelulosa interacciona con las fibras de celulosa y las protege del ataque enzimático, por lo que la adición de enzimas hemicelulasas, que degradan componentes de la hemicelulosa, puede aumentar la accesibilidad de las celulasas a las fibras de celulosa y mejorar la eficacia del proceso de HE. El efecto positivo de la suplementación con hemicelulasas sobre sustratos lignocelulósicos ha sido descrito por distintos autores (Benkö y col., 2008; Kumar y Wyman, 2009a-b; Li y col., 2010a-b).

En este trabajo, se ha estudiado la HE de paja de trigo pretratada utilizando una mezcla de celulasas (NS 50013 y NS 50010) suplementada con dos preparaciones comerciales con actividad hemicelulasa, NS 50030 y NS 50014, ambas de "Novozymes". El objetivo fue evaluar el efecto de estas enzimas en la degradación

de paja de trigo pretratada por EV. Las actividades enzimáticas y el contenido en proteínas de estas preparaciones se resumen en la tabla 4.13, donde se observa que la actividad predominante en ambas preparaciones es la actividad xilanasa. En la preparación NS 50030 se detectó además cierta actividad β -xilosidasa (41,0 UI/ml) y α -L-arabinofuranosidasa (4,2 UI/ml).

4.8.1.1 Efecto de la suplementación con las xilanasas NS 50014 y NS 50030 en la HE utilizando RSI como sustrato

Para evaluar el efecto de la suplementación con las xilanasas NS 50014 y NS 50030 se realizaron ensayos de HE utilizando como sustrato el residuo sólido insoluble (RSI) de paja de trigo pretratada por EV a 220 °C y 2,5 min (material pretratado I) en una concentración de sustrato de 1,3% de sólidos totales (ST) (p/p). A la mezcla de celulasas NS 50013-NS 50010 (15 UPF-15 UI β -glucosidasa/g celulosa) se añadió una dosis de 10 mg proteína/g celulosa de xilanasa. La dosis de 10 mg/g celulosa equivale a 1512,6 UI xilanasa/g celulosa y a 276,2 UI xilanasa/g celulosa para las preparaciones NS 50014 y NS 50030, respectivamente (tabla 4.21).

Tabla 4.21. Actividaes enzimáticas (UI/g celulosa) correspondientes a 10 mg proteína/g celulosa suplementadas en el ensayo de HE.

Enzima	Volumen (μ l)	Xilanasa	β -xilosidasa	AF
NS 50014	4,6	1512,6	<0,1	<0,1
NS 50030	2,2	276,2	21,6	2,2

La figura 4.17 muestra la producción de glucosa y xilosa durante la HE. La concentración de xilosa en el medio fue baja debido al bajo contenido en hemicelulosa del RSI (4,4%), no observándose diferencias significativas a las 72 h entre el ensayo control sin suplementar y los ensayos suplementados. Sin embargo, hasta las 24 h las concentraciones más altas de xilosa se detectaron en el ensayo de suplementación con la enzima NS 50030, que además de xilanasa mostró actividad β -xilosidasa.

La suplementación tanto con NS 50014 como con NS 50030 mejoró significativamente la producción de glucosa con respecto al control (NS 50013-NS 50010) hasta las 6 h. Al final del proceso (72 h), los rendimientos de glucosa se

igualaron, alcanzándose un 87-90% del rendimiento teórico en todos los casos. A pesar de que la preparación NS 50014 posee una actividad xilanasa significativamente superior, los mejores resultados se obtuvieron con la suplementación con NS 50030, con la que se alcanzó un rendimiento en glucosa de 86% a las 24 h. Esta preparación presenta mayor actividad β -xilosidasa, que hidroliza las cadenas cortas de xilano generadas por la xilanasa, y por tanto se detecta más xilosa libre en el medio de hidrólisis. Además, la presencia de cadenas laterales en la hemicelulosa también puede dificultar la accesibilidad a las cadenas de xilano, por lo que la mayor actividad α -L-arabinofuranosidasa (AF) presentes en el preparado NS 50030 podría contribuir a las mejoras obtenidas en la HE respecto a la preparación NS 50014. Los resultados muestran el potencial de estas preparaciones, principalmente NS 50030, para mejorar la hidrólisis de la fracción hemicelulósica y aumentar la accesibilidad de las celulasas a las fibras de celulosa.

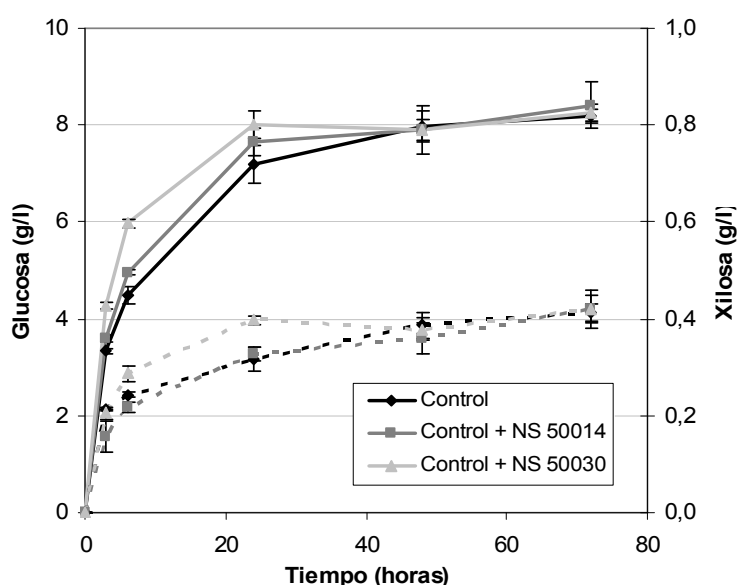


Figura 4.17. HE. Efecto de la suplementación con NS 50030 y NS 50014. Producción de glucosa (g/l, líneas continuas) y xilosa (g/l, líneas discontinuas). Sustrato: RSI, 1,3% ST (p/p). 50 °C, 800 rpm.

4.8.1.2 Efecto de la suplementación con la xilanasa NS 50030 en la HE de paja de trigo pretratada a alta carga de enzima y baja carga de enzima

Para el desarrollo comercial de la HE de materiales lignocelulósicos es necesario utilizar bajas dosis de enzima, que reduzcan el coste del catalizador, y altas cargas de sustrato, que permitan obtener altas concentraciones de azúcares

fermentables. Puesto que la suplementación con NS 50030 se mostró más efectiva que la suplementación con NS 50014, se realizaron ensayos utilizando la enzima NS 50030 con mayor carga de sustrato y menores cargas de enzima. La suplementación con NS 50030 se evaluó no sólo sobre el RSI, sino también sobre el material pretratado completo (MPC) (material pretratado I, 220 °C, 2,5 min). El MPC y el RSI se utilizaron en una concentración de 6,8% y 4,8% ST (p/p), respectivamente, de tal forma que en ambos casos la concentración de sólidos insolubles (RSI) fue la misma (4,8%). La mezcla control (C) de celulasas (NS 50013-NS 50010; 5 UPF-5 UI β -glucosidasa/g celulosa) se suplementó con NS 50030 en dosis de 0,55, 1,1, 2,2 y 3,3 mg proteína/g celulosa, que corresponden aproximadamente a 15, 30, 60 y 90 UI xilanasa/g celulosa.

- Efecto de la suplementación con la xilanasa NS 50030 utilizando RSI como sustrato

La figura 4.18 muestra las cinéticas de producción de glucosa y xilosa en los ensayos realizados con las diferentes mezclas enzimáticas sobre RSI como sustrato. En general, la adición de la enzima NS 50030 mejoró de forma significativa los rendimientos de HE tanto en glucosa como en xilosa, no observándose diferencias significativas entre las diferentes dosis estudiadas. El rendimiento en glucosa de la mezcla control fue de 48,7%, mientras que la suplementación con NS 50030 incrementó la producción de glucosa a las 72 h en un 23,7%, alcanzando un rendimiento máximo de 60,3%. La producción de xilosa aumentó con las distintas dosis de NS 50030 hasta en un 37,0%, obteniéndose un rendimiento máximo de 50,2%.

Aunque el contenido en xilano de este sustrato es relativamente bajo (3,6%), las xilanasas pueden actuar sobre la hemicelulosa residual y sobre la depositada sobre las fibras durante el pretratamiento, incrementándose de este modo la accesibilidad de las fibras de celulosa. Además, las xilanasas también pueden ocupar sitios inespecíficos de unión, reduciendo las uniones improductivas de las celulasas y mejorando su rendimiento. También en estos ensayos con baja carga de celulosa, las xilanasas han mostrado un efecto positivo sobre sustratos con bajo contenido en xilano, lo que parece indicar el importante papel que tiene la ubicación y disposición de la hemicelulosa (no sólo la cantidad) en la hidrólisis de la celulosa (García-Aparicio y col., 2007; Várnai y col., 2010).

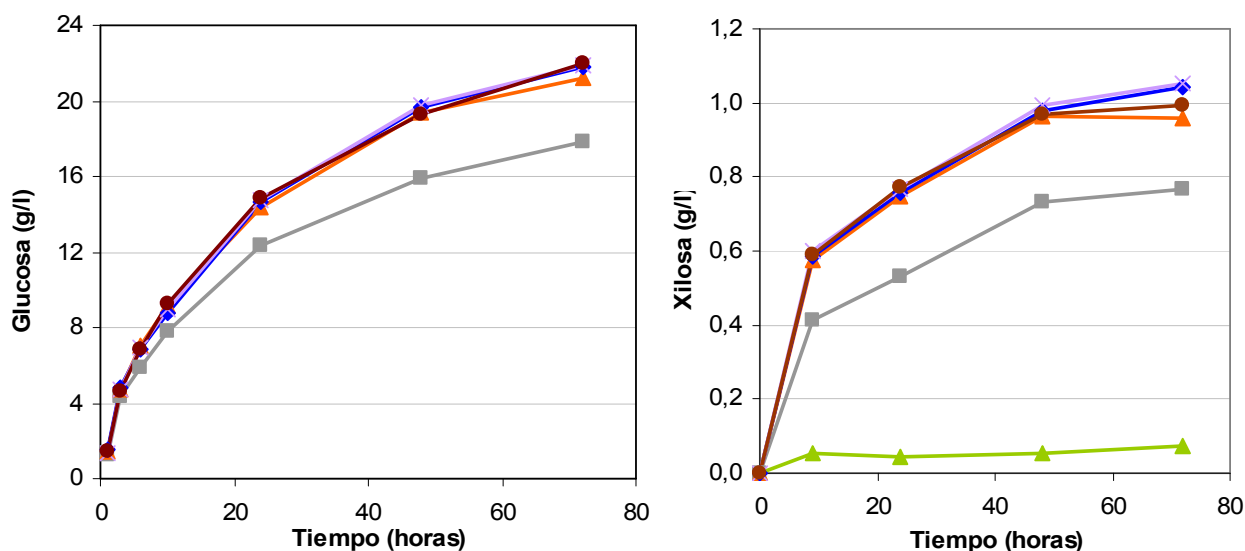


Figura 4.18. HE. Producción de glucosa y xilosa (g/l) en ensayos de suplementación con NS 50030. Sustrato RSI, 220 °C, 2,5 min, 4,8% ST (p/p).

- Control (C): NS 50013 (5 UPF/g celulosa) + NS 50010 (5 UI β -glucosidasa/g celulosa)
- ▲ NS 50030 (3,3 mg/g celulosa)
- ▲ C + NS 50030 (0,55 mg/g celulosa)
- ◆ C + NS 50030 (1,1 mg/g celulosa)
- ✕ C + NS 50030 (2,2 mg/g celulosa)
- C + NS 50030 (3,3 mg/g celulosa)

- Efecto de la suplementación con la xilanasa NS 50030 utilizando MPC como sustrato

La figura 4.19 muestra las cinéticas de producción de glucosa y xilosa en los ensayos de suplementación con NS 50030 durante las 72 h de HE. Como ocurrió con el RSI, la adición de xilanasa al medio de hidrólisis generó un aumento significativo en la producción de glucosa y xilosa respecto al control sólo con celulasas (NS 50013-NS 50010). En este caso, tampoco se detectaron diferencias significativas entre las distintas dosis de NS 50030. A las 72 h, la producción de glucosa aumentó entre un 19,0 (1,1 mg NS 50030) y un 26,4% (3,3 mg NS 50030) en comparación con el control, alcanzando un rendimiento máximo de 51,5%. A pesar de que el MPC contiene 3,4 g/l de glucosa (solubilizada durante el pretratamiento), la concentración final es ligeramente más baja que la obtenida en los ensayos con RSI como sustrato. El menor rendimiento en glucosa al emplear el MPC se explica por el efecto inhibitor que los azúcares solubles y los compuestos de degradación ejercen sobre las enzimas.

Respecto a la producción de xilosa, se observó un aumento considerable de la concentración en el medio de hidrólisis en comparación con los ensayos con RSI. La presencia de xilosa libre (4,4 g/l) y de oligómeros de xilosa (19,2 g/l) solubilizados en el MPC explica esta diferencia. La producción de xilosa en los ensayos de suplementación con NS 50030 aumentó con las distintas dosis entre un 1,3 y un 5,4% respecto al control, alcanzando un rendimiento máximo de 59,5%. En este caso, además del efecto en la HE de la hemicelulosa insoluble, que potencia la hidrólisis de la celulosa, las xilanasas hidrolizan los oligómeros de xilosa solubles. Estos xilooligómeros se han descrito como inhibidores de la acción de las celulasas, por lo que la acción de las xilanasas hidrolizando los oligómeros puede reducir este efecto (Qing y col., 2010).

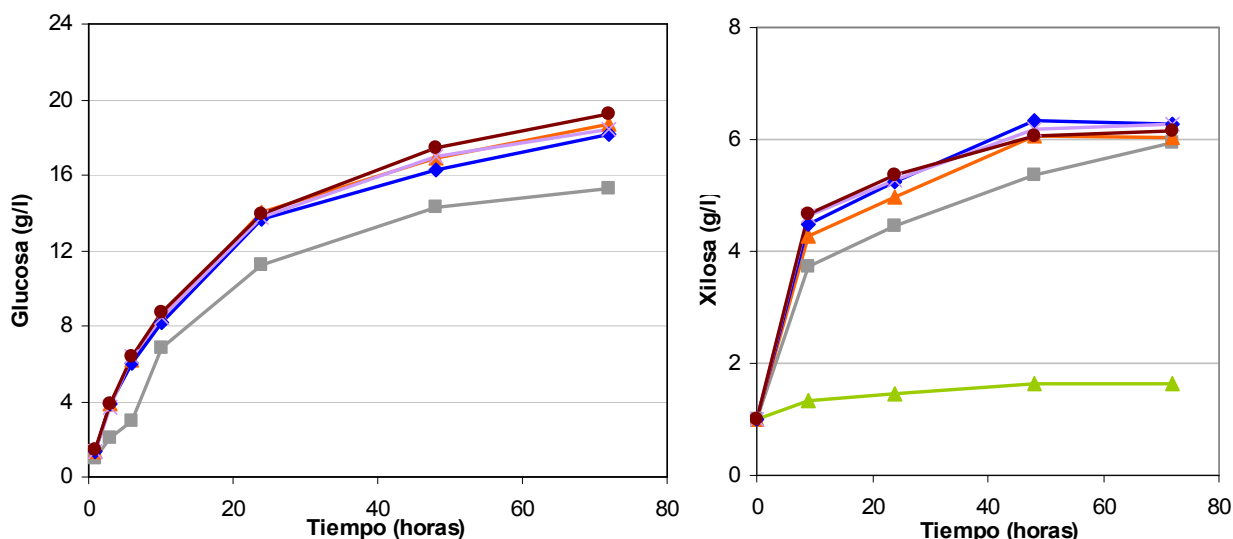


Figura 4.19. HE. Producción de glucosa y xilosa (g/l) en ensayos de suplementación con NS 50030. Sustrato MPC, 220 °C, 2,5 min, 6,8% ST (4,8% RSI) (p/p).

- Control (C): NS 50013 (5 UPF/g celulosa) + NS 50010 (5 UI β -glucosidasa/g celulosa)
- ▲ NS 50030 (3,3 mg/g celulosa)
- ▲ C + NS 50030 (0,55 mg/g celulosa)
- ◆ C + NS 50030 (1,1 mg/g celulosa)
- ✕ C + NS 50030 (2,2 mg/g celulosa)
- C + NS 50030 (3,3 mg/g celulosa)

En general, aunque el rendimiento de HE en glucosa disminuyó respecto a la utilización del RSI, la producción de azúcares fermentables (glucosa y xilosa) totales aumentó con el MPC como sustrato, ya que contiene tanto los azúcares solubilizados en el pretratamiento como los producidos mediante la HE. Resultados similares han

sido observados en anteriores trabajos en los que la inhibición de los azúcares solubles y de los compuestos de degradación presentes en el MPC afectaron negativamente los rendimientos de HE en glucosa (Cantarella y col., 2004; García-Aparicio y col., 2006). La inhibición de los azúcares solubles podría aliviarse mediante procesos de HE acoplados a la fermentación. En este contexto, la integración del MPC en el proceso de producción de etanol resultaría especialmente apropiada en procesos que incluyen co-fermentación de glucosa y xilosa, como se mostrará en el apartado 4.9.

En este estudio, la suplementación con la xilanasa NS 50030 mejoró en todos los casos los rendimientos de HE de paja de trigo pretratada por EV, lo que muestra su potencial para mejorar la eficacia del proceso. El efecto positivo de la NS 50030 sobre la HE se puede explicar por el aumento de la accesibilidad de las celulasas a las cadenas de glucano como consecuencia de la hidrólisis de la hemicelulosa, o bien por la ruptura de los enlaces que unen celulosa y hemicelulosa. Ambos mecanismos, aunque están probablemente relacionados, son difíciles de demostrar experimentalmente debido a la compleja estructura de la lignocelulosa.

4.8.1.3 Efecto de la suplementación con la xilanasa NS 50030 sobre la producción de etanol en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

El efecto de la suplementación con la xilanasa NS 50030 se evaluó en la producción de etanol en ensayos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) sobre paja de trigo pretratada por EV a 220 °C-2,5 min (material pretratado I). Los experimentos se realizaron utilizando la levadura *S. cerevisiae* "Ethanol Red" y como sustrato se utilizaron tanto el RSI como el MPC. La concentración del RSI en el medio fue de 9,1% ST (p/p), mientras que cuando se utilizó el MPC la concentración fue de 5,7% ST (p/p). Previo al proceso de SFS se realizó una presacarificación a 50 °C y 150 rpm durante 24 h, tras las que se redujo la temperatura a 32 °C y se inició la fermentación con una carga de inóculo de 1 g/l. Se utilizaron las enzimas NS 50013 (10 UPF/g celulosa) y NS 50010 (10 UI β -glucosidasa/g celulosa), suplementadas con la xilanasa NS 50030 en una dosis de 3,3 mg proteína/g celulosa, que corresponde a 90 UI xilanasa/g celulosa.

En la figura 4.20 se muestran los perfiles de SFS obtenidos cuando se utilizó el RSI como sustrato. Como puede observarse, la suplementación con xilanasa también tuvo un efecto positivo en la producción de etanol. El rendimiento obtenido en el ensayo control fue de 58,9%, mientras que la suplementación con xilanasa aumentó el rendimiento hasta el 62,0%. Esta mejora se debió, fundamentalmente, al incremento en la producción de glucosa derivado de la acción de la xilanasa.

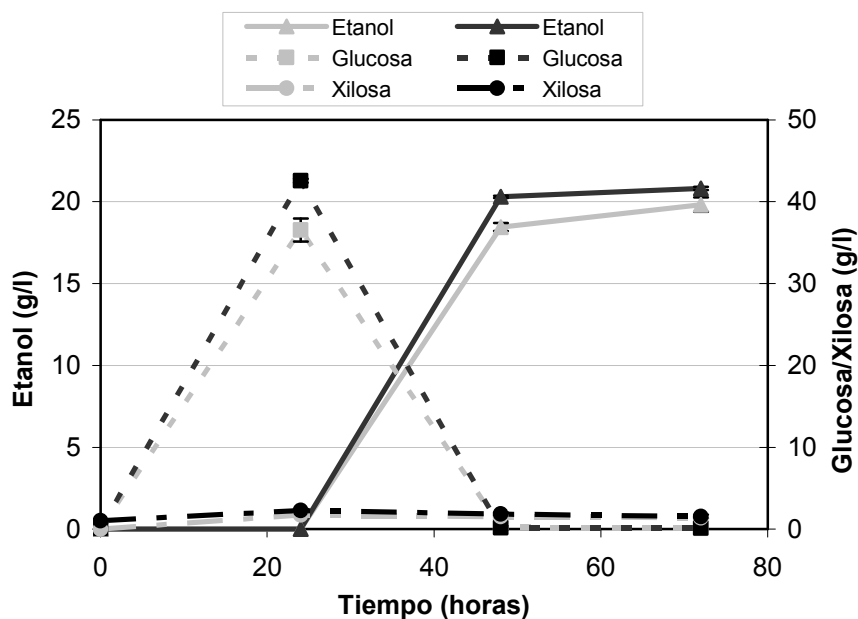


Figura 4.20. SFS. Producción de glucosa, xilosa y etanol (g/l). Inóculo: 1 g/l *S. cerevisiae* "Ethanol Red". Sustrato RSI, 9,1% ST (p/p). Tiempo de presacarificación: 24h. Dosis: NS 50013, 10 UPF/g celulosa; NS 50010, 10 UI/g celulosa; NS 50030, 90 UI (3,3 mg proteína) xilanasa/g celulosa. Líneas grises: Control sin suplementación con NS 50030. Líneas negras: Ensayo de suplementación con NS 50030.

Cuando se utilizó MPC, no se llegó a producir etanol durante las 72 h de proceso. En el prehidrolizado del material pretratado se detectaron 1,8 g/l de furfural, 0,4 g/l de hidroximetilfurfural, 2,6 g/l de ácido fórmico y 6,4 g/l de ácido acético, además de menores concentraciones de productos de degradación de la lignina. La toxicidad de los compuestos de degradación presentes en el MPC inhibió el crecimiento y la producción de etanol de la levadura. Por el contrario, la HE no fue totalmente inhibida por los compuestos de degradación y después de 72 h de proceso se detectaron 24,2 g/l de glucosa y 7,9 g/l de xilosa libres. Cuando se añadió xilanasa, las concentraciones de glucosa y xilosa fueron de 26,8 g/l y 8,7 g/l, respectivamente. Resultados similares se han obtenido en otros trabajos con sustratos lignocelulósicos

pretratados en los que se observó un aumento en la producción de glucosa y xilosa pero una inhibición total del crecimiento de la levadura (Linde y col., 2007; Tomás-Pejó y col., 2009b). La aplicación de procesos químicos de destoxificación o la aplicación de enzimas con capacidad para degradar compuestos fenólicos derivados de la lignina, como las lacasas, son una opción interesante para aumentar la fermentabilidad de los sustratos lignocelulósicos pretratados. Como se ha mostrado en el apartado 4.3.2.2, la evaporación y posterior incremento del pH reduce la concentración de productos de degradación en la fracción soluble generada en el pretratamiento, reduciendo su efecto tóxico.

4.8.2 Efecto de la suplementación con endoxilanasas (XInC y XInA) y α -L-arabinofuranosidasa (AF) en la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada

Como se ha mostrado en el apartado anterior, la compleja estructura de la lignocelulosa hace que la suplementación de los cócteles celulolíticos con enzimas accesorias, como xilanasas u otras hemicelulasas, tenga gran potencial para aumentar los rendimientos de la HE. Sin embargo, el mecanismo por el que la adición de enzimas hemicelulasas potencia la HE de la celulosa no ha sido totalmente explicado hasta el momento. La hemicelulosa de materiales herbáceos como la paja de trigo está formada principalmente por polímeros de xilano, monosustituidos por residuos de otros azúcares, como la arabinosa. En este estudio, se evaluó el efecto de enzimas recombinantes, que mostraron distintas actividades hemicelulasas. Se estudiaron dos endoxilanasas (XInC y XInA) y una α -L-arabinofuranosidasa (AF) en ensayos de HE con paja de trigo pretratada por EV como sustrato, para evaluar su efecto en la liberación de azúcares fermentables. Los principales resultados obtenidos han sido publicados en el artículo IV, incluido como anexo en esta Tesis.

Estas enzimas fueron producidas y suministradas por Biopolis S.L. (<http://www.biopolis.es/>). XInC y XInA son endoxilanasas de *Aspergillus nidulans* clonadas y expresadas en *S. cerevisiae* bajo el control de un promotor constitutivo (Fernández-Espinar y col., 1992; Pérez-González y col., 1996). XInC pertenece a la familia 10, cuyas enzimas se caracterizan por no ser específicas del xilano, sino que pueden presentar cierta actividad ante oligómeros de pequeño tamaño. Por su parte, XInA pertenece a la familia 11, que incluye enzimas específicas de xilano (Collins y col., 2005; Vries y Visser, 2001). AF es una enzima de *Aspergillus niger*, producida por la cepa transformante *S. cerevisiae* T7 (Sánchez-Torres y col., 1996).

4.8.2.1 Caracterización de XInC, XInA y AF

Las enzimas XInC, XInA y AF se caracterizaron en cuanto a sus actividades enzimáticas y su contenido en proteínas (tabla 4.15). Las actividades específicas de estas enzimas se muestran en la tabla 4.22. Se observó que XInC y XInA mostraron fundamentalmente actividad endoxilanasas, mientras que AF mostró principalmente actividad α -L-arabinofuranosidasa. Estas enzimas no fueron purificadas, se utilizaron a partir de los medios de cultivo liofilizados, y por lo tanto no todo el contenido en proteína en el cultivo corresponde a las enzimas XInC, XInA o AF.

Tabla 4.22. Contenido en proteínas y actividades específicas (UI/mg de proteína) de XInC, XInA y AF.

	Proteínas *	Celulasa (UPF/mg)	β -glucosidasa (UI/mg)	Xilanasas (UI/mg)	β -xilosidasa (UI/mg)	α -L-arabinofuranosidasa (UI/mg)
XInC	15,7 \pm 1,4	< 0,1	< 0,1	46,7	0,1	< 0,1
XInA	398,6 \pm 10,3	< 0,1	< 0,1	2,1		
AF	15,8 \pm 0,6	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	3,4

* El contenido en proteínas está expresado como mg/g del cultivo liofilizado.

4.8.2.2 Estudio de la adición de diferentes dosis de XInC, XInA y AF en la HE

En primer lugar se realizaron ensayos para estudiar la suplementación por separado de XInC, XInA y AF en ensayos de HE sobre el MPC de paja de trigo como sustrato.

- Xilanasas C (XInC)

Los ensayos de HE se suplementaron con diferentes dosis de **XInC** utilizando el MPC obtenido tras el pretratamiento por EV a 210 °C y 2,5 min (material pretratado III) como medio de HE. La concentración de sustrato utilizada fue de 10% ST (p/p) y como complejo celulolítico se utilizó una mezcla de NS 50013 y NS 50010 (5 UPF y 15 UI β -glucosidasa/g celulosa, respectivamente), que se suplementó con 50, 100, 200 y 400 UI xilanasas/g celulosa de XInC.

La figura 4.21 muestra la producción de glucosa (A) y xilosa (B) en los diferentes ensayos. La suplementación con XInC tuvo un efecto positivo, aumentando

la producción de xilosa y, especialmente, la de glucosa. Aunque las distintas dosis de XInC aumentaron los rendimientos de producción de glucosa y xilosa, con dosis superiores a 100 UI sólo se detectó una ligera mejora en los rendimientos, que incluso llegaron a disminuir en algún caso. Esta disminución del rendimiento con dosis altas de xilanasa podría deberse a la competición con las celulasas por los sitios de unión, que afectaría negativamente el proceso de HE. Con la dosis de 100 UI/g celulosa (2 mg de proteína/g celulosa) la producción de glucosa y xilosa a las 72 h aumentó respecto al control en un 24,2 y un 6,9%, respectivamente. En comparación con el ensayo con una dosis de 50 UI/g celulosa, la suplementación con 100 UI/g celulosa mejoró la producción de glucosa y xilosa en un 10,9 y un 9,4%, respectivamente.

XInC mostró básicamente actividad endoxilanasas, cuya acción tiene como productos principales xilotriosa, xilobiosa. Bajo estas condiciones de ensayo, XInC aportó menos de 0,1 UI β -xilosidasa/g celulosa, por lo que la adición de esta actividad aumentaría probablemente la producción de xilosa (Selig, et al., 2008).

Los ensayos realizados mostraron el potencial de la suplementación con XInC para mejorar la eficacia del proceso de HE de paja de trigo pretratada. Según los resultados obtenidos se fijó una dosis de 100 UI/g celulosa para posteriores ensayos de suplementación enzimática.

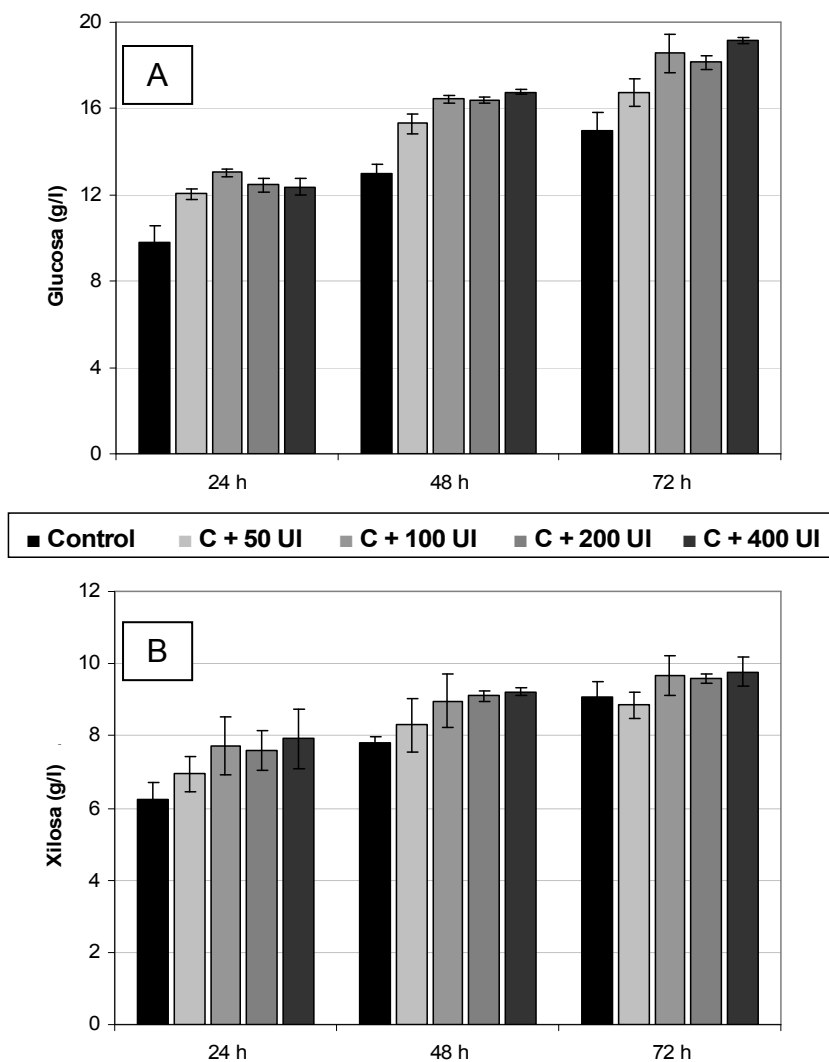
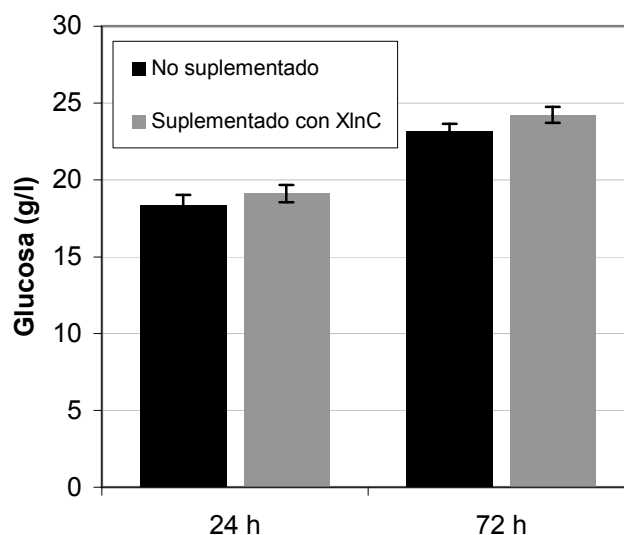


Figura 4.21. Efecto de la adición de XInC en la HE de paja de trigo pretratada (MPC, 210 °C, 2,5 min, 10% ST (p/p)). A. Producción de glucosa (g/l). B. Producción de xilosa (g/l). Dosis celulosa: NS 50013, 5 UPF/g celulosa; NS 50010, 15 UI β -glucosidasa/g celulosa; XInC, 50, 100, 200 y 400 UI. 50 °C, 150 rpm.

Una vez observado el efecto positivo de XInC sobre el rendimiento de HE, se llevó a cabo un experimento en el que se igualaron las cargas de enzima en base al contenido en proteína (27 mg proteína/g celulosa). En el ensayo sin suplementación se añadieron 24 mg de proteína del preparado celulolítico NS 50013 y 3 mg de proteína de β -glucosidasa (NS 50010) por gramo de celulosa. En el ensayo de suplementación se redujo la carga de NS 50013 a 22 mg y se añadieron 2 mg de proteína (100 UI) de XInC, para mantener así la carga total de proteína en 27 mg/g celulosa. La figura 4.22 muestra las dosis empleadas en los dos ensayos y la producción de glucosa a las 24 y 72 h de HE. En el ensayo sin suplementación, a pesar de tener mayor actividad sobre papel de filtro se obtuvo menor producción de glucosa. En el ensayo suplementado

con XInC, a pesar de utilizar menor dosis de celulasa se mejoró la producción de glucosa a las 24 y 72 h, lo que demuestra una vez más el efecto positivo de la actividad xilanasa en los cócteles enzimáticos y su potencial para reducir las cargas de celulasas en el proceso.



DOSIS (mg prot/g celulosa)				
	NS 50013	NS 50010	XIn C	Total
No suplementado	24 (10 UPF)	3 (15 UI)	0	27
Suplementado con XInC	22 (9 UPF)	3 (15 UI)	2 (100 UI)	27

Figura 4.22. HE. Cargas de enzima empleadas en los ensayos (mg/g celulosa) y producción de glucosa (g/l) a las 24 y 72 h. Sustrato MPC, 10% ST (p/p). 50 °C, 150 rpm.

- Xilanasa A (XInA)

Se estudió el efecto en la HE de paja de trigo pretratada por EV de la endoxilanasas **XInA** (familia 11 de glicosil hidrolasas) y se comparó con la XInC (familia 10). Ambas xilanasas (XInA y XInC) se suplementaron en una dosis de 100 UI xilanasas/g celulosa a una mezcla de NS 50013 (10 UPF/g celulosa) y NS 50010 (15 UI/g celulosa), que se utilizó como control. Se utilizó como sustrato el MPC pretratado a 210 °C y 2,5 min (material pretratado IV) en una concentración de 10% ST (p/p).

La figura 4.23 muestra la producción de glucosa y xilosa en los diferentes ensayos. Se observó que la suplementación tanto con XInA como con XInC mejoró la producción de glucosa durante la HE respecto al control sin suplementar. A las 72 h este aumento fue de alrededor de un 21% con ambas endoxilanasas. Aunque al final

del proceso no se detectaron diferencias significativas entre los ensayos con XInA y con XInC, al comienzo de la HE (3 y 6 h) se observó mayor producción de glucosa en el caso de la suplementación con XInC. Como se ha comentado, XInA pertenece al grupo de xilanasas de la familia 11, que podrían ser inhibidas por la presencia de oligómeros (Vries y Visser, 2001). El MPC contiene una cierta cantidad de oligómeros solubles (20,7 y 2,0 g/l de xilosa y glucosa oligomérica, respectivamente), por lo que su presencia en el medio de HE explicaría los resultados obtenidos con XInA en las primeras horas de HE. Por su parte, XInC pertenece a la familia 10, que ha sido descrita por no mostrar inhibición por oligómeros.

En cuanto a la producción de xilosa, no se observaron diferencias entre los distintos ensayos a partir de las 24 h. A las 6 h de proceso sí se detectó un aumento con la suplementación con XInC respecto a los demás ensayos. Como en el ensayo anterior, una mayor dosis de actividad β -xilosidasa podría aumentar la producción de xilosa monomérica en el medio. A la vista de los resultados obtenidos, la enzima XInC se muestra más adecuada para su aplicación en procesos de HE utilizando el MPC de paja de trigo pretratada.

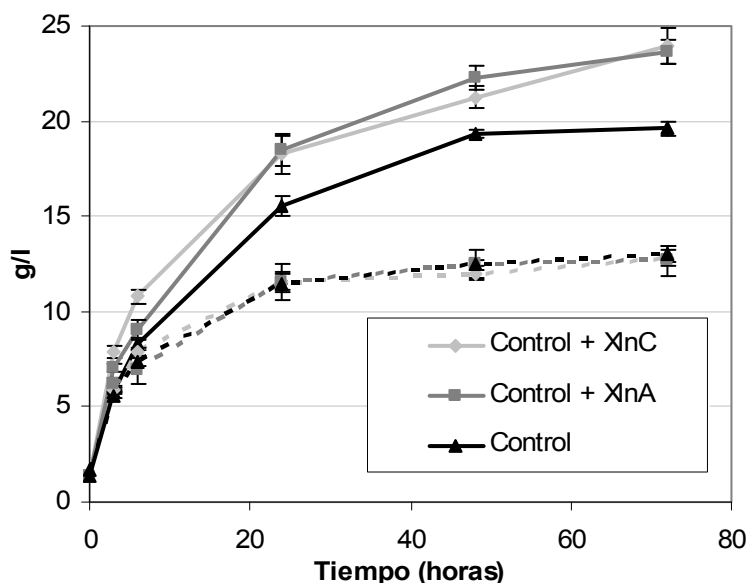


Figura 4.23. HE. Producción de glucosa (g/l, líneas continuas) y de xilosa (g/l, líneas discontinuas). Dosis enzimáticas: NS 50013, 10 UPF/g celulosa; NS 50010, 15 UI β -glucosidasa/g celulosa; XInA y XInC, 100 UI xilanasas/g celulosa. Sustrato MPC 210 °C, 2,5min, 10% ST (p/p). 50 °C, 150 rpm.

- α -L-arabinofuranosidasa (AF)

La enzima AF utilizada en este trabajo es una α -L-arabinofuranosidasa B, que puede actuar sobre el arabinoxilano, retirando los residuos de arabinosa unidos mediante enlaces α -1,2 y α -1,3 a la cadena de xilano. En la paja de trigo las moléculas de arabinosa se encuentran generalmente monosustituidas en posición C-3 en la cadena de xilano (Sun y col., 1999; Sun y col., 2005a-b). Por lo tanto, la acción de AF permite retirar sustituciones laterales, aumentar los sitios de unión de las endoxilasas y mejorar la hidrólisis de la hemicelulosa, que a su vez puede conllevar una mejora en la hidrólisis de la celulosa (Saha, 2003). Además, los residuos de arabinosa pueden actuar formando enlaces con intermediarios de la lignina, por lo que su retirada ayudaría a romper el complejo lignina-carbohidratos (Raweesri y col., 2008).

Se estudiaron distintas dosis de AF en ensayos de suplementación enzimática utilizando como sustrato el MPC de paja de trigo pretratada por EV a 210 °C y 2,5 min (material pretratado IV, tabla 4.3) en una concentración de 10% ST (p/p). Este sustrato presentó un 0,4% de arabinosa en el RSI y 0,5 g/l de arabinosa soluble en forma oligomérica. Las distintas dosis de AF (10, 15, 20 y 25 UI α -L-arabinofuranosidasa/g celulosa) se suplementaron a la mezcla de celulasas compuesta por NS 50013 (5 UPF/g celulosa) y NS 50010 (5 UI β -glucosidasa/g celulosa).

La figura 4.24 muestra la producción de glucosa durante la HE, que en estos ensayos incluye la concentración tanto de glucosa como de celobiosa. En general, se observó el efecto positivo de la suplementación con AF, aunque con las dosis más altas (20 y 25 UI/g celulosa) apenas se aumentaron los rendimientos alcanzados con la dosis de 15 UI/g celulosa, lo que podría indicar saturación de los sitios de unión para la AF. Por otro lado, los liofilizados procedentes del cultivo de *S. cerevisiae* pueden contener, además de la enzima AF, otros compuestos que, en altas concentraciones, podrían interferir en la HE.

A las 72 h la producción de glucosa máxima se obtuvo con la dosis de 15 UI que corresponde a 4,5 mg proteína/g celulosa. El aumento respecto al control sin suplementar fue de un 8,7%, una diferencia estadísticamente significativa según el test Tukey HSD con un nivel de confianza del 95%.

En cuanto a la producción de xilosa (no mostrada), no se observaron diferencias significativas entre los ensayos suplementados con AF y el control, pero se detectó un aumento en la concentración de xilobiosa y xilotriosa en los ensayos suplementados con AF, lo que demuestra el efecto positivo de AF en la hidrólisis de la hemicelulosa. La producción de arabinosa mejoró ligeramente durante las primeras horas de HE, no observándose diferencias al final del proceso. Según los resultados obtenidos se fijó una dosis de AF de 15 UI/g celulosa para posteriores ensayos de suplementación enzimática con esta actividad.

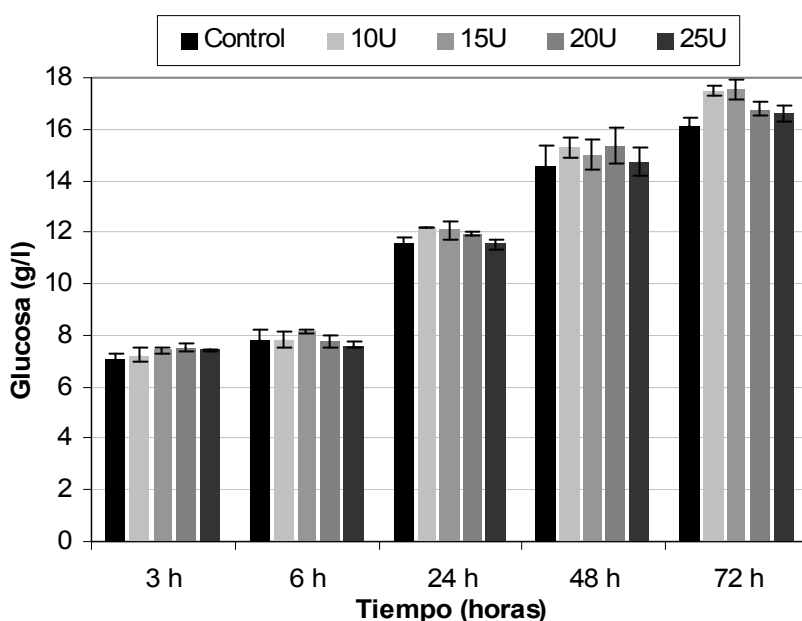


Figura 4.24. Efecto de diferentes dosis de AF en la producción de glucosa (g/l) en ensayos de HE con paja de trigo pretratada (210 °C, 2,5 min, 10% ST (p/p)). Dosis celulosa: NS 50013, 5 UPF/g celulosa; NS 50010, 5 UI β -glucosidasa/g celulosa; AF, 10, 15, 20, 25 UI α -L-arabinofuranosidasa/g celulosa.

Yang y Wyman observaron que la adición de proteínas como albúmina sérica bovina (BSA) durante la HE de sustratos lignocelulósicos puede reducir las uniones inespecíficas de las enzimas celulolíticas y mejorar el proceso (Yang y Wyman, 2006). Para comprobar si la adición de AF mejora la HE como consecuencia de su acción hidrolítica, o por la propia presencia de proteína ocupando sitios inespecíficos, se realizó un ensayo para comparar los efectos en la HE de la proteína BSA y la enzima AF. Ambas proteínas (BSA y AF) se añadieron a una mezcla de celulasas en la misma dosis, 4,5 mg proteína/g celulosa, observándose el efecto positivo de la actividad α -L-

arabinofuranosidasa respecto a la proteína BSA (resultados no mostrados). Se descartó por tanto que el efecto positivo de la adición de AF se deba su unión a sitios inespecíficos y sí a su actividad catalítica sobre el sustrato lignocelulósico.

4.8.2.3 Efecto de la combinación de AF y XInC en la HE de paja de trigo pretratada (MPC) a diferente severidad

Una vez observado el potencial tanto de las endoxilanasas, como de AF para mejorar la HE de paja de trigo, se estudió el efecto de la combinación de estas actividades sobre sustratos pretratados por EV con distinta severidad. Se utilizaron como medio de HE los MPC procedentes del pretratamiento por EV a 220 °C, 2,5 min y 210 °C, 2,5 min (materiales pretratados I y IV), que mostraron una composición diferente derivada de la severidad de las condiciones utilizadas. En todos los casos la carga de sustrato fue de 3,8% ST (p/p).

Se utilizaron distintas preparaciones de celulasas: NS 50013 (suplementada con 5 UI β -glucosidasa/g celulosa de NS 50010), Accellerase 1500 y Cellic CTec en una dosis de 5 UPF/g celulosa, y se suplementaron con 100 UI xilanasas/g celulosa de XInC y 15 UI α -L-arabinofuranosidasa/g de AF. Estas preparaciones celulolíticas proceden de cepas de *Trichoderma* spp, que producen una gran variedad de actividades enzimáticas implicadas en la degradación de la lignocelulosa (tabla 4.13) (Banerjee y col., 2010). Sin embargo, algunas de estas actividades se expresan en cantidades muy pequeñas, por lo que resulta difícil evaluar su efecto y su potencial para mejorar los rendimientos de HE.

- Suplementación sobre sustrato pretratado a 220 °C, 2,5 min.

La figura 4.25 muestra la producción de glucosa, xilosa y arabinosa a las 72 h de HE con la mezcla enzimática NS 50013-NS 50010 (control) suplementada individual y combinadamente con las enzimas XInC y AF. Como se observa en la figura 4.25, aunque la suplementación por separado de estas enzimas (C+XInC y C+AF) tiene un efecto positivo, los rendimientos más altos se alcanzaron cuando ambas actividades se suplementaron simultáneamente (C+XInC+AF). La adición de XInC y AF no sólo mejoró la producción de xilosa y arabinosa, sino también la producción de glucosa, lo que demuestra la capacidad de estas enzimas para aumentar la accesibilidad de las fibras de celulosa y mejorar el proceso de HE.

Se calculó el grado de sinergia de las dos enzimas teniendo en cuenta el efecto positivo obtenido con cada una de las dos enzimas individualmente respecto a la mejora cuando se aplicaron simultáneamente. En cuanto a la producción de glucosa el grado de sinergia fue del 29,5%. En comparación con el control, la producción de glucosa, xilosa y arabinosa en el ensayo suplementado con XInC y AF aumentó en un 19,5%, 18,6% y 22,1%, respectivamente. El rendimiento de HE (glucosa) fue 9,9% superior respecto al control alcanzando un 58% al final del proceso. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas al 95%.

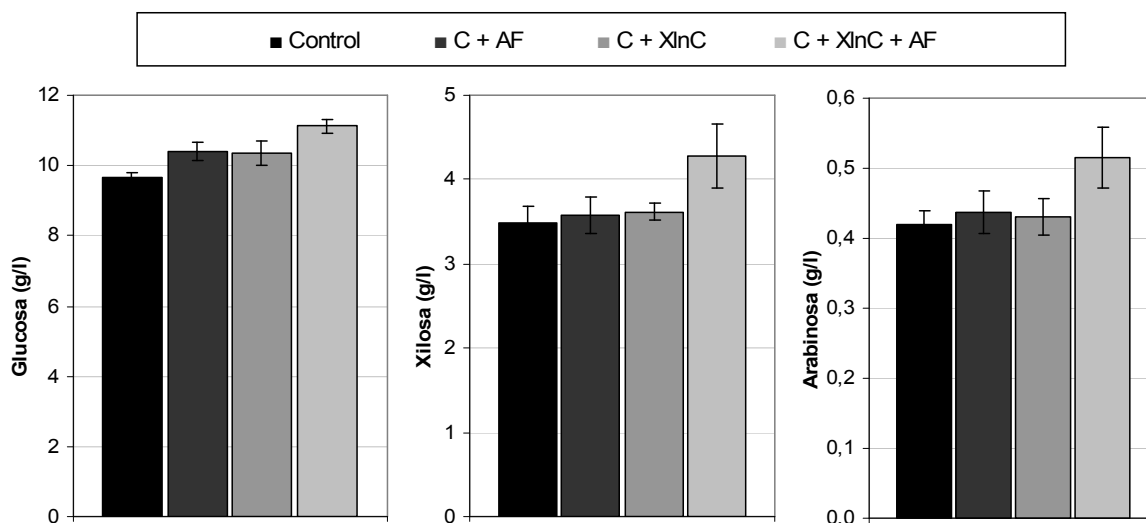


Figura 4.25. Producción de glucosa, xilosa y arabinosa (g/l) en ensayos de suplementación enzimática con XInC (100 UI/g celulosa) y AF (15 UI/g celulosa) de la mezcla de celulosas NS 50013-NS 50010 (5 UPF/g celulosa-5 UI β -glucosidasa/g celulosa). Sustrato: MPC, 220 °C, 2,5 min, 3,8% ST(p/p), 50 °C, 72 h.

El efecto sinérgico observado puede explicarse por la acción de AF, que retira las sustituciones de arabinosa de la cadena de xilano. Las moléculas de arabinosa pueden bloquear los enlaces β -1,4 en la cadena de xilano, por lo que la acción de AF aumenta los sitios de unión de las endoxilanasas (XInC). Análogamente, la acción de XInC puede aumentar la exposición de nuevas cadenas de xilano unido a arabinosa, aumentando los sitios de unión para AF y favoreciendo el efecto sinérgico de ambas enzimas (Raweesri y col., 2008). Globalmente, la degradación de la matriz hemicelulósica permite aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático.

En este caso, el material insoluble (RSI) obtenido tras el pretratamiento a 220 °C y 2,5 min. presenta un contenido muy bajo de arabinosa (material pretratado I, tabla 4.2), lo que sugiere que el efecto sinérgico de AF y XInC se produce también sobre los oligómeros solubles en el MPC. En la fracción soluble o prehidrolizado se detectaron 0,8 g/l de arabinosa, de los cuales la mitad se encontraron en forma oligomérica unidas a cadenas de xilosa. Además, se ha descrito en la bibliografía que los oligómeros ejercen un mayor efecto inhibitor sobre las celulasas que los azúcares libres, por lo que su hidrólisis en las primeras horas del proceso podría disminuir esta inhibición (Kumar y Wyman, 2009c; Qing y col., 2010). Para confirmar esta hipótesis, se realizaron ensayos de suplementación utilizando como sustrato el RSI lavado (no mostrados), observándose un efecto menor al observado con MPC, lo que confirmaría el efecto positivo de esta enzima sobre los oligómeros solubles.

Se estudió también la suplementación con AF (15 UI/g celulosa) y XInC (100 UI/g celulosa) utilizando dos preparados comerciales recientemente desarrollados, Cellic CTec (Novozymes) y Accellerase 1500 (Genencor). En las condiciones de ensayo empleadas (5 UPF/g celulosa), Accellerase 1500 y Cellic CTec apenas aportaron actividad α -L-arabinofuranosidasa (0,2 y 1,1 UI) y solamente 6,6 y 8,0 UI de actividad xilanasa por gramo de celulosa, respectivamente.

La figura 4.26 muestra los perfiles de producción de glucosa y xilosa durante los ensayos con Accellerase 1500 y Cellic CTec suplementadas con XInC y AF. En ambos casos, la adición de XInC y AF mejoró la producción de xilosa y especialmente, la de glucosa. Para Accellerase 1500 y Cellic CTec, la suplementación con ambas actividades supuso un aumento en la concentración de glucosa a las 72 h del 35,9% y 29,4%, respectivamente. El rendimiento de HE (glucosa) con Accellerase 1500 y Cellic CTec suplementadas fue 10,4% y 6,7% mayor, respectivamente, que con los preparados no suplementados.

Las diferencias en cuanto a producción de xilosa fueron menores, aunque se observó un ligero aumento en su concentración en los ensayos suplementados. Cuando se empleó Accellerase 1500 la diferencia respecto al ensayo no suplementado resultó ser estadísticamente significativa al 95% según el test de medias Tukey HSD, mientras que para Cellic CTec no se detectaron diferencias significativas.

A la vista de los resultados obtenidos, puede concluirse que la suplementación de celulasas comerciales con actividades hemicelulasas mejora significativamente la

hidrólisis de la paja de trigo pretratada por EV, lo que demuestra que las enzimas accesorias con actividad hemicelulolítica juegan un papel importante en la hidrólisis de la lignocelulosa.

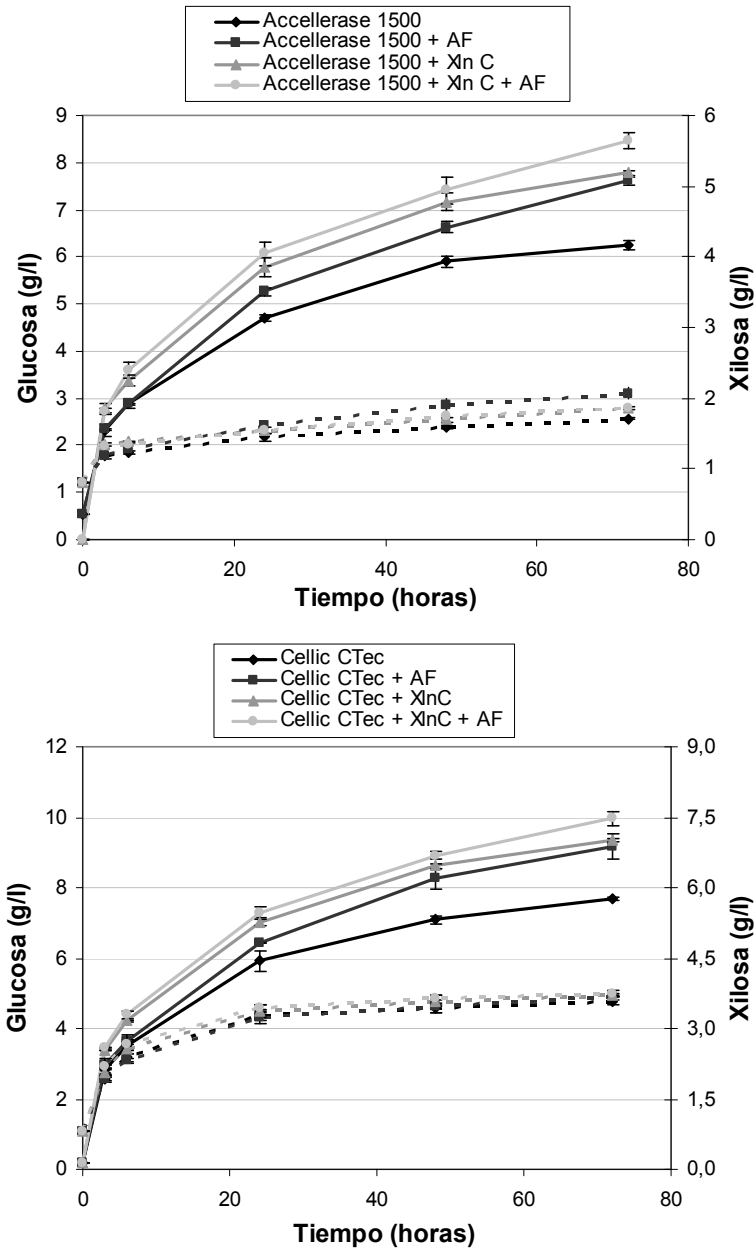


Figura 4.26. HE. Producción de glucosa (g/l, línea continua) y xilosa (g/l, línea discontinua). Suplementación de Accellerase 1500 y Cellic CTec (5 UPF/g celulosa) con XInC (100 UI/g celulosa) y AF (15 UI/g celulosa). Sustrato MPC, 220 °C-2,5 min, 3,8% ST (p/p).

- Suplementación sobre sustrato pretratado a menor severidad (210 °C, 2,5 min).

Una de los objetivos en la investigación de nuevos pretratamientos de la biomasa lignocelulósica es la reducción de la temperatura de proceso. La disminución de la temperatura del pretratamiento conlleva una reducción de los costes energéticos, menor degradación de azúcares y consecuentemente menor producción de compuestos inhibidores. Sin embargo, disminuir la severidad del pretratamiento aumenta la proporción de hemicelulosa en el RSI y reduce la accesibilidad de la celulosa, lo que influye negativamente en los rendimientos de HE. La presencia de enzimas hemicelulasas en el cóctel enzimático podría permitir disminuir la severidad del pretratamiento sin reducir los rendimientos de HE. Como se ha mostrado en el ensayo anterior, estas enzimas actúan retirando la matriz hemicelulósica y favorecen la accesibilidad de las celulasas a la celulosa.

En este contexto, el efecto de la suplementación con las enzimas XInC y AF se estudió sobre un sustrato pretratado bajo condiciones menos severas. En la figura 4.27 se muestra la producción de glucosa a las 24 y 72 h en el ensayo con la mezcla NS 50013-NS 50010, mientras que en la figura 4.28 se muestra la producción de glucosa y xilosa en los ensayos utilizando las enzimas Accellerase 1500 y Cellic CTec, todas ellas a una carga de 5 UPF/g celulosa. En general, se observa que la suplementación con XInC (100 UI/g celulosa) y AF (15 UI/g celulosa) aumentó la producción de glucosa y xilosa cuando se aplicaron individualmente, aunque en este caso, con un sustrato con mayor contenido en hemicelulosa insoluble, la suplementación con XInC fue más efectiva que la adición de AF.

La mayor producción de glucosa y xilosa se obtuvo cuando XInC y AF se suplementaron simultáneamente. A las 72 h la suplementación de los complejos NS 50013-NS 50010, Accellerase 1500 y Cellic CTec incrementó la producción de glucosa en un 38,9, 42,5 y 25,2%, respectivamente. Los rendimientos de HE (glucosa) fueron 15,2, 15,1 y 11,1% más altos que en los ensayos con las preparaciones sin suplementar.

En cuanto a la producción de xilosa, la suplementación produjo un aumento a las 72 h del 9,6, 9,5 y 2,2% para NS 50013-NS 50010 (no mostrado), Accellerase 1500 y Cellic CTec, respectivamente. El aumento en la producción de xilosa observado en la suplementación de Cellic CTec no se mostró estadísticamente significativo, mientras

que las demás diferencias señaladas sí fueron estadísticamente significativas al 95%. Cellic CTec presentó mayor actividad xilanasas que las otras dos preparaciones, lo que podría explicar las menores diferencias en cuanto a producción de xilosa observadas en los ensayos de suplementación de esta preparación (tabla 4.13).

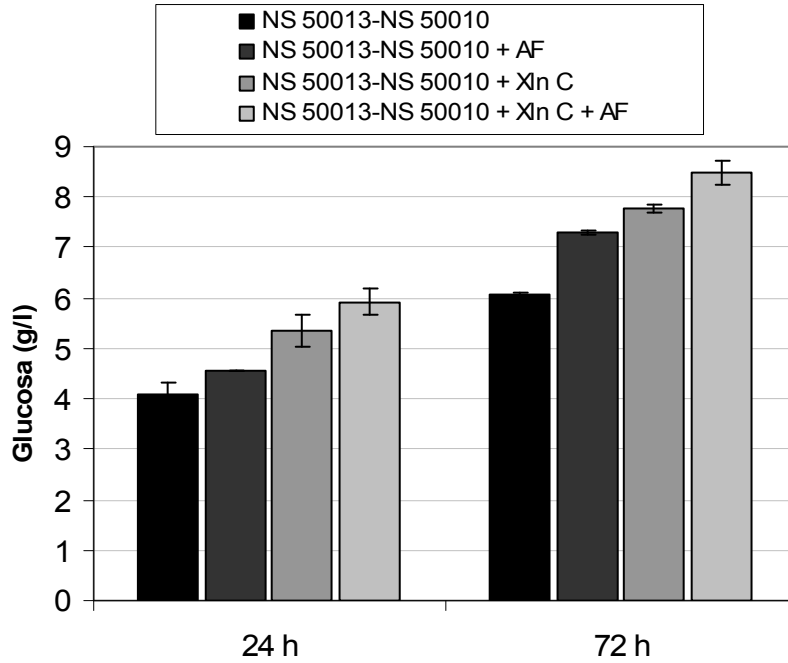


Figura 4.27. HE. Producción de glucosa (g/l). Suplementación de la mezcla NS 50013-NS50010 (5 UPF-5 UI β -glucosidas/g celulosa) con XInC y AF. Sustrato MPC, 210 °C-2,5 min, 3,8% ST (p/p).

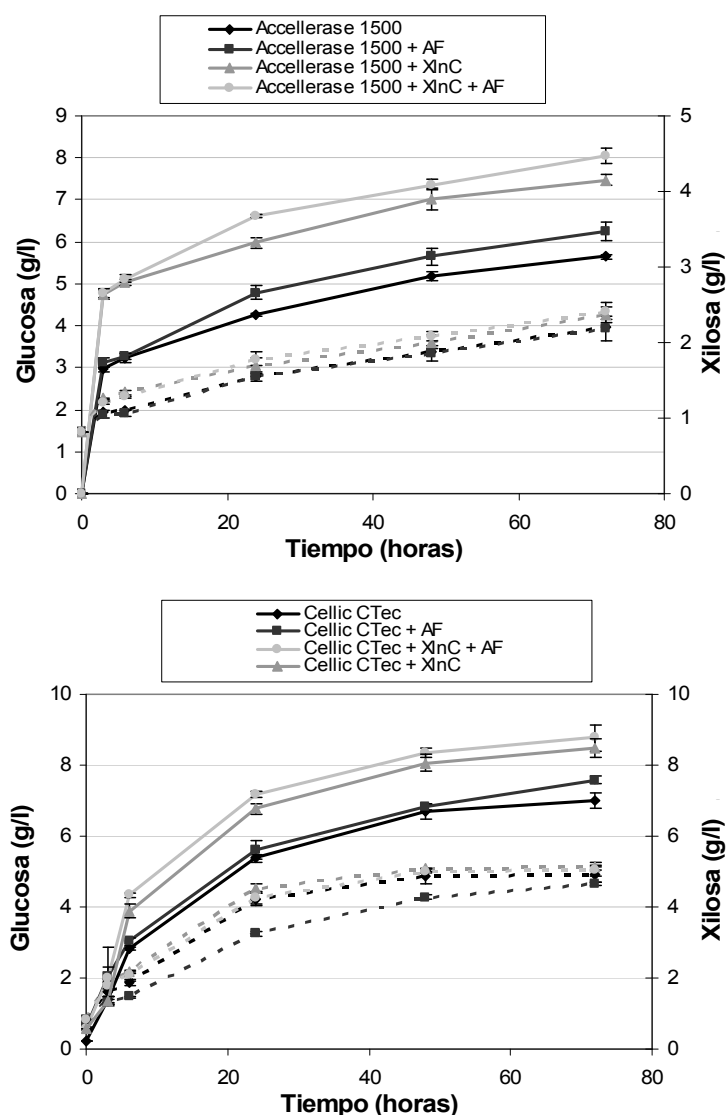


Figura 4.28. HE. Producción de glucosa (línea continua) y xilosa (línea discontinua) (g/l). Suplementación de Accellerase 1500 y Cellic CTec (5 UPF/g celulosa) con XInC y AF. Sustrato MPC, 210 °C-2,5 min, 3,8% ST (p/p).

Los resultados obtenidos muestran que la suplementación con XInC tuvo un efecto positivo en la HE con los dos sustratos utilizados, pretratados a distintas condiciones (220 y 210 °C) y con un contenido en xilano diferente. En trabajos anteriores se ha mostrado el efecto positivo de las xilanasas en la HE, incluso con sustratos con bajo contenido en xilano. Esto demuestra el importante papel que la estructura y disposición de la hemicelulosa, aun en baja proporción, tiene sobre la accesibilidad de las celulasas a las fibras de celulosa (García-Aparicio y col., 2007). Además, la suplementación con xilanasas favorece la hidrólisis de los xilooligómeros solubles presentes en el material pretratado.

Como se explicó anteriormente, condiciones menos severas de pretratamiento implican una reducción de la accesibilidad de la celulosa y menores rendimientos de HE. Así pues, los rendimientos de HE (glucosa) con las mezclas sin suplementar fueron mayores en todos los casos con el sustrato pretratado a 220 °C que con el material pretratado a 210 °C (figura 4.29). La diferencia más evidente se observó en el caso de la mezcla control NS 50013-NS 50010 sin suplementar, con la que se obtuvo un rendimiento de 47,2% sobre el sustrato pretratado a 220 °C y de 35,5% sobre el pretratado a 210 °C. Con Accellerase 1500 y Cellic CTec se obtuvieron resultados similares.

En los tres casos, la suplementación de las preparaciones celulolíticas con XInC y AF utilizando el sustrato pretratado a 210 °C mejoró significativamente los rendimientos de HE respecto a los ensayos con las preparaciones no suplementadas y sobre el sustrato pretratado a 220 °C (figuras 4.25 y 4.26). Los rendimientos con las preparaciones NS 50013-NS 50010, Accellerase 1500 y Cellic CTec con las condiciones "MPC-210 °C + XInC+AF" fueron 3,5, 14,2 y 8,9% superiores a los del ensayo sin suplementar con el sustrato pretratado bajo condiciones más severas (MPC 220). Como se muestra en la figura 4.29, en el caso de la preparación Cellic CTec, la suplementación sobre el sustrato pretratado a 210 °C mejoró incluso los rendimientos de la preparación suplementada sobre el sustrato pretratado a 220 °C.

Cabe destacar que el material pretratado a 210 °C contiene un mayor contenido en xilano debido a la menor degradación de la hemicelulosa durante el pretratamiento, por lo que la producción de xilosa mediante la HE fue considerablemente más alta al utilizar este sustrato.

Los resultados de los ensayos sin suplementación demuestran que condiciones de pretratamiento relativamente severas (220 °C, 2,5 min.) favorecen la obtención de altos rendimientos de HE. Sin embargo, bajo estas condiciones de pretratamiento gran parte de la hemicelulosa solubilizada se degrada a furfural y otros compuestos, que tienen un gran efecto inhibitorio sobre el microorganismo fermentador, como se ha comprobado en los ensayos de SFS utilizando el MPC (apartado 4.8.1.3). La suplementación de los cócteles celulolíticos con enzimas adecuadas, en este caso hemicelulasas, permite aumentar estos rendimientos sin recurrir a pretratamientos más severos. Considerando que el pretratamiento puede suponer hasta un tercio del coste de la producción de etanol (Lynd, 1996) la combinación de pretratamientos de baja severidad y cócteles enzimáticos adecuados, que permitan mantener altos

rendimientos de HE, puede conllevar mejoras significativas en el proceso global de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

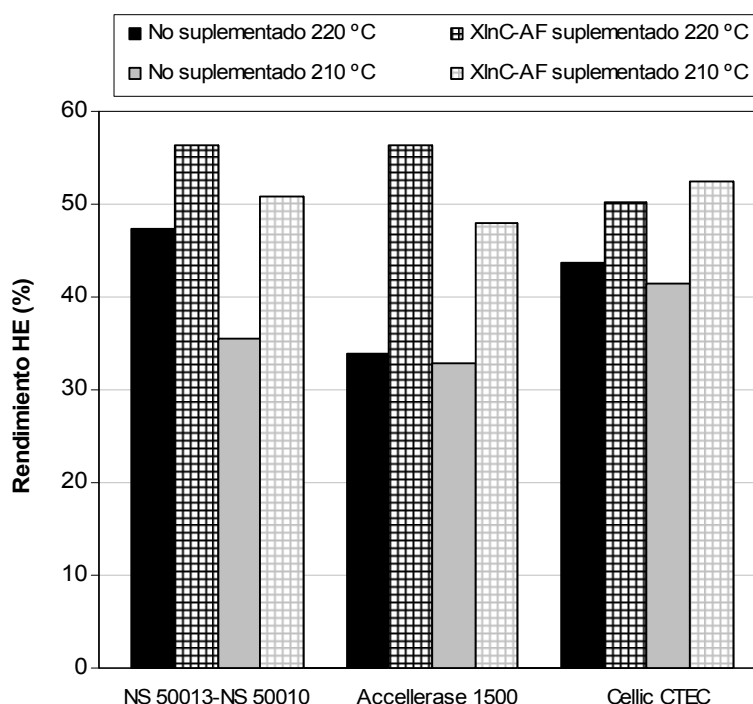


Figura 4.29. Comparación de los rendimientos de HE obtenidos a las 72 h con las preparaciones enzimáticas suplementadas y sin suplementar con las enzimas XInC y AF y los dos sustratos pretratados utilizados: 220 °C, 2,5 min y 210 °C, 2,5 min.

4.8.2.4 Efecto de la suplementación con AF y XInC en la HE y SFS con alta concentración de sólidos

La implementación de los procesos de producción de etanol a escala comercial requiere la evaluación de los sistemas enzimáticos en ensayos con mayor contenido en sólidos que los realizados anteriormente (3,8% ST). Por ello, la suplementación con XInC y AF de la mezcla NS 50013-NS 50010 (5 UPF-5 UI β -glucosidasa/g celulosa) se estudió con una concentración de sustrato de 10% ST (p/p) utilizando MPC de paja de trigo pretratada por EV a 210 °C, 2,5 min (material pretratado III). La figura 4.30 muestra la producción de glucosa en los ensayos de HE a las 3, 24 y 72 h del proceso. Debido a la baja actividad β -glucosidasa aplicada, a las 3 y 24 h se acumuló en el medio cierta cantidad de celobiosa, cuya concentración se tuvo en cuenta en el cálculo de rendimiento de HE. Como se observó en el apartado 4.8.2.2, la suplementación por

separado con XInC y AF mejoró los rendimientos de HE. Sin embargo, también en este caso se obtuvieron los mejores resultados cuando ambas actividades se añadieron simultáneamente, lo que a esta carga de sustrato aumentó la producción de glucosa en un 17,2%. El rendimiento de HE (glucosa) a las 72 h fue 6% mayor que el obtenido con la mezcla NS 50013-NS 50010 no suplementada.

Al contrario que en ensayos anteriores con menor carga de sustrato, la producción de xilosa no aumentó significativamente en los ensayos de suplementación (no mostrado en la figura). Sin embargo, sí se detectó una mayor acumulación de xilobiosa y xilotriosa, lo que muestra el efecto hidrolítico de las enzimas accesorias presentes en el medio. La baja actividad β -xilosidasa presente en los cócteles podría ser responsable de la acumulación de oligosacáridos, por lo que una mayor proporción de esta actividad conduciría previsiblemente a una mayor liberación de xilosa. También se detectó un pequeño aumento en la concentración de arabinosa respecto al control en los ensayos suplementados.

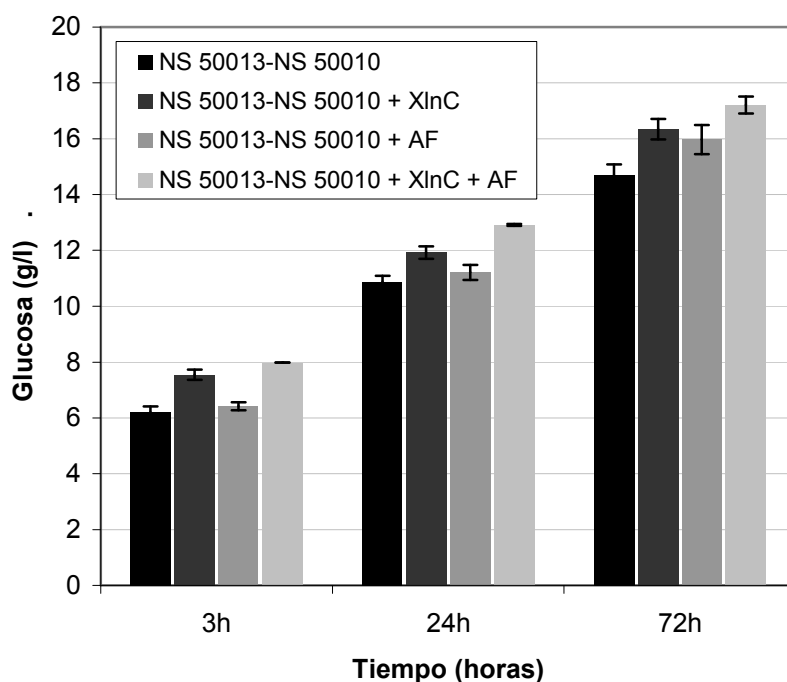


Figura 4.30. Producción de glucosa en ensayos de suplementación de la mezcla NS 50013-NS 50010 con XInC (100 UI/g celulosa) y AF (15 UI/g celulosa). Sustrato MPC 210 °C, 2,5 min, 10 % ST (p/p).

En el ensayo anterior no se alcanzaron altos rendimientos de HE debido a la baja carga de enzima utilizada. Por tanto, se realizó también un ensayo de suplementación con una dosis más alta de celulasas, 9 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI β /g celulosa (NS 50010). La concentración de sustrato se mantuvo en 10% ST (p/p) (material pretratado II, 210 °C-2,5 min, tabla 4.2) y las dosis de XInC y AF fueron de 100 UI y 15 UI/ g celulosa, respectivamente. En este caso, el rendimiento de HE (glucosa) a las 72 h con la mezcla de celulasas sin suplementar fue de 53,7% mientras que la suplementación alcanzó un 58,9%, incrementándose en un 9,3% la producción de glucosa. A diferencia del ensayo anterior, apenas se acumuló celobiosa en el medio de HE. Aunque no se encontraron diferencias significativas en cuanto a producción de xilosa, se observó, como en el caso anterior y a pesar de aumentar la carga de enzima, cierta acumulación de xilooligómeros, indicando nuevamente el déficit de actividad β -xilosidasa en el cóctel enzimático.

Con objeto de establecer si la adición de actividades hemicelulasas tiene efecto sobre la producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada, la suplementación con XInC y AF se estudió también en un ensayo de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) con la levadura *S. cerevisiae* "Ethanol Red" (2 g/l tamaño inóculo) y una concentración de MPC de 10% ST (material pretratado IV). Para ello, se realizó un ensayo control sin suplementar con una dosis de celulasas de 10 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI β -glucosidasa/g celulosa (NS 50010). En el ensayo de suplementación se añadió a la mezcla de celulasas 100 UI/g celulosa de XInC y 15 UI/g celulosa de AF. En la figura 4.31 se muestra la concentración de glucosa, xilosa y etanol durante las 72 h de SFS.

A diferencia de lo ocurrido en los ensayos de SFS utilizando como sustrato el MPC pretratado a 220 °C (apartado 4.8.1.3), en los que la concentración de tóxicos inhibió completamente el crecimiento de la levadura y la producción de etanol, en estos ensayos con el MPC pretratado a 210 °C sí hubo producción de etanol, a pesar de la mayor concentración de sólidos aplicada. El contenido de tóxicos solubles en el prehidrolizado de este material pretratado fue menor (0,7 g/l de furfural, 0,2 de g/l HMF, 1,7 g/l de ácido fórmico y 4,0 g/l de acético), lo que aumenta la fermentabilidad de estos medios y evita la aplicación de procedimientos de destoxificación, que son complicados y costosos de integrar en procesos industriales.

La suplementación con AF y XInC mejoró la producción de etanol en un 27,2%, alcanzando un rendimiento a las 72 h de 51%. Este aumento en la producción de etanol está relacionado con el efecto positivo que tienen las actividades hemicelulasas en la HE, y por tanto en la producción de glucosa. Además, el efecto de la suplementación se observó también en la producción de xilosa, cuya concentración aumenta significativamente respecto al ensayo no suplementado. La utilización de microorganismos co-fermentadores de glucosa y xilosa aumentaría los rendimientos de la producción de etanol en este tipo de procesos.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos realizados con las enzimas XInC y AF muestran el potencial de la aplicación de enzimas accesorias para mejorar la producción de azúcares a partir de biomasa lignocelulósica pretratada en condiciones más suaves, y consecuentemente para aumentar el rendimiento global del proceso de producción de etanol.

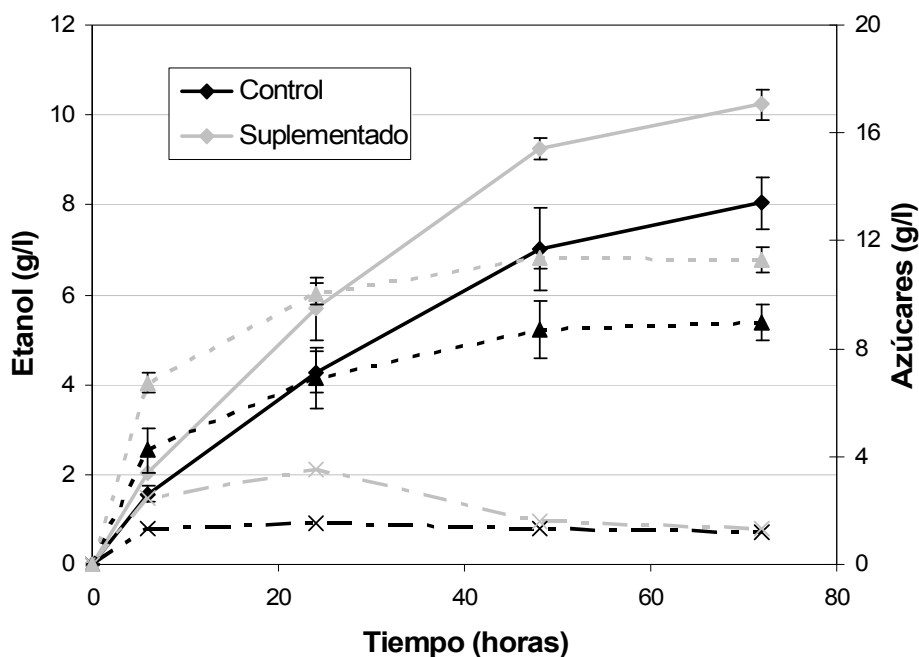


Figura 4.31. Producción de glucosa (X), xilosa (▲) y etanol (●) (g/l) en ensayos de SFS. Dosis NS 50013-NS 50010, 10 UPF-15 UI/g celulosa; XInC, 100 UI/g celulosa; AF, 15 UI/g celulosa. Sustrato MPC 210 °C, 2,5 min, 10 % ST (p/p).

4.8.3 Efecto de la suplementación enzimática con celulasas recombinantes

Además de la suplementación de los cócteles celulolíticos con enzimas con actividad hemicelulasa se evaluaron enzimas recombinantes con actividades celulasas por su potencial para mejorar la HE de la paja de trigo pretratada. Concretamente se utilizaron dos enzimas con actividad celobiohidrolasa y una enzima con actividad endoglucanasa.

4.8.3.1 Suplementación con celobiohidrolasas (CBH) recombinantes

Se realizaron ensayos de suplementación con las enzimas con actividad β -celobiohidrolasa H3AcP1 y P3D1-P2E3, producidas y suministradas por la compañía Biópolis S.L (ver apartado 3.5), y que actúan por tanto liberando unidades de celobiosa a partir de los extremos de las cadenas de celulosa. Estas enzimas presentaron un contenido de proteínas de 403,1 mg y 433,8 mg de proteína y una actividad celobiohidrolasa (determinada por el suministrador) de 10,8 y 580 UI por gramo de cultivo liofilizado, respectivamente.

La mezcla de celulasas NS 50013-NS 50010 (5 UPF y 5 UI/g celulosa) se suplementó con 10, 25 y 100 mg proteína/g celulosa de CBH. Como sustrato se utilizó RSI de paja de trigo pretratada a 220 °C, 2,5 min (material pretratado I) en una concentración de 10% ST (p/p).

En la figura 4.32 A se muestra la producción de celobiosa en los diferentes ensayos a las 3, 24 y 72 h. Dosis crecientes de ambas CBH aumentaron la producción de celobiosa, producto final de la actividad hidrolítica de esta enzima, no observándose diferencias significativas entre las dos CBH estudiadas. En cuanto a la producción de glucosa (figura 4.32 B) las diferencias fueron menores, aunque a las 72 h la suplementación con todas las dosis de las dos CBH supuso un aumento en la concentración de glucosa en el medio respecto al control. El control sin suplementar alcanzó un rendimiento a las 72 h (teniendo en cuenta la producción de glucosa y celobiosa) de 52,7%. Con la adición de CBH aumentaron los rendimientos, alcanzándose con la dosis más alta (100 mg) un 61,1% y un 62,8% con H3AcP1 y P3D1-P2E3, respectivamente.

Los resultados muestran el potencial de estas dos enzimas para mejorar el cóctel enzimático comercial y la HE de un material lignocelulósico como la paja de trigo. No obstante, deben realizarse estudios posteriores para evaluar las proporciones óptimas de los diferentes componentes enzimáticos en los cócteles.

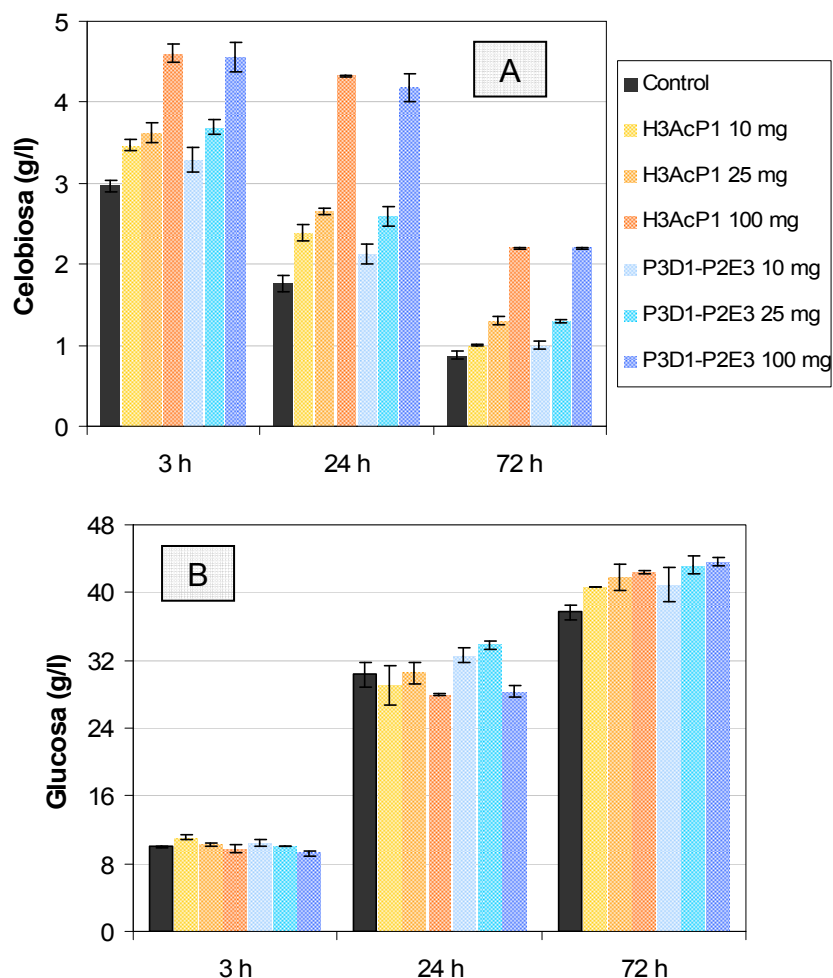


Figura 4.32. Producción (g/l) de cellobiosa (A) y de glucosa (B) en ensayos de suplementación con las β -celobiohidrolasa H3AcP1 y P3D1-P2E3. Sustrato RSI 220 °C, 2,5 min, 10% ST (p/p).

4.8.3.2 Suplementación con endoglucanasa recombinante.

Se realizaron ensayos de suplementación con la enzima endoglucanasa EGL producida y suministrada por Biópolis S.L (ver apartado 3.5), y cuya actividad hidroliza internamente los enlaces β 1-4 de las cadenas de celulosa. La enzima mostró una actividad endoglucanasa de 3,62 UI/g cultivo liofilizado y un contenido de proteínas de 6,24 mg proteína/g liofilizado.

En los ensayos de HE se utilizó como sustrato RSI (pretratado a 220 °C, 2,5 min, material pretratado I) a una concentración de 1,3% ST (p/p). La mezcla de celulasas (NS 50013, 5 UPF/g celulosa y NS 50010, 15 UI β -glucosidasa/g celulosa) se suplementó con la enzima EGL en una dosis de 20 mg proteína/g celulosa (11,7 UI endoglucanasa/mg proteína). Como se observa en la figura 4.33. la suplementación con EGL mejoró ligeramente la producción de celobiosa y también de glucosa, que aumentó en un 8,1% respecto al control. Como en el caso de las CBH, la enzima recombinante EGL puede mejorar las propiedades de los cócteles enzimáticos y la producción de azúcares libres.

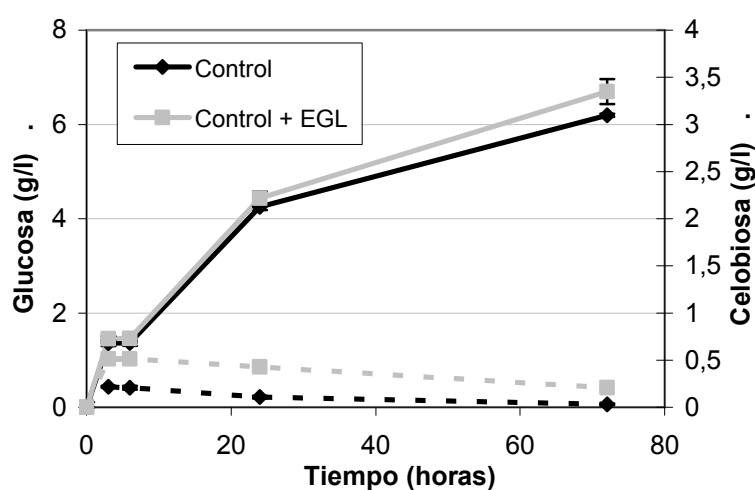


Figura 4.33. HE. Producción de glucosa (línea continua) y celobiosa (línea discontinua). Sustrato RSI, 1,3% ST (p/p).

4.8.4 Efecto de la adición de expansinas en la hidrólisis enzimática

Las expansinas constituyen una familia de proteínas vegetales implicadas en el debilitamiento y relajación de la pared celular. Este proceso permite la incorporación de subunidades a los polímeros y está relacionado con la extensión de la pared vegetal y el crecimiento celular (Cosgrove, 1999; Cosgrove, 2000). Las expansinas no muestran una actividad hidrolítica, sin embargo son capaces de alterar la estructura de la pared celular y modificar la interacción de los distintos componentes, principalmente la celulosa y la hemicelulosa.

La acción de las expansinas flexibiliza la estructura molecular de la pared vegetal, por lo que podrían aplicarse en los procesos de HE de biomasa lignocelulósica para aumentar la accesibilidad de las fibras de celulosa a las celulasas.

A pesar de no presentar capacidad catalítica, las expansinas han mostrado un efecto sinérgico con las celulasas y su capacidad de mejorar la HE (Baker y col., 2000; Kim y col., 2009).

Se estudiaron en ensayos de HE expansinas producidas y suministradas por la compañía Calantia S.L. Estas expansinas se produjeron mediante agroinfección transitoria sobre hojas de *Nicotiana benthamiana* y se utilizaron en combinación con celulasas para estudiar un posible efecto sinérgico en la HE de paja de trigo por EV. En estos ensayos se utilizaron los extractos crudos de proteína de las hojas de *N. benthamiana* infiltradas. Estos extractos presentaron una concentración de proteína de 3,3 mg/ml, de los cuales se estimó una proporción de expansina de alrededor del 1-2%. Además, no se detectó actividad celulasa sobre papel de filtro, ni liberación de azúcares cuando se ensayaron sobre paja de trigo pretratada, confirmándose la ausencia de capacidad hidrolítica de los extractos utilizados.

La mezcla enzimática NS 50013-NS 50010 (control) se suplementó con los extractos con expansinas para evaluar su efecto en la HE. Se realizaron ensayos de HE utilizando como sustrato RSI de paja de trigo pretratada por EV (material pretratado I, 220 °C, 2,5 min) a una concentración de 1,3% ST (p/p). Las dosis de celulasas empleadas fueron de 5-15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 5-15 UI/g celulosa (NS 50010), que corresponden a 12-36 y 1-3 mg proteína/g celulosa, respectivamente. Las dosis de expansina estudiadas fueron: 23,6 mg, 47,2 mg y 77,8 mg proteína/g celulosa. También se realizaron ensayos de HE suplementados con las mismas dosis de un extracto crudo de *N. benthamiana* sin agroinfectar con expansina (Control + Extracto). Los resultados obtenidos en este ensayo "Control + Extracto" sirvieron para determinar el efecto que las proteínas no expansinas pudieran tener en la HE. Además, en los extractos de las hojas se detectó cierto contenido en glucosa, que fue tenido en cuenta para los cálculos de HE.

Primeramente, se realizaron ensayos de HE con una dosis de celulasas de 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010). Las dosis de expansina estudiadas en este caso fueron de 23,6 y 77,8 mg/g celulosa. En la figura 4.34 se muestra la producción de glucosa en los ensayos de suplementación con ambas dosis de expansina. En el ensayo con 23,6 mg de expansina (figura 4.34 A) la producción de glucosa a las 24 h aumentó en un 0,8% respecto al control con extracto crudo de proteínas (sin expansinas), una diferencia que resultó estadísticamente no significativa según el test Tukey HSD con un nivel de confianza del 95%. En los ensayos con una

dosis más alta de expansina (77,8 mg/g celulosa, figura 4.34 B) la producción de glucosa a las 24 h aumentó en un 7,7% respecto al control con extracto crudo de proteínas (sin expansinas). En este caso, aunque el aumento fue pequeño, el análisis estadístico mostró diferencias significativas. En estos ensayos se utilizó una dosis alta de celulasa (15 UPF/g celulosa), por lo que los rendimientos en el control sin suplementar alcanzaron valores cercanos al máximo (75% a las 24 h). De esta forma, aunque se observó el efecto positivo de las expansinas el aumento en el rendimiento fue bajo. Kim y col. detectaron un efecto similar a altas dosis de celulasa probablemente debido a la competición por los sitios de unión en el sustrato (Kim y col., 2009).

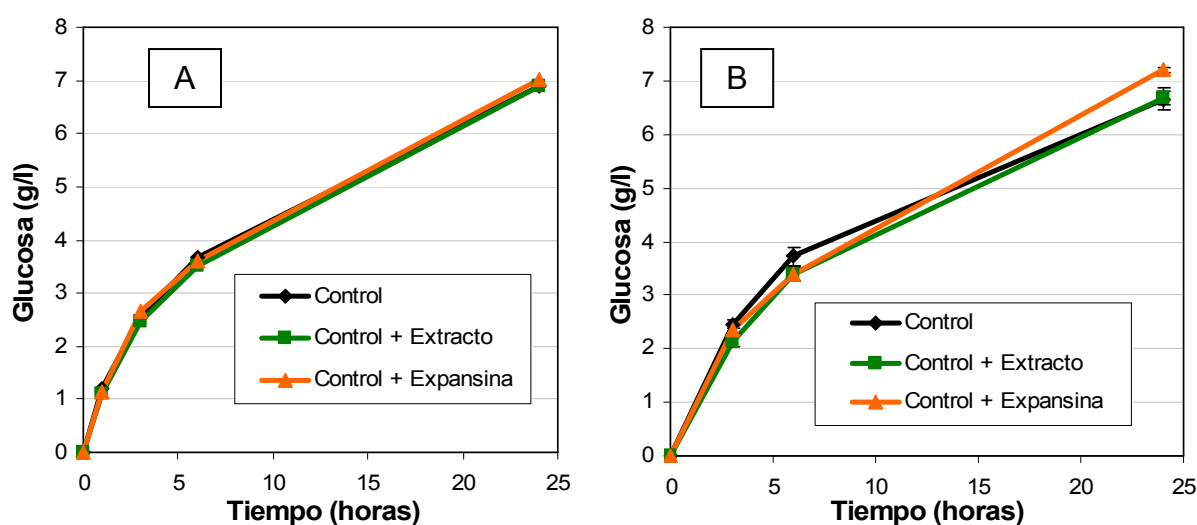


Figura 4.34. Producción de glucosa (g/l) en ensayos de suplementación con expansina. Dosis de celulasa: 15 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010). Dosis expansina: 23,6 mg/g celulosa (A) y 77,8 mg/g celulosa (B). Sustrato: RSI, 1,3 % ST (p/p).

Para estudiar el efecto de la suplementación con expansinas con dosis más bajas de enzima, se realizaron ensayos con 5 UPF/g celulosa (NS 50013) y 5 IU/g celulosa (NS 50010) y dosis de expansina de 47,2 y de 77,8 mg/g celulosa (figura 4.35). A las 48 h se observó un aumento en la producción de glucosa de 13,8% (dosis 47,2 mg) y 14,5% (dosis 77,8 mg), respecto a los controles con extracto crudo de proteínas (sin expansinas). El análisis de las medias Tukey HSD confirmó la significación estadística de estas diferencias a las 48 h de proceso, mientras que en las etapas iniciales no se detectaron diferencias significativas.

Además del efecto positivo de las expansinas sobre la producción de glucosa cuando se utilizaron bajas dosis de celulasa, también se observó un efecto positivo con la adición del extracto sin expansinas. Este hecho puede explicarse por su contenido de proteínas, que pueden quedar unidas a la lignina y así disminuir las uniones inespecíficas de las celulastas. Como ha sido referenciado anteriormente, este efecto ha sido estudiado con proteínas como BSA (Yang y Wyman, 2006).

Además, la adición de expansinas mostró un efecto sinérgico con las celulastas. En el ensayo con la dosis más alta de expansina se determinó un grado de sinergia a las 48 h del 15% (calculado teniendo en cuenta la glucosa producida separadamente por expansinas y celulastas y la producida por la mezcla suplementada).

La capacidad de proteínas como las expansinas para afectar la pared celular y mejorar la HE de sustratos lignocelulósicos resulta interesante y prometedora para continuar posteriores estudios. La aplicación de enzimas purificadas, así como su evaluación sobre concentraciones de sustrato más altas resultaría de gran interés para valorar posibles mejoras en la HE de sustratos lignocelulósicos.

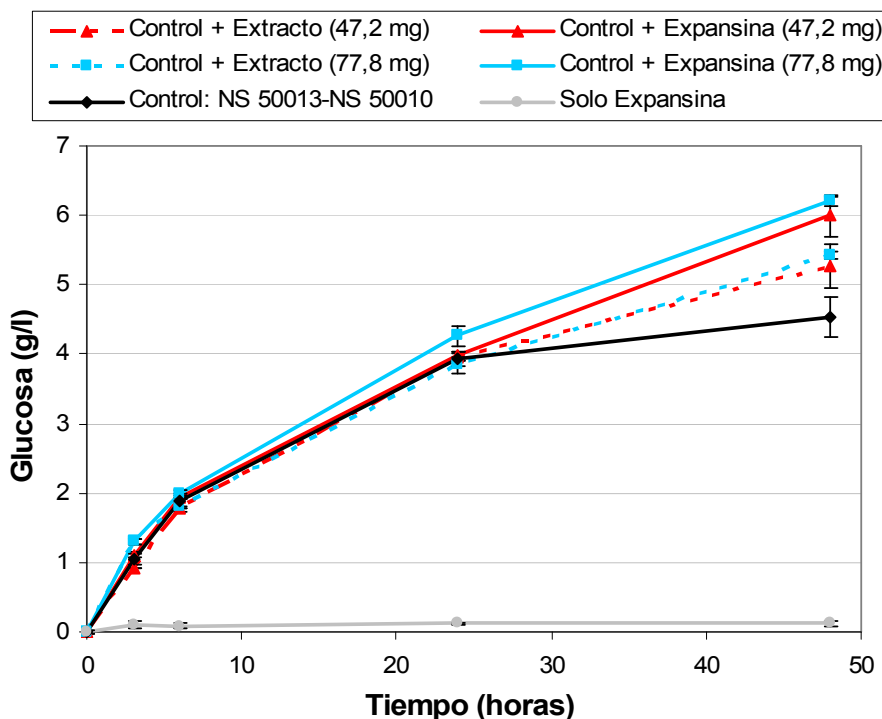


Figura 4.35. Producción de glucosa (g/l) en ensayos de suplementación con expansina. Dosis de celulasa: 5 UPF/g celulosa (NS 50013) y 5 UI/g celulosa (NS 50010). Dosis expansina: 47,2 mg/g celulosa (azul) y 77,8 mg/g celulosa (rojo). Líneas discontinuas: Control + Extracto. Sustrato: RSI, 1,3 % ST (p/p).

4.9 Estrategias de adición de xilanasas en la HE y en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas

Las heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos, como la paja de trigo pretratada, y la propia complejidad de los sistemas hidrolíticos implicados en la degradación de los carbohidratos hacen que la secuencia en la que actúan las diferentes enzimas influya en la efectividad del proceso de HE. Por lo tanto, la adición de enzimas en distintos momentos del proceso de hidrólisis puede ser una alternativa eficaz para optimizar la producción de azúcares fermentables. La suplementación de los cócteles enzimáticos con actividad xilanasa, cuyo efecto positivo se ha observado en los apartados anteriores, se ha estudiado utilizando diferentes estrategias de adición en ensayos de HE, sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS) utilizando el MPC de paja de trigo pretratada por EV a 210 °C y 2,5 min (material pretratado IV). Los principales resultados obtenidos en este estudio se presentaron en el artículo V, incluido como anexo en esta Tesis.

4.9.1 Efecto en la HE de diferentes estrategias de suplementación con XInC

Como se ha visto en los apartados anteriores, la adición de enzimas con actividad xilanasa a los preparados celulolíticos comerciales aumenta los rendimientos de HE de sustratos lignocelulósicos como la paja de trigo. Los resultados obtenidos demuestran que la compleja estructura de los materiales lignocelulósicos, incluso después del pretratamiento, requiere para su completa degradación no sólo de la acción de las enzimas celulolíticas, sino también de otras actividades accesorias como las hemicelulasas.

Como también ha sido explicado a lo largo de esta Tesis, tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo se obtiene un sustrato que contiene una fracción insoluble formada principalmente por celulosa y lignina, con una pequeña aunque significativa proporción de hemicelulosa; y una fracción soluble formada fundamentalmente por oligómeros de xilosa y productos de degradación (ácido acético, fórmico y furfural, principalmente), que son inhibidores de la HE y la fermentación.

En este contexto, no sólo es interesante estudiar el efecto de la suplementación de las preparaciones celulolíticas con enzimas accesorias, sino también el efecto que sobre la HE y la fermentación puede tener la secuencia en que estas enzimas actúan sobre los materiales pretratados. Por ello, en este apartado se estudia el efecto que diferentes estrategias de suplementación de la endoxilanasas XInC tienen sobre la eficiencia de la HE de la lignocelulosa.

La suplementación con XInC a diferentes tiempos se evaluó en experimentos de HE utilizando el MPC de paja de trigo una concentración de 10% de ST (p/p). La mezcla de celulasas NS 50013 (10 UPF/g celulosa) y NS 50010 (15 UI β -glucosidasa/g celulosa) se suplementó con 100 UI xilanasas/g celulosa de XInC. Según las actividades determinadas en esta Tesis y mostradas en la tabla 4.13, NS 50013 y NS 50010 presentaron bajo las condiciones utilizadas en estos ensayos, 19,4 UI y 0,7 UI xilanasas/g celulosa, respectivamente.

La adición de XInC se realizó mediante las siguientes estrategias:

C. Ensayo control con celulasas (NS 50013-NS 50010) sin adición de XInC.

C0X0. Tanto las celulasas (NS 50013-NS 50010) como la XInC se añadieron conjuntamente al inicio del ensayo ($t = 0$ h).

C0X24. NS 50013-NS 50010 se añadió al comienzo de la HE ($t=0$ h) y la XInC a las 24 h del proceso.

C0X48. NS 50013-NS 50010 se añadió al comienzo ($t=0$ h) y la XInC se suplementó a las 48 h del proceso.

C24X0. La XInC se añadió 24 h antes de la adición de NS 50013-NS 50010.

La figura 4.36 muestra la producción de glucosa y xilosa durante la HE con las distintas estrategias de adición de XInC estudiadas. En todos los casos, la mayor parte de la xilosa se encontró en forma monomérica tras 24-48 h de incubación del MPC con celulasas, lo que muestra que la actividad xilanasas de la mezcla NS 50013-NS 50010 es capaz de hidrolizar los oligómeros solubles presentes en el MPC.

En general, la adición de XInC mejoró ligeramente la producción de xilosa y especialmente la producción de glucosa, que aumentó de manera significativa en todas las condiciones estudiadas en comparación con el ensayo control sin suplementación. La adición simultánea de XInC y celulasas (C0X0) mejoró la producción de glucosa a lo largo de todo el proceso de HE, y tras 96 h aumentó en un

26,9% respecto al control (de 20,4 g/l a 25,9 g/l). La adición de XInC tras 24 h (C0X24) y 48 h (C0X48) del proceso también mejoró los rendimientos de HE (23,0-23,1 g/l de glucosa) respecto al control, sin embargo, en el ensayo C0X0 la producción de glucosa fue mayor, lo que indica que las xilanasas también actúan sinérgicamente con las celulasas al inicio del proceso, alterando la matriz hemicelulósica y aumentando la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Tras 24-48 h de HE, momentos en los que se añade XInC en los ensayos C0X24 y C0X24, la celulosa más accesible ya ha sido hidrolizada, quedando la más recalcitrante a la hidrólisis. Laureano-Pérez y col. también observaron efectos negativos de la hemicelulosa y de la lignina en la HE en las etapas finales del proceso (2005).

Aunque la XInC parece tener un efecto potenciador de la hidrólisis de la celulosa más recalcitrante, la adición previa de XInC antes de las celulasas (C24X0) resultó ser la estrategia más adecuada y con la que se alcanzaron los rendimientos de HE más altos. Como se observa en la figuras 4.36 A y B, tras 24 h de hidrólisis sólo con XInC (C24X0) apenas aumentó la producción de glucosa y xilosa. Sin embargo, tras la adición de celulasas la tasa de HE aumentó, mejorando la producción de glucosa y xilosa al final del proceso respecto a los demás ensayos (28,6 g/l glucosa y 14,7 g/l xilosa a las 96 h). En comparación con los ensayos Control y C0X0 la producción de glucosa aumentó en un 40,1 y 10,3%, y la de xilosa en un 10,1 y 8,1%, respectivamente. También se observó en estos ensayos un ligero aumento de xilobiosa y xilotriosa en las primeras horas del proceso (datos no mostrados).

Para facilitar la interpretación de los resultados, en la figura 4.36 C se muestra la producción de glucosa en estos mismos ensayos, pero considerando el tiempo inicial el de la adición de las celulasas. Se observa un aumento en las tasas de HE en los ensayos de suplementación con XInC, especialmente en el caso en el que ésta fue añadida previamente. El rendimiento de HE en el ensayo C24X0 alcanzó el 67,1% (glucosa) y el 82,8% (xilosa). En la figura 4.37 se resumen los rendimientos obtenidos a las 96 h en los diferentes ensayos.

Como referencia se realizó un ensayo, no mostrado en la figura, con una dosis mayor de celulasas: 15 UPF (NS 50013) y 15 UI (NS 50010)/g celulosa. Como cabía esperar la glucosa producida a las 96 h con esta carga de enzima (28,4 g/l) superó la obtenida en el ensayo control, con una dosis menor de celulosa (20,4 g/l). En el ensayo C24X0, se alcanzó una concentración de 28,6 g/l de glucosa, ligeramente superior a la obtenida con la dosis alta de celulosa (15 UPF), lo que demuestra el

potencial de las xilanasas y otras enzimas accesorias para reducir las dosis de celulasas y conseguir un proceso más eficiente.

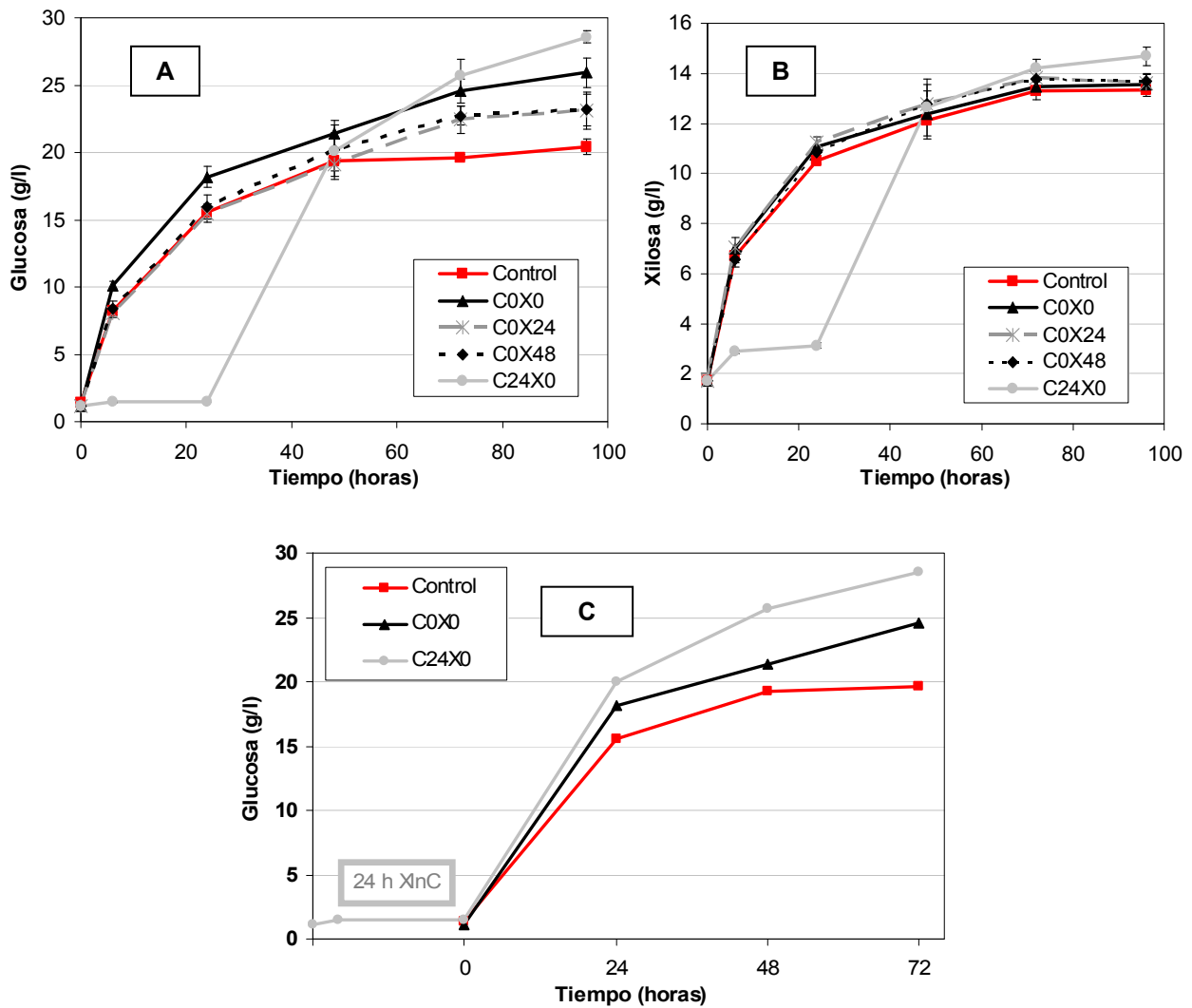


Figura 4.36. HE. Producción de glucosa (A) y xilosa (B) (g/l). Producción de glucosa (g/l) considerando como tiempo inicial el de adición de celulasas (C). Sustrato MPC. 10% ST (p/p). Dosis: NS 50013, 10 UPF/g celulosa; NS 50010, 15 UI/g celulosa; XInC, 100 UI/g celulosa. 50 °C, 150 rpm. Estrategias de suplementación con XInC: Control, sin adición de XInC; C0X0, adición simultánea de celulasas y XInC a t=0h; C0X24, celulasas a t=0h y XInC a las 24 h; C0X48, celulasas a t=0h y XInC a las 48 h; C24X0, XInC añadida 24 h antes que celulasas.

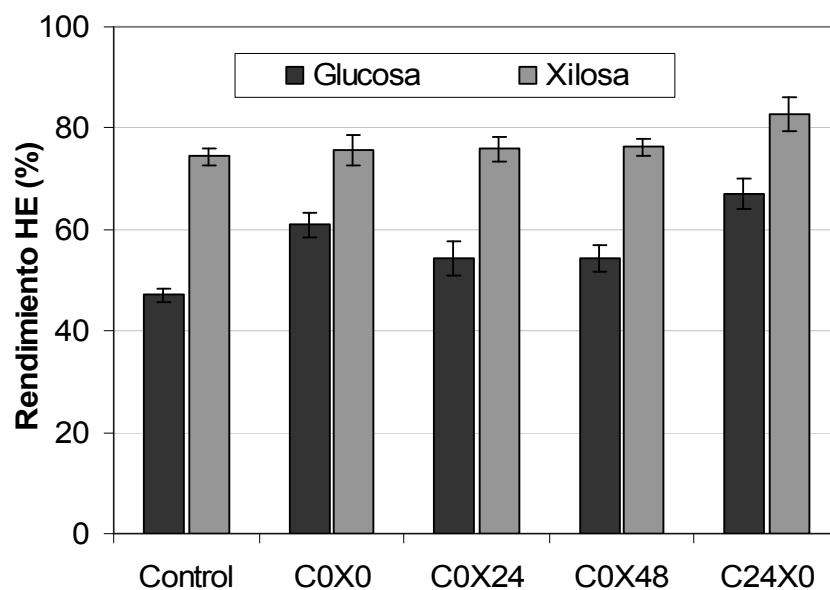


Figura 4.37. Rendimientos de hidrólisis enzimática obtenidos a las 96 h con las diferentes estrategias de adición de enzimas.

Diferentes estudios han mostrado la fuerte relación existente entre la retirada de la matriz hemicelulósica y la digestibilidad de la celulosa (Kumar y Wyman., 2009a-b; Öhgren y col., 2007a). Generalmente se han aceptado dos posibles mecanismos o hipótesis que son difícilmente verificables experimentalmente debido a la compleja estructura de la biomasa: (1) un aumento de la accesibilidad de las cadenas de glucano debido a la eliminación de la hemicelulosa y/o (2) una ruptura de los enlaces entre la hemicelulosa y la celulosa.

Kumar y Wyman (2009b) estudiaron el efecto de la adición de xilanasas como etapa previa a la HE con celulasas. Plantearon la hipótesis de que la aplicación previa de xilanasas aumentaría el tamaño del poro y la accesibilidad de la celulosa (Suurnäkki y col., 1997). Sin embargo, no observaron diferencias significativas con respecto a la adición simultánea de celulasas y xilanasas.

En este trabajo se ha utilizado como sustrato el MPC obtenido tras el pretratamiento por EV, así que además de la celulosa y de la hemicelulosa contenidas en la fracción sólida, están presentes en el medio cierta cantidad de azúcares solubles oligoméricos, principalmente xilooligómeros, al inicio del proceso de HE (tabla 4.2). Además del efecto inhibitorio descrito de la xilosa libre sobre las celulasas (García-Aparicio y col., 2006), recientemente se ha mostrado un mayor efecto inhibitorio de los xilooligómeros (Kumar y Wyman, 2009c; Qing y col., 2010). Por lo tanto, la acción de

XInC, hidrolizando estos oligómeros, podría reducir su efecto inhibitorio sobre las celulasas. XInC pertenece a la familia 10 de xilanasas, caracterizadas por no ser inhibidas por oligómeros, por lo que su presencia en los cócteles enzimáticos resulta especialmente apropiada en este tipo de medios (Vries y Visser, 2001).

Como ha sido mencionado, y así se observa en la figura 4.36, la producción de glucosa y xilosa en el ensayo C24X0 apenas aumentó durante las 24 h de tratamiento únicamente con XInC, ya que esta enzima sólo posee actividad endoxilanasas. También se observó que XInC apenas afectó el xilano de la fracción insoluble durante este período, ya que la concentración de xilosa soluble total apenas aumentó. En la figura 4.38 se muestran los cromatogramas con los perfiles de azúcares solubles antes y después de 24 h de hidrólisis con XInC. Se observa que los azúcares solubles del MPC se encuentran en su mayor parte en forma de oligómeros. Tras 24 h de hidrólisis con XInC los picos correspondientes a los oligómeros de mayor peso molecular se redujeron, mientras que aumentaron los correspondientes a xilotriosa y xilobiosa, lo que muestra claramente que los xilooligómeros de cadena larga se hidrolizaron en gran medida durante ese período debido a la acción de XInC. Además, a las 6 h de hidrólisis con XInC (no mostrado) los perfiles de azúcares obtenidos fueron similares a los obtenidos a las 24 h, lo que sugiere la posibilidad de reducir el tiempo de la incubación previa con xilanasas. A las 24 h, la concentración de xilobiosa y xilotriosa fue aproximadamente 3 y 2,4 veces superior respecto al inicio de la reacción (figura 4.38).

El efecto inhibitorio de los xilooligómeros de cadena larga, que se ha indicado anteriormente, se reduciría por la acción hidrolítica de la XInC, favoreciendo por tanto la acción de las enzimas celulolíticas. Debido a la falta de actividad β -xilosidasa la xilobiosa no se hidrolizó y no se observó apenas aumento en la concentración de xilosa durante las 24 h con sólo XInC (figura 4.38). Por su parte, NS 50013 y NS 50010 sí muestran cierta actividad β -xilosidasa (7,2 y 0,2 UI/g celulosa en el ensayo), por lo que una vez en el medio se produjo un rápido aumento de la concentración de xilosa.

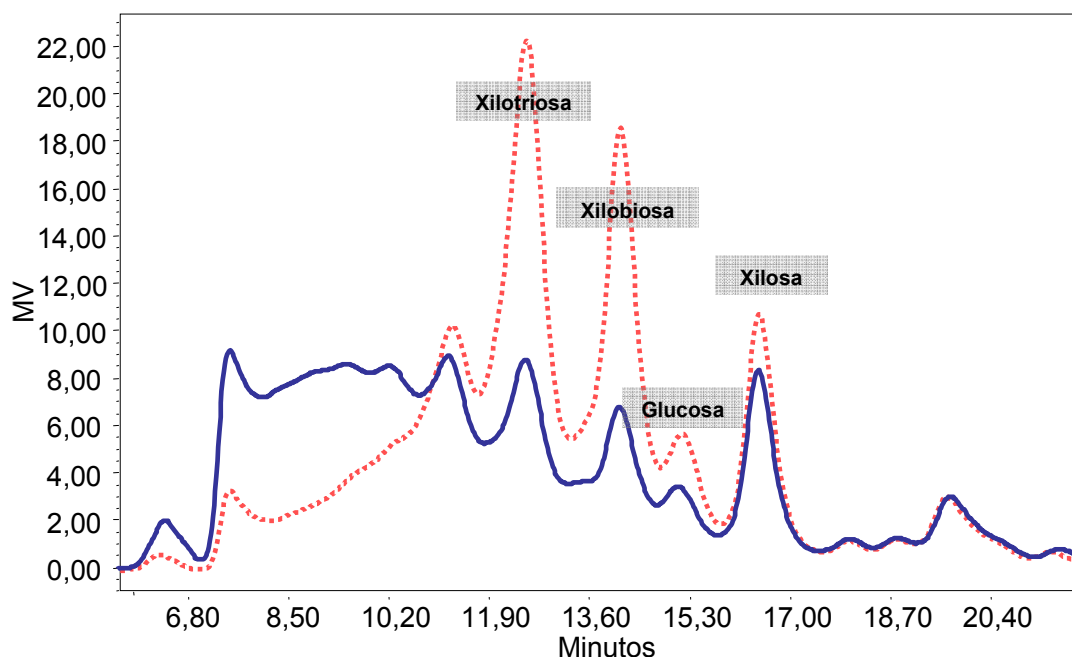


Figura 4.38. Perfiles de azúcares ensayo C0X24. Cromatograma HPLC. Línea azul continua: 0 h, antes de añadir XInC. Línea roja discontinua: 24 h tratamiento con XInC.

Ensayo adición XInC con mayor dosis de celulasa

Se estudió la suplementación previa con XInC en ensayos en las mismas condiciones que en el apartado anterior pero con una dosis mayor de celulasas más cercana a la habitualmente utilizada en procesos de HE (15 UPF/g celulosa de NS 50013 y 15 UI/g celulosa de NS 50010) (resultados no mostrados). A mayores dosis de celulasa también se observó el efecto positivo de la adición de XInC. Con la adición de XInC como etapa previa se mejoró la producción de glucosa al final del proceso en un 4% respecto al ensayo con adición simultánea de celulasas y en un 9% respecto al control sin suplementación. El rendimiento máximo con esta configuración tras 24 h de HE con xilanasas y 96 h con celulasas alcanzó un 71,6% (glucosa) y un 92,1% (xilosa).

Efecto de BSA y celulasa adicional en la HE

Como se ha sido explicado anteriormente, proteínas como BSA pueden unirse a la lignina y evitar la adsorción inespecífica e irreversible de las enzimas celulolíticas, aumentando así su efectividad en la HE (Yang y Wyman, 2006). Para confirmar que el efecto de la adición previa de XInC fue debido a su actividad hidrolítica y no a la unión

a sitios inespecíficos, se realizaron ensayos añadiendo XInC y la proteína albúmina sérica bovina (BSA) a la misma concentración de proteína. En los ensayos de HE se utilizó, como en los ensayos anteriores, el MPC de paja de trigo pretratada a 210 °C, 2,5 min en una concentración de 10% ST (p/p) y una dosis de celulasas de 10 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010).

La XInC y la BSA se añadieron a una dosis de 2 mg de proteína/g celulosa 24 h antes que las celulasas. La figura 4.39 muestra la producción de glucosa en los diferentes ensayos. La adición de BSA (Control + BSA) no tuvo efecto positivo respecto al control, mientras que la suplementación con XInC (Control + XInC) mejoró significativamente los rendimientos de HE. Como en los ensayos anteriores, la concentración de xilobiosa y xilotriosa aumentó durante las 24 h de hidrólisis con XInC. En el caso del ensayo con BSA, estas concentraciones se mantuvieron constantes durante las 24 h de tratamiento con BSA, mostrando nuevamente el efecto de XInC sobre los oligómeros solubles. Los resultados muestran que el efecto que produce XInC en la HE se debe fundamentalmente a su actividad catalítica y no a la unión a sitios inespecíficos en la lignina.

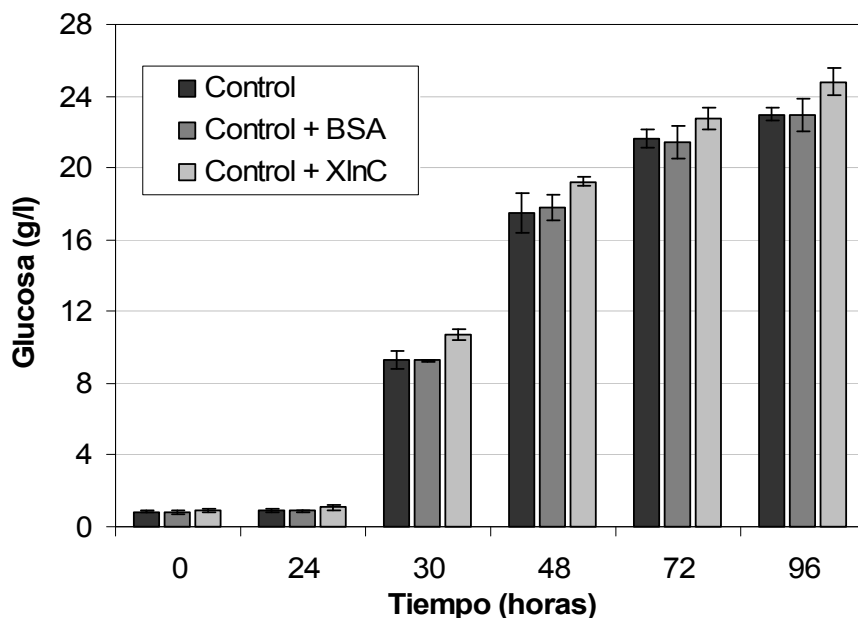


Figura 4.39. HE. Comparación BSA-XInC. Producción de glucosa. Sustrato MPC, 10% ST (p/p). Dosis: NS 50013, 10 UPF/g celulosa; NS 50010, 15 UI/g celulosa; XInC, 2 mg/g celulosa (100 UI/g celulosa); BSA, 2 mg/g celulosa. 50 °C, 150 rpm.

Ensayo con RSI como sustrato

Para estudiar el efecto de la adición previa de XInC sobre los carbohidratos insolubles se realizó un ensayo de HE (no mostrado) con RSI como sustrato (10% ST, (p/p)), por tanto sin azúcares solubles en el medio al inicio del ensayo. La dosis de celulasas fue 10 UPF/g celulosa (NS 50013) y 15 UI/g celulosa (NS 50010) y la de XInC de 100 UI xilanas/g celulosa. El resto de las condiciones del ensayo fueron las mismas que en los ensayos anteriores. En este caso, la adición previa de XInC también mejoró los rendimientos de HE. La producción de glucosa aumentó en un 4,4% respecto a la suplementación simultánea de celulasas y XInC, alcanzando a las 96 h una concentración de 38,2 g/l, que supone un rendimiento de 78,1%. Como cabía esperar, los rendimientos de HE mejoraron en comparación con los obtenidos en los ensayos con MPC, debido al efecto inhibitor que los azúcares y los compuestos de degradación solubles ejercen sobre las enzimas. A pesar del efecto positivo de la suplementación con XInC sobre RSI como sustrato, las ventajas del tratamiento previo con XInC fueron mucho más evidentes cuando se utilizó el MPC como medio de HE, lo que confirma el efecto positivo en la hidrólisis de los xilooligómeros solubles contenidos en el material pretratado.

4.9.2 Integración de XInC en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas

Una vez demostrado que la adición de xilanasas mejora la HE de la paja de trigo, se estudió el efecto de su suplementación en procesos de producción de etanol. Para ello, se realizaron ensayos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) utilizando la levadura comercial fermentadora de glucosa *S. cerevisiae* "Ethanol Red" y ensayos de sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS) con la cepa recombinante *S. cerevisiae* F12, capaz de co-fermentar la glucosa y la xilosa. Para preparar el preinóculo se utilizó medio "Delft" con las dos cepas (ver apartado 3.8.1), con la diferencia de que para la cepa "Ethanol Red" se utilizó como fuente de carbono 40 g/l de glucosa y para la cepa F12, 20 g/l de glucosa y 20 g/l de xilosa. Para realizar las fermentaciones se añadió una carga de inóculo de 2 g/l.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de HE se fijaron tres estrategias de adición enzimática: un ensayo sólo con celulasas (control), adición simultánea de celulasa y XInC al inicio de la fermentación (C0X0) y una incubación

previa con XInC a 50 °C durante 24 h antes de la adición de celulasas (C24X0). Las dosis de enzimas fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos de HE: 10 UPF/g celulosa (NS 50013), 15 U β -glucosidasal/g celulosa (NS 50010) y 100 UI xilanasal/g celulosa (XInC). En todos los casos, la levadura se inóculo al mismo tiempo que la adición de celulasas. Como medio de fermentación se utilizó el MPC procedente del pretratamiento por EV a 210 °C, 2,5 min a una concentración de 10% ST (p/p). Las fermentaciones transcurrieron durante 144-192 h a 35 °C y 150 rpm.

4.9.2.1 Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) de celulosa a etanol

La figura 4.40 muestra la concentración de glucosa, xilosa y etanol durante la SFS con *S. cerevisiae* “Ethanol Red” y las distintas estrategias de adición de enzimas. *S. cerevisiae* “Ethanol Red” es capaz de metabolizar la glucosa que se va liberando por la acción de las enzimas, por lo que su concentración es baja durante todo el proceso. Por el contrario, la concentración de xilosa aumenta y se mantiene en el medio debido a la incapacidad de esta cepa para fermentar las pentosas.

El efecto positivo de la suplementación con XInC observado en los ensayos de HE también se observó en los ensayos de SFS. La producción de etanol al final del proceso aumentó significativamente cuando la mezcla de celulasas fue suplementada con XInC. Aunque entre las dos estrategias de adición de XInC no hubo diferencias significativas, la máxima concentración de etanol (12,3 g/l) se alcanzó a las 144 h en el ensayo C24X0, en el que XInC fue añadida previamente. En este ensayo, el rendimiento de etanol fue de 60,9% del teórico. En comparación con el control, la producción de etanol en los ensayos C0X0 y C24X0 aumentó en un 9,2% y en un 13,9%, respectivamente.

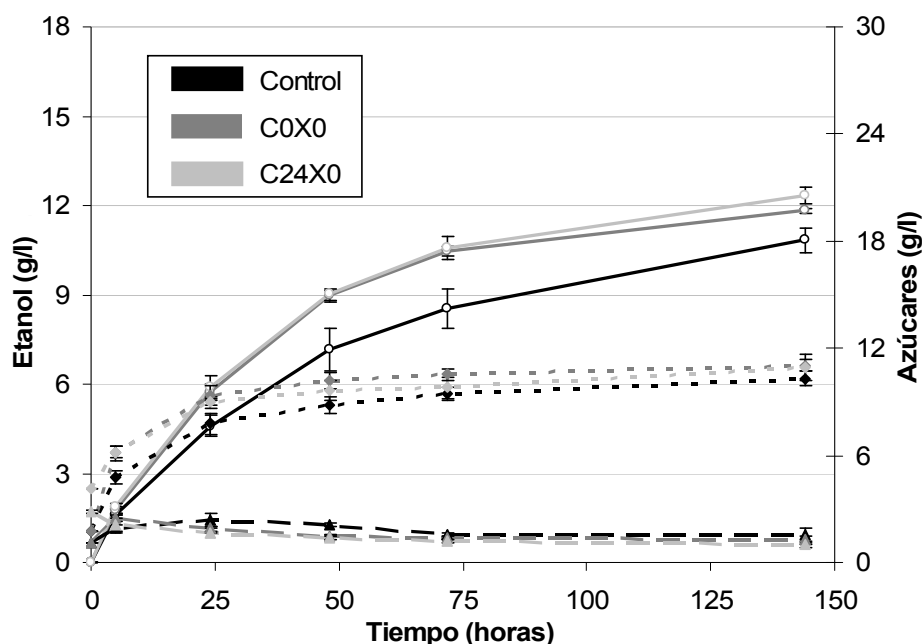


Figura 4.40. SFS. *S. cerevisiae* "Ethanol Red". Inóculo 2 g/l. Concentración (g/l) de Etanol (o), glucosa (▲) y xilosa (♦). Sustrato MPC, 210 °C, 2,5 min, 10% ST (p/p).

4.9.2.2 Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS) de celulosa y hemicelulosa a etanol

La figura 4.41 muestra la concentración de glucosa, xilosa y etanol en los ensayos de SCFS utilizando la cepa recombinante co-fermentadora de glucosa y xilosa *S. cerevisiae* F12. Como en los ensayos de SFS, la suplementación con XInC resultó en un aumento en la producción de glucosa y xilosa en el medio, y por tanto en la producción de etanol, que aumentó desde las primeras etapas del proceso. La productividad de etanol en los ensayos suplementados con XInC, C0X0 y C24X0, fue de 0,41 y 0,44 g/l.h a las 5 h; y de 0,28 y 0,29 g/l.h a las 24 h, respectivamente. La concentración final de etanol (192 h) aumentó en un 18,0% y en un 20,3% en los ensayos C0X0 y C24X0, en comparación con el ensayo control. La concentración más alta de etanol (17,5 g/l) se obtuvo en el ensayo con adición previa de XInC (C24X0), alcanzando un rendimiento de etanol de 63,9% a las 144 h y 70,9% al final de la SCFS. No obstante, como en el caso de la SFS, las diferencias entre los experimentos C0X0 y C24X0 no fueron significativas.

Tanto en los ensayos de SFS (figura 4.40) como en la SCFS la glucosa producida por la HE se consume rápidamente, siendo su concentración inferior a 1-1,5

g/l a lo largo del proceso. La concentración de xilosa en la SFS aumenta, alcanzándose concentraciones al final del proceso de 10-11 g/l. Sin embargo, en los ensayos de SCFS con la cepa F12, sólo se acumularon entre 6,5 y 8 g/l de xilosa, lo que muestra claramente el consumo de xilosa por la levadura. La producción de etanol a las 144 h en la SCFS (ensayo C24X0) fue un 28,4% superior que en la SFS suplementada (ensayo C24X0) y un 46% mayor que en la SFS convencional sin suplementar (control). Los resultados muestran las ventajas de la utilización de enzimas hemicelulasas junto con levaduras co-fermentadoras de glucosa y xilosa y su potencial para mejorar los rendimientos en la producción de etanol.

Otros autores también han mostrado aumentos en la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos utilizando cepas co-fermentadoras de hexosas y pentosas (Hahn-Hägerdal y col., 2007; Öhgren y col., 2006a; Tomás-Pejó y col., 2008b). La obtención de cepas que co-fermenten eficientemente la glucosa y xilosa es una de las áreas de investigación más activas para mejorar la eficiencia global del proceso de producción de etanol (Ha y col., 2011; Matsushika y col., 2009). Teniendo en cuenta que el contenido en xilosa de la biomasa lignocelulósica puede alcanzar hasta un 30%, su conversión a etanol aumentaría de forma considerable los rendimientos a partir de este tipo de materiales. En estos ensayos, la co-fermentación de la xilosa y de la glucosa aumentó la producción de etanol a las 144 h de 12,3 a 15,8 g/l. Teniendo en cuenta el contenido de xilosa y glucosa en el MPC y asumiendo un rendimiento de fermentación de 0,46 para la glucosa y 0,26 para la xilosa, el rendimiento de producción de etanol a las 144 h aumentó de un 49,6% en la SFS a un 63,8% en la SCSF.

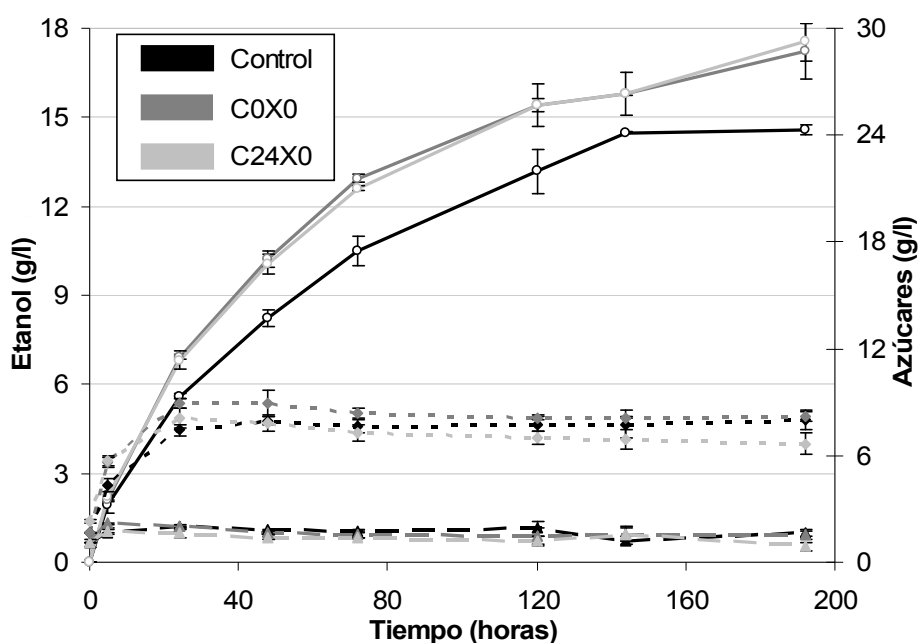


Figura 4.41. SCFS. *S. cerevisiae* F12. Inóculo 2 g/l. Concentración (g/l) de Etanol (o), glucosa (▲) y xilosa (◆). Sustrato MPC, 210 °C, 2,5 min, 10% ST (p/p).

La producción del inóculo puede suponer hasta un 50% del coste total del proceso de la SFS ó SCFS, por lo que la reducción del tamaño de inóculo es una opción interesante para reducir el coste del proceso (Galbe y Zacchi, 2002). Con objeto de estudiar el efecto del tamaño de inóculo sobre la producción de etanol, se realizaron ensayos de SCFS reduciendo el tamaño de inóculo a 1 g/l con las mismas estrategias de suplementación enzimática que en el ensayo anterior (2 g/l de inóculo). La figura 4.42 muestra la producción de glucosa, xilosa y etanol durante la SCFS. Se observó que, en general, con este tamaño de inóculo la fase de latencia del microorganismo aumentó. De hecho, en los ensayos control y C0X0 la producción de etanol se retrasó hasta las 48 y 72 h, respectivamente, acumulándose glucosa y xilosa en el medio de fermentación. Por el contrario, cuando el MPC fue incubado previamente durante 24 h con XInC la fase de latencia se acortó y la producción de etanol comenzó a las 6 h.

El MPC utilizado como medio de fermentación contiene compuestos derivados de la degradación de los azúcares y de la lignina que en altas concentraciones pueden ser tóxicos para la levadura. En este caso, los principales compuestos contenidos en el prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV

fueron furfural (0,7 g/l), HMF (0,2 g/l), ácido fórmico (1,7 g/l) y ácido acético (4,0 g/l). La mayoría de los microorganismos fermentadores son capaces de contrarrestar su efecto negativo mediante distintas vías metabólicas como la reducción de los furanos a sus correspondientes alcoholes (menos tóxicos) o el bombeo de protones en el caso de la presencia de ácidos alifáticos (Oliva y col., 2003; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a-b). En este ensayo, la mayor disponibilidad de azúcares libres como consecuencia de la acción de XInC sobre los oligómeros podría favorecer las rutas metabólicas de destoxificación de algunos compuestos como el furfural o el HMF, disminuyendo su concentración y acortando la fase de latencia del microorganismo.

A pesar de las ventajas de la suplementación con XInC en el ensayo con 1 g/l de inóculo no se alcanzaron las producciones de etanol obtenidas en la SCFS con un tamaño de inóculo de 2 g/l, que fueron hasta un 42% superiores. Estos resultados coinciden con trabajos anteriores, en los que un aumento del tamaño de inóculo en medios de fermentación con alto contenido en compuestos tóxicos mejoró la adaptación del microorganismo e incrementó la producción de etanol (Oliva y col., 2005).

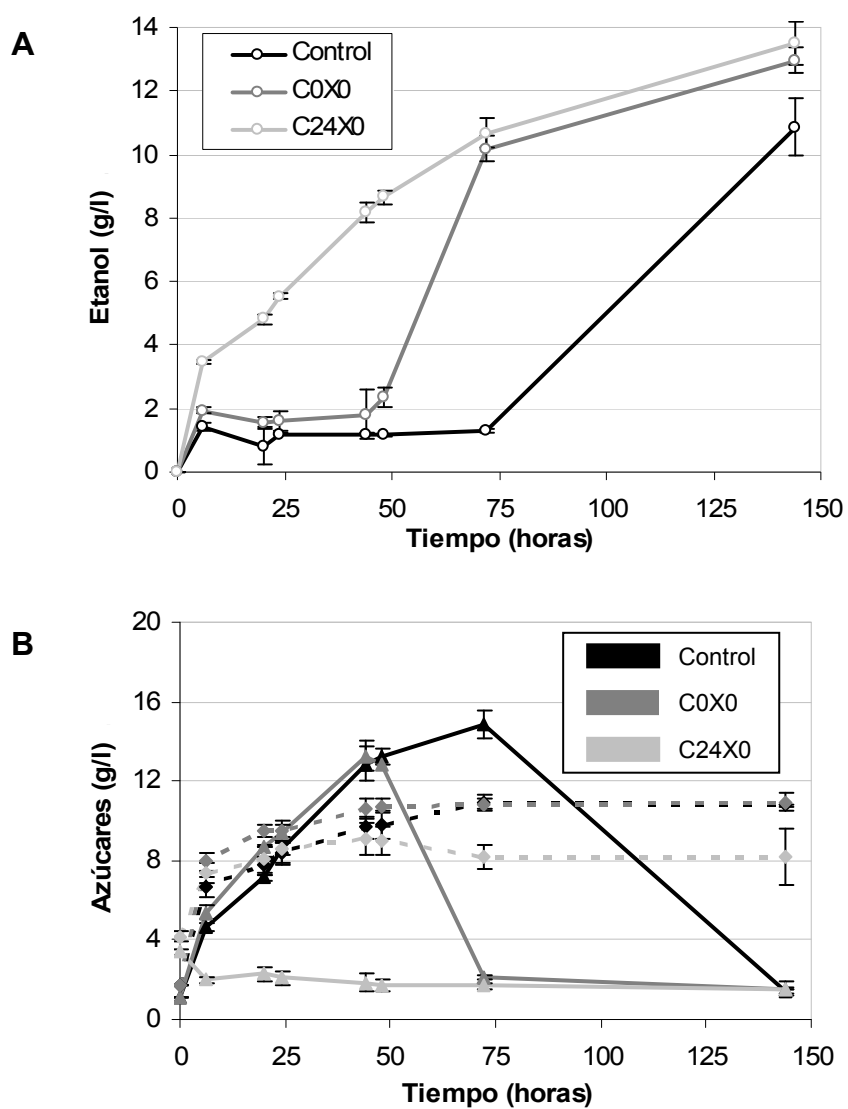


Figura 4.42. SCFS. *S. cerevisiae* F12. Inóculo 1 g/l. A: concentración (g/l) de Etanol (○). B: concentración de glucosa (▲) y xilosa (♦). Sustrato MPC, 210 °C, 2,5 min, 10% ST (p/p).

4.9.3 Estrategias de suplementación con los preparados comerciales

Cellic CTec y Cellic HTec

Cellic CTec y Cellic HTec son complejos enzimáticos comerciales recientemente desarrollados por la compañía “Novozymes” para reemplazar las celulasas de primera generación (NS 50013-NS 50010) en los procesos de producción de etanol a partir de lignocelulosa. Como se muestra en la tabla 4.13, Cellic CTec presenta fundamentalmente actividades celulasa y β -glucosidasa, mientras que Cellic HTec es una preparación con actividades hemicelulasas, principalmente xilanasa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de suplementación con la enzima XInC (apartado 4.9.1), se realizaron ensayos utilizando dos estrategias de adición de los cócteles Cellic CTec y Cellic HTec. Además del ensayo control sin adición de Cellic HTec, se estudió la adición simultánea de Cellic CTec y Cellic HTec (C0X0) y la aplicación durante 24 h de Cellic HTec previamente a la adición de Cellic CTec (C24X0). Como medio de HE se utilizó el MPC de paja de trigo pretratada a 210 °C, 2,5 min con un contenido en sólidos del 10% ST (p/p). La dosis utilizada de Cellic CTec fue de 24 mg/g celulosa, correspondientes a 15 UPF/g celulosa. Teniendo en cuenta tanto los resultados obtenidos con XInC como las recomendaciones del producto la dosis de Cellic HTec se fijó en 3,8 mg/g celulosa (65 UI xilanasa/g celulosa).

La figura 4.43 muestra la producción de glucosa y xilosa durante la HE en los distintos ensayos. Como ocurrió con la enzima XInC, con la suplementación previa con la preparación Cellic HTec (ensayo C24X0) se obtuvieron los mejores rendimientos de HE, alcanzándose un 84,0% y un 79,8%, para la producción de glucosa y xilosa, respectivamente. La producción de glucosa en el ensayo C24X0 aumentó en un 11,9% y un 43,1% en comparación con los ensayos C0X0 y control, mientras que la producción de xilosa aumentó en un 5,8% y en un 22,3%, respectivamente.

Durante las 24 h de HE con Cellic HTec se observó un aumento en la concentración de glucosa y xilosa ligeramente superior al observado en los ensayos con XInC. Esta preparación posee cierta actividad celulasa y β -xilosidasa, además de xilanasa, lo cual explica este aumento en la producción de xilosa y glucosa monoméricas. Además, se observó también, como ocurrió con XInC, un aumento en las concentraciones de xilobiosa y xilotriosa tras las 24 h de HE con Cellic HTec.

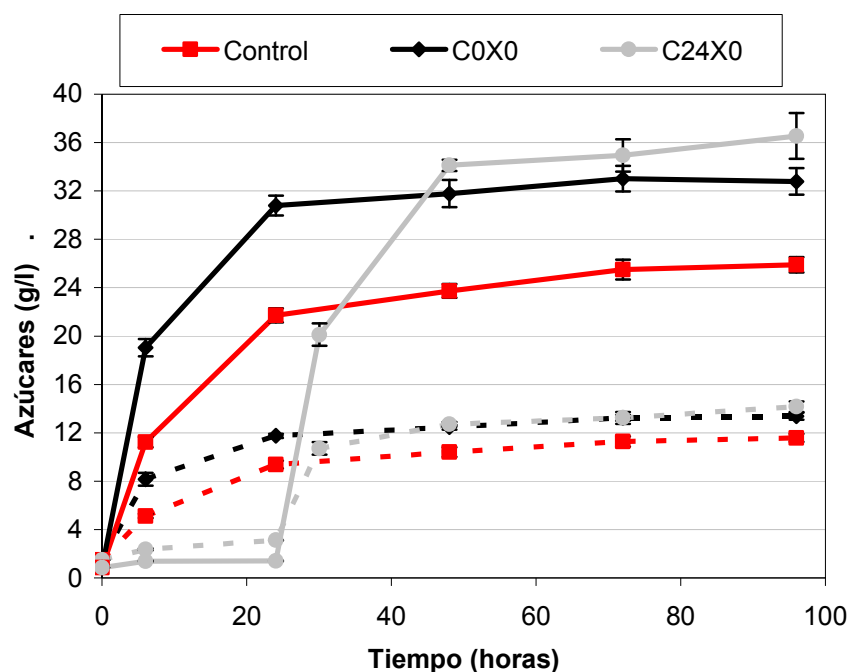


Figura 4.43. HE. Producción de glucosa (línea continua) y xilosa (línea discontinua) con las distintas estrategias de suplementación con Cellic CTec y Cellic HTec. Sustrato MPC, 10% ST (p/p). Dosis: Cellic CTec, 24 mg/g celulosa (15 UPF/g celulosa); Cellic HTec, 3,8 mg/g celulosa. 50 °C, 150 rpm.

Los resultados confirman lo observado en apartados anteriores, el efecto positivo de la suplementación con actividades hemicelulasas en la HE de sustratos lignocelulósicos como la paja de trigo pretratada por EV. La incubación de enzimas con actividad xilanasa (tanto XInC como la preparación comercial Cellic HTec) previa a la adición de celulasas se muestra como una estrategia eficaz y prometedora para aumentar la recuperación de azúcares fermentables, reducir las dosis de enzima aplicadas y mejorar el proceso global de producción de etanol.

5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONES

1. Las distintas condiciones de severidad del pretratamiento de autohidrólisis por explosión por vapor (220 °C y 210 °C, 2,5 min.) producen materiales pretratados con distinta composición y susceptibilidad al ataque enzimático. Bajo las condiciones de mayor severidad (220 °C) se alcanzan altos rendimientos de hidrólisis enzimática, sin embargo se degrada una cantidad significativa de los azúcares hemicelulósicos y se generan mayor cantidad de compuestos tóxicos. El material pretratado con menor severidad (210 °C) presenta un contenido mayor de hemicelulosa insoluble y menor cantidad de compuestos de tóxicos.
2. La paja de trigo pretratada por explosión por vapor es una fuente de carbono adecuada para la producción de enzimas con *Trichoderma reesei* RUTC30. La composición de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) de la fuente de carbono tiene influencia en la composición del cóctel enzimático. La utilización de una fuente de carbono con mayor contenido en hemicelulosa aumentó la producción de enzimas con actividades hemicelulasas, cuyo efecto positivo se refleja en la hidrólisis enzimática.
3. La determinación de actividades enzimáticas sobre sustratos modelo no aporta una estimación real de la capacidad de las enzimas para hidrolizar sustratos lignocelulósicos. El microensayo enzimático desarrollado es un método adecuado para evaluar los cócteles enzimáticos sobre el residuo sólido insoluble (RSI) pretratado y sobre el material pretratado completo.
4. La suplementación de los cócteles celulolíticos con preparaciones comerciales con actividades hemicelulasas mejora la producción de xilosa, y especialmente la de glucosa, incluso con sustratos con bajo contenido en hemicelulosa, lo que demuestra la gran influencia que la presencia de pequeñas cantidades de hemicelulosa residual tiene en la hidrólisis de la celulosa.
5. La acción de la endoxilanasas XInC, hidrolizando internamente las cadenas de xilano y de la α -L-arabinofuranosidasa, retirando las sustituciones laterales de arabinosa de la hemicelulosa, muestra un efecto sinérgico y facilita la accesibilidad de la celulosa, mejorando la producción de glucosa durante la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada.

6. La suplementación con enzimas accesorias hemicelulasas permite reducir la severidad del pretratamiento por explosión por vapor de la paja de trigo sin comprometer los altos rendimientos de hidrólisis enzimática obtenidos con pretratamientos a mayor severidad.
7. La combinación de pretratamientos a menor severidad, con menor producción de tóxicos, y la suplementación con hemicelulasas permite realizar el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) de celulosa a etanol con altos rendimientos, sin necesidad de realizar ninguna etapa de destoxificación.
8. La incubación con enzimas xilanasas previa a la hidrólisis de la celulosa provoca la hidrólisis de los xilooligómeros solubles presentes en el medio, lo que reduce su efecto inhibitorio sobre las celulasas. Esta estrategia de adición enzimática mejora los rendimientos de hidrólisis enzimática y la producción de etanol mediante procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS).
9. La utilización de paja de trigo pretratada a 210 °C en procesos de SCFS, con la levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* F12, suplementados con xilanasas permite aumentar la producción de etanol hasta un 46% respecto al proceso convencional de SFS.

5. CONCLUSIONS

1. The different steam explosion pretreatment severity conditions (220 °C and 210 °C, 2.5 min) produce pretreated substrates with different composition and susceptibility to enzymatic degradation. More severe conditions (220 °C) increased enzymatic yields, however also promotes higher degradation of hemicellulosic sugars and generation of toxics. Pretreated material at lower severity conditions (210 °C) presents a higher insoluble hemicellulose content and lower concentration of toxic compounds.
2. Steam explosion pretreated wheat straw is an adequate carbon source for enzyme production by *Trichoderma reesei* RUTC30. Carbohydrate composition (cellulose and hemicellulose) of the carbon source affects the enzymatic cocktail composition. Utilization of carbon sources with higher content of hemicellulose increases the production of hemicellulases, which has a positive effect on the enzymatic hydrolysis.
3. Enzymatic activities determined using commercial substrates provide an unrealistic estimation of the ability of the enzymes to hydrolyze lignocellulosic substrates. The enzymatic microassay developed in this Thesis is an appropriate method to evaluate the enzymatic mixtures using pretreated water insoluble solids (WIS) and the whole slurry obtained after steam explosion pretreatment as substrates.
4. Supplementation of cellulase cocktails with commercial hemicellulase preparations improves xylose and, especially, glucose production, even with low hemicellulose content substrates; which shows the influence of little amounts of hemicellulose on cellulose hydrolysis.
5. The action of endoxylanase XInC, hydrolyzing internal bonds in xylan chains, and α -L-arabinofuranosidase, removing arabinose substitutions from xylan backbone, show a synergistic effect and enhances the accessibility to cellulose, increasing glucose production in the enzymatic hydrolysis process of wheat straw.

6. Supplementation with accessory hemicellulases enables a reduction of the steam explosion pretreatment severity, maintaining the enzymatic hydrolysis yields obtained at higher severity conditions.
7. Combination of milder severity pretreatments, with lower production of toxics, and hemicellulases supplementation results in high yields in a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process, and avoids a detoxification step.
8. Incubation with xylanases prior to cellulases addition promotes the hydrolysis of soluble xylooligomers present in the media, which reduces their inhibitory effect on cellulases. This supplementation strategy improves the enzymatic hydrolysis yields and ethanol production in SSF and simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) processes.
9. SSCF with wheat straw pretreated at 210 °C using the recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 and supplemented with xylanases results in a 46% increase in ethanol production respect to conventional SSF process.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alfani, A., Gallifuoco, F., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M. 2000. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 184-192.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M.F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 340-349.
- Andric, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K. 2010. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 280-297.
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. 2005. Transcription regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 719-739.
- Bailey, M.J., Biely P., Poutanen K. 1991. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.
- Bailey, M.J., Nevalainen, K.M.H. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, 153-157.
- Baker, J.O., King, M.R., Adney, W.S., Decker, S.R., Vinzant, T.B., Lantz, S.E., Nieves, R.E., Thomas, S.R., Li, L.C., Cosgrove, D.J., Himmel, M.E. 2000. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 217-223.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215-242.
- Ballesteros, M. 2006. Carburantes sin petróleo: Bioetanol. *Investigación y Ciencia*, 362, 78-85.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M. 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 130, 496-508.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., & Ballesteros M. 2002. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste *Brassica carinata* at different particle sizes. *Process Biochemistry*, 38, 187-192.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Sáez, F., Ballesteros, M. 2001. Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 237-252.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process SFS with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39, 1843-1848.

- Ballesteros, M., Sáez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Negro, M.J., Martínez, J.M., Castañeda, R., Oliva, J.M. 2010. Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 423-431.
- Bamaga, O., Thakur, M., Verma, M. 2003. Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America*, 34 2, 53-58.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J.S., Walton, J.D. 2010. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioenergy Research*, 3, 82-92.
- Barta, Z., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Dienes, D., Ballesteros, M., Réczey, K. 2010. Refining hemp hurds into fermentable sugars or ethanol. *Chemical and Biochemical Engineering*, 24 (3) 331–339.
- Bayer, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y., Lamed, R. 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual review of microbiology*, 58, 521-554.
- Benítez, T., Limón, C., Delgado-Jarana, J., Rey, M. 1998. Glucanolytic and other enzymes and their genes. En: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. Ed: Harman, G.E., Kubicek, C.P. Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, 101–127.
- Benkő, Z., Siika-Aho, M., Viikari, L., Réczey, K. 2008. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 109-114.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Maximenko, V., Bura, R., Markov, A., Sinitsyn, A., Okunev, O., Solovieva, I., Saddler, J.N. 2006. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 129-132, 528-545.
- Berlin, A., Maximenko, V., Bra, R., Kamg, K.Y., Gilkes, N., Saddler, J. 2005. A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 880-886.
- Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 287-296.
- Bhat, M.K., Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15, 583-620.
- Bidlack, J., Malone, M., Benson, R. 1992. Molecular structure and components integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences*, 75, 51-56.
- Boisset, C., Pétrequin, C., Chanzy, H., Henrissat, B., Schülein, M. 2001. Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 339-345.
- 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.

- Brett, C.T., Waldron, K.W. 1996. "The molecular component of the cell wall" and "Cell wall architecture and the skeletal role of the cell wall". En: Physiology and biochemistry of plant cell walls. Ed: Blackk, M., Charlwood, B. Chapman & Hall, 2ª edición, Londres, Reino Unido, 4-74.
- Brown, R.M. 2003. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? Journal of polymer science, Part A: Polymer chemistry, 42, 487-495.
- Brownell, H.H., Saddler, J.N. 1984. Steam-explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 14, 54-68.
- Buranov, A.U., Mazza, G. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. Industrial Crops and Products, 28, 237-259.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F. 2004. Effect of inhibitors release during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. Biotechnology Progress, 20, 200-206.
- Cara, C., Romero, I., Oliva, J.M., Sáez, F., Castro, E. 2007. Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. Applied Biochemistry and Biotechnology, 137-140, 379-394.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Castro, E. 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. Fuel, 87, 692-700.
- Cardona, C.A., Sánchez, O.J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. Bioresource Technology, 98, 2415-2457.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plant: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. The Plant Journal, 3, 1-30.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M. 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. Journal of Scientific and Industrial Research, 67, 849-864.
- Castells, X.E. 2005. Tratamiento y valorización energética de residuos. Ed: Díaz de Santos, Madrid, España.
- Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N. 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? Advances in biochemical engineering/biotechnology, 108, 67-93.
- Chang, V.S., Holtzapple, M. 2000. Fundamental factors affecting biomass reactivity. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 5-37.
- Chen, S., Wayman, M. 1992. Novel inducers derived from starch for cellulase production by *Trichoderma reesei*. Process Biochemistry, 27, 327-334.
- Cherry, J.R., Fidantsef, A.L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: An update. Current Opinion in Biotechnology, 14, 438-443.
- Chu, B.C.H., Lee, H. 2007. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. Biotechnology Advances, 25, 425-441.

Chundawat, S.P.S., Balan, V., Dale, B.E. 2008. High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 1281-1294.

Collins, T., Gerday, C., Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23.

Cosgrove, D.J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 391-417.

Cosgrove, D.J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407, 321-326.

Dahlman, O., Jacobs, A., Sjöberg, J. 2003. Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose*, 10, 325-334.

Deshpande, P., Nair, S., Khedkar, S. 2008. Water hyacinth as carbon source for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 552-560.

DIRECTIVA 2009/28/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO. 2009.

Domingues, F.C., Queiroz, J.A., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 394-401.

Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, F., Hahn-Hägerdal, B. 2000. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3381-3386.

Eriksson, T., Karlsson, J., Tjerneld, F. 2002. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I Cel 7A and endoglucanase I Cel7B of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101, 41-60.

Esteghlalian, A.R., Srivastava, V., Gilkes, N., Gregg, D.J., Saddler, J.N. 2001. An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. En: *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. Ed: Himmel, M.É., Baker, W., Saddler, J.N., ACS, 100-111.

FAOSTAT. 2009. Food and Agricultural Organization FAO. <http://faostat.fao.org/>

Faulds, C.B., Mandalari, G., Curco, R.B., Bisignano, G., Christakopoulos, P., Waldron, K.W. 2006. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 622-629.

Fengel, D., Wegener, G. 1989. En: *Wood; chemistry, ultrastructure and reactions*. Ed: Walter de Gruyter. Berlin-Nueva York, 613 p.

Fernández-Espinar, M.T., Ramón, D., Piñaga, F., Vallés, S. 1992. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 91, 91-96.

- Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H.A., Teunissen, P.J., Yao, J., Ward, M. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 31988-31997.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 618-628.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J. 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 136-140, 353-365.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129, 278-288.
- García-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, M., González, A., Negro, M.J. 2011. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel*, 90, 1624-1630.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M., Bolado, S. 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*, 100, 1608-1613.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800.
- Golias, H., Dumsday, G.J., Stanley, G.A., Pamment, N.B. 2000. Characteristics of cellulase preparations affecting the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Biotechnology Letters*, 22, 617-621.
- Golias, H., Dumsday, G.J., Stanley, G.A., Pamment, N.B. 2002. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, 96, 155-168.
- Gómez, L.D., Steele-King, C.G., McQueen-Mason, S.J. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls. *New Phytologist*, 178, 473-485.
- Gómez, L.D., Whitehead, C., Barakate, A., Halpin, C., McQueen-Mason, S.J. 2010. Automated saccharification assay for determination of digestibility in plant materials. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 23.
- Gruno, M., Våljamaä, P., Pettersson, G., Johansson, G. 2004. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 503-511.

Gyalai-Korpos, Nagy, G., Mareczky, Z., Schuster, A., Réczey, K., Schmoll, M. 2010. Relevance of the light signalling machinery for cellulase expression in *Trichoderma reesei* *Hypocrea jecorina*. BMC Research Notes, 3, 330.

Ha, S.J., Galazka, J.M., Rin Kim, S., Choi, J.H., Yang, X., Seo, J.H., Louise Glass, N., Cate, J.H.D., Jin, Y.S. 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 108, 504-509.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Applied Microbiology and Biotechnology, 74, 937-953.

Hammel, K.E. 1997. Fungal degradation of lignin. En: Plant litter quality and decomposition. Ed: Cadish, G., Giller, K.E. CAB International, Wallingford, Reino Unido, 33-45.

Hayes, D.J. 2009. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. Catalysis Today, 145, 138-151.

Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmüller, H., Sinner, M., Esterbauer, H. 1993. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. En: Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Ed: Saddler, J.N. CAB International, Wallingford, Reino Unido, 33-72.

Hayward, T., Hamilton, J., Tholudur, A., McMillan, J. 2000. Improvements in titer, productivity, and yield using solka-floc for cellulase production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 859-874.

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 100, 10-18.

Hendy, N.A., Wilke, C.R., Blanch, H.W. 1984. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. Enzyme and Microbial Technology, 6, 73-77.

Henriksson H., Stahlberg J., Isaksson R., Pettersson G. 1996. The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: a comparison of cellobiohydrolase 1 and endoglucanase 1. FEBS letters, 390, 339-346.

Henrissat, B., Davies, G. 1997. Structural and sequences-based classification of glycoside hydrolases. Current Opinion in Structural Biology, 7, 637-644.

Himmel, M.E., Andey, W.S., Baker, J.O., Nieves, R.A., Thomas, S.R. 1996. Cellulases: Structure, Function, and Applications. En: Handbook on bioethanol production and utilization. Ed: Wyman, C. Taylor and Francis, Washington, DC, EEUU, 143-161.

Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science, 315, 804-807.

Horváth, I.S., Sjöde, A., Alriksson, B., Jönsson, L. J., Nilvebrant, N.O. 2005. Critical conditions for improved fermentability during overliming of acid hydrolysates from spruce. Applied Biochemistry and Biotechnology, 121-124, 1031-1044.

- Howard, R.L., Abotsi, E., Rensburg, J., Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619.
- Hsu, T.-A. 1996. Pretreatment of biomass. En: *Handbook on bioethanol production and utilization*. Ed: Wyman, C. Taylor and Francis, Washington, DC, EEUU, 179-212.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A. 1990. Phenolic-acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry*, 29, 733-737.
- Ilmén, M., Thrane, C., Penttilä, M. 1996. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full length and a truncated mutant form. *Molecular and General Genetics*, 251, 451-460.
- Ingram, L.O., Gómez, P.F., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., York, S.W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 205-214.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC. 2001. *Climate change: the scientific basis*. Cambridge Univ. press, Cambridge, Reino Unido.
- Jacobsen, J., Lydolph, M., Lange, L. 2005. Culture independent PCR: an alternative enzyme discovery strategy. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 63-71.
- Jin, M., Lau, M.W., Balan, V., Dale, B.E. 2010. Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424ALNH-ST. *Bioresource Technology*, 101, 8171-8178.
- Jorgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 119-134.
- Jorgensen, H., Olsson, L. 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT20888. Effect off substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 381-390.
- Juhász, T. 2005. Enzymes for improved hydrolysis of lignocellulosics. Thesis Dissertation. Dpt. of Agricultural Chemical Technology. Budapest University of Technology and Economics, Hungría.
- Juhász, T., Egyhazi, A., Réczey, K. 2005a. β -glucosidase production by *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 243-254.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. 2005b. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40, 3519-3525.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Sziarto, N., Réczey, K. 2004. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, 201-211.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource Technology*, 100, 6378-6384.

Kabel, M.A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A.G.J., Schols, H.A. 2006. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, 98, 2034-2032.

Kádár, Z., Szengyel Z., Réczey, K. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crop and Products* 20, 103-110.

Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P., Angelidaki, I. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100, 2562-2568.

Karhumaa, K., Sanchez, R. G., Hahn, H., Gorwa-Grauslund, M. F. 2007. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 6, 5.

Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Julson, J.L. 2008. Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. *American Society of Agricultural and Biological Engineers, Annual International Meeting*, 6, 3562-3577.

Kim, E.S., Lee, H.J., Bang, W.G., Choi, I.G., Kim, K.H. 2009. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1342-1353.

Kim, J.S., Kim, H., Lee, J.S., Lee, J.P., Park, S.C. 2008. Pretreatment characteristics of waste oak wood by ammonia percolation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148, 15-22.

Kim, S., Dale, B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26, 361-375.

Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen A.B. 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 82, 15-26.

Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B. K. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 10-26.

Kootstra, A.M.J., Beeftink, H.H., Scott, E.L., Sanders, J.P.M. 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*, 46, 126-131.

Kovács, K., Macrelli, S., Szakacs, G., Zacchi, G. 2009a. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 14.

Kovács, K., Szakacs, G., Zacchi, G. 2009b. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresource Technology*, 100, 1350-1357.

- Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jorgensen, H., Elder, T. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 1, 5.
- Kubicek, C.P. 1992. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. *Advances in Biochemical Engineering*, 45, 1-27.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729.
- Kumar, R., Wyman, C.E. 2009a. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 100, 4203-4213.
- Kumar, R., Wyman, C.E. 2009b. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*, 25, 302-314.
- Kumar, R., Wyman, C.E. 2009c. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnology and Bioengineering* 102 (2), 457-467.
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S.A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Yakunin, A.F. 2005. Enzyme genomics: application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 263-279.
- Lam, T.B.T., Kadoya, K., Iiyama, K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57, 987-992.
- Laureano-Pérez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E. 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 1081-1099.
- Lechón, Y., Cabal, H., Lago, C., De la Rúa, C., Sáez, R.M., Fernández. 2005. Análisis de ciclo de vida de combustibles alternativos para el transporte. Fase I. Análisis de ciclo de vida comparativo del etanol de cereales y la gasolina. *Energía y cambio climático*. Ministerio de Medio Ambiente.
- Li, B.Z., Balan, V., Yuan, Y.J., Dale, B.E. 2010a. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion AFEX pretreatment. *Bioresource Technology*, 101, 1285-1292.
- Li, X., Kim, T.H., Nghiem, N.P. 2010b. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation TPSSF. *Bioresource Technology*, 101, 5910-5916.
- Liming, X., Xueliang, S. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*, 91, 259-262.

Linde, M., Galbe, M., Zacchi, G. 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loading and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1100-1107.

Lo, C.M., Zhang, Q., Lee, P., Ju, L.K. 2005. Cellulase production by *Trichoderma reesei* using sawdust hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 561-573.

Lynd, L.R. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment*, 21, 403-465.

Lynd, L.R., Van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 577-583.

Mandels, M., Webber, J. 1969. The Production of Cellulases. En: *Cellulases and Their Applications*. Ed: Hajny, G.J., Reese, E.T., American Chemical Society, EEUU, 391-414.

Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15, 804-816.

Marchessault, R.H., Malhotra, S.L., Jones, A.Y., Perovic, A. 1983. The wood explosion process: characterization and uses of lignin/cellulose products. En: *Wood and agricultural residues*, Academic press, Nueva York, EEUU, 401-413.

Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G.J., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., De Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., Brettin, T.S. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* syn. *Hypocrea jecorina*. *Nature Biotechnology* 26, 553-560.

Matsushika, A., Inoue, H., Murakami, K., Takimura, O., Sawayama, S. 2009. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 100, 2392-2398.

McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83, 37-46.

Medve, J., Karlsson, J., Lee D, Tjerneld, F. 1998. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 59, 621-634.

Merino, S.T., Cherry, J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 95-120.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

- Mohagheghi, A., Grohmann, K., Wyman, C.E. 1988. Production of cellulase on mixtures of xylose and cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 17, 263-277.
- Montenecourt, B.S., Eveleigh, D.E. 1979. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. En: *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*. Ed: Brown, R.D., Jurasek, L. American Chemical Society, 289-301.
- Mosier, N., Wyman, C.E., Dale, B.D., Elander, R.T., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, C.M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, 673-686.
- Murphy, J.D., Power, N.M. 2008. How can we improve the energy balance of ethanol production from wheat? *Fuel*, 87, 1799-1806.
- Nagendran, S., Hallen-Adams, H.E., Paper, J.M., Aslam, N., Walton, J.D. 2009. Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 427-435.
- Navarro, D., Couturier, M., da Silva, G.G.D., Berrin, J.G., Rouau, X., Asther, M., Bignon, C. 2010. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microbial Cell Factories*, 9, 58.
- Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Cabañas, A., Ballesteros, M. 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 87-100.
- Nobles, D.R., Romanovicz, D.K., Brown, R.M. 2001. Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiology*, 127, 529-542.
- Nogawa, M., Goto, M., Okada, H., Morikawa, Y. 2001. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Current Genetics*, 38, 329-334.
- NREL. National Renewable Energy Laboratory. 2007. Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. NREL.Golden.CO, EEUU.
- Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., Zacchi, G. 2007a. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98, 2503-2510.
- Öhgren, K., Galbe, M., Zacchi, G. 2005. Optimization of steam pretreatment of SO₂-impregnated corn stover for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 1055-1067.
- Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., Zacchi, G. 2006a. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, 126, 488-498.
- Öhgren, K., Rudolf, A., Galbe, M., Zacchi, G. 2006b. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy*, 30, 863-869.

- Öhgren, K., Vehmaanpera, J., Siika-Aho, M., Galbe, M., Viikari, L., Zacchi, G. 2007b. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 607-613.
- Olanders, B., Steenari, B.M. 1995. Characterization of ashes from wood and straw. *Biomass and Bioenergy*, 8, 105-115.
- Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., González, A., Ballesteros, M., 2005. Application of Fenton's reaction to steam explosion prehydrolysates from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, 887–899.
- Oliva, J.M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 141-154.
- Olsson, L., Christensen, T.M.I.E., Hansen, K.P., Palmqvist, E.A. 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 612-619.
- Olsson L., Jørgensen, H., Krogh, K.B.R., Roca, C. 2005. Bioethanol production from lignocellulosic material. En: *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. Ed: Dumitriu, S. Marcel Dekker, Nueva york, EEUU, 957-993.
- Olsson, L., Soerensen, H.R., Dam, B.P., Christensen, H., Krogh, K.M., Meyer, A.S. 2006. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 129-132, 117-129.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74, 17-24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 25-33.
- Palonen, H., Thomsen, A.B., Tenkanen, M., Schmidt, A.S., Viikari, L. 2004. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117, 1-17.
- Pan, X., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N. 2004. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 115, 1103-1114.
- Pan, X.J., Gilkes, N., Saddler, J.N. 2006. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung*, 60, 398-401.
- Penttilä, M., Teeri, T., Nevalainen, H., Knowles, J.K.C. 1991. The molecular biology of *Trichoderma reesei* and its application to biotechnology. En: *Applied molecular genetics of fungi*. Ed: Peberdy, J.F., Caten, C.E., Ogden, J.E, Bennett, J.W. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 85-102.

- Pérez, J.A., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P. 2007. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 929-938.
- Pérez, J.A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M.J., Manzanares, P. 2008. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*, 87, 3640-3647.
- Pérez-González, J.A., Graaff, L.H.D., Visser, J., Ramón, D. 1996. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2179-2182.
- Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hägerdal, B. 1991. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Process Biochemistry*, 26, 65-74.
- Plan de Acción Nacional de Energías Renovables de España. PANER 2010-2020.
- Poutanen, K., Rättö, M., Puls, J., Viikari, L. 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *Journal of Biotechnology*, 6, 49-60.
- Puls, J. 1997. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia*, 120, 183-196.
- Qing, Q., Yang, B., Wyman, C.E. 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*, 101, 9624-9630.
- Raweesri, P., Riangrunrojana, P., Pinphanichakarn, P. 2008. α -l-arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresource Technology*, 99, 8981-8986.
- Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., Meyer, A.S. 2007. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 143, 27-40.
- Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454, 841-845.
- Rudolf, A., Alkasrawi, M., Zacchi, G., Liden, G. 2005. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 195-204.
- Saha, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 279-291.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40, 3693-3700.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyysönen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttilä, M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence with sequence similar to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, 269, 4202-4211.

- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185-194.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., Ramón, D. 1996. Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* *abfB* gene. *FEMS Microbiology Letters*, 145, 189-194.
- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G. 2006. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 756-762.
- Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R. 2008. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresource Technology*, 99, 4997-5005.
- Sims R, Taylor M, Saddler, J., Mabee, W.E. From 1st to 2nd generation biofuel technologies: an overview of current industry and RD&D activities. 2008. International Energy Agency.
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., Taylor, M. 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101, 1570-1580.
- Sipos, B., Benkő, Z., Dienes, D., Réczey, K., Viikari, L., Siika-Aho, M. 2009. Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 347-364.
- Sipos, B., Dienes, D., Schleicher, A., Perazzini, R., Crestini, C., Siika-Aho M., Réczey, K. 2010. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam pretreated spruce in the presence of polyethylene glycol. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 84-90.
- Sjöström, E. 1993. Wood polysaccharides. En: *Wood Chemistry. Fundamentals and Applications*. Ed: Sjöström, E.. Academic Press Inc, San Diego, CA, EEUU.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G. 2003. Combined use of H₂SO₄ and SO₂ impregnation for steam pretreatment of spruce in ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108, 127-140.
- Solomon, B.D., Barnes, J.R., Halvorsen, K.E. 2007. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, 31, 416-425.
- Sonderegger, M., Jeppsson, H., Larsson, C., Gorwa-Grauslund, M.F., Boles, E., Olsson, L., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B., Sauer, V. 2004. Fermentation performance of engineered and evolve xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 90-98.
- Sonderegger, M., Sauer, U. 2003. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1990-1998.
- Sternberg, D., Mandels, G.R. 1979. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *Journal of Bacteriology*, 139, 761-769.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.

- Sun, R.C., Fang, J. M., Rowlands, P., Bolton, J. 1998. Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2804-2809.
- Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1997. A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*, 6, 1-8.
- Sun, X.F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S. 2005a. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 860-870.
- Sun, R.C., Tomkinson, J. 2002. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 50, 263-271.
- Sun, R.C., Tomkinson, J., Wang, Y.X., Xiao, B. 1999. Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. *Polymer*, 41, 2647-2656.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S. 2005b. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 60, 15-26.
- Suto, M., Tomita, F. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 305-311.
- Suurnäkki, A., Li, T.Q., Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., Vuorinen, T., Ödberg, L. 1997. Effects of enzymatic removal of xylan and glucomannan on the pore size distribution of kraft fibres. *Holzforschung*, 51, 27-33.
- Szczodrak, J., Targonski, Z. 1987. Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 300-303.
- Szengyel, Z., Zacchi, G. 2000. Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89, 31-42.
- Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., Réczey, K. 2000. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam- pretreated spruce. Hydrolytic potential of cellulases on different substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 679-691.
- Tabka, M.G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J.C. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1621-1651.
- Taj-Aldeen, S.J. 1993. Effect of starch on the induction of [beta]-glucosidase in *Trichoderma reesei*. *Mycological Research*, 97, 318-320.

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 4744-4753.

Tangnu, S.K., Blanch, H.W., Wilke, C.R. 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1837-1849.

Tappi Test Methods. 2006. Tappi T205 SP-02, Tappi T218 SP-02.

Teymouri, F., Laureano-Pérez, L., Alizadeh, H., Dale, B.E. 2005. Optimization of the ammonia fiber explosion AFEX treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 96, 2014-2018.

Thygesen, A., Thomsen, A.B., Schmidt, A.S., Jorgensen, H., Ahring, B.K., Olsson, L. 2003. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 606-615.

Tian, S., Luo, X.L., Yang, X.S., Zhu, J.Y. 2010. Robust cellulosic ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine using an adapted strain *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification. *Bioresource Technology*, 101, 8678-8685.

Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Oliva, J.M., Olsson, L. 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 1211-1220.

Tomás-Pejó, E., García-Aparicio, M.P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Ballesteros, M. 2009a. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*, 100, 890-895.

Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M. 2008a. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, 874-884.

Tomás-Pejó, E., Oliva J.M., Ballesteros M., Olsson, L. 2008b. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 1122-1131.

Tomás-Pejó, E., Oliva J.M., González, A., Ballesteros, I., Ballesteros, M. 2009b. Bioethanol production from wheat straw by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel*, 88, 2142-2147.

Tu, M., Chandra, R.P., Saddler, J.N. 2007. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. *Biotechnology Progress*, 23, 1130-1137.

Väljamaä, P. 2002. The kinetics of cellulose enzymatic hydrolysis. Implications of synergism between enzymes. Thesis Dissertation. Faculty of Science and Technology, Uppsala university, Sweden.

- Van Zyl, W.H., Lynd, L.R., Den Haan, R., McBride, J.E. 2007. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 205-235.
- Várnai, A., Siika-Aho, M., Viikari, L. 2010. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 185-193.
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., Siika-Aho, M. 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 121-145.
- Vries, R.P., Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 497-522.
- Wang, Z., Chen, M., Xu, Y., Li, S., Lu, W., Ping, S., Zhang, W., Lin, M. 2008. An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis* *pdc* and *adhB* genes for enhanced ethanol production from xylose. *Biotechnology Letters*, 30, 657-663.
- Warzywoda, M., Larbre, E., Pourquié, J. 1992. Production and characterization of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* grown on various carbon sources. *Bioresource Technology*, 39, 125-130.
- Wayman, M., Chen, S. 1992. Cellulase production by *Trichoderma reesei* using whole wheat flour as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 825-831.
- Wilson, D.B. 2009. Cellulase and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 295-299.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G. 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 19, 1109-1117.
- World Energy Council. 2011. <http://www.worldenergy.org/publications>.
- Wyman, C. E. 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor & Francis, Washington. 417 pp.
- Wyman, C.E. 2001. Twenty years of trials, tribulations and research progress in bioethanol technology: Selected keys events along the way. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 5-21.
- Xiao, Z., Zhang, X., Greff, D.J., Saddler, J.N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116, 1115-1126.
- Xiong, H., Turunen, O., Pastinen, O., Leisola, M., Weymarn, N. 2004. Improved xylanase production by *Trichoderma reesei*; grown on l-arabinose and lactose or d-glucose mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 353-358.
- Yang, B., Wyman, C.E. 2006. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 611-617.

Yang, B., Wyman, C.E. 2008. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2, 26-40.

Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, 452-481.

Zhang, H.Y., Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 797-779.

Zhang, Y., Xu, J.L., Xu, H.J., Yuan, Z.H., Guo, Y. 2010. Cellulase deactivation based kinetic modelling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresource Technology*, 101, 8261-8266.

Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 815-827.

Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzaple, M.T. 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 99, 3817-3828.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Romling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39, 1452-1463.

ANEXOS

Artículo I. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. 2010. Bioresource Technology, 101:4851-4861.

Artículo II. Cellulase production using different streams of wheat grain- and wheat straw-based ethanol processes. 2010. Journal of Industrial Microbial and Technology. DOI 10.1007/s10295-010-0811-9.

Artículo III. Application of a microassay method to study enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. 2010. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 85:1291-1297.

Artículo IV. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. 2011. Bioresource Technology, 102:4552-4558.

Artículo V. Strategies of xylanase supplementation for an efficient saccharification and co-fermentation process from pretreated wheat straw. 2011. Biotechnology progress. DOI 10.1002/btpr.623.



Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review

P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro *

CIEMAT, Renewable Energy Division, Biomass Unit, Avda. Complutense 22, Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2009

Received in revised form 24 November 2009

Accepted 25 November 2009

Available online 29 December 2009

Keywords:

Pretreatment

Bioethanol

Enzymatic hydrolysis

ABSTRACT

Biofuel produced from lignocellulosic materials, so-called second generation bioethanol shows energetic, economic and environmental advantages in comparison to bioethanol from starch or sugar. However, physical and chemical barriers caused by the close association of the main components of lignocellulosic biomass, hinder the hydrolysis of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars. The main goal of pretreatment is to increase the enzyme accessibility improving digestibility of cellulose. Each pretreatment has a specific effect on the cellulose, hemicellulose and lignin fraction thus, different pretreatment methods and conditions should be chosen according to the process configuration selected for the subsequent hydrolysis and fermentation steps. This paper reviews the most interesting technologies for ethanol production from lignocellulose and it points out several key properties that should be targeted for low-cost and advanced pretreatment processes.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing problem of the CO₂ emissions besides some energy security concerns has strengthened the interest in alternative, nonpetroleum-based sources of energy. Biomass is the only suitable and renewable primary energy resource than can provide alternative transportation fuels such as bioethanol or biodiesel in the short-term (Hamelinck et al., 2005; Sun and Cheng, 2002).

Current production of bioethanol relies on ethanol from starch and sugars but there has been considerable debate about its sustainability. In this context, bioethanol produced from lignocellulosic biomass is an interesting alternative since lignocellulosic raw materials do not compete with food crops and they are also less expensive than conventional agricultural feedstocks.

Lignocellulose is the most abundant renewable biomass; its annual production has been estimated in 1×10^{10} MT worldwide (Sánchez and Cardona, 2008). The biological conversion of different lignocellulosic feedstocks such as forest and agricultural residues, or lignocellulosic crops dedicated to ethanol offers numerous benefits but its development is still hampered by economic and technical obstacles (Sánchez and Cardona, 2008). In this context, some of the most important factors to reduce ethanol production cost are: an efficient utilization of the raw material to obtain high ethanol yields, high productivity, high ethanol concentration in the distillation feed, and also process integration in order to reduce

the energy demand (Galbe and Zacchi, 2007; Tomás-Pejó et al., 2008).

Ethanol production from lignocellulosic biomass comprises the following main steps: hydrolysis of cellulose and hemicellulose, sugar fermentation, separation of lignin residue and, finally, recovery and purifying the ethanol to meet fuel specifications. The task of hydrolyzing lignocellulose to fermentable monosaccharides is still technically problematic because the digestibility of cellulose is hindered by many physico-chemical, structural and compositional factors. Owing to these structural characteristics, pretreatment is an essential step for obtaining potentially fermentable sugars in the hydrolysis step. The aim of the pretreatment is to break down the lignin structure and disrupt the crystalline structure of cellulose for enhancing enzymes accessibility to the cellulose during hydrolysis step (Mosier et al., 2005b).

Current pretreatment research is focused on identifying, evaluating, developing and demonstrating promising approaches that primarily support the subsequent enzymatic hydrolysis of the treated biomass with lower enzyme dosages and shorter bioconversion times. A large number of pretreatment approaches have been investigated on a wide variety of feedstocks types and there are several recent review articles which provide a general overview of the field (Carvalho et al., 2008; Hendriks and Zeeman, 2009; Taherzadeh and Karimi, 2008; Yang and Wyman, 2008).

Besides being considered a crucial step in the biological conversion to ethanol, biomass pretreatment represents one of the main economic costs in the process. In fact, it has been described as the second most expensive unit cost in the conversion of lignocellulose

* Corresponding author.

E-mail address: mariajose.negro@ciemat.es (M.J. Negro).

to ethanol based on enzymatic hydrolysis preceded by feedstocks cost (Mosier et al., 2005b).

Since different lignocellulosic materials have different physico-chemical characteristics, it is necessary to adopt suitable pretreatments technologies based on the lignocellulosic biomass properties of each raw material. Furthermore, the choice of certain pretreatment has a large impact on all subsequent steps in the overall conversion scheme in terms of cellulose digestibility, generation of toxic compounds potentially inhibitory for yeast, stirring power requirements, energy demand in the downstream process and wastewater treatment demands (Galbe and Zacchi, 2007). Other studies describe several parameters (pentose recovery, chip size required, concentration of toxic compounds formed during pretreatment and low energy demand) as deciding factors in an effective pretreatment (Sun and Cheng, 2002).

The purpose of this work is to review the most interesting pretreatment technologies and recent advances for ethanol production from lignocellulose as well as to analyse the interrelated factors between pretreatment, hydrolysis and fermentation.

2. Key factors for an effective pretreatment of lignocellulosic biomass

There are several key properties to take into consideration for low-cost and advanced pretreatment process (Yang and Wyman, 2008):

- *High yields for multiple crops, sites ages, harvesting times.*
Various pretreatments have been shown to be better suited for specific feedstocks. For example, alkaline-based pretreatment methods such as lime, ammonia fiber explosion (AFEX), and ammonia recycling percolation (ARP), can effectively reduce the lignin content of agricultural residues but are less satisfactory for processing recalcitrant substrate as softwoods (Chandra et al., 2007). Acid based pretreatment processes have been shown to be effective on a wide range of lignocellulose substrate, but are relatively expensive (Mosier et al., 2005b).
- *Highly digestible pretreated solid.*
Cellulose from pretreatment should be highly digestible with yields higher than 90% in less than five and preferably less than 3 days with enzyme loading lower than 10 FPU/g cellulose (Yang and Wyman, 2008).
- *No significant sugars degradation.*
High yields close to 100% of fermentable cellulosic and hemicellulosic sugars should be achieved through pretreatment step.
- *Minimum amount of toxic compounds.*
The liquid hydrolyzate from pretreatment must be fermentable following a low-cost, high yield conditioning step. Harsh conditions during pretreatment lead to a partial hemicellulose degradation and generation of toxic compounds derived from sugar decomposition that could affect the proceeding hydrolysis and fermentation steps (Oliva et al., 2003). Toxic compounds generated and their amounts depend on raw material and harshness of pretreatment. Degradation products from pretreatment of lignocellulose materials can be divided into the following classes: carboxylic acids, furan derivatives, and phenolic compounds. Main furan derivatives are furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) derived from pentoses and hexoses degradation, respectively; (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Weak acids are mostly acetic and formic and levulinic acids. Phenolic compounds include alcohols, aldehydes, ketones and acids (Klinke et al., 2002).
- *Biomass size reduction not required.*
Milling or grinding the raw material to small particle sizes before pretreatment are energy-intensive and costly technologies.

- *Operation in reasonable size and moderate cost reactors.*
Pretreatment reactors should be low in cost through minimizing their volume, employing appropriate materials of construction for highly corrosive chemical environments, and keeping operating pressures reasonable.
- *Non-production of solid-waste residues.*
The chemicals formed during hydrolyzate conditioning in preparation for subsequent steps should not present processing or disposal challenges.
- *Effectiveness at low moisture content.*
The use of raw materials at high dry matter content would reduce energy consumption during pretreatment.
- *Obtaining high sugar concentration.*
The concentration of sugars from the coupled operation of pretreatment and enzymatic hydrolysis should be above 10% to ensure an adequate ethanol concentration and to keep recovery and other downstream cost manageable.
- *Fermentation compatibility.*
The distribution of sugar recovery between pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis should be compatible with the choice of an organism able to ferment pentoses (arabinose and xylose) in hemicellulose.
- *Lignin recovery.*
Lignin and other constituents should be recovered to simplify downstream processing and for conversion into valuable co-products (Yang and Wyman, 2008)
- *Minimum heat and power requirements.*
Heat and power demands for pretreatment should be low and/or compatible with the thermally integrated process.

3. Factors limiting enzymatic hydrolysis

The pretreatment is a necessary step to alter some structural characteristics of lignocellulose, increasing glucan and xylan accessibility to the enzymatic attack. As it has been mentioned, these structural modifications of the lignocellulose are highly dependent on the type of pretreatment employed and have a great effect on the enzymatic hydrolysis (Kumar et al., 2009b) and subsequent steps. The choice of pretreatment technology for a particular raw material depends on several factors, some of them directly related to the enzymatic hydrolysis step such as sugar-release patterns and enzymes employed. Thus, the combination of the composition of the substrate, type of pretreatment, and dosage and efficiency of the enzymes used for the hydrolysis have a great influence on biomass digestibility; although the individual impacts of these factors on the enzymatic hydrolysis are still unclear.

Main factors that influence the enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic feedstocks can be divided in two groups: enzyme-related and substrate-related factors, though many of them are interrelated during the hydrolysis process. Composition of the liquid fraction and solid process streams resulting from different pretreatment approaches can be widely different. These differences will have a great influence on the requirements for effective enzymatic saccharification in subsequent processing steps.

The reduction of pretreatment severity is sometimes required to reduce economic cost. Low severity factor results in less sugar-release and consequently higher amount and different types of enzymes will be required to achieve high sugar yields from both cellulose and hemicellulose fraction. In this context, development of hemicellulases and other accessory enzymes needed for complete degradation of lignocellulose components has become an important issue. Recent studies show the importance of new balanced enzymatic complexes containing optimal combinations to effectively modify the complex structure of lignocellulosic materials (García-Aparicio et al., 2007; Merino and Cherry, 2007).

Substrate-related factors limiting enzymatic hydrolysis are directly connected to the pretreatment employed. These factors are described separately although their effect is normally interrelated.

3.1. Cellulose cristallinity (*cristallinity index, CrI*)

Degree of polymerization and cellulose cristallinity have been considered as important factors in determining the hydrolysis rates of relatively refined cellulosic substrates (Chang and Holtzaple, 2000), but data from several independent investigations indicate that these parameters alone do not explain the recalcitrance of lignocellulosic substrates (Puri, 1984). In fact, cellulases complexes capable of hydrolyzing crystalline cellulose have been identified (Mansfield et al., 1999). In some studies wherein cristallinity was suggested to be important, the lignocellulosic materials were mechanically pretreated, therefore any decrease in cristallinity was accompanied by an alteration of other substrate characteristics such as particle size reduction or increase in available surface area.

It has been observed that pretreatment of lignocellulosics improves its hydrolysability but in some cases increases the CrI of the cellulose fraction. This fact has been suggested to be due to the removal or reduction of more easily available amorphous cellulose after pretreatments such steam explosion (Mansfield et al., 1999). In contrast, high pH pretreatments have been shown to have less effect and even reduced biomass cristallinity in some instances (Kumar et al., 2009b).

3.2. Cellulose degree of polymerization (*DP, number of glycosyl residues per cellulose chain*)

Degree of polymerization is essentially related to other substrate characteristics, such as cristallinity. Although the role of glucan chain length is not definitively known, it is believed to affect cellulose hydrolysis (Puri, 1984). Depolymerization depends on the nature of cellulosic substrate. In the enzymatic hydrolysis, endoglucanases cut at internal sites of the cellulose chains, preferentially less ordered, being primarily responsible for decreasing degree of polymerization of cellulosic substrates. However, regardless the substrate being attacked there seems to be a “leveling off” of the cellulose DP, correlated with the increased recalcitrance of the residual crystalline cellulose (Mansfield et al., 1999).

The effect of different pretreatments on cellulose chain length has been studied showing reduced degree of polymerization in solids prepared by different pretreatments suggesting that xylan removal had a more severe impact on cellulose chain length than lignin removal (Kumar et al., 2009b).

3.3. Substrates available surface area (*pore volume*)

Accessibility of the substrate to the cellulolytic enzymes is one of the major factors influencing hydrolysis process. Thus, one of the main objectives of the pretreatment is to increase the available surface area for the enzymatic attack.

3.4. Lignin barrier (*content and distribution*)

The presence of lignin and hemicellulose difficults the access of cellulase enzymes to cellulose difficult (Mansfield et al., 1999), thus reducing the efficiency of the hydrolysis.

Lignin limits the rate of enzymatic hydrolysis by acting as a physical barrier, preventing the digestible parts of the substrate to be hydrolyzed (Chang and Holtzaple, 2000). Besides, lignin appears to reduce cellulose hydrolysis by non-productively binding cellulolytic enzymes (Esteghlalian et al., 2001). Different strategies have been studied recently to overcome the non-productive

adsorption of cellulase to lignin such as alkali extraction and addition of protein (e.g. BSA) or other additives (e.g. poly ethylene glycol, Tween) (Börjesson et al., 2007; Pan et al., 2005). Although the use of additives introduces an additional cost to the ethanol production process, significant benefits could be achieved by improving the enzymatic hydrolysis step.

Irregular binding of enzymes onto lignin is also influenced by the nature of the substrate (Esteghlalian et al., 2001). While various cellulases differ in their inhibition by lignin, the xylanases and glucosidases are less affected (Berlin et al., 2006).

Some pretreatments have been reported to produce different effects such as melting and lignin relocation (steam explosion) or disruption of lignin-carbohydrates linkages (AFEX) (Laureano-Pérez et al., 2005). Lignin chemistry is actually one of main research areas nowadays. It has a great impact on the enzymatic hydrolysis but also, as one of the main components in lignocellulosic materials, different further applications of lignin are under investigation to obtain potential higher value products in a developed biorrefinery process. The effects of different pretreatments on lignin are further detailed.

3.5. Hemicellulose content

Removal of hemicellulose increases the mean pore size of the substrate and therefore increases the accessibility and the probability of the cellulose to become hydrolyzed (Chandra et al., 2007). On the other hand, hemicellulosic sugars recovery in the pretreated solids would be interesting to obtain higher total fermentable sugar production. In this case enzymatic requirements for hemicellulosic modification must be taken into account (Kumar and Wyman, 2009a). Degree of acetylation in the hemicellulose is another important factor because lignin and acetyl groups are attached to the hemicellulose matrix and may hinder polysaccharide breakdown (Chang and Holtzaple, 2000).

3.6. Feedstock particle size

There is some evidence to support that reduction of particle size increases specific surface area and subsequently the accessibility of cellulose to the enzymes (Sun and Cheng, 2002).

3.7. Porosity

Previous studies have concluded that the pore size of the substrate in relation to the size of the enzymes is the main limiting factor in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass (Chandra et al., 2007). Cellulases can get trapped in the pores if the internal area is much larger than the external area which is the case for many lignocellulosic materials (Zhang and Lynd, 2004). An increase of porosity in pretreatment processes can significantly improve the hydrolysis.

3.8. Cell wall thickness (*coarseness*)

The waxy barrier comprising grass cuticle and tree bark impedes penetration of enzymes; even milled, plant stems and woody tissues limit liquid penetration by their nature.

3.9. Change in accessibility with conversion

The role of glucan accessibility and its change with conversion has been debatable, with a few studies showing that glucan accessibility becomes limiting with conversion (Wang et al., 2006) and a few others showing not significant decrease of accessibility with conversion or even no change at all (Kumar and Wyman, 2009b).

4. Pretreatment technologies for lignocellulosic biomass

Universal pretreatment process is difficult to envision owing to the diverse nature of different biomass feedstocks. A multitude of different pretreatment technologies have been suggested during the last decades. They can be classified into biological, physical, chemical and physico-chemical pretreatments, according to the different forces or energy consumed in the pretreatment process. Combination of these methods has been also studied.

4.1. Biological pretreatments

Fungal pretreatment has been previously explored to upgrade lignocellulosic materials for feed and paper applications. Recently, this environmentally friendly approach has received renewed attention as a pretreatment method for enhancing enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass in ethanol production processes. Biological pretreatments employ microorganisms mainly brown, white and soft-rot fungi which degrade lignin and hemicellulose and very little of cellulose, more resistant than the other components (Sánchez, 2009). Lignin degradation by white-rot fungi, the most effective for biological pretreatment of lignocellulosic materials, occurs through the action of lignin-degrading enzymes such as peroxidases and laccases (Kumar et al., 2009a).

Several white-rot fungi such as *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Pleurotus ostreatus* have been examined on different lignocellulosic biomass showing high delignification efficiency (Kumar et al., 2009a; Shi et al., 2008). Biological pretreatment by white-rot fungi has been combined with organosolv pretreatment in an ethanol production process by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from beech wood chips (Itoh et al., 2003). Results from other recent studies have shown that fungal pretreatment of wheat straw for 10 days with a high lignin-degrading and low cellulose-degrading fungus (fungal isolate RCK-1) resulted in a reduction in acid loading for hydrolysis, an increase in the release of fermentable sugars and a reduction in the concentration of fermentation inhibitors. Ethanol yield and volumetric productivity with *Pichia stipitis* were 0.48 g/g and 0.54 g/L h, respectively (Kuhar et al., 2008). An evaluation of biological pretreatment of sugarcane trash using eight different bacteria and fungi was performed on the basis of quantitative changes in the components of the sugarcane trash, the production of the cellulase enzyme complex, total protein and the release of reducing sugars by different bioagents as well as the interaction among different chemical parameters affecting the pretreatment (Singh et al., 2008). In this case, the microbial pretreatment of trash increased accessibility of sugars for enzymatic hydrolysis.

In general, such processes offer advantages such as low-capital cost, low energy, no chemicals requirement, and mild environmental conditions. However, the main drawback to develop biological methods is the low hydrolysis rate obtained in most biological materials compared to other technologies (Sun and Cheng, 2002).

To move forward a cost-competitive biological pretreatment of lignocellulose, and improve the hydrolysis to eventually improve ethanol yields, there is a need to keep on studying and testing more basidiomycetes fungi for their ability to delignify the plant material quickly and efficiently.

4.2. Physical pretreatments

4.2.1. Mechanical comminution

The objective of the mechanical pretreatment is a reduction of particle size and crystallinity of lignocellulosic in order to increase the specific surface and reduce the degree of polymerization. This

can be produced by a combination of chipping, grinding or milling depending on the final particle size of the material (10–30 mm after chipping and 0.2–2 mm after milling or grinding) (Sun and Cheng, 2002). Different milling processes (ball milling, two-roll milling, hammer milling, colloid milling and vibro energy milling) can be used to improve the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials (Taherzadeh and Karimi, 2008). The power requirement of this pretreatment is relatively high depending on the final particle size and the biomass characteristics. Taking into account the high energy requirements of milling and the continuous rise of energy prices, it is likely that this process is not economically feasible (Hendriks and Zeeman, 2009).

4.2.2. Extrusion

Extrusion process is a novel and promising physical pretreatment method for biomass conversion to ethanol production. In extrusion, the materials are subjected to heating, mixing and shearing, resulting in physical and chemical modifications during the passage through the extruder. Screw speed and barrel temperature are believed to disrupt the lignocellulose structure causing defibrillation, fibrillation and shortening of the fibers, and, in the end, increasing accessibility of carbohydrates to enzymatic attack (Karunanithy et al., 2008). The different bioreactor parameters must be taken into account to achieve the highest efficiency in the process. In recent studies application of enzymes during extrusion process is being considered as a promising technology for ethanol production.

4.3. Chemical pretreatments

4.3.1. Alkali pretreatments

The effect that some bases have on lignocellulosic biomass is the basis of alkaline pretreatments, which are effective depending on the lignin content of the biomass. Alkali pretreatments increase cellulose digestibility and they are more effective for lignin solubilization, exhibiting minor cellulose and hemicellulose solubilization than acid or hydrothermal processes (Carvalho et al., 2008).

Alkali pretreatment can be performed at room temperature and times ranging from seconds to days. It is described to cause less sugar degradation than acid pretreatment and it was shown to be more effective on agricultural residues than on wood materials (Kumar et al., 2009a). Nevertheless, possible loss of fermentable sugars and production of inhibitory compounds must be taken into consideration to optimize the pretreatment conditions.

Sodium, potassium, calcium and ammonium hydroxides are suitable alkaline pretreatments. NaOH causes swelling, increasing the internal surface of cellulose and decreasing the degree of polymerization and crystallinity, which provokes lignin structure disruption (Taherzadeh and Karimi, 2008). NaOH has been reported to increase hardwood digestibility from 14% to 55% by reducing lignin content from 24–55% to 20% (Kumar et al., 2009a).

Ca(OH)₂, also known as lime, has been widely studied. Lime pretreatment removes amorphous substances such as lignin, which increases the crystallinity index. Lignin removal increases enzyme effectiveness by reducing non-productive adsorption sites for enzymes and by increasing cellulose accessibility (Kim and Holtzapfle, 2006). Lime also removes acetyl groups from hemicellulose reducing steric hindrance of enzymes and enhancing cellulose digestibility (Mosier et al., 2005b). Lime has been proven successfully at temperatures from 85–150 °C and for 3–13 h with corn stover (Kim and Holtzapfle, 2006) or poplar wood (Chang et al., 2001). Pretreatment with lime has lower cost and less safety requirements compared to NaOH or KOH pretreatments and can be easily recovered from hydrolysate by reaction with CO₂ (Mosier et al., 2005b).

Addition of an oxidant agent (oxygen/H₂O₂) to alkaline pretreatment (NaOH/Ca(OH)₂) can improve the performance by favouring lignin removal (Carvalho et al., 2008). Ethanol yields of 0.33 g/g have been obtained in simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF) processes with *Escherichia coli* FBR5 from wheat straw pretreated with alkali peroxide (Saha and Cotta, 2006). Furthermore, no furfural or HMF were detected in hydrolysates obtained with alkaline peroxide pretreatment which favours the fermentation step in an ethanol production process (Taherzadeh and Karimi, 2008).

4.3.2. Acid pretreatment

The main objective of the acid pretreatments is to solubilize the hemicellulosic fraction of the biomass and to make the cellulose more accessible to enzymes. This type of pretreatments can be performed with concentrated or diluted acid but utilization of concentrated acid is less attractive for ethanol production due to the formation of inhibiting compounds. Furthermore, equipment corrosion problems and acid recovery are important drawbacks when using concentrated acid pretreatments. The high operational and maintenance costs reduce the interest of applying the concentrated acid pretreatment at commercial scale (Wyman, 1996).

Diluted acid pretreatment appears as more favourable method for industrial applications and have been studied for pretreating wide range of lignocellulosic biomass. Different types of reactors such as percolation, plug flow, shrinking-bed, batch and counter-current reactors have been applied for pretreatment of lignocellulosic materials (Taherzadeh and Karimi, 2008). It can be performed at high temperature (e.g. 180 °C) during a short period of time; or at lower temperature (e.g. 120 °C) for longer retention time (30–90 min). It presents the advantage of solubilizing hemicellulose, mainly xylan, but also converting solubilized hemicellulose to fermentable sugars. Nevertheless, depending on the process temperature, some sugar degradation compounds such as furfural and HMF and aromatic lignin degradation compounds are detected, and affect the microorganism metabolism in the fermentation step (Saha et al., 2005). Anyhow, this pretreatment generates lower degradation products than concentrated acid pretreatments.

High hydrolysis yields have been reported when pretreating lignocellulosic materials with diluted H₂SO₄ which is the most studied acid. Hydrochloric acid, phosphoric acid and nitric acid have also been tested (Mosier et al., 2005a). Saccharification yield as high as 74% was shown when wheat straw was subjected to 0.75% v/v of H₂SO₄ at 121 °C for 1 h (Saha et al., 2005). Olive tree biomass was pretreated with 1.4% H₂SO₄ at 210 °C resulting in 76.5% of hydrolysis yields (Cara et al., 2008). Recently, ethanol yield as high as 0.47 g/g glucose was achieved in fermentation tests with cashew apple bagasse pretreated with diluted H₂SO₄ at 121 °C for 15 min (Rocha et al., 2009).

Organic acids such as fumaric or maleic acids are appearing as alternatives to enhance cellulose hydrolysis for ethanol production. In this context, both acids were compared with sulfuric acid in terms of hydrolysis yields from wheat straw and formation of sugar degradation compounds during pretreatment. Results showed that organic acids can pretreat wheat straw with high efficiency although fumaric acid was less effective than maleic acid. Furthermore, less amount of furfural was formed in the maleic and fumaric acid pretreatments than with sulfuric acid (Kootstra et al., 2009).

4.3.3. Ozonolysis

Ozone is a powerful oxidant that shows high delignification efficiency (Sun and Cheng, 2002). This lignin removal increases the yield in following enzymatic hydrolysis. The pretreatment is usually performed at room temperature and normal pressure and does not lead to the formation of inhibitory compounds that can affect

the subsequent hydrolysis and fermentation. Ozonolysis has been applied on several agricultural residues such as wheat straw and rye straw increasing in both cases the enzymatic hydrolysis yield after ozonolysis pretreatment (García-Cubero et al., 2009). Despite of some interesting results further research has to be performed regarding ethanol production from lignocellulosic materials pretreated with ozone. An important drawback to consider is the large amounts of ozone needed, which can make the process economically unviable (Sun and Cheng, 2002).

4.3.4. Organosolv

Organosolvation method is a promising pretreatment strategy, since it has demonstrated its potential for lignocellulosic materials (Papatheofanous et al., 1995). Numerous organic or aqueous solvent mixtures can be utilized, including methanol, ethanol, acetone, ethylene glycol and tetrahydrofurfuryl alcohol, in order to solubilize lignin and provide treated cellulose suitable for enzymatic hydrolysis (Zhao et al., 2009a). Comparing to other chemical pretreatments the main advantage of organosolv process is the recovery of relatively pure lignin as a by-product (Zhao et al., 2009a).

In some studies these mixtures are combined with acid catalysts (HCl, H₂SO₄, oxalic or salicylic) to break hemicellulose bonds. A high yield of xylose can usually be obtained with the addition of acid. However, this acid addition can be avoided for a satisfactory delignification by increasing process temperature (above 185 °C).

Organosolv process has been suggested to be combined with previous acid hydrolysis to separate hemicellulose and lignin in a two-stage fractionation. High lignin removal (70%) and minimum cellulose loss (less than 2%) are achieved (Papatheofanous et al., 1995).

Removal of solvents from the system is necessary using appropriate extraction and separation techniques, e.g., evaporation and condensation, and they should be recycled to reduce operational costs. Solvents need to be separated because they might be inhibitory to enzymatic hydrolysis and fermentative microorganisms (Sun and Cheng, 2002). The high commercial price of solvents is another important factor to consider for industrial applications. For economic reasons, among all possible solvents, the low-molecular weight alcohols with lower boiling points such as ethanol and methanol are favored.

4.3.5. Ionic liquids (ILs) pretreatment

The use of ILs as solvents for pretreatment of cellulosic biomass has recently received much attention. ILs are salts, typically composed of large organic cations and small inorganic anions, which exist as liquids at relatively low temperatures; often at room temperature. Their solvent properties can be varied by adjusting the anion and the alkyl constituents of the cation. These interesting properties include chemical and thermal stability, non-flammability, low vapour pressures and a tendency to remain liquid in a wide range of temperatures (Hayes, 2009). Since no toxic or explosive gases are formed, ILs are called “green” solvents. Carbohydrates and lignin can be simultaneously dissolved in ILs with anion activity (e.g. the 1-butyl-3-methylimidazolium cation [C₄mim]⁺) because ILs form hydrogen bonds between the non-hydrated chloride ions of the IL and the sugar hydroxyl protons in a 1:1 stoichiometry. As a result, the intricate network of non-covalent interactions among biomass polymers of cellulose, hemicellulose, and lignin is effectively disrupted while minimizing formation of degradation products. However, most data showing the effectiveness of ILs has been developed using pure crystalline cellulose, and its applicability to a more complex combination of constituents in lignocellulosic biomass requires further studies. Nevertheless, the use of ILs has also been already demonstrated on some lignocellulosic feedstocks such as straw (Li et al., 2009) or wood (Lee et al., 2009).

For the large-scale application of ILs, development of energy-efficient recycling methods for ILs is a prerequisite and should be investigated in detail. Toxicity to enzymes and fermentative microorganisms must be also studied before ILs can be considered a real option for biomass pretreatment (Yang and Wyman, 2008; Zhao et al., 2009b). Depending on the amount of ILs residues remaining, significant negative effect on cellulase activity may be observed. Thus, ILs residues removal would be required to prevent decrease of final sugars concentrations.

In a pretreatment study using 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate, the yield of reducing sugars from wheat straw pretreated with this ionic liquid at 130 °C for 30 min was 54.8% after being enzymatically hydrolyzed for 12 h (Li et al., 2009). The fermentability of the hydrolysates obtained after enzymatic saccharification of the regenerated wheat straw was also evaluated. Results obtained using *Saccharomyces cerevisiae* indicated that wheat straw pretreated by this IL did not bring any negative effect on the growth of *S. cerevisiae* (Li et al., 2009).

Further research is needed to improve the economics of ILs pretreatment before they can be applied at industrial scale. Technology is still expensive and commercial IL recovery methods have not been fully developed. In addition, techniques need to be developed to recover hemicellulose and lignin from solutions after extraction of cellulose (Hayes, 2009). Despite of these current limitations, advanced research e.g. as potential synthesis of ILs from carbohydrates, may play a role in reducing their cost. Development of ILs pretreatment offers a great potential for future lignocellulose biorefining processes.

4.4. Physico-chemical pretreatments

4.4.1. Steam explosion: SO₂-steam explosion

Steam explosion is the most widely employed physico-chemical pretreatment for lignocellulosic biomass. It is a hydrothermal pretreatment in which the biomass is subjected to pressurised steam for a period of time ranging from seconds to several minutes, and then suddenly depressurised. This pretreatment combines mechanical forces and chemical effects due to the hydrolysis (autohydrolysis) of acetyl groups present in hemicellulose. Autohydrolysis takes place when high temperatures promote the formation of acetic acid from acetyl groups; furthermore, water can also act as an acid at high temperatures. The mechanical effects are caused because the pressure is suddenly reduced and fibers are separated owing to the explosive decompression. In combination with the partial hemicellulose hydrolysis and solubilization, the lignin is redistributed and to some extent removed from the material (Pan et al., 2005). Removal of hemicelluloses exposes the cellulose surface and increases enzyme accessibility to the cellulose microfibrils.

The most important factors affecting the effectiveness of steam explosion are particle size, temperature, residence time and the combined effect of both temperature (T) and time (t), which is described by the severity factor (R_0) [$R_0 = t * e^{[T-100]/14.75}$] being the optimal conditions for maximum sugar yield a severity factor between 3.0 and 4.5 (Alfani et al., 2000). Higher temperatures result in an increased removal of hemicelluloses from the solid fraction and an enhanced cellulose digestibility, they also promote higher sugar degradation.

Steam explosion process offers several attractive features when compared to other pretreatment technologies. These include the potential for significantly lower environmental impact, lower capital investment, more potential for energy efficiency, less hazardous process chemicals and conditions and complete sugar recovery (Avellar and Glasser, 1998). Among the main advantages, it is worth to mention the possibility of using high chip size, unnecessary addition of acid catalyst (except for softwoods), high sugar

recovery, good hydrolysis yields in enzymatic hydrolysis and its feasibility at industrial scale development. It is remarkable the fact that energy use for obtaining small chips size before pretreatment can make up one third of the power requirements of the entire process (Hamelinck et al., 2005). Furthermore, although the possibility of avoiding acid catalysts has been previously stated as an advantage, the addition of an acid catalyst has been also described as a manner to increase cellulose digestibility, to improve hemicellulose hydrolysis and, depending on the temperature, to decrease the production of degradation compounds (Sun and Cheng, 2002). Since cost reduction and low energy consumption are required for an effective pretreatment, high particle sizes as well as non-acid addition would be desirable to optimize the effectiveness on the process (Hamelinck et al., 2005).

Although acid utilization in steam explosion has been introduced with some disadvantages, many pretreatment approaches (SO₂-explosion) have included external acid addition (H₂SO₄) to catalyze the solubilization of the hemicellulose, lower the optimal pretreatment temperature and give a partial hydrolysis of cellulose (Brownell et al., 1986; Tengborg et al., 1998). Notwithstanding, the main drawbacks when using acids are related to equipment requirements and higher formation of degradation compounds (Mosier et al., 2005b; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). In general, SO₂-catalyzed steam explosion is regarded as one of the most effective pretreatment method for softwood material (Tengborg et al., 1998).

Steam explosion technology has been proven for ethanol production from a wide range of raw materials as poplar (Oliva et al., 2003), olive residues (Cara et al., 2006), herbaceous residues as corn stover (Varga et al., 2004), and wheat straw (Ballesteros et al., 2006). It has successfully performed with hardwoods and agricultural residues or herbaceous biomass but it is not very effective for softwoods due to its low content of acetyl groups in the hemicellulosic portion (Sun and Cheng, 2002).

With the aim of maximizing sugar recoveries, some authors have suggested a two-step pretreatment (Tengborg et al., 1998). In the first step, pretreatment is performed at low temperature to solubilize the hemicellulosic fraction, and the cellulose fraction is subjected to a second pretreatment step at temperatures higher than 210 °C. It offers some additional advantages such as higher ethanol yields, better use of the raw material and lower enzyme dosages during enzymatic hydrolysis (Söderström et al., 2002). Nevertheless, an economic evaluation is needed to determine the effectiveness of an additional steam explosion (Galbe and Zacchi, 2007).

The main drawbacks of steam explosion pretreatment are the partially hemicellulose degradation and the generation of some toxic compounds that could affect the following hydrolysis and fermentation steps (Oliva et al., 2003). The toxic compounds generated and their amounts depend on the raw material and the harshness of the pretreatment. Hence, the necessity of using a robust strain in the subsequent fermentation step. The major inhibitors are furan derivatives, weak acids and phenolic compounds. The main furan derivatives are furfural and 5-hydroxymethyl furfural derived from pentoses and hexoses degradation, respectively. Both have been reported as inhibitors by prolongation of the lag phase during batch fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000).

Weak acids generated during steam explosion are mostly acetic acid, formed from the acetic groups present in the hemicellulosic fraction, and formic and levulinic acids derived from further degradation of furfural and HMF. Wide range of phenolic compounds are generated due to the lignin breakdown varying widely between different raw materials. Several detoxification methods have been studied in order to reduce the inhibitory effect caused by these compounds on enzymes and yeasts. However, owing to the

additional cost in the overall process, detoxification should be avoided if possible. Besides detoxification, several approaches such as genetic modification, evolutionary engineering or adaptative strategies are nowadays appearing as a promising alternatives to obtain more tolerant yeasts (Liu et al., 2005).

4.4.2. Liquid hot water

Liquid hot water is another hydrothermal treatment which does not require rapid decompression and does not employ any catalyst or chemicals. Pressure is applied to maintain water in the liquid state at elevated temperatures (160–240 °C) and provoke alterations in the structure of the lignocellulose.

The objective of the liquid hot water is to solubilize mainly the hemicellulose, to make the cellulose more accessible and to avoid the formation of inhibitors. The slurry generated after pretreatment can be filtered to obtain two fractions: one solid cellulose-enriched fraction and a liquid fraction rich in hemicellulose derived sugars. To avoid the formation of inhibitors, the pH should be kept between 4 and 7 during the pretreatment because at this pH hemicellulosic sugars are retained in oligomeric form and monomers formation is minimized. Therefore the formation of degradation products is also lower (Mosier et al., 2005a).

Liquid hot water has been shown to remove up to 80% of the hemicellulose and to enhance the enzymatic digestibility of pretreated material in herbaceous feedstocks, such as corn stover (Mosier et al., 2005a), sugarcane bagasse (Laser et al., 2002) and wheat straw (Pérez et al., 2008). Two-step pretreatment has been studied to optimize hemicellulosic sugars recovery and to enhance enzymatic hydrolysis yields. Lignin is partially depolymerized and solubilized as well during hot water pretreatment but complete delignification is not possible using hot water alone, because of the recondensation of soluble components originating from lignin.

Flow through systems have been reported to remove more hemicellulose and lignin than batch systems from some materials. Addition of external acid during the flow trough process has been also studied but it is discussed if hemicellulose and lignin removal is increased with the acid addition (Wyman et al., 2005a).

In general, liquid hot water pretreatments are attractive from a cost-savings potential: no catalyst requirement and low-cost reactor construction due to low-corrosion potential. It has also the major advantage that the solubilized hemicellulose and lignin products are present in lower concentration, due to higher water input, and subsequently concentration of degradation products is reduced. In comparison to steam explosion, higher pentosan recovery and lower formation of inhibitors are obtained, however, water demanding in the process and energetic requirement are higher and it is not developed at commercial scale.

4.4.3. Ammonia fiber explosion (AFEX)

In the AFEX process, biomass is treated with liquid anhydrous ammonia at temperatures between 60 and 100 °C and high pressure for a variable period of time. The pressure is then released, resulting in a rapid expansion of the ammonia gas that causes swelling and physical disruption of biomass fibers and partial decrystallization of cellulose. While some other pretreatments such as steam explosion produce a slurry that can be separated in a solid and a liquid fractions, AFEX produces only a pretreated solid material.

AFEX has been reported to decrease cellulose crystallinity and disrupt lignin-carbohydrates linkages (Laureano-Pérez et al., 2005). During the pretreatment only a small amount of the solid material is solubilized; little hemicellulose and lignin is removed (Wyman et al., 2005a). Deacetylation of hemicellulose is also observed. AFEX removes the least acetyl groups from certain lignocellulosic materials (Kumar et al., 2009b). Digestibility of biomass is increased after AFEX pretreatment (Galbe and Zacchi, 2007) and

therefore the enzymatic hydrolysis results in greater yields. Both cellulases and hemicellulases will be required in hydrolysis process due to the considerable remaining hemicellulose in the pretreated material.

Ammonia recovery and recycle is feasible despite of its high volatility (Teymouri et al., 2005) but the associated complexity and costs of ammonia recovery may be significant regarding commercial potential of the AFEX pretreatment (Eggeman and Elander 2005; Mosier et al., 2005b).

No formation of inhibitors for the downstream biological processes is one of the main advantages of the ammonia pretreatment, even though some phenolic fragments of lignin and other cell wall extractives may remain on the cellulosic surface.

The AFEX pretreatment is more effective on agricultural residues and herbaceous crops, with limited effectiveness demonstrated on woody biomass and other high lignin feedstocks (Wyman et al., 2005a). There have been reported recent strategies to optimize the conditions in the AFEX pretreatment in studies using different materials (Teymouri et al., 2005). At optimal conditions AFEX can achieve more than 90% conversion of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars for a broad variety of lignocellulosic materials. In fact, despite of little removal of lignin or hemicellulose in the AFEX process, enzymatic digestion at low enzyme loadings results very high comparing other pretreatment alternatives (Wyman et al., 2005b). This may suggest that ammonia affects lignin and possibly hemicellulose differently than other chemicals, reducing the ability of lignin to adsorb enzyme and/or to make its access to cellulose more difficult.

A reduction of ammonia requirements and concentration, and a decrease of enzyme loadings while maintaining high conversions of cellulose and hemicellulose can diminish the total cost of ethanol production using AFEX process. Recently, AFEX pretreatment has been successfully used in saccharification and cofermentation processes with recombinant *S. cerevisiae* strains obtaining high ethanol yields.

Furthermore, besides ethanol production, AFEX pretreatment has been showed as a feasible method for pretreating switchgrass for protein extraction (Bals et al., 2007). In this context, the integrated recovery of sugars and protein would be a feasible approach to a cellulosic biorefinery implying a reduction in the ethanol selling price.

Attending industrial requirements a larger and continuous version of AFEX process based on extrusion technology, known as FIBEX, has been developed and tested (Wyman et al., 2005a).

Another type of process utilizing ammonia is ammonia recycle percolation (ARP) in which aqueous ammonia (5–15 wt%) passes through a reactor packed with biomass. Temperature is normally fixed at 140–210 °C, reaction time up to 90 min and percolation rate about 5 mL/min (Sun and Cheng, 2002; Kim et al., 2008a). ARP can solubilize hemicellulose but cellulose remains intact. It leads to a short-chained cellulosic material with high glucan content (Yang and Wyman, 2008). An important challenge for ARP is to reduce liquid loading or process temperature to reduce energy cost. In this context Soaking Aqueous Ammonia (SAA) appears as an interesting alternative since it is performed at lower temperature (30–75 °C) being one of the few pretreatment methods where both glucan and xylan are retained in the solids. Due to that, it results in a pretreated material very interesting for being used with pentose fermenting microorganisms. Furthermore, high xylose recovery at lower temperatures is reflected in lower amount of inhibitory compounds released from sugar degradation. Recently, ethanol yields as high as 89.4% of the theoretical ethanol yield was shown from barley hull pretreated using SAA in a SSCF process using a recombinant *E. coli* KO11 (Kim et al., 2008b).

4.4.4. Wet oxidation

Wet oxidation is an oxidative pretreatment method which employs oxygen or air as catalyst. It allows reactor operation at relatively low temperatures and short reactor times (Palonen et al., 2004). The oxidation is performed for 10–15 min at temperatures from 170 to 200 °C and at pressures from 10 to 12 bar O₂ (Olsson et al., 2005). The addition of oxygen at temperatures above 170 °C makes the process exothermic reducing the total energy demand. The main reactions in wet oxidation are the formation of acids from hydrolytic processes and oxidative reactions.

It has been proven to be an efficient method for solubilization of hemicelluloses and lignin and to increase digestibility of cellulose, specially. It has been widely used for ethanol production followed by SSF (Martín et al., 2008).

Phenolic compounds are not end-products during wet oxidation because they are further degraded to carboxylic acids. However, furfural and HMF production is lower during wet oxidation when comparing to steam explosion or LHW methods. Na₂CO₃ addition has been shown to decrease formation of inhibitory compounds by maintaining pH in the neutral to alkaline range.

To pretreat wheat straw with Na₂CO₃, results in 96% recovery of the cellulose (65% converted to glucose) and 70% of hemicellulose yield (Klinke et al., 2002). High yields have been also obtained after wet oxidation pretreatment of corn stover and spruce (Palonen et al., 2004).

In general, low formation of inhibitors and efficient removal of lignin are achieved with wet oxidation pretreatment. On the other hand, cost of oxygen and catalyst are considered one of the main disadvantages for wet oxidation development technologies.

4.4.5. Microwave pretreatment

Microwave-based pretreatment can be considered a physico-chemical process since both thermal and non-thermal effects are often involved. Pretreatments were carried out by immersing the biomass in dilute chemical reagents and exposing the slurry to microwave radiation for residence times ranging from 5 to 20 min (Keshwani, 2009). Preliminary experiments identified alkalis as suitable chemical reagents for microwave-based pretreatment (Zhu et al., 2006). An evaluation of different alkalis identified sodium hydroxide as the most effective alkali reagent.

4.4.6. Ultrasound pretreatment

The effect of ultrasound on lignocellulosic biomass have been employed for extracting hemicelluloses, cellulose and lignin but less research has been addressed to study the susceptibility of lignocellulosic materials to hydrolysis (Sun and Tomkinson, 2002). In spite of the minor research on ultrasound pretreatment from lignocellulose, some researchers have also shown that saccharification of cellulose is enhanced efficiently by ultrasonic pretreatment (Yachmenev et al., 2009).

Higher enzymatic hydrolysis yields after ultrasound pretreatment could be explained because cavitation effects caused by introduction of ultrasound field into the enzyme processing solution greatly enhance the transport of enzyme macromolecules toward the substrate surface. Furthermore, mechanical impacts, produced by the collapse of cavitation bubbles, provide an important benefit of opening up the surface of solid substrates to the action of enzymes, in addition, the maximum effects of cavitation occur at 50 °C, which is the optimum temperature for many enzymes (Yachmenev et al., 2009).

4.4.7. CO₂ explosion

Carbon dioxide explosion is also used for lignocellulosic biomass pretreatment. The method is based on the utilization of CO₂ as a supercritical fluid, which refers to a fluid that is in a gaseous form but is compressed at temperatures above its critical point to a liquidlike density. Supercritical pretreatment conditions can effectively remove lignin increasing substrate digestibility. Addition of co-solvents such ethanol can improve delignification. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) has been mostly used as an extraction solvent but it is being considered for non-extractive purposes due to its many advantages (Schacht et al., 2008). In aqueous solution CO₂ forms carbonic acid, which favours the polymers hydrolysis. CO₂ molecules are comparable in size to water and ammonia and they can penetrate in the same way the small pores of lignocellulose. This mechanism is facilitated by high pressure. After the explosive release of CO₂ pressure, disruption of cellulose and hemicellulose structure is observed and consequently accessible surface area of the substrate to enzymatic attack increases.

Operation at low temperatures compared to other methods prevents monosaccharides degradation, but in comparison to steam

Table 1

Summary of the advantages and disadvantages with different methods for pretreating lignocellulosic biomass.

Pretreatment method	Advantages	Disadvantages
Biological	<ul style="list-style-type: none"> – Degrades lignin and hemicellulose – Low energy consumption 	<ul style="list-style-type: none"> – Low rate of hydrolysis
Milling	<ul style="list-style-type: none"> – Reduces cellulose crystallinity 	<ul style="list-style-type: none"> – High power and energy consumption
Steam explosion	<ul style="list-style-type: none"> – Causes lignin transformation and hemicellulose solubilization – Cost-effective – Higher yield of glucose and hemicellulose in the two-step method 	<ul style="list-style-type: none"> – Generation of toxic compounds – Partial hemicellulose degradation
AFEX	<ul style="list-style-type: none"> – Increases accessible surface area – Low formation of inhibitors 	<ul style="list-style-type: none"> – Not efficient for raw materials with high lignin content
CO ₂ explosion	<ul style="list-style-type: none"> – Increases accessible surface area – Cost-effective – Do not imply generation of toxic compounds 	<ul style="list-style-type: none"> – High cost of large amount of ammonia – Does not affect lignin and hemicelluloses – Very high pressure requirements
Wet oxidation	<ul style="list-style-type: none"> – Efficient removal of lignin – Low formation of inhibitors – Minimizes the energy demand (exothermic) 	<ul style="list-style-type: none"> – High cost of oxygen and alkaline catalyst
Ozonolysis	<ul style="list-style-type: none"> – Reduces lignin content – Does not imply generation of toxic compounds 	<ul style="list-style-type: none"> – High cost of large amount of ozone needed
Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> – Causes lignin and hemicellulose hydrolysis 	<ul style="list-style-type: none"> – High cost – Solvents need to be drained and recycled – High cost of acid and need to be recovered – Reactor corrosion problems – Formation of inhibitors
Concentrated acid	<ul style="list-style-type: none"> – High glucose yield – Ambient temperatures 	<ul style="list-style-type: none"> – Generation of degradation products
Diluted acid	<ul style="list-style-type: none"> – Less corrosion problems than concentrated acid – Less formation of inhibitors 	<ul style="list-style-type: none"> – Low sugar concentration in exit stream

Table 2
Effect of different pretreatment technologies on the structure of lignocellulose.

	Milling	Steam explosion	LHW	Acid	Alkaline	Oxidative	AFEX	ARP	Lime	CO ₂ explosion
Increases accessible surface area	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Cellulose decrystallization	H	–	n.d.	–	–	n.d.	H	H	n.d.	–
Hemicellulose solubilization	–	H	H	H	L	–	M	M	M	H
Lignin removal	–	M	L	M	M	M	H	H	H	–
Generation of toxic compounds	–	H	L	H	L	L	L	M	M	–
Lignin structure alteration	–	H	M	H	H	H	H	H	H	–

H: high effect; M: moderate effect; L: low effect; n.d. not determined.

Table 3
Capital cost of five pretreatment processes (raw material: corn stover) (Eggeman and Elander, 2005).

	Pretreatment direct fixed capital, \$MM	Pretreatment breakdown %reactor/ other	Total fixed capital, \$MM	Ethanol production, MM gal/year	Total fixed capital, \$/gal annual capacity
Diluted acid	25.0	64/36	208.6	56.1	3.72
Hot water	4.5	100/0	200.6	44.0	4.57
AFEX	25.7	26/74	211.5	56.8	3.72
ARP	28.3	25/75	210.9	46.3	4.56
Lime	22.3	19/18	163.6	48.9	3.35
Non pretreatment	0	–	200.3	9.0	22.26
Ideal pretreatment	0	–	162.5	64.7	2.51

and ammonia explosion sugar yields obtained are lower. Nevertheless a comparison of different pretreatment methods on several substrates showed that CO₂ explosion was more cost-effective than ammonia explosion and formation of inhibitors was lower compared to steam explosion (Zheng et al., 1998). In aspen and southern yellow pine supercritical CO₂ improves enzymatic hydrolysis (Kim and Hong, 2001).

Anyway, current efforts to develop these methods do not guarantee economic viability yet. A very high pressure requirements is specially a concerning issue. On the other hand, carbon dioxide utilization is an attractive alternative to reduce costs because of its co-production during ethanol fermentation. Other advantages are non toxicity, non-flammability and easy recovery after extraction.

5. Conclusions and perspectives

Different pretreatment methods for lignocellulosic materials have been described and widely studied to improve ethanol production processes. All these methods should make the lignocellulose accessible to enzymatic reactions, where crystallinity of cellulose, its accessible surface area, and lignin and hemicellulose disposal are the main substrate-related factors affecting the enzymatic hydrolysis. Table 1 shows the main advantages and disadvantages of the most promising pretreatment methods, while Table 2 summarizes the most significant effects of the different technologies on the structure of lignocellulose.

Among the different methods, chemical and thermochemical are currently the most effective and include the most promising technologies for industrial applications. Combination of different pretreatments have been also considered and might be interesting to obtain optimal fractionation of the different components and reach very high yields.

Although huge information about the effects of different pretreatments on biomass composition and sugar yields have been reported in literature, few references exist on the comparison of the pretreatment costs. A quantitative economic analysis of some pretreatment methods was given by Eggeman and Elander (2005).

This study was focused on identifying the process economic impact of the different pretreatment approaches related to capital and operating cost investment and glucose and xylose sugar yields. Table 3 shows the capital cost for each studied case. It could be concluded that low-cost pretreatment reactors are often counterbalanced by higher cost pretreatment catalyst recovery or higher costs for ethanol product recovery. These results serve as a guide but they should not be taken as a basis, because no differentiation for variation in the state of development of each technology was made.

To further decrease the cost of the pretreatment step in the biomass conversion to ethanol it is essential to minimize sugar losses, to increase solids concentration as high as possible and to keep low reactors and associated equipment costs. In order to increase sugar yields, efficient conversion and utilization of hemicellulosic sugars has become an important task and an opportunity to reduce ethanol production cost. In this context current efforts have been addressed to obtain new recombinant xylose-fermenting yeasts as well as specific enzymes for an effective hemicellulose deconstruction. Thus, an efficient integrated process should also include the pentose fraction since the yield of ethanol may be double.

From a basic research point of view, one approach which is receiving more attention is the study of the effects of pretreatment at a more fundamental level. Plant cell wall is very complex and research at cellular, ultrastructural and even molecular level could contribute to understand the diverse catalytic reactions acting on biomass as well as the consequences of thermal or chemical pretreatments. This knowledge should be applied to achieve an integrated and efficient biomass conversion process to ethanol.

References

- Alfani, A., Gallifuoco, F., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M., 2000. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25, 184–192.
- Avellar, B.K., Glasser, W.G., 1998. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass Bioenergy* 14, 205–218.
- Ballesteros, I., Negro, M., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130, 496–508.
- Bals, B., Teachworth, L., Dale, B., Balan, V., 2007. Extraction of proteins from switchgrass using aqueous ammonia within and integrated biorefinery. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 187–198.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J.N., 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* 125, 198–209.
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., Tjerneld, F., 2007. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 186–195.
- Brownell, H.H., Yu, E.K.C., Saddler, J.N., 1986. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 729–801.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M.J., Castro, E., 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochem.* 41, 423–429.
- Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J.M., Sáez, F., Castro, E., 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* 99, 1869–1876.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 849–864.

- Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N., 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 67–93.
- Chang, V.S., Holtzapfle, M., 2000. Fundamentals factors affecting biomass reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86, 5–37.
- Chang, V.S., Nagwani, M., Kim, C.H., Holtzapfle, M.T., 2001. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass: poplar wood and newspaper. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 94, 1–28.
- Egeman, T., Elander, R.T., 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 2019–2025.
- Esteghlalian, A.R., Sivistava, V., Gilkes, N., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2001. An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. In: Himmel, M.E., Baker, W., Saddler, J.N. (Eds.), *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. ACS, pp. 100–111.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 41–65.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 136–140, 353–365.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresour. Technol.* 100, 1608–1613.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy* 28, 384–410.
- Hayes, D.J., 2009. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catal. Today* 145, 138–151.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.
- Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, M., 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol.* 103, 273–280.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Julson, J.L., 2008. Influence of high shear reactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008. ASABE 084114. ASABE, St. Joseph, Mich.
- Keshwani, D.R., 2009. Microwave Pretreatment of Switchgrass for Bioethanol Production. Thesis Dissertation. North Carolina State University.
- Kim, S., Holtzapfle, M.T., 2006. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. *Bioresour. Technol.* 97, 778–785.
- Kim, K., Hong, J., 2001. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 77, 139–144.
- Kim, J.S., Kim, H., Lee, J.S., Lee, J.P., Park, S.C., 2008a. Pretreatment characteristics of waste oak wood by ammonia percolation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 148, 15–22.
- Kim, T.H., Taylor, F., Hicks, K.B., 2008b. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresour. Technol.* 99, 5694–5702.
- Klinke, H.B., Ahning, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 82, 15–26.
- Kootstra, A.M.J., Beertink, H.H., Scott, E.L., Sanders, J.P.M., 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochem. Eng. J.* 46, 126–131.
- Kuhar, S., Nair, L.M., Kuhar, R.C., 2008. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and eventual conversion to ethanol. *Can. J. Microbiol.* 54, 305–313.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009a. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog.* 25, 302–314.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009b. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? *Bioresour. Technol.* 100, 4193–4202.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009a. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009b. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 3948–3962.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J., Lynd, L.R., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for conversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* 81, 33–44.
- Laureano-Pérez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121, 1081–1099.
- Lee, S.H., Doherty, T.V., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2009. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1368–1376.
- Li, Q., He, Y.C., Xian, M., Jun, G., Xu, X., Yang, J.M., Li, L.Z., 2009. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. *Bioresour. Technol.* 100, 3570–3575.
- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Gorsich, S.W., 2005. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121–124, 451–460.
- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N., 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15, 804–816.
- Martín, C., Thomsen, M.H., Hauggaard, H., Thomsem, A.B., 2008. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. *Bioresour. Technol.* 99, 8777–8782.
- Merino, S.T., Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 95–120.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R., 2005a. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 1986–1993.
- Mosier, N., Wyman, C.E., Dale, B.D., Elander, R.T., Lee, Y.Y., Holtzapfle, M., Ladisch, C.M., 2005b. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.
- Oliva, J.M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 141–154.
- Olsson, L., Jörgensen, H., Krogh, K.B.R., Roca, C., 2005. Bioethanol production from lignocellulosic material. In: Dimitriu, S. (Ed.), *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. Marcel Dekker, New York, pp. 957–993.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33.
- Palonen, H., Thomsen, A.B., Tenkanen, M., Schmidt, A.S., Viikari, L., 2004. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117, 1–17.
- Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2005. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Appl. Biochem. Biotechnol. – Part A Enzyme Eng. Biotechnol.* 124, 1069–1079.
- Papathoanous, M.G., Billa, E., Koullas, D.P., Monties, B., Koukios, E.G., 1995. Two-stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. *Bioresour. Technol.* 54, 305–310.
- Pérez, J.A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M.J., Manzanares, P., 2008. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel* 87, 3640–3647.
- Puri, V.P., 1984. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1219–1222.
- Rocha, M.V., Rodrigues, T.H., de Macedo, G.R., Gonçalves, L.R., 2009. Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155, 407–417.
- Saha, B.C., Cotta, M.A., 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol. Prog.* 22, 449–453.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* 40, 3693–3700.
- Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 185–194.
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–5295.
- Schacht, C., Zetzl, C., Brunner, G., 2008. From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *J. Supercrit. Fluids* 46, 299–321.
- Shi, J., Chinn, M.S., Sharma-Shivappa, R.R., 2008. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour. Technol.* 99, 6556–6564.
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., Shrivastava, A.K., 2008. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 667–673.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G., 2002. Two-step steam pretreatment of softwood with SO₂ impregnation for ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98–100, 5–21.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- Sun, R.C., Tomkinson, R.C., 2002. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 50 (3), 263–271.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–1651.
- Tengborg, C., Stenberg, K., Galbe, M., Zacchi, G., Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 1998. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70–72, 3–15.
- Teymouri, F., Laureano-Pérez, L., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 2014–2018.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J. Sci. Ind. Res.* 67, 874–884.
- Varga, E., Reczey, K., Zacchi, G., 2004. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113–116, 509–523.
- Wang, L., Zhang, Y., Gao, P., Shi, D., Liu, H., Gao, H., 2006. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 443–456.
- Wyman, C.E., 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor Francis, Washington, p. 417.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapfle, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005a. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 1959–1966.

- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzappple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005b. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 2026–2032.
- Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T., Lambert, A., 2009. Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 3, 25–31.
- Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Bior.* 2, 26–40.
- Zhang, H.Y., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 779–797.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009a. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 815–827.
- Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N., 2009b. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139, 47–54.
- Zheng, Y., Lin, H.M., Tsao, G.T., 1998. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Prog.* 14, 890–896.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Ding, Y., Chi, R., Liao, J., Zhang, Y., 2006. Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosyst. Eng.* 93, 279–283.

Cellulase production using different streams of wheat grain- and wheat straw-based ethanol processes

Miklós Gyalai-Korpos · Réka Mangel ·
Pablo Alvira · Dóra Dienes · Mercedes Ballesteros ·
Kati Réczey

Received: 31 May 2010 / Accepted: 10 August 2010
© Society for Industrial Microbiology 2010

Abstract Pretreatment is a necessary step in the biomass-to-ethanol conversion process. The side stream of the pretreatment step is the liquid fraction, also referred to as the hydrolyzate, which arises after the separation of the pretreated solid and is composed of valuable carbohydrates along with compounds that are potentially toxic to microbes (mainly furfural, acetic acid, and formic acid). The aim of our study was to utilize the liquid fraction from steam-exploded wheat straw as a carbon source for cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. Results showed that without detoxification, the fungus failed to utilize any dilution of the hydrolyzate; however, after a two-step detoxification process, it was able to grow on a fourfold dilution of the treated liquid fraction. Supplementation of the fourfold-diluted, treated liquid fraction with washed pretreated wheat straw or ground wheat grain led to enhanced cellulase (filter paper) activity. Produced enzymes were tested in hydrolysis of washed pretreated wheat straw. Supplementation with ground wheat grain provided a more efficient enzyme mixture for the hydrolysis by means of the near-doubled β -glucosidase activity obtained.

Keywords *Trichoderma reesei* RUT C30 · Wheat straw · Steam pretreatment · Cellulase fermentation · Hydrolyzate

Introduction

Lignocellulosic materials, in the form of agricultural and forestry residues, are produced in abundant amounts worldwide. To utilize their carbohydrate content for ethanol fermentation, the feedstock needs to be pretreated and hydrolyzed by cellulase enzymes to liberate sugars. One of the drawbacks of the industrial-scale spread of the process is the high price of cellulase enzymes, which accounts for approximately 15% of the total ethanol production costs [21]. One possibility for reducing this cost is on-site enzyme production using the liquid stream of pretreatment as the carbon source.

Pretreatment is necessary to disrupt the resistant lignocellulose matrix consisting of cellulose, hemicellulose, and lignin. The main aim of the pretreatment is to make the cellulose surface accessible to cellulase enzymes during the subsequent hydrolysis [2]. However, because of the harsh conditions, some components are removed from the matrix and even degraded. In the case of steam explosion, partial hydrolysis and solubilization of the hemicellulose fraction occur [16], and therefore these substances remain in the liquid fraction after separation of the pretreated slurry. This liquid fraction, also referred to as the hydrolyzate, contains valuable sugars, mostly oligomeric forms of pentoses, along with degradation products that have possible inhibitory effects on the growth of microbes. This inhibitory property makes further utilization of the hydrolyzate difficult. The predominant degradation products present in the liquid fraction of steam explosion are hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural, derived from glucose and xylose,

This article is based on a presentation at the 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.

M. Gyalai-Korpos (✉) · R. Mangel · D. Dienes · K. Réczey
Department of Applied Biotechnology and Food Science,
Budapest University of Technology and Economics,
Szent Gellért tér 4, 1111 Budapest, Hungary
e-mail: miklos_gyalai-korpos@mkt.bme.hu

P. Alvira · M. Ballesteros
CIEMAT, Renewable Energies Division, Biofuels Unit,
Av. Complutense 22, 28040 Madrid, Spain

respectively [1]. Further breakdown of these inhibitors also occurs, leading to formic acid formation. Another aliphatic acid, acetic acid, originates from the acetyl groups on the xylan and mannan backbone of the hemicellulose. Besides these inhibitors, phenolic compounds derived from lignin degradation are also detected. Importantly, levels of these inhibitors depend on substrate composition and pretreatment conditions [31].

Although there are several options for utilizing the hydrolyzate from different raw materials and pretreatments, a preliminary detoxification is often required, regardless of the raw material and the type of pretreatment. The most investigated alternative involves producing ethanol from the sugar content of the liquid fraction using naturally occurring yeast strains (e.g., *Pichia stipitis*) or engineered bacteria or yeast strains (e.g., *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae*) that are able to convert both hexoses and pentoses to ethanol [29, 40]. Xylitol production by different yeast strains has also been examined by using xylose-rich acid hydrolyzates as substrates [32]. Hydrolyzate of hydrothermally treated wheat straw was also used for production of biogas [19] and biohydrogen [18]. The liquid fraction of steam-pretreated willow was investigated as carbon source for β -glucosidase production by different *Aspergillus* and *Penicillium* strains [33]. Some attempts were also made to employ this fraction for cultivating *Trichoderma reesei*. One option for utilizing this fraction is detoxification; *T. reesei* is able to consume some of the inhibitors in low concentrations under certain conditions [22, 30]. The second possibility is using it as carbon source for cellulase production [7, 12, 23, 33, 36].

The filamentous fungus *T. reesei* (anamorph of *Hypocrea jecorina*) is one of the most studied cellulase-producing organisms. Cellulase secretion in *Trichoderma* is an inducible phenomenon, but the mechanism of cellulose sensing is still unclear, mostly due to its water insolubility. Several small compounds, like sophorose [35] and sorbose [28], possess the capability to induce cellulase secretion, but an industrial application of these compounds, as carbon sources, is unfeasible because they are expensive to purchase. Lactose, another inducer, could be a preferable choice for industry because whey, a by-product of cheese processing, contains lactose. However, whey is not readily available on-site as it is not biomass related [10, 42]. The liquid fraction obtained from steam pretreatment contains both glucose and xylose oligomers which may induce cellulase secretion in *Trichoderma*; owing to its availability, this liquid fraction can be a good substrate for on-site enzyme production.

Although starch is usually not recognized as an inducer for cellulase production in *Trichoderma* species, an inductive effect was reported for starch-derived compounds in *T. reesei* RUT C30 [10, 43]. One possible explanation

for this finding is that during the acidic or enzymatic hydrolysis of starch, reversion products, such as sophorose, are also formed, and these products can act as inducers of cellulase transcription [10]. However, the same positive effect was observed in the case of utilizing native starch as partial carbon source supplemented with cellulosic materials [38, 43]. Using starchy materials like wheat grain for on-site enzyme production by *T. reesei* RUT C30 can be a good integration opportunity for the biomass-to-ethanol process in first-generation factories.

In our study, the potential utilization of the liquid fraction of steam-exploded wheat straw, a possible raw material for second-generation ethanol [39], was tested in shake flask cultures of *T. reesei* RUT C30. Additionally, the medium was supplemented with dried distiller's grain as nitrogen source and either with washed pretreated wheat straw or wheat grain as extra carbon source to examine their effect on specific activities. Produced fermentation broths were tested in enzymatic hydrolysis of washed pretreated wheat straw.

Materials and methods

Strain and raw materials

For enzyme production experiments, *T. reesei* RUT C30 (ATCC56765) strain obtained from the American Type Culture Collection was used. It was maintained at 30°C on malt agar slants composed of 20 g/l malt extract, 20 g/l agar, 5 g/l glucose, and 1 g/l peptone. Slants were subcultured biweekly.

The following materials were utilized as carbon sources for enzyme production alone or in combination: pretreated wheat straw separated into liquid and water-insoluble fractions, ground wheat grain with or without α -amylase treatment, wheat distiller's grain, and Solka Floc 200 FCC commercial cellulose product (International Fiber Corporation, North Tonawanda, NY, USA).

The wheat straw was harvested in 2008 in Soria, Spain. It was milled using a laboratory hammer mill to obtain a chip size of 10 mm, and it was stored at room temperature until use.

Mazurka-type wheat grain was harvested in the fall of 2009 in Somodorpuzta, Hungary. Dried grain was ground, and the following size distribution was obtained: 49.8% (related to total weight) was between 1.00 and 0.32 mm, while 82.2% was between 1.40 and 0.10 mm. For the α -amylase treatment, ground wheat grain was suspended in 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5.6) to make a 30% solution. Liquefaction was performed for 1 h at 85°C using Termamyl SC DC (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) at an enzyme dosage of 0.2 g/kg dry solid.

Table 1 Composition of wheat straw before and after steam pretreatment (210°C, 2.5 min)

	Glucan, %	Xylan, %	Lignin, %
Wheat straw	40.7 ± 2.7	27.6 ± 2.4	17.0 ± 0.8
Pretreated whole slurry	42.4 ± 1.3 ^a	18.6 ± 0.5 ^a	25.5 ± 2.2
WIS (washed solid)	57.5 ± 0.8	6.0 ± 0.1	30.1 ± 0.1

Data are presented as mean values of triplicates with standard deviations

^a Monomers, oligomers, and polymers are presented together as polymers

Before composition analyses occurred, all samples were ground into a fine powder.

Pretreatment

Steam explosion pretreatment was performed in a 10-l reactor at 210°C for 2.5 min using Masonite technology [24]. These conditions were established according to previous experiments based on optimal sugar recovery and hydrolysis yields [3]. Under these circumstances, most of the xylan content in the wheat straw was solubilized (Table 1). Following the pretreatment, a slurry with 31.0% total solid was recovered. One portion of the slurry was vacuum-filtered to separate water-insoluble solids and the liquid fraction. The solid fraction was thoroughly washed with tap water resulting in washed pretreated wheat straw (WIS), and both fractions were stored at -20°C until further use. The ratio of WIS and soluble solid content was 21.1 and 9.9%, respectively, related to the whole slurry. The obvious lack of xylan content in the slurry is due to some loss during the recovery process after pretreatment and to degradation into furfural, which was present in the liquid fraction.

Detoxification

The liquid fraction was vacuum-evaporated at 50°C for 10 min, during which the starting volume of 250 ml decreased by 60 ml. This loss was replaced by distilled water to obtain the initial volume again. The solution was then overlimed at 35°C by adding Ca(OH)₂ powder to pH 10 with continuous stirring. Once a pH of 10 was achieved, the solution was stirred for an additional 1 h. To remove any precipitate, the overlimed liquid was centrifuged (3,400g, 5 min); the supernatant was stored at 4°C until use.

Inoculum preparation

Conidia from 14-day-old slants were harvested with sterile distilled water. This suspension was used to inoculate

Erlenmeyer flasks containing 200 ml of sterile modified Mandels' medium to obtain a final concentration of 10⁸ conidia/ml. This medium contained 1.87 g/l (NH₄)₂SO₄, 2.67 g/l KH₂PO₄, 0.53 g/l CaCl₂·2H₂O, 0.81 g/l MgSO₄·7H₂O, 0.40 g/l urea, 5.0 mg/l FeSO₄·7H₂O, 1.7 mg/l MnSO₄·H₂O, 1.4 mg/l ZnSO₄·7H₂O, and 2.0 mg/l CoCl₂·6H₂O; it was supplemented with peptone to 1.00 g/l, yeast extract to 0.33 g/l, and Solka Floc as carbon source to 10 g/l. Inoculated flasks were closed with cotton plugs and incubated at 30°C and 300 rpm on a rotary shaker for 4 days.

Shake flask cultivation

The medium for cellulase production was composed of (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, and carbon sources at different concentrations. Concentrations of the two salts were equal and were based on the amount of the carbon source. When the carbohydrate content was 15 g/l or lower, 0.83 g/l of both salts were used; this amount was doubled (1.66 g/l) when the carbohydrate content was above 15 g/l. Each medium contained an additional 5 g/l wheat distiller's grain, which also included lignocellulosic carbohydrates (18.6% glucan and 14.6% xylan); although it was added to the medium as a nitrogen source, it contained 32.2% protein. To avoid pH changes 0.1 M TRIS and maleic acid were also added; it had been previously discovered that TRIS–maleic acid buffer can stabilize the pH during cultivation, and, under these conditions, some positive effects on cellulase production were also observed [17]. All of the substances were suspended either in tap water or in the liquid fraction of steam-pretreated wheat straw that had been undiluted or diluted with tap water (1:1 and 1:3). The pH was set to 5.8 with NaOH, resulting in a 0.1 M TRIS–maleic acid buffer system (pH 5.8).

Cellulase-producing media were inoculated with an aliquot of 4-day-old preculture at 10% (v/v), and cultures were propagated at 30°C and 300 rpm on a rotary shaker. Samples were withdrawn regularly and centrifuged (3,400g, 5 min) to separate supernatants for further analysis. Fermentations were terminated after 7 or 11 days, and whole fermentation broths were stored at -20°C to test some of them in hydrolysis assays.

Reducing sugar, enzyme activity, and protein assays

For measurement of reducing sugars (RS), 3 ml of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent was added to 1.5 ml of an appropriately diluted sample, and the mixture was placed in boiling water for 5 min. After cooling and adding 16 ml of distilled water, the absorbance was measured at 550 nm to determine the concentration of the RS. Glucose was used to prepare the standard curve.

Filter paper activity (FPA) measurements were performed to describe the overall potential for saccharification. Appropriately diluted supernatant was used to liberate 1 mg of glucose under assay conditions; the volume was increased to 1.5 ml by adding 0.05 M acetate buffer (pH 4.8). A strip of Whatman No. 1 filter paper (1 × 6 cm), equal to 50 mg of substrate, was added and incubated for 1 h at 50°C. Three milliliters of DNS reagent was added to each tube to stop the reaction. The amount of released RS was measured as discussed above. FPA was expressed as FPU/ml, where FPU was defined as the amount of liberated glucose given in micromoles per minute.

To measure xylanase activity, 0.1 ml of the appropriately diluted supernatant, to liberate approximately 0.25 µg xylose, was added to the mixture of 0.4 ml 0.05 M citrate buffer (pH 5.3) and 0.5 ml of 1% (w/v) birchwood xylan (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution prepared in citrate buffer pH 5.3. After incubating at 50°C for 10 min, the reaction was terminated by adding 1.5 ml of the DNS reagent, and the mixture was placed in boiling water for 5 min. After cooling, the absorbance was read at 550 nm. A xylose calibration curve was used to calculate the activity unit, which was defined as the amount of xylose released, given in micromoles per minute.

β-Glucosidase activity was assayed according to Berghem and Pettersson with a 5 mM 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside solution as the substrate [5].

The concentration of the extracellular protein in the fermentation supernatants was determined by the Bradford method using Coomassie Blue G250 reagent [8]. A calibration curve was obtained by using bovine serum albumin as the standard.

Hydrolysis

Hydrolysis experiments were carried out in a 5-ml reaction volume in test tubes with magnetic stirring at 50°C. Dry WIS content was 2% suspended in 0.05 M acetate buffer (pH 4.8). The enzyme to substrate ratio used achieved a glucan dosage of 20 FPU/g. As a control, the substrate was hydrolyzed by commercial enzyme preparation, Celluclast 1.5L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) supplemented with Novozym 188 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) in 20 FPU/g glucan cellulase and 20 IU/g glucan total β-glucosidase dosages. Hydrolysis was run for 72 h with withdrawals at 0, 3, 6, 9, 24, 48, and 72 h. At each time point, three tubes were taken (representing triplicates) and boiled for 5 min to inactivate the enzymes. They were then centrifuged, and the supernatant was prepared for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis to measure cellobiose, glucose, and xylose concentrations. The conversion values were calculated based on the initial glucan and xylan content of the WIS.

Analytical methods

The glucan and xylan contents of wheat straw before and after steam pretreatment were determined in triplicates using a two-step sulfuric acid hydrolysis, which was based on a method described by Hägglund [13]. In our analysis, a modified method was performed in which 0.5 g raw material was dispersed in 2.5 ml 72% sulfuric acid and maintained at room temperature for 2 h with occasional stirring. Next, 75 ml of distilled water was added and autoclaved for 1 h at 121°C. The reaction mixture was separated on preweighed, dried G4 glass filtering crucibles. The filtrate was analyzed for carbohydrates by HPLC. The filter cake was washed with hot distilled water and dried at 105°C. This residue was defined as the lignin content, and it was corrected for its ash content, which was determined after incineration at 550°C for 6 h.

To determine the starch content of wheat grain, a 0.5-g sample was suspended in a mixture of 25 ml distilled water and 10 ml 2 M NaOH. It was then incubated at 90°C for 20 min, followed by cooling to a temperature below 50°C. The sample was neutralized through the addition of 10 ml 2 M HCl. Then 10 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.2) and AMG 300L amyloglucosidase at 600 U/g solid were added for a 12-h hydrolysis at 40°C. This mixture was centrifuged at 3,400g for 5 min, and the supernatant was analyzed for glucose via HPLC. Measured glucose concentrations were reduced by the glucose content of the AMG 300L. The remaining solid was washed to remove residual glucose, dried, and analyzed for lignocellulose content as described above.

Samples for HPLC analysis were prepared by filtering through a regenerated cellulose syringe filter with 0.45-µm pore size (ProFill, Langerwehe, Germany). The glucose, cellobiose, and xylose contents of hydrolysis and the composition analysis samples were separated on an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (BioRad, Hercules, CA USA), which was run at 65°C with 5 mM sulfuric acid as mobile phase at a flow rate of 0.5 ml/min. After separation, compounds were detected by a Shimadzu RID-10A refractive index detector (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Sugars and degradation compounds in the liquid fraction were also measured. Total sugars (including both monomers and oligomers) were determined after mild acid hydrolysis (4% (v/v) H₂SO₄, 120°C and 30 min). Monomeric and total sugar concentrations in the liquid fraction were measured by HPLC (Waters, Mildford, MA, USA) with a 2414 refractive index detector (Waters, Mildford, MA, USA). A Transgenomic CarboSep CHO-682 carbohydrate analysis column was employed for the separation, and it operated at 80°C with deionized water as mobile phase (0.5 ml/min).

Furfural, HMF, vanillin, 4-hydroxybenzaldehyde, coumaric acid, and ferulic acid were analyzed on an Aminex HPX-87H column at 65°C. For the mobile phase, 89% 5 mM H₂SO₄ and 11% acetonitrile, at a flow rate of 0.7 ml/min, were used. For detection, a 1050 photodiode-array detector (Agilent, Waldbronn, Germany) was employed. Acetic and formic acid were also quantified by HPLC (Waters, Milford, MA, USA) with a 2414 refractive index detector and an Aminex HPX-87H column maintained at 65°C with a 5 mM sulfuric acid mobile phase at a flow rate of 0.6 ml/min.

Results and discussion

Effect of wheat grain addition on cellulase production

To investigate the effect of wheat grain on cellulase production by *T. reesei* RUT C30, the following experiment was performed. As a carbon source, 5 g/l Solka Floc was supplemented with 6.25 g/l ground wheat grain (80% carbohydrate content). As controls, 12.5 g/l ground wheat grain and 10 g/l Solka Floc were used as sole carbon sources.

After 7 days of cultivation, the highest overall cellulase activity, 1.03 FPU/ml, was measured from supernatant samples produced on Solka Floc plus ground wheat grain (SFWG). The cellulase activity of this sample was 20% higher than that in the Solka Floc control (Fig. 1). Broths growing on medium containing wheat grain afforded the lowest activity (0.63 FPU/ml). β -Glucosidase secretion (data not shown) was the most effective on the mixed carbon source (0.50 IU/ml), and, surprisingly, the next highest value was measured from broths on solely ground wheat grain (0.49 IU/ml). These samples had 25 and 23% higher β -glucosidase activity, respectively, than that of the

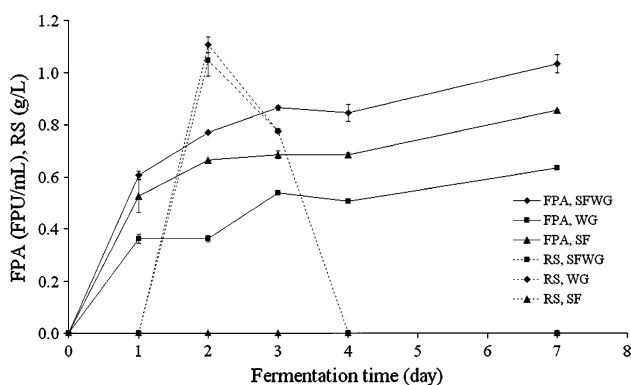


Fig. 1 FPA and RS profile on 10 g/l Solka Floc (SF), 12.5 g/l ground wheat grain (WG), and 5 g/l Solka Floc plus 6.25 g/l ground wheat grain (SFWG). Standard deviation values are calculated from two shake flasks run in parallel

Solka Floc control (0.40 IU/ml). Because the main component of wheat grain is starch (65.9%), it was assumed that the effect caused by the wheat grain addition was most likely related to its starch content. Nevertheless, a small amount of lignocellulosic carbohydrate from wheat distiller's grain and wheat bran was also present in each case. Wayman and Chen [43] also observed that untreated whole wheat flour was good at inducing cellulase synthesis in *T. reesei* RUT C30. They assumed that the reason for this induction involved some synergy between the effects of bran and starch in the whole wheat flour.

In the broths containing ground wheat grain, accumulation of RS content was observed with peaking on day 2 (1.11 and 1.05 g/l for wheat grain with and without Solka Floc, respectively) and was consumed by day 4. Because RS liberation was not found in broths containing Solka Floc alone, and Solka Floc with wheat grain did not yield significantly more glucose, hydrolysis of starch and consumption of its products occurred. Production of amyolytic enzymes by the *Trichoderma* species (including *T. reesei*) has already been reported [4].

Fermentations were also performed on the α -amylase-treated ground wheat grain in combination with Solka Floc. This carbon source mixture resulted in a higher FPA but a lower β -glucosidase activity, compared to the results with untreated ground grain (data not shown). Because β -glucosidase activity is a crucial factor in hydrolysis with *T. reesei* enzymes [9], untreated ground grain was used in the following experiments. Higher cellulase activity obtained on amylase-treated grain agreed with the theory of Chen and Wayman [10], who assumed that during enzymatic or acidic hydrolysis of starch, reversion products, such as sophorose, are formed under certain circumstances. These products can act to induce cellulase expression. Differences in the β -glucosidase activity can be explained by the mechanisms of bacterial amylases (Thermamyl SC from *Bacillus licheniformis*) or those of fungal (produced by *Trichoderma* itself) origin. While the amylases from bacteria randomly attack the α -1–4 bonds of starch to create dextrans, the fungal amylases, presumably also those of *T. reesei* RUT C30, liberate maltose and glucose from chain ends. β -Glucosidase triggered by lignocellulosic components in the medium can form cellulase inducers via transglycolysation from this starch-derived glucose. This ability of β -glucosidases from different species has already been proposed [10, 11]. It was hypothesized that some of these compounds can trigger even more β -glucosidase, creating a positive feedback loop.

On the other hand, *T. reesei* RUT C30 does not possess any functional genes encoding maltose permease, which is responsible for maltose uptake into the cell. As a consequence, its growth on media where the sole carbon source is starch, or other α -glucans, is strongly impaired [34]. This

phenomenon is supported by an earlier finding that starch itself was a poor inducer of cellulase enzyme production [10]. Furthermore, the catabolite derepressive property of *T. reesei* RUT C30 [15] also has an important role in helping to avoid repression by glucose from starch. These unique features of RUT C30 are crucial in cellulase secretion triggered by starch or its derivatives because no cellulolytic enzyme production was observed in *T. reesei* QM9414 cultures growing on acid-hydrolyzed potato starch [25].

Liquid fraction as carbon source for cellulase production

The liquid fraction separated after steam pretreatment of wheat straw was tested in cellulase fermentations with no dilution, twofold or fourfold dilutions supplemented with other medium components at a pH of 5.8. The concentration of the RS remained constant during the 11-day cultivation (12.5 g/l for 1:3 dilution, 22.4 g/l for 1:1 dilution, and 36.5 g/l for undiluted liquid fraction), indicating that there was no utilization of the carbon source even at the highest dilution; this result also indicates that no growth occurred.

Based on these results, a two-step detoxification process of the liquid fraction was executed. Importantly, there was no optimization of the detoxification process; the primary aim of the current process was to make the liquid fraction useable. Originally, the liquid fraction contained HMF and furfural, derived from glucose and xylose, respectively. Additionally, a large amount of acetic acid was present, which demonstrates the high degree of hemicellulose solubilization. Further degradation of furfural and HMF occurred, resulting in formation of formic acid (Table 2). Besides the inhibitors listed in Table 2, other compounds, namely 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, coumaric and ferulic acids, were identified at minor concentrations (<0.1 g/l).

During evaporation, volatile compounds were partially eliminated from the mixture. Approximately 61, 10, and 4% of the initial amount of furfural, acetic acid, and formic acid, respectively, was found in the condensate (Table 2). With a prolonged boiling time, it is possible that more acids could be stripped out. For acetic acid and HMF, the mass balances are complete within error intervals; 89 and 100% were left in liquid fraction. In the case of furfural (24% left in liquid fraction) and formic acid (88%), the mass balances are only partial, and therefore it was assumed that even more evaporated from the liquid fraction, leaving the cooler without condensation. As a result of the two-step detoxification process, furan aldehydes were almost completely eliminated, but an increase in acetic acid concentration was observed. The results of repeated evaporation showed a good correspondence with the first test in terms of the concentrations of each compound. However, the results of repeated overliming were in line with the first experiment only for the furfural, HMF, and acetic acid. In contrast to the other compounds, the concentration of formic acid decreased during the first overliming, but it increased during the second; this difference can also be detected in the high standard deviation of the mean value. Effectiveness of overliming with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ depends on its severity, which can be described with three parameters: final pH, temperature, and treatment time. Aliphatic acids are usually unaffected, but under harsher conditions, their concentration can increase. Horváth et al. investigated the effect of these factors on the composition, and only one setup was found to decrease the concentration of formic acid, but even in this case the concentration of acetic acid increased; in all other investigated setups, increases in both concentrations were observed [14]. The parameters of that one exception (pH 10, 30°C, and 1 h) are quite similar to the overliming process applied in our experiments (pH 10, 35°C, and 1 h). However, some oscillations in temperature may result in an increased formic acid concentration as well.

Table 2 Effect of detoxification on inhibitor concentrations (g/l) in liquid fraction separated after steam pretreatment

Compound	Untreated	After evaporation ^a	Condensate	After overliming ^b
Furfural	2.1 ± 0.5	0.5 ± 0.0	5.3 ± 0.8	0.0
HMF	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.0	0.1 ± 0.1
Acetic acid	8.8 ± 0.8	7.8 ± 0.1	3.8 ± 0.1	12.4 ± 1.7
Formic acid	7.2 ± 0.9	6.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	6.8 ± 2.2 ^c

Mean values of two detoxifications with standard deviations are presented. During evaporation from an initial volume of 250 ml, approximately 60 ml of volume was lost, and it was replaced by distilled water

^a Refilled to original volume with distilled water

^b Adjusted to pH 5.8 as used in fermentations

^c The values of two detoxification trials showed different trends, for details see text

Table 3 Sugar concentrations in liquid fraction before and after detoxification (given in g/l)

	Untreated		Detoxified	
	Monomer	Total	Monomer	Total
Glucose	0.6 ± 0.1	7.2 ± 0.7	2.1 ± 0.2	7.1 ± 0.3
Xylose	5.5 ± 0.2	40.5 ± 3.1	6.4 ± 0.2	37.6 ± 3.3
Others ^a	2.6 ± 0.3	4.5 ± 0.6	2.4 ± 0.1	4.8 ± 0.1

Data are presented as mean values of triplicates with standard deviations

^a Galactose, mannose, and arabinose

Interestingly, an elevated concentration of ferulic acid was detected, from the initial 0.04 to 0.49 g/l after overliming. One possible reason for this increase is that at the low pH of the original liquid (around 3.4), ferulic acid can form polymers, which were not determined. However, at higher pH values, such as those following overliming and the pH adjustment to 5.8, these polymers are degraded and can be measured as monomers.

As an effect of detoxification, the content of glucose and xylose increased but with slightly decreasing total sugar concentrations, which shows that during detoxification further degradation of oligomers occurred (Table 3). The concentrations of other carbohydrates remained constant, within error intervals.

Fermentations were performed with the detoxified liquid, and enzyme production was only observed in the case of the fourfold-diluted liquid fraction, which reached an activity of 1.18 FPU/ml after 11 days. At the other dilutions, the concentration of the RS was constant during fermentation. Therefore, in the subsequent parts of the study, the detoxified liquid fraction was applied at a 1:3 dilution with tap water.

In the case of this dilution, the initial acetic acid concentration of the treated liquid fraction was 3.1 g/l in the culture broths. The effect of acetic acid on cellulase production by *T. reesei* RUT C30 was investigated up to 3 g/l at a pH of 6.0 using Mandels' medium with washed steam-pretreated willow as carbon source and no influence was observed [37]. However, there is no information about the effect of acetic acid at higher concentrations. When furfural (0.4, 0.8, and 1.2 g/l) was also added into the same medium containing acetic acid at low concentrations (1.0 and 2.0 g/l), the acetic acid appeared to reduce the inhibitory effect of the furfural [37]. Both the acetic acid and the furfural concentrations were in these ranges in the fourfold-diluted, untreated liquid fraction (2.20 and 0.52 g/l, respectively), but no sugar consumption was observed during cultivation, demonstrating an effect of other inhibitors present in the liquid fraction. This synergy between inhibitors was also confirmed by the fact that the total

amount of inhibitors in the treated liquid was higher than in the original one, but mostly contained only aliphatic acids and enzyme production occurred when it was diluted fourfold.

Inhibitors were also measured in fermentation broths at the end of cultivation. In the case of broths containing undiluted or twofold dilutions of the liquid fraction, the concentrations of the inhibitors did not change during cultivation. Neither aliphatic acids, nor the other inhibitors were detected in the broth with fourfold-diluted treated liquid fraction. Palmqvist et al. [30] and Szengyel et al. [37] also found that *T. reesei* was able to consume acetic acid in media containing low overall levels of inhibitors. In the current study, consumption of formic acid by *T. reesei* was also detected.

Integrated enzyme production

The fourfold-diluted, treated liquid fraction was supplemented with other carbon sources related to wheat processing to enhance cellulase productivity and to optimize the composition of the enzyme mixture for the hydrolysis. Media compositions are presented in Table 4. With these media, every compound, excluding salts and buffer, would be available in-house through an integrated wheat processing factory. As reference fermentation, WIS of steam-pretreated wheat straw was used as carbon source and suspended in 0.1 M TRIS–maleic acid buffer prepared with tap water.

The presence of inhibitory compounds in the liquid fraction prolonged the lag phase of enzyme production compared to the reference. Therefore, when the reference had already reached maximal FPA after 7 days, the other cultures still showed increasing activities (Fig. 2).

The prolonged lag phase could be perceived on the RS curves as well. RS concentration increased during the first 2 days of fermentation, which was due to the enzymes present in the inocula and the presence of inhibitors. No RS accumulation was observed in REF where cells were immediately able to utilize the released sugars from the WIS. When *T. reesei* started to grow, the concentration of RS dropped sharply. This event occurred at the same time in the media containing the liquid fraction, irrespective of the supplementing carbon source. Thus, the supplementary substrates did not decrease the length of the lag phase. During RS consumption, enzyme production had also started, possibly even in the presence of monomers. In this case, the catabolite derepressive feature of the RUT C30 strain became a crucial factor again because it can contribute largely to this observed enzyme production. It has been determined that in *T. reesei* RUT C30 cultures growing on a mixture of xylose and cellulose, xylose was consumed first to support growth [27]. However, when

Table 4 Main carbohydrate composition of fermentation media (g/l)

Abbr.	Carbon source	Glucan	Xylan	Others ^a	Monomers ^b	Total
LIQ	1:3 diluted liquid fraction	2.2	8.5	0.6	2.7	14.0
LIQWG	LIQ + 12.5 g/l wheat grain	11.2	9.5	0.6	2.7	24.0
LIQWIS	LIQ + 14.3 g/l WIS	10.4	9.4	0.6	2.7	23.1
REF	14.3 g/l WIS	8.2	0.9	–	–	9.1

Carbohydrate content of wheat distiller's grain supplementation (5 g/l) and non-starch carbohydrates from wheat grain are included

^a Arabinose, galactose, and mannose oligomers

^b Including glucose, xylose, arabinose, galactose, and mannose

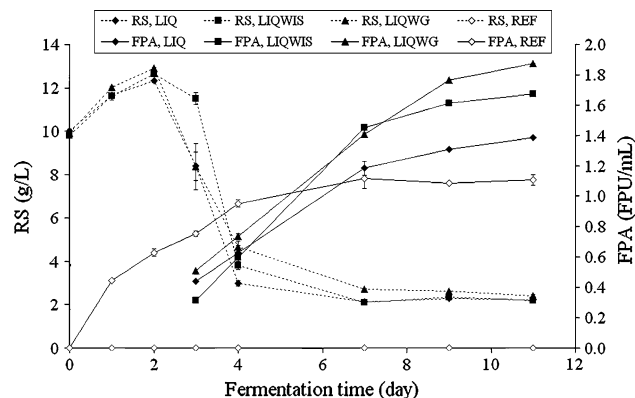


Fig. 2 FPA and RS profile for LIQ, LIQWG, LIQWIS, and REF (for abbreviations see Table 4). Mean values and standard deviations are shown for two flask cultures that were grown in parallel. FPA values of the liquid fraction containing media for the first and second days are not shown because they are highly affected by the amount of RS background

glucose (2.5 g/l) was present in the medium with xylose (7.5 g/l), in the form of a conditioned hydrolyzate and supplemented with 1% Solka Floc, the glucose was utilized first, resulting in its depletion by the second day, followed by depletion of xylose on the third day, and no increase was detected in either concentration [12]. Therefore, we hypothesized that these easily accessible sugars can promote growth of the fungus even in the presence of inhibitors.

An experiment was also carried out with the twofold dilution of the liquid fraction supplemented with 12.5 g/l ground wheat grain to determine whether additional substrates could decrease the inhibitory effect. However, no RS consumption occurred.

Beside the presence of inhibitors, a different matrix of carbohydrates in the media could also cause differences in FPA profiles compared to the reference. The liquid fraction only contained soluble xylose and glucose in addition to their oligomers derived from lignocellulosic material. Induction of cellulase secretion by water-soluble glucose oligomers ($n < 6$) in *T. koningii* [41] has been reported and also partially by xylose in *T. reesei* RUT C30 [27]. In the liquid fraction used in this study, these soluble inducing

oligomers are readily available. However, in the case of WIS, only water-insoluble polymers were present, and they needed to be degraded before utilization.

After 11 days, the highest volumetric activities of the cultures were obtained in the medium supplemented with wheat grain, which was also reflected in the protein content (Table 5). Supplementation with wheat grain caused a 35% increase in FPA, which was 21% in the case of WIS compared to the liquid fraction alone. The highest FPA yield was obtained by the reference containing no inhibitors, followed by the unsupplemented liquid fraction (Table 5). In the case of supplementations, the enhanced carbohydrate content did not result in increased FPA yields. Xylanase activities were practically equal in the LIQ and LIQWIS samples, while 30% higher xylanase activity was measured by using wheat grain supplementation. Final xylanase activity of REF was 62% lower than that obtained in the LIQ sample. On one hand, the reason for this low activity may be the lower xylan content in the washed pretreated wheat straw (Table 4). On the other hand presence of D-xylose di- and trisaccharides in the liquid fraction may cause more powerful stimulation of xylanase secretion than the monomers alone [45]. Moreover, L-arabinose was found to be a more effective inducer of xylanase secretion than xylose [44]. In the liquid fraction used for this study, the presence of arabinose was significant because it was the third highest concentration among monomers (0.5 g/l) in the fourfold-diluted, treated liquid fraction.

No differences in β -glucosidase activity were observed between the LIQ and REF samples. The main improvement with the wheat grain addition (LIQWG) was the near-doubled β -glucosidase activity, leading to a more favorable BG/FPA ratio. With the WIS supplementation (LIQWIS), no significant increase could be obtained, at least extracellularly. This positive effect on β -glucosidase activity with the LIQWG may be related to the starch content of wheat grain because enhanced β -glucosidase activity has been observed when *T. reesei* RUT C30 was cultivated on Mandels' medium with different carbon sources supplemented with 1% starch [38].

Table 5 Final protein concentrations, volumetric activities, and yields after 11 days of cultures for the LIQ, LIQWG, LIQWIS, and REF samples

	Protein (g/l)	BGL (IU/ml)	XYL (IU/ml)	FPA (FPU/ml)	Yield (FPU/g CH)	BGL/FPA ratio (%)
LIQ	0.58 ± 0.03	0.88 ± 0.02	127 ± 4	1.38 ± 0.01	98.6	64
LIQWG	1.18 ± 0.05	1.74 ± 0.03	165 ± 4	1.87 ± 0.05	77.9	93
LIQWIS	0.69 ± 0.02	0.91 ± 0.06	130 ± 5	1.67 ± 0.04	72.3	55
REF	0.44 ± 0.06	0.88 ± 0.01	49 ± 6	1.11 ± 0.04	122.1	79

For abbreviations see Table 4. Data are presented as mean values and standard deviations from two parallel flask cultures

Fermentation was repeated to confirm the results, and the repetitions yielded good correspondence with the initial data.

Hydrolysis

For hydrolysis experiments, whole fermentation broths from 11-day cultures in LIQ, LIQWG, and LIQWIS media were used. Hereafter, these abbreviations refer to enzymes produced in the corresponding medium. Whole fermentation broth of *T. reesei* RUT C30 has been reported to be more effective than the supernatant in hydrolysis in terms of glucose liberation [20]. The reason for this finding is likely that β -glucosidase mostly appears in hyphae-bound form [26], and the presence of this enzyme component at a sufficient concentration is crucial for an elevated glucose yield.

Hydrolysis of the pretreated and washed wheat straw (WIS) was performed with equal enzyme doses, 20 FPU/g glucan of WIS for each broth. For a reference, a commercial enzyme preparation from *T. reesei*, Celluclast 1.5L, was used at the same dosage. However, it was supplemented with β -glucosidase from *Aspergillus niger* (Novozym 188) to obtain 20 BG IU/g glucan. This addition was necessary because the β -glucosidase level of Celluclast 1.5L is suboptimal [9]. Other activities of the culture broths (supernatants) in the volume containing 20 FPU are presented in Table 6. While the BGL/FPA ratio for the LIQ and LIQWIS samples was 64 and 55%, respectively, that of LIQWG was similar to the ratio of the reference (93 vs. 100%, respectively). The doses of

xylanase were similar in the cases of LIQ and LIQWG, whereas LIQWIS presented the lowest xylanase and β -glucosidase activities. However, activities by the bound and intracellular enzymes were not included in the dosages because the activity values used for calculating the needed volume were measured from the supernatants.

Hydrolysis time curves for released glucose (cellobiose included) and xylose are presented in Fig. 3. Some cellobiose accumulation was observed with each fermentation broth but to a different extent. The highest cellobiose concentration, 3.3 g/l, was measured from samples hydrolyzed with LIQ broth after 24 h, while a decline was already occurring in the other samples at this time. Although less β -glucosidase activity was added with broth LIQWIS (Table 6), it showed less cellobiose accumulation than the aforementioned sample. This finding is somehow contrary to the measured amount of β -glucosidase, but these measurements were taken from the supernatant. Thus, it can be assumed that the LIQWIS broth had more enzymes in the hyphae or substrate-bound form (the LIQWIS broth contained a solid residue of the steam-pretreated substrate resulting in higher enzyme adsorption). Although LIQWG had the optimal BGL/FPA ratio (Table 5), cellobiose accumulation was much higher than in the reference. However, LIQWG was the most effective among the broths tested (Fig. 3), in terms of glucose liberation. By the end of the 72-h hydrolysis, differences between broths and the reference decreased. Even the LIQWG broth reached the level of the commercial enzymes.

In connection with the concentration of cellobiose, the glucose in the reference sample increased fastest, but at the

Table 6 Enzyme activities and protein content of produced and commercial enzymes representing 20 FPU cellulase activity

	Volume (ml)	FPA (FPU)	Protein (mg)	BGL (IU)	XYL (IU)
LIQ	14.49	20	8.40	12.75	1,840
LIQWG	10.70	20	12.63	18.62	1,766
LIQWIS	11.98	20	8.27	10.90	1,557
Celluclast + Novozym 188 ^a	0.34	20	13.04	20	243

Although whole culture broths were used in hydrolysis, enzyme activities were measured from supernatants

^a BGL supplemented to 20 IU/g glucan

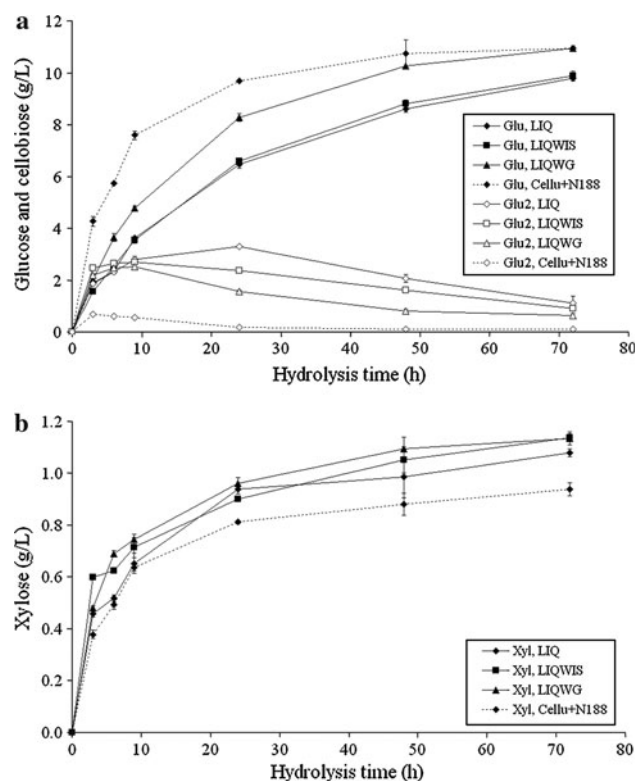


Fig. 3 Concentrations of released sugars during hydrolysis of pretreated and washed wheat straw by 20 FPU/g glucan dosages of LIQ, LIQWIS, and LIQWG broths. A reference hydrolysis was performed by using commercial enzyme preparations (Celluclast 1.5L supplemented with Novozym 188). Data are presented as mean values of three parallel tubes with standard deviations. **a** Glucose (Glu) and cellobiose (Glu2) concentrations. **b** Xylose concentration

end of the 72-h hydrolysis, glucose in samples with LIQWG broth also reached 11 g/l. Surprisingly, the liberated glucose in samples with broths LIQ and LIQWIS did not reflect the difference between their respective accumulation of cellobiose (approximately 1 g/l after 72 h). During the 72-h hydrolysis, both the reference sample and that from broth LIQWG attained 85% glucan conversion and LIQWIS and LIQ, 77 and 76%, respectively, compared to the theoretical maximum.

Liberation of xylose was similar in each case and more effective than with the Celluclast 1.5L-Novozym 188 combination, which had the lowest dose of xylanase. In terms of the dose of xylanase, there was no large difference between the broths. However, the xylan content of the substrate was rather low. On the other hand, higher xylanase activities may have contributed to the efficient glucose liberation achieved by increasing the accessibility of cellulose [6]. Final xylan conversion values were the following for each broth: 70% for the reference, and 81, 85, and 85% for LIQ, LIQWG, and LIQWIS, respectively, although LIQWIS contained the lowest xylanase activity among the broths.

Conclusions

In this study, we investigated the possibility of using the liquid fraction of steam pretreatment in on-site enzyme production by *T. reesei* RUT C30. As a result of the presence of inhibitors, no enzyme production was observed with an untreated liquid fraction, even when it was diluted fourfold. Successful fermentation could be performed only in a fourfold-diluted, detoxified liquid fraction. In this treated liquid furfural and HMF were eliminated, but concentrations of aliphatic acids increased. Therefore, the total amount of inhibitors remained unchanged. Our findings demonstrate that up to a specific level, the synergy of the inhibitors is more important than their discrete concentrations.

The main advantage of using the liquid fraction as carbon source was the highly enhanced xylanase activity compared to the reference (WIS in tap water). Wheat grain supplementation resulted in nearly doubled β -glucosidase activity compared to the original liquid fraction alone. However, FPA yields from supplemented media (LIQWIS and LIQWG) were considerably lower than those of the references.

Steam-pretreated and washed wheat straw was found to be a good substrate for enzymatic hydrolysis, for both commercial and in-house-produced enzymes. Contrary to expectations, the enzyme produced in medium supplemented with washed pretreated wheat straw (broth LIQWIS) did not yield any more glucose. However, adding wheat grain into the medium resulted in enhanced efficiency of hydrolysis, which is most likely due to the elevated β -glucosidase activity. This sample eventually reached the same final conversion as the commercial enzyme mixture supplemented with β -glucosidase.

With this study, we demonstrated that after detoxification, the liquid fraction of steam-pretreated wheat straw is a reasonable substrate for *T. reesei* RUT C30, which makes on-site enzyme production available using a less expensive carbon source. Moreover, supplementing this medium with ground wheat grain also carries apparent advantages and provides the possibility for the integration of second-generation ethanol technologies with on-site cellulase production in wheat grain processing ethanol factories.

Acknowledgments Hungarian National Research Fund (OTKA K72710) is gratefully acknowledged for the financial support.

References

- Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. J Chem Technol Biotechnol 82:340–349. doi: 10.1002/jctb.1676

2. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour Technol* 101:4851–4861. doi:[10.1016/j.biortech.2009.11.093](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093)
3. Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabanas A, Manzanares P, Ballesteros M (2006) Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* 129–132: 496–508. doi:[10.1385/ABAB:130:1:496](https://doi.org/10.1385/ABAB:130:1:496)
4. Benitez T, Limón C, Delgado-Jarana J, Rey M (1998) Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and gliocladium*, vol 2. Taylor & Francis, London, UK, pp 89–113
5. Berghem LE, Pettersson LG (1974) The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. *Eur J Biochem* 46:295–305. doi:[10.1111/j.1432-1033.1974.tb03621.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03621.x)
6. Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, Okunev O, Gusakov A, Maximenko V, Gregg D, Sinitsyn A, Saddler J (2005) Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme Microb Technol* 37:175–184. doi:[10.1016/j.enzmictec.2005.01.039](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.039)
7. Bigelow M, Wyman C (2002) Cellulase production on bagasse pretreated with hot water. *Appl Biochem Biotechnol* 98–100:921–934. doi:[10.1385/ABAB:98-100:1-9:921](https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:921)
8. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi:[10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
9. Breuil C, Chan M, Gilbert M, Saddler JN (1992) Influence of β -glucosidase on the filter paper activity and hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Bioresour Technol* 39:139–142. doi:[10.1016/0960-8524\(92\)90132-H](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90132-H)
10. Chen S, Wayman M (1992) Novel inducers derived from starch for cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Process Biochem* 27:327–334. doi:[10.1016/0032-9592\(92\)87010-E](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)87010-E)
11. Fujimoto H, Nishida H, Ajsaka K (1988) Enzymatic syntheses of glucobioses by a condensation reaction with α -glucosidase, β -glucosidases and glucoamylase. *Agric Biol Chem* 52:1345–1351
12. Hayward T, Hamilton J, Templeton D, Jennings E, Ruth M, Tholudur A, McMillan J, Tucker M, Mohagheghi A (1999) Enzyme production, growth, and adaptation of *T. reesei* strains QM9414, L-27, RL-P37, and RUT C-30 to conditioned yellow poplar sawdust hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol* 77:293–309. doi:[10.1385/ABAB:77:1-3:293](https://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:293)
13. Hågglund E (1951) The wood components and their chemical properties. In: Hågglund E (ed) *Chemistry of wood*. Academic, New York, USA, pp 37–389
14. Horváth IS, Sjöde A, Alriksson B, Jönsson LJ, Nilvebrant N (2005) Critical conditions for improved fermentability during overliming of acid hydrolysates from spruce. *Appl Biochem Biotechnol* 121–124:1031–1044. doi:[10.1007/978-1-59259-991-2_87](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_87)
15. Ilmén M, Thrane C, Penttilä M (1996) The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet* 251:451–460. doi:[10.1007/BF02172374](https://doi.org/10.1007/BF02172374)
16. Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod Biorefin* 1:119–134. doi:[10.1002/bbb.4](https://doi.org/10.1002/bbb.4)
17. Juhász T, Szengyel Z, Szijártó N, Réczey K (2004) Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Appl Biochem Biotechnol* 113:201–211. doi:[10.1385/ABAB:113:1-3:201](https://doi.org/10.1385/ABAB:113:1-3:201)
18. Kaparaju P, Serrano M, Thomsen AB, Kongjan P, Angelidaki I (2009) Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresour Technol* 100:2562–2568. doi:[10.1016/j.biortech.2008.11.011](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.011)
19. Kaparaju P, Serrano M, Angelidaki I (2009) Effect of reactor configuration on biogas production from wheat straw hydrolysate. *Bioresour Technol* 100:6317–6323. doi:[10.1016/j.biortech.2009.06.101](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.101)
20. Kovács K, Szakacs G, Zacchi G (2009) Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresour Technol* 100:1350–1357. doi:[10.1016/j.biortech.2008.08.006](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.006)
21. Kumar S, Singh SP, Mishra IM, Adhikari DK (2009) Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chem Eng Technol* 32:517–526. doi:[10.1002/ceat.200800442](https://doi.org/10.1002/ceat.200800442)
22. Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N, Jönsson L (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol* 77:91–103. doi:[10.1385/ABAB:77:1-3:91](https://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:91)
23. Lo C, Zhang Q, Lee P, Ju L (2005) Cellulase production by *Trichoderma reesei* using sawdust hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol* 121–124:561–573. doi:[10.1385/ABAB:122:1-3:0561](https://doi.org/10.1385/ABAB:122:1-3:0561)
24. Marchessault RH, Malhotra SL, Jones AY, Perovic A (1983) The wood explosion process: characterization and uses of lignin/cellulose products. In: *Wood and agriculture residues*. Academic, New York, pp 401–413
25. Marquina D, Flores M (1997) Use of potato starch extraction wastes to grow cellulolytic fungi. *Adv Food Sci* 19:75–80
26. Messner R, Kubicek CP (1990) Evidence for a single, specific β -glucosidase in cell walls from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb Technol* 12:685–690. doi:[10.1016/0141-0229\(90\)90008-E](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90008-E)
27. Mohagheghi A, Grohmann K, Wyman C (1988) Production of cellulase on mixtures of xylose and cellulose. *Appl Biochem Biotechnol* 17:263–277. doi:[10.1007/BF02779162](https://doi.org/10.1007/BF02779162)
28. Nogawa M, Goto M, Okada H, Morikawa Y (2001) L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet* 38:329–334. doi:[10.1007/s002940000165](https://doi.org/10.1007/s002940000165)
29. Olsson L, Hahn-Hägerdal B (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol* 18:312–331. doi:[10.1016/0141-0229\(95\)00157-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00157-3)
30. Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Szengyel Z, Zacchi G, Réczey K (1997) Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme Microb Technol* 20:286–293. doi:[10.1016/S0141-0229\(96\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00130-5)
31. Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol* 74:17–24. doi:[10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
32. Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM (1998) Biotechnological production of xylitol part. 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresour Technol* 66:25–40. doi:[10.1016/S0960-8524\(98\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00037-6)
33. Réczey K, Brumbauer A, Bollók M, Szengyel Z, Zacchi G (1998) Use of hemicellulose hydrolysate for β -glucosidase fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 70–72:225–235. doi:[10.1007/BF02920139](https://doi.org/10.1007/BF02920139)
34. Seidl V, Gamauf C, Druzhimina IS, Seiboth B, Hartl L, Kubicek CP (2008) The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics* 9:327. doi:[10.1186/1471-2164-9-327](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-327)
35. Sternberg D, Mandels GR (1979) Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol* 139:761–769
36. Szengyel Z, Zacchi G, Réczey K (1997) Cellulase production based on hemicellulose hydrolysate from steam-pretreated

- willow. *Appl Biochem Biotechnol* 63–65:351–362. doi:[10.1007/BF02920437](https://doi.org/10.1007/BF02920437)
37. Szengyel Z, Zacchi G (2000) Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Appl Biochem Biotechnol* 89:31–42. doi:[10.1385/ABAB:89:1:31](https://doi.org/10.1385/ABAB:89:1:31)
38. Taj-Aldeen SJ (1993) Effect of starch on the induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. *Mycol Res* 97:318–320. doi:[10.1016/S0953-7562\(09\)81128-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81128-3)
39. Talebna F, Karakashev D, Angelidaki I (2010) Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol* 101:4744–4753. doi:[10.1016/j.biortech.2009.11.080](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080)
40. van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik MAH, Wisselink HW, Scheffers WA, van Dijken JP, Pronk JT (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:391–418. doi:[10.1007/s10482-006-9085-7](https://doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7)
41. Wang CH, Hseu TH, Huang CM (1988) Induction of cellulase by cello-oligosaccharides in *Trichoderma koningii* G-39. *J Biotechnol* 9:47–59. doi:[10.1016/0168-1656\(88\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(88)90014-4)
42. Warzywoda M, Larbre E, Pourquié J (1992) Production and characterization of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* grown on various carbon sources. *Bioresour Technol* 39:125–130. doi:[10.1016/0960-8524\(92\)90130-P](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90130-P)
43. Wayman M, Chen S (1992) Cellulase production by *Trichoderma reesei* using whole wheat flour as a carbon source. *Enzyme Microb Technol* 14:825–831. doi:[10.1016/0141-0229\(92\)90099-A](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90099-A)
44. Xiong H, Turunen O, Pastinen O, Leisola M, von Weymarn N (2004) Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:353–358. doi:[10.1007/s00253-003-1548-4](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1548-4)
45. Xiong H, von Weymarn N, Turunen O, Leisola M, Pastinen O (2005) Xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. *Bioresour Technol* 96:753–759. doi:[10.1016/j.biortech.2004.08.007](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.007)

Application of a microassay method to study enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw

Pablo Alvira,* María José Negro, Felicia Sáez and Mercedes Ballesteros

Abstract

BACKGROUND: The conversion of lignocellulosic biomass to ethanol includes a disruptive pretreatment process followed by enzyme-catalyzed hydrolysis of the cellulose and hemicellulose components to fermentable sugars. As the cost and hydrolytic efficiency of enzymes are major factors that restrict the commercialization of biomass conversion processes, significant efforts are made nowadays to improve the enzymatic mixtures and make the process cost-effective.

RESULTS: In this work, enzymatic microassays have been developed and validated to test new different enzymatic formulations on real lignocellulosic substrates. Homogeneous handsheets from steam pretreated wheat straw were elaborated to be used as substrate. The microassay was adapted to test both water-insoluble solids and the whole slurry as substrates. Results in hydrolysis microassays were comparable with those obtained in standard flask assays using pretreated wheat straw. Moreover, using the enzymatic microassays, two novel preparations have been evaluated, demonstrating the ability of microassays to discriminate between different enzymatic mixtures.

CONCLUSIONS: This enzymatic microassay represents a rapid method to test the performance of new selected cellulase enzymes on real pretreated lignocellulosic substrates. This microassay will enable evaluation of enzyme components separately, or optimized mixtures.

© 2010 Society of Chemical Industry

INTRODUCTION

Ethanol from lignocellulosic biomass is one of the most attractive alternatives to be developed as fuel. Among different strategies for the conversion of lignocellulosic raw materials into fermentable sugars, enzyme-catalyzed processes have been extensively studied. Although significant efforts have been made during recent decades to develop cost-effective bioconversion processes, there are still a number of drawbacks to be overcome for a successful industrial application. In this context, effective enzymatic hydrolysis (EH) of cellulose and hemicellulose has a great potential for improving the economic feasibility of the bioethanol production process.

Lignocellulosic biomass refers to the majority of the non-food materials available from plants. It presents a complex structure containing three main components: cellulose, hemicellulose and lignin. Among lignocellulosic materials, wheat straw is an abundant and cheap source of biomass in Europe and it is available as an agricultural waste. Considering the utilization for animal feeding and for soil maintenance, about 60% of world production could be directed as a waste material to energetic purposes.¹ Owing to its high sugars content, it is a promising raw material for bioprocesses producing ethanol using EH in combination with fermentation.

Different strategies have been described for enzymatic biomass conversion to ethanol. The process usually consists of four main steps: pretreatment, enzyme production, enzymatic hydrolysis of carbohydrates and alcoholic fermentation. Among all the pretreatment methods developed to date,² steam explosion (SE) has been proved to make the cellulose more accessible for enzymatic catalytic reactions.^{3,4} Slurry obtained after pretreatment can be

filtered to obtain a water-insoluble solids (WIS) fraction, which contains the majority of cellulose and lignin, and a liquid fraction or prehydrolysate, which contains the hemicellulosic sugars solubilized during the pretreatment and different degradation products. Pretreatment conditions can modify the substrate composition having a great effect on the following hydrolysis and fermentation steps.

Enzyme production and subsequent enzymatic hydrolysis processes are two of the steps preventing the whole process from becoming cheaper and competitive.⁵ Different enzymes are involved in the complete hydrolysis of carbohydrates contained in lignocellulosic biomass and a combination of different activities are necessary for their complete degradation into fermentable sugars. To convert cellulose into glucose at least three categories of enzymes are involved; endoglucanases hydrolyze internal β -1,4-glucosidic bonds in the cellulose chain, cellobiohydrolases cleave off cellobiose units from the end of the chain, and β -glucosidase converts cellobiose into glucose.⁶ These enzymes work synergistically to hydrolyze cellulose by creating new accessible sites and relieving product inhibition.^{7,8} However, complex structure of lignocellulose requires not only cellulase and β -glucosidase activities for its complete hydrolysis. Xylanases and other accessory enzymes act synergistically with cellulases and play an important role in the efficient hydrolysis of cellulose and hemicellulose. It was reported that the presence of hemicellulose

* Correspondence to: Pablo Alvira, CIEMAT-Renewable Energies Division Av.Complutense 22, 28040, Madrid, Spain. E-mail: pablo.alvira@ciemat.es

CIEMAT-Renewable Energies Division, Av.Complutense 22, 28040, Madrid, Spain

Table 1. Enzymes characterization

Enzyme	Cellulase activity		β -glucosidase activity		Xylanase U mL ⁻¹	Protein content Mg mL ⁻¹	Specific activity FPU mg ⁻¹ protein
	FPU/mL	U mL ⁻¹ (Avicel)	U mL ⁻¹ (cellobiose)	U mL ⁻¹ (ρ NPG)			
NS 50013	62.3 \pm 6.3	74 \pm 3.5	11.5 \pm 2.1	38.1 \pm 4.0	121.7 \pm 24.7	140.2 \pm 5.1	0.44
NS 50010	–	–	809.4 \pm 84.5	595.7 \pm 55.8	40.6 \pm 4.6	188.7 \pm 8.1	–
NS 22074	108.4 \pm 19.6	138.9 \pm 0.5	1540 \pm 10	716.9 \pm 34.5	195.5 \pm 9.9	201.0 \pm 21	0.54
Accellerase 1000	55.7 \pm 4.6	56 \pm 1.1	142.7 \pm 17	415.2 \pm 62.2	183.7 \pm 19.4	90.42 \pm 0.9	0.61

in lignocellulosic feedstocks, even in low quantities, can prevent cellulases degrading the cellulose efficiently.^{9–11}

Current lignocellulosic enzymes used for bioethanol production are produced by industrially relevant filamentous fungi such as *Trichoderma reesei*. Although considerable reduction of enzyme costs have been achieved by optimization of fungi strains, culture media and downstream processing, further improvements are still required. An interesting approach for obtaining more effective commercial preparations could be to identify and improve individual enzyme components and supplementing or replacing the set of cellulases with novel enzymes. In fact, some of the enzymes which can potentially improve the enzymatic cocktails are expressed in such low level that their beneficial effect cannot be estimated. Optimization of the cellulase enzymes and mixtures^{12,13} and the enzyme loadings can improve the hydrolysis step making the process cost-effective.^{14,15}

In this context, proper enzymatic assays are required for screening novel enzymes. The enzymes are usually evaluated by their activity towards model substrates,^{16,17} but it is generally accepted that activities on filter paper or Avicel provide a poor estimation of the ability of the enzymes to hydrolyze lignocellulosic substrates. Thus, it would be interesting to assay these new enzymes on real lignocellulosic substrates. Unlike filter paper or other synthetic substrates, the complex structure of lignocellulose contains significant amounts of lignin and hemicellulose, which has a great effect on the EH performance. Microassay methods represent a technical advance to select the most appropriate combinations since many different cellulase complexes can be evaluated rapidly.^{18,19} Furthermore, when reducing the volume assay, the amount of enzyme required for the tests is very little. Since recombinant enzymes obtained at lab-scale are often produced in small quantities, micro-scale methods are appropriate to evaluate the enzymatic performance of novel enzyme mixtures.²⁰

A novel microassay method was developed by Berlin *et al.*¹⁸ using handsheets from yellow poplar organosolv pulp, which mainly contains cellulose, but little hemicellulose and lignin. In this work, handsheets were prepared from steam exploded wheat straw, in which a significant proportion of hemicellulose and lignin still remains insoluble after pretreatment, and hence the effect of both components on the EH is considered. Handsheets, which can be made from a wide range of different lignocellulosic materials, present a homogeneous composition, resulting in a very suitable substrate for EH microassays.

Enzymatic microassays have been validated in 2 mL eppendorf tubes and 48-well microplates using pretreated wheat straw handsheets as substrate. Results obtained in the enzymatic microassays were compared for further validation with those obtained at larger scale with standard shake flask assays.

In this work, the microassay method has been adapted and validated to test enzymatic preparations using the whole slurry obtained after pretreatment, which represents a novel contribution with respect to previous microassay methods reported. It is well recognized that all sugars (not only glucose) contained in the pretreated slurry should be converted to ethanol to achieve an economical ethanol production process from lignocellulosic biomass. Therefore, EH and fermentation of the whole slurry containing soluble and insoluble carbohydrates is desirable. This objective becomes feasible since pentose-fermenting yeasts are being developed, applicable to the ethanol production processes.^{21,22} Integration of the whole slurry in the biomass-to-ethanol process entails additional advantages because there is no need to filter after pretreatment, and waste of water is diminished. On the other hand, if the whole slurry is employed, inhibitors released during SE pretreatment could have a negative effect on the EH²³ and subsequent fermentation.²⁴ This effect must be evaluated when addressing the use of new enzymatic mixtures.

EXPERIMENTAL

Enzymes

NS 50013, a cellulase preparation, and NS 50010, which mainly presents β -glucosidase activity, are enzyme preparations from Novozymes used for the microassay method validation. A mixture of both preparations was also used as control in the enzymatic microassays. Two novel enzymatic preparations have been evaluated using the microassay method: Accellerase 1000 from Genencor and NS 22074 from Novozymes. NS 22074 is identified as an enzyme preparation with global cellulase activity, and Accellerase 1000 is referenced as an enzyme complex containing multiple enzyme activities; mainly exoglucanase, endoglucanase, hemicellulase and β -glucosidase. Measurement of enzymatic activities, expressed in International Units (IU), was performed using different substrates to determine global and single activities. Overall cellulase activity was determined using Avicel and filter paper (Whatman No. 1 filter paper strips)²⁵ and β -Glucosidase activity was measured using ρ -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (ρ -NPG)²⁶ and cellobiose²⁵ as substrates. Xylanase activity was determined on xylan birch.²⁷ For protein content quantification in the preparations, BCA protein assay kit was used (Pierce Ref. 23225) using bovine serum albumin as standard. Table 1 shows the characterization of the enzymatic preparations.

Raw material and pretreatment

Wheat straw, selected as raw material for these experiments had the following composition (% dry weight): cellulose,

40.5; hemicellulose, 26.1 (xylan, 22.7; arabinan, 2.1; and galactan, 1.3); lignin, 18.1; ash, 5.1; and extractives, 14.6.

SE pretreatment was performed using Masonite technology in a 10 L reactor at 220 °C for 2.5 min. These conditions were established according to previous experiments based on optimal sugars recovery and EH yields.⁴ After pretreatment, one portion of the slurry was filtered to separate water insoluble solids (WIS) and the liquid fraction. Both slurry and washed WIS were used for the enzymatic hydrolysis assays. Chemical composition of raw and pretreated material was determined using the standard Laboratory Analytical Procedures for biomass analysis (LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-017 and LAP-019) provided by the National Renewable Energies Laboratory.²⁸

Sugars and degradation compounds contained in the liquid fraction were also measured. A mild acid hydrolysis (4% (v/v) H₂SO₄, 120 °C and 30 min) was used to determine the total amount of sugars in monomeric and oligomeric form.

Preparation of handsheets

Handsheets from steam pretreated wheat straw (WIS fraction) were made to obtain a homogeneous lignocellulosic substrate for EH tests. Approximately 60 g of WIS (80% humidity) were diluted to obtain a suspension of 1% (w/v) consistency. This mixture was homogenized in a disintegrator ISP (Mod. 692) for a total of 37 500 revolutions. 400 g of the suspension were used to prepare each handsheet according to Tappi rules²⁹ using a standard handsheet forming apparatus (ENJO 39.71) supplied by Papelquimia S.A. (Girona, Spain). Finally, handsheets were pressed for 5 min and dried at room temperature. Small substrate disks were easily perforated from the handsheets to be added in the microassays. Chemical composition of handsheets was determined as described above for raw and pretreated material composition analysis. Three different samples were taken from different parts of the sheet area.

Analytical methods

Sugar concentration was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, Mildford, MA) equipped with a 2414 refractive index detector (Waters). A Transgenomic CarboSep CHO-682 carbohydrates analysis column operated at 80 °C with deionized water as a mobile-phase (0.5 mL min⁻¹) was employed for the separation.

Furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), vanillin, 4-hydroxybenzaldehyde, coumaric acid and ferulic acid were analyzed by HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany), using an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) at 65 °C. As mobile phase, 89% 5 mmol L⁻¹ H₂SO₄ and 11% acetonitrile at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹ were used. For detection, a 1050 photodiode-array detector (Agilent, Waldbronn, Germany) was employed. Acetic and formic acid were also quantified by HPLC (Waters) with a 2414 refractive index detector (Waters). A Bio-Rad Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs) column maintained at 65 °C and a mobile phase (5 mmol L⁻¹ H₂SO₄) at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹.

Enzymatic hydrolysis

Flask assay procedure

Standard EH assays were performed in 100 mL shake flasks at pH 5, 50 °C and 150 rpm in a shaking incubator (CERTOMAT IS, 25 mm shaking amplitude) and using citrate buffer 0.05 mol L⁻¹. Samples were withdrawn at different times (3, 6, 24, 48 and 72 h), centrifuged and analyzed by HPLC. Substrate loading was 1% of

total solids (TS) (w/v) in experiments using WIS as substrate and 1.5 and 3.8% TS (w/v) in experiments with the whole slurry. Total assay volume was 25 mL. Enzymatic dosages for the enzymatic microassay validation were fixed at 15 FPU g⁻¹ cellulose (NS 50013) and 15 IU (on cellobiose) g⁻¹ cellulose (NS 50010).

Microassay procedure. WIS and Slurry

Microassays were performed in 2 mL eppendorf tubes and in 48 shallow-well microplates. The EH conditions in the microassay procedure were the same as in the flasks assays except for the agitation, which was adapted to the microplate incubator (ThermoStar, 3 mm shaking amplitude) and fixed to 800 rpm. The total working volume was 0.5 mL and all the experiments were performed in triplicate. Substrate disks obtained from handsheets weighed approximately 2.3 ± 0.1 mg and were manually distributed to the wells or eppendorf tubes. A small steel bead was added to facilitate mixing, and in the case of microplates, they were sealed with a sealing tape (NUNC, ref. 236707) to minimize evaporation loss.

Liquid fraction obtained after pretreatment was added to the eppendorf tubes or wells, together with the handsheets disks, to validate the microassay using the pretreated whole slurry. The liquid fraction was added in the same proportion as was determined in the original slurry.

Evaporation loss in microplate procedure

Evaporation loss during microplate procedure was measured experimentally by using a fixed glucose concentration and checking concentration change at different times (3, 6, 24, 48 and 72 h). The correction factor determined for the microplate procedure developed in this work was 0.0, 0.1, 1.4, 6.4 and 9.1% at 3, 6, 24, 48, 72 h, respectively. This correction factor was taken into account to analyze the results. Evaporation loss should be considered and recalculated in the case of changing any reaction parameters such as temperature or agitation because it may have a great influence on the results.

Evaluation of novel enzymatic preparations using enzymatic microassays

Enzymatic microassays were performed to evaluate two novel preparations from Novozymes and Genencor: NS 22074 and Accellerase 1000. A mixture of NS 50013 (33 mg protein g⁻¹ cellulose) and NS 50010 (3 mg protein g⁻¹ cellulose) was used as a control. These dosages are equivalent to 15 FPU g⁻¹ cellulose and 15 IU g⁻¹ cellulose, respectively. The enzyme dosage for NS 22074 and Accellerase 1000 was fixed at the same protein content: 36 mg protein g⁻¹ cellulose. The enzymatic microassays were run in 2 mL eppendorf tubes at 1.3% TS (w/v) substrate concentration using disks from the handsheets made of pretreated wheat straw. Samples were withdrawn at 3, 6, 24, and 48 h.

Calculations

EH yields were calculated as the ratio of glucose and/or xylose released divided by potential glucose and/or xylose content in WIS fraction. SPSS 11.5 software was used to elaborate analysis of variance (ANOVA) and identify differences among the conditions studied. ANOVA gives a statistical test of whether the means of several groups are all equal. The confidence level to identify statistically significant differences was 95.0%.

Table 2. Solid fraction (WIS) and handsheets composition (analysis in triplicate)

Component	WIS (% dry weight)	Handsheets (% dry weight)
Cellulose	66.4 ± 4.2	66.5 ± 0.1
Hemicellulose	3.7 ± 0.8	4.4 ± 0.1
Lignin	29.4 ± 4.3	28.1 ± 1.5
Ash	4.1 ± 0.5	4.55 ± 0.5

Table 3. Sugars composition in the liquid fraction after steam explosion pretreatment

Sugar content	Monomeric form (g L ⁻¹)	Oligomeric form (g L ⁻¹)	Total concentration (g L ⁻¹)
Glucose	0.7	2.7	3.4
Xylose	4.4	19.2	23.6
Galactose	0.2	0.4	0.6
Arabinose	0.4	0.4	0.8
Mannose	-	0.4	0.4

Table 4. Degradation products in the liquid fraction after steam explosion pretreatment

Compound	Concentration
Acetic acid (g L ⁻¹)	6.4
Formic acid (g L ⁻¹)	2.6
Furfural (g L ⁻¹)	1.8
5-HMF (g L ⁻¹)	0.4
4-hydroxybenzaldehyde (mg L ⁻¹)	14
Vanillin (mg L ⁻¹)	80
Coumaric acid (mg L ⁻¹)	50
Ferulic acid (mg L ⁻¹)	60

RESULTS AND DISCUSSION

Pretreated wheat straw composition

A slurry with a 23% (w/w) total solids content was recovered after pretreatment of the raw material. The insoluble solids (WIS) and the soluble solids content was 15.7% (w/w) and 7.3% (w/w), respectively.

As was mentioned, to obtain an appropriate homogeneous substrate for the microassays, handsheets were elaborated from WIS. Subsequently both materials (WIS and handsheets) composition (Table 2) was compared to check possible alterations occurring during handsheets formation. Interestingly, during the pretreatment 85% of the hemicellulose was solubilized resulting in a higher proportion of cellulose and lignin in the solid fraction compared with raw material. No significant differences were observed between WIS and handsheets composition. Cellulose content in WIS (66.4%) and handsheets (66.5%) was practically identical and carbohydrates and lignin contents were also very similar. Therefore, it could be concluded that handsheet preparation did not alter pretreated substrate composition and they could be used as real substrate for the enzymatic assays. Low variation in sample composition throughout the surface confirmed that handsheets present a homogeneous composition and therefore the disks can easily be cut to the desired size for distribution to the assaying vials.

The composition of the liquid fraction obtained after pretreatment was determined to identify the sugar content (Table 3) and the presence of potential inhibitors (Table 4). As can be observed in Table 3, a considerable part of the hemicellulosic sugars remain soluble as oligomers in the liquid fraction. After sulfuric-acid catalyzed hydrolysis, a significant amount of monomeric hemicellulosic sugars was recovered. Table 4 shows that acetic acid (6.4 g L⁻¹) formed from acetyl groups in hemicellulose and formic acid (2.6 g L⁻¹), from furfural and hydroxymethylfurfural degradation, are the most abundant compounds. Furfural (1.8 g L⁻¹) was formed due to pentose degradation and 5-HMF was originated from hexoses. Little 5-HMF was found due to low hexoses content in the wheat straw hemicellulose. Some phenolic compounds

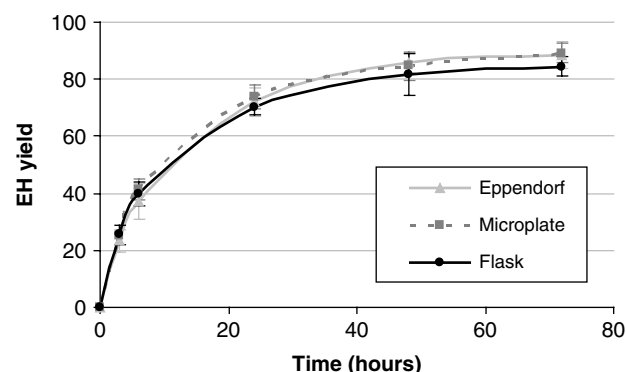


Figure 1. Effect of volume assay on EH yield using handsheets as substrate at 1% TS (w/v) of substrate loading and at 50 °C. Enzyme dosage: 15 FPU g⁻¹ cellulose (NS 50013) and 15 IU g⁻¹ cellulose (NS 50010).

were also determined as soluble solids in the prehydrolyzate. The inhibitory effect on enzymatic hydrolysis of degradation compounds generated during SE pretreatment has been investigated by different authors.^{23,30} High sugar concentration (mainly xylose), acetic acid and phenolic compounds were shown as main responsible for inhibition of enzymatic hydrolysis. In this work, screening tests using full-slurry hydrolyzates to assess the effect of soluble components produced in the pretreatment step on enzymatic performance have been developed.

Enzymatic microassays validation

Effect of volume assay

To test the effect of the volume assay using handsheets on glucose release during the EH, different experiments in eppendorf tubes (0.5 mL), 48-well microplates (0.5 mL) and 100 mL shaking flasks (25 mL) were performed. Figure 1 shows very comparable hydrolytic profiles in all experiments. ANOVA analysis did not show statistically significant differences between the means of the variables at the 95.0% confidence level, and therefore it could be concluded that the reduction of enzymatic reaction volume from 25 mL to 0.5 mL did not affect the EH yields.

Effect of substrate drying conditions

Further validation of the microassay required comparison of the results in microassays using handsheets with those obtained in shake flasks using WIS as substrate. Although the WIS fraction was not previously dried to prepare the handsheets, a final drying step is required in the handsheets formation. It has been reported

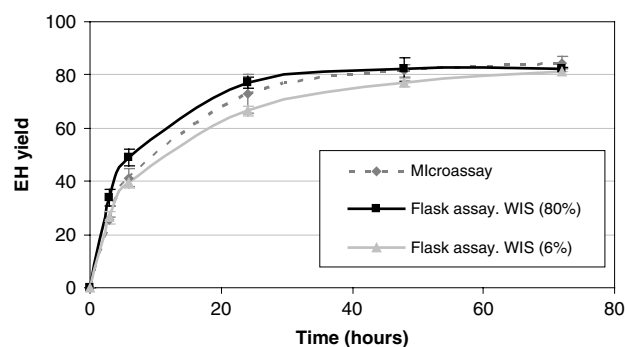


Figure 2. EH yields using WIS as substrate at 1% TS (w/v) of substrate loading and at 50 °C. Enzyme dosage: 15 FPU g⁻¹ cellulose (NS 50013) and 15 IU g⁻¹ cellulose (NS 50010).

that in non-dried materials, the capillaries maintain the humidity and the surface pores remain open, favouring the enzymatic attack. Through the drying process the water between the fibers disappears and the adjacent fibers become more tightly joined.^{31,32} To evaluate the effect of the drying step in handsheet preparation, both dried WIS at room temperature (6% humidity), and not dried WIS (80% humidity) were used for EH assays and results were compared with those obtained in microassays (in eppendorf vials). Figure 2 shows the negative effect of drying the WIS on the hydrolysis yield. At the beginning of the enzymatic hydrolysis process, higher glucose production in experiments not using dried WIS was found.

Nevertheless, it is observed that microassay hydrolysis profiles do not differ significantly from those obtained in standard flask assays with non-dried WIS. In fact, at longer times the EH yields became very similar in all experiments. These observations are supported by ANOVA analysis, showing no significant differences in the results after 24 h. No differences were observed either in xylose or cellobiose release (data not shown). In fact, cellobiose was present in very small amounts since high β -glucosidase dose was applied in the assay. According to these results, it could be concluded that handsheet formation did not have a relevant effect on substrate properties and therefore handsheets from pretreated wheat straw can be considered as an appropriate substrate for EH studies.

Slurry as EH media

Utilization of the pretreated whole slurry in the integrated bioconversion process entails different advantages. As was explained, during SE pretreatment a large portion of the hemicellulose is hydrolyzed to soluble low molecular weight sugars which remain in the liquid fraction. For integration into an industrial scale, it will be desirable to use both liquid and solid fractions of the pretreated lignocellulosic material.³³ Enzymatic microassays were adapted with the purpose of studying different enzymatic preparations using the slurry as EH media. Microassays (in eppendorf vials) and standard flask assays on slurry were run simultaneously to compare the hydrolysis results. As explained previously, when using slurry in microassays, liquid fraction was added to the wells containing handsheets disks to simulate the slurry composition.

It is known that a number of soluble compounds produced during the pretreatment are potentially toxic or inhibitory to cellulases.^{23,30} To avoid underestimating the inhibitory effect using low slurry loading, two different solid concentrations were

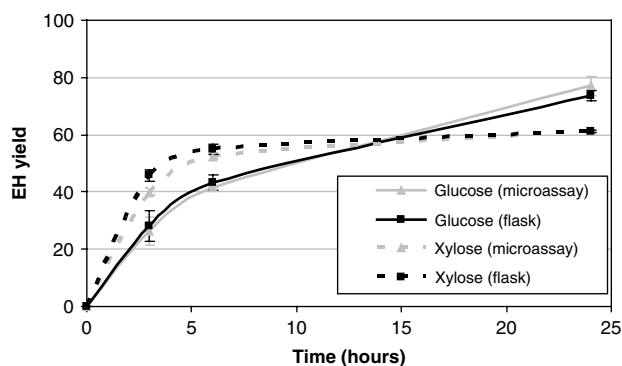


Figure 3. EH yields (glucose and xylose) with slurry as EH media and at 1.5% TS (w/v) of substrate loading and at 50 °C. Enzyme dosage: 15 FPU g⁻¹ cellulose (NS 50013) and 15 IU g⁻¹ cellulose (NS 50010).

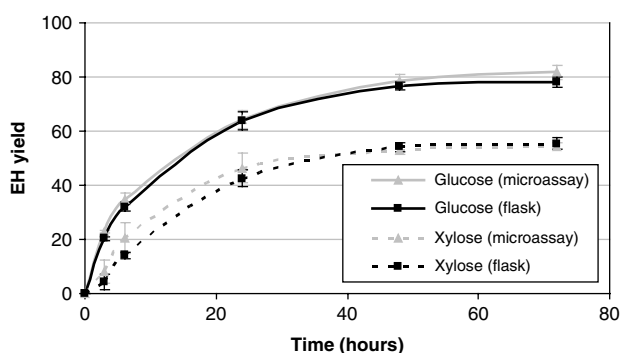


Figure 4. EH yields (glucose and xylose) with slurry as EH media. 3.8% TS (w/v) of substrate loading and at 50 °C. Enzyme dosage: 15 FPU g⁻¹ cellulose (NS 50013) and 15 IU g⁻¹ cellulose (NS 50010).

assayed: 1.5% and 3.8% TS (w/v). The microassays were performed in eppendorf vials and the results of these experiments are shown in Figs 3 and 4, for 1.5% and 3.8% TS (w/v), respectively. Hydrolysis profiles (glucose and xylose production) were similar at the two substrate concentrations and no differences were observed on cellobiose production which again was present in very small amount due to high β -glucosidase activity (data not shown). ANOVA analysis was performed and showed no significant differences between standard and micro-scale assays at any sampling time. These results allowed validation of the enzymatic microassay method to test enzymatic preparations using the whole slurry as EH media.

Evaluation of novel enzymatic preparations using enzymatic microassays

The enzymatic preparations NS 22074, Accellerase 1000 and a control mixture of NS50013 and NS 50010 (included in the study for comparison) were evaluated using enzymatic microassays and handsheets of pretreated wheat straw (WIS) as substrate. Figure 5 shows EH yields obtained with the enzymatic preparations and the control. Results show the ability of the microassays to differentiate the most effective enzyme mixtures. Although relatively high yields were reached with all the preparations, it was observed that NS 22074 and Accellerase 1000 improved the EH yields at all the sampling times with respect to the control mixture. The best results were achieved with the preparation NS 22074 from Novozymes obtaining yields of 91% and 95% of cellulose conversion at 24 and

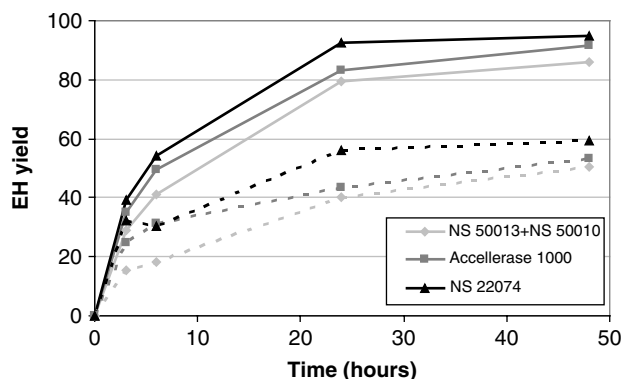


Figure 5. EH yields with different enzyme preparations at 1.3% TS (w/v) of substrate loading and at 50 °C. Glucose (continuous lines). Xylose (discontinuous lines). Enzyme dosage: 36 mg protein g⁻¹ cellulose.

48 h, respectively. Xylose production was also higher when using NS 22074 and Accellerase 1000. Higher specific cellulase activity as well as higher β -glucosidase activity in the novel preparations would explain this better performance under these conditions (see Table 1). Due to high β -glucosidase activity in both NS 22074 (716.9 U mL⁻¹) and Accellerase 1000 (415.2 U mL⁻¹), no cellobiose was practically accumulated in the assay medium, which shows that supplementation with extra β -glucosidase was not necessary. Moreover, xylanase activity present in the preparations would help to hydrolyze the hemicellulose fraction and make cellulose more accessible to cellulases by increasing available surface area. In general, activities characterization of the enzymes and results obtained in enzymatic microassays using real lignocellulosic substrates can provide very interesting information to optimize the enzymatic hydrolysis process.

CONCLUSIONS

Development of a commercially-viable bioconversion process from lignocellulose biomass to ethanol includes the optimization and evaluation of different enzyme preparations. In this study, enzymatic microassays have been developed to evaluate the performance of different enzymes on the EH of pretreated wheat straw. Results obtained in enzymatic microassays were comparable with those from standard procedures in shake flasks. The preparation of a homogeneous substrate from steam-exploded wheat straw helps to overcome the problem associated with the use of highly heterogeneous substrates in enzymatic hydrolysis assays, and was shown to be appropriate at small scale.

In a full-scale process it is crucial to reach high sugar and ethanol concentrations in order to decrease the energy demand in the downstream process. To increase the sugar concentration during large-scale operation, it is assumed that the whole slurry after pretreatment should be used without introducing separation steps. Since the new low-cost cellulases should be integrated in a SSCF (simultaneous saccharification and co-fermentation) process, the enzyme quality and performance must be tested in the presence of soluble sugars and inhibitory compounds present in the whole slurry. In this context, the microassay was also adapted to assay the EH using the whole slurry obtained after pretreatment.

In summary, this methodology represents a technical advance by increasing the number of conditions that can be tested rapidly and is applicable for screening of cellulase preparations and test enzyme supplementation. In this work, a microassay method

has been applied to evaluate two novel enzyme preparations from Novozymes (NS 22074) and Genencor (Accellerase 1000), showing the ability of microassays to discriminate between enzymatic preparations. Since the cost and hydrolytic efficiency of enzymes are major factors that restrict the commercialization of biomass bioconversion processes, these methods offer an interesting approach to facilitate the selection of appropriate enzyme configurations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by 'Abengoa Bioenergy New Technologies' within the CENIT I+DEA Project financed by CDTI (Spanish Ministry of Science and Innovation).

The enzymatic preparations used in this work have been kindly provided by Novozymes (Denmark) and Genencor (USA).

The authors thank Dr Helena De la Fuente at the Chemical Engineering Department in Complutense University of Madrid for providing handsheets formation equipment and giving expert assistance.

REFERENCES

- Kim S and Dale BE, Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy* **26**:361–375 (2004).
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M and Negro MJ, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour Technol* **101**:4851–4861 (2010).
- Brownell HH and Saddler JN, Steam-explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* **14**:54–68 (1984).
- Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P and Ballesteros M, Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* **130**:496–508 (2006).
- Sun Y and Cheng J, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* **83**:1–11 (2002).
- Himmel ME, Adney WS, Baker JO, Nieves RA and Thomas SR, Cellulases: structure, function, and applications, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, ed. by Wyman CE. Taylor & Francis, pp. 143–161 (1996).
- Jørgensen H, Kristensen JB and Felby C, Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod Bioresour* **1**:119–134 (2007).
- Väljamaä P, The kinetics of cellulose enzymatic hydrolysis: implications of synergism between enzymes. Thesis Dissertation, Faculty of Sciences and Technology, Uppsala University (2002).
- García Aparicio MP, Ballesteros M, Manzanares P, Ballesteros I, González A and Negro MJ, Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl Biochem Biotechnol* **136–140**:353–365 (2007).
- Kumar R and Wyman CE, Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog* **25**:302–314 (2009).
- Ohgren K, Bura R, Saddler J and Zacchi G, Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour Technol* **98**:2503–2510 (2007).
- Gusakov AV, Salanovich TN, Antonov AI, Ustinov BB, Okunev ON, Burlingame R, et al, Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng* **97**:1028–1038 (2007).
- Zhou J, Wang YH, Chu J, Luo LZ, Zhuang YP and Zhang SL, Optimization of cellulase mixtures for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically design experiments. *Bioresour Technol* **100**:819–825 (2008).
- Banerjee G, Scott-craig JS and Walton JD, Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioeng Res* **3**:82–92 (2010).
- Merino ST and Cherry J, Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **108**:95–120 (2007).

- 16 Boisset C, Pétrequin C, Chanzy H, Henrissat B and Lein M, Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng* **72**:339–345 (2001).
- 17 Medve J, Karlsson J, Lee D and Tjerneld F, Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnol Bioeng* **59**:621–634 (1998).
- 18 Berlin A, Maximenko V, Bra R, Kamg KY, Gilkes N and Saddler J, A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Bioeng* **93**:880–886 (2005).
- 19 Chundawat SPS, Balan V and Dale BE, High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Bioeng* **99**:1281–1294 (2008).
- 20 Kim ES, Lee HJ, Bang WG, Choi IG and Kim KH, Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng* **102**:1342–1353 (2009).
- 21 Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I and Gorwa-Grauslund MF, Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Biochem Biotechnol* **74**:937–953 (2007).
- 22 Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M and Olsson L, Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol Bioeng* **100**:1122–1131 (2008).
- 23 García-Aparicio M, Ballesteros I, González A, Oliva JM, Ballesteros M and Negro MJ, Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* **129**:278–288 (2006).
- 24 Palmqvist E and Hahn-Hägerdal B, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technol* **74**:25–33 (2000).
- 25 Ghose TK, Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* **59**:257–268 (1987).
- 26 Bailey MJ and Nevalainen KMH, Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme Microbiol Technol* **3**:153–157 (1981).
- 27 Bailey MJ, Biely P and Poutanen K, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* **23**:257–270 (1991).
- 28 NREL: National Renewable Energy Laboratory, Chemical analysis and testing laboratory analytical procedures. Golden CO. www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html (2007).
- 29 Tappi, Tappi test methods. Tappi T205 SP-02, Tappi T218 SP-02 (2006).
- 30 Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A and Alfani F, Effect of inhibitors release during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnol Prog* **20**:200–206 (2004).
- 31 Esteghlalian AR, Svivastava V, Gilkes N, Gregg DJ and Saddler JN, An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks, in *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*, ed by Himmel ME, Baker W and Saddler JN. American Chemical Society, USA, pp. 100–111 (2001).
- 32 Hendriks ATWM and Zeeman G, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* **100**:10–18 (2009).
- 33 Tomás-Pejó E, Oliva JM and Ballesteros M, Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J Sci Ind Res* **67**:874–884 (2008).



Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw

P. Alvira*, M.J. Negro, M. Ballesteros

CIEMAT-Renewable Energies Division, Biofuels Unit, Av. Complutense 22, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2010

Received in revised form 28 December 2010

Accepted 30 December 2010

Available online 5 January 2011

Keywords:

Enzymatic hydrolysis

Hemicellulases

Wheat straw

Steam explosion

ABSTRACT

The cost and hydrolytic efficiency of enzymes are major factors that restrict the commercialization of the bioethanol production process from lignocellulosic biomass. Hemicellulases and other accessory enzymes are becoming crucial to increase enzymatic hydrolysis (EH) yields at low cellulase dosages. The aim of this work was to evaluate the effect of two recombinant hemicellulolytic enzymes on the EH of steam pretreated wheat straw. Pretreatments at two severity conditions were performed and the whole slurry obtained after steam explosion pretreatment was employed as substrate. An endoxylanase (Xln C) from *Aspergillus nidulans* and an α -L-arabinofuranosidase (AF) from *Aspergillus niger*, have been applied in combination with cellulase enzymes. A degree of synergism of 29.5% and increases up to 10% in the EH yields were obtained, showing the potential of accessory activities to improve the EH step and make the whole process more effective.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ethanol from lignocellulosic biomass has become a real alternative to be developed as fuel. The process is based on the utilization of carbohydrates contained in plant cell walls in a biological conversion process to produce ethanol. Among lignocellulosic materials, wheat straw is an abundant raw material that can be considered as a waste material; about 60% of its world production could be directed to energetic purposes (Kim and Dale, 2004). Ethanol production using enzymatic hydrolysis (EH) requires a preliminary pretreatment to increase cellulose accessibility to the enzymes (Wyman et al., 2005). Among different pretreatment methods developed to date, steam explosion (SE) is considered an appropriate method for herbaceous biomass (Alvira et al., 2010b). After pretreatment, EH and fermentation are performed separately or simultaneously to obtain ethanol as final product (Alfani et al., 2000).

The cost and hydrolytic efficiency of enzymes employed during the EH are major factors that restrict the commercialization of bioethanol production from lignocellulose. Different enzymatic activities are involved in the complete hydrolysis of carbohydrates contained in lignocellulosic biomass. To convert cellulose into glucose three enzymatic activities are required; endoglucanases hydrolyze internal β -1,4-glucosidic bonds in the cellulose chain, cellobiohydrolases cleave off cellobiose units from the end of the chain and β -glucosidase converts cellobiose into glucose (Himmel

et al., 1996). These enzymes work synergistically to hydrolyze cellulose by creating new accessible sites and relieving product inhibition (Jørgensen et al., 2007; Våljamaä, 2002).

Apart from cellulose, the complex structure of lignocellulose contains a significant proportion of hemicellulose and lignin (20–30% and 15–20%, respectively in wheat straw (Prasad et al., 2007)), which have a great effect on the EH process. It has been reported that the presence of hemicellulose in lignocellulosic feedstocks, even in low quantities, can prevent cellulases to degrade the cellulose efficiently (García-Aparicio et al., 2007; Öhgren et al., 2007). Additionally, it is recognized that all sugars (not only glucose) contained in the pretreated substrate should be converted to ethanol by hexose and pentose fermenting yeasts to achieve an economically viable ethanol production process (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Tomás-Pejó et al., 2008). In this context, an efficient hydrolysis of the hemicellulosic fraction becomes crucial and supplementation with hemicellulolytic and other accessory enzymes have the potential to increase EH yields and reduce the enzyme dosages and costs.

Utilization of the whole slurry obtained after SE pretreatment entails different advantages and disadvantages: separation and washing process can be avoided diminishing energy and water consumption, and the amount of potential fermentable sugars increases. On the other hand, inhibitors released during SE pretreatment could have a negative effect on the EH (Cantarella et al., 2004; García-Aparicio et al., 2006) and subsequent fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). In general, more severe conditions imply enhanced accessibility of fibers to enzymatic attack, but also increased degradation and loss of sugars as well as higher

* Corresponding author. Tel.: +34 913466054; fax: +34 913460939.

E-mail address: pablo.alvira@ciemat.es (P. Alvira).

formation of compounds potentially toxic for microorganisms (Cantarella et al., 2004; Kabel et al., 2007). Severity reduction makes the pretreatment step more economically viable, but often results in less digestibility of biomass, mostly related to the decrease in hemicellulose removal. Hemicellulases may have an important role to maintain high sugar conversion rates when pretreatment severity conditions are reduced to diminish the costs and losses of sugar associated to the SE pretreatment.

Considering the high variability of hemicellulose, the structural modifications of insoluble residual fragments and the wide range of oligomers produced during the pretreatment, the role of hemicellulases in the EH of pretreated lignocellulosic biomass becomes a challenge. Hemicellulases involved in herbaceous biomass hydrolysis include endoxylanases, xylosidases, esterases and arabinosidases. These enzymes work in concert and their synergistic effect on hemicellulose degradation is being widely studied. Xylanase and β -xylosidase supplementation has been reported to improve EH of corn stover pretreated by different technologies (Li et al., 2010; Öhgren et al., 2007; Kumar and Wyman, 2009). Xylanase positive effect was also observed on the EH of steam pretreated substrates as barley straw (García-Aparicio et al., 2007) or spruce (Várnai et al., 2010) even when xylan content was low. Tabka et al. (2006) showed a synergistic action of cellulase, xylanase and feruloyl esterase on the enzymatic saccharification of wheat straw. A synergistic action of α -L-arabinofuranosidase with hemicellulolytic enzymes has been also shown in the degradation of agricultural residues (Raweesri et al., 2008).

In wheat straw hemicellulose on average 11 out of 100 xylose residues are linked to an arabinose (Kabel et al., 2007). Hydrothermal pretreatments such as SE usually remove arabinose from the xylan backbone, however certain amount of arabinose can remain linked to xylan or to xylooligomers in the pretreated material. These arabinose residues may hinder the action of endoxylanase catalyzing internal breakdown of the xylan chain. α -L-arabinofuranosidases remove arabinose residues, favouring xylan debranching and degradation but also helps to disrupt lignin–carbohydrate binding since arabinose residues are believed to take part in lignin–hemicellulose ether bonds (Sun et al., 2005). Efficient hydrolysis and removal of hemicellulosic fraction could have a synergistic effect by increasing accessibility of cellulases to the cellulose fibres and improving the EH process, making possible a reduction of the enzyme dosages.

In this work, two recombinant hemicellulolytic enzymes; an endoxylanase (Xln C) and an α -L-arabinofuranosidase (AF) have been studied in combination with low dosages of commercial cellulase enzymes to evaluate their effect and potential application on the EH of the whole slurry obtained from SE pretreatment of wheat straw.

2. Methods

2.1. Enzymes

Two recombinant hemicellulolytic enzymes were studied: an endoxylanase (XlnC) from *Aspergillus nidulans* (Fernández-Espinar et al., 1992; Pérez-González et al., 1996) and an α -L-arabinofuranosidase (AF) from *Aspergillus niger* (Sánchez-Torres et al., 1996), which were kindly supplied by Biopolis S.L. (Spain). Both enzymes were expressed heterologously and produced in *Saccharomyces cerevisiae* strains under the control of a constitutive yeast promoter, resulting in the construction of recombinant xylanolytic yeast strains.

Three commercial cellulase mixtures were used to evaluate the effect of hemicellulolytic enzymes supplementation. A mixture NS 50013 and NS 50010, both from Novozymes, was employed. NS

50013 is a cellulase preparation which presents low β -glucosidase activity; therefore extra supplementation with NS 50010, which mainly presents β -glucosidase activity, is typically applied in bioconversion processes to produce ethanol. In addition, two novel cellulase preparations from Novozymes (Cellic CTEC) and Genencor (Accellerase 1500) have been studied in supplementation assays with XlnC and AF.

Measurement of enzymatic activities, expressed in International Units (IU), was performed using different substrates to determine global and single activities. Overall cellulase activity was determined using filter paper (Whatman No. 1 filter paper strips) and β -glucosidase activity was measured using cellobiose (Ghose, 1987) as substrate. Xylanase activity was determined on 30 g/L xylan birch (Bailey et al., 1991); and β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activity were measured, respectively, using 2 g/L p -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (p NPX) and 2 g/L p -nitrophenyl- β -D-arabinofuranoside (p NPA), both methods slightly modified from Poutanen et al. (1987). For protein content quantification in the preparations, BCA protein assay kit (Pierce Ref. 23225) was used using bovine serum albumin as standard.

2.2. Raw material and steam explosion pretreatment

SE pretreatment of wheat straw milled at 10 mm was carried out in a 10 L reactor at two different conditions: 220 °C, 2.5 min and 210 °C, 2.5 min. These conditions were selected according to previous optimization studies developed at CIEMAT based on optimal sugars recovery and EH yield (Ballesteros et al., 2006). For analytical purposes, the whole slurry was filtered to obtain a solid fraction, which was thoroughly washed with tap water to obtain the water insoluble solids (WIS) fraction, and a liquid fraction. Chemical composition of both raw and pretreated material (WIS fraction) was determined using the standard Laboratory Analytical Procedures for biomass analysis (LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-017 and LAP-019) provided by the National Renewable Energy Laboratory (NREL, 2007). Sugars and degradation compounds contained in the liquid fraction were also measured. A mild acid hydrolysis (4% (v/v) H₂SO₄, 120 °C and 30 min) was performed to determine the total amount of sugars in monomeric and oligomeric form.

2.3. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic microassays were carried out in 2 mL eppendorf tubes. The EH conditions were fixed in a microplate incubator (ThermoStar, 3 mm shaking amplitude) at 50 °C and 800 rpm, using citrate buffer 0.05 mol/L at pH 5. The total working volume was 0.5 mL and all the experiments were performed in triplicate. Wheat straw pretreated at 220 °C and 2.5 min was applied at 3.8% total solids (TS) (w/w) substrate concentration. Substrate disks obtained from handsheets made of pretreated wheat straw were used as substrate and liquid fraction obtained after pretreatment was added to the eppendorf tubes to obtain the same concentration as the original slurry. After 72 h the EH was stopped and the samples were centrifuged and analyzed for sugar concentration. Additional details about the validation of the enzymatic microassay method and handsheets preparation are available in Alvira et al. (2010a). The same conditions (3.8% TS (w/w), 50 °C, citrate buffer pH 5) were repeated for enzymatic assays using pretreated wheat straw at 210 °C and 2.5 min as substrate.

High solids content assays at a substrate loading of 10% TS (w/w) were performed in shaking flasks using the whole slurry from wheat straw pretreated at 210 °C and 2.5 min. Enzymatic assays were performed in 100 mL shake flasks using citrate buffer 0.05 mol/L at pH 5, 50 °C and 150 rpm in a shaking incubator (CERTOMAT IS, 25 mm shaking amplitude). Samples were with-

drawn at 3, 24, and 72 h, centrifuged and analyzed for sugar concentration.

According to previous experiments (not shown) a dosage of 100 IU xylanase/g cellulose was established for XlnC, which corresponds to 2 mg protein (in the freeze-dried culture)/g cellulose. In case of AF, the dosage was fixed to 15 IU α -L-arabinofuranosidase/g cellulose corresponding to 4.5 mg protein/g cellulose.

A combination of NS 50013 and NS 50010 was used as cellulase mixture. A relatively low dosage was fixed for the enzymatic assays: 5 FPU/g cellulose (NS 50013) and 5 IU β -glucosidase/g cellulose (NS 50010). This mixture results in a dosage of \sim 6 FPU/g cellulose which corresponds to a total protein loading of 13 mg/g cellulose. For the supplementation assays of Cellic CTEC and Accellerase 1500 with the enzymes XlnC and AF it was also used a dosage of 5 FPU/g cellulose, which corresponds to 10 and 8.2 mg protein/g cellulose, respectively.

2.4. Analytical methods and calculations

Sugar concentration in the samples withdrawn at different times was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a device (Waters, Milford, MA) equipped with a 2414 refractive index detector (Waters). A Transgenomic CarboSep CHO-682 carbohydrate analysis column operated at 80 °C with deionized water as a mobile-phase (0.5 mL/min) was employed for the separation.

Furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) were analyzed by HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany), using an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) at 65 °C equipped with a 1050 photodiode-array detector (Agilent, Waldbronn, Germany). As mobile phase, 89% 5 mmol/L H₂SO₄ and 11% acetonitrile at a flow rate of 0.7 mL/min were used.

Acetic and formic acid were also quantified by HPLC (Waters) using a 2414 refractive index detector (Waters) and a Bio-Rad Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs) column maintained at 65 °C with a mobile phase (5 mmol/L H₂SO₄) at a flow rate of 0.6 mL/min.

EH yields were calculated as the ratio of the glucose (and cellobiose) released divided by potential glucose content in the pretreated material expressed by percentage. A “degree of synergism” of two enzymes (XlnC and AF) was calculated as the ratio of the increase produced separately by the two enzymes, and the increase produced by the mixture, expressed in percentage.

Mean values and standard deviations were calculated from the triplicates to present the results. Software Statgraphics Plus 5.0 was used to carry out Tukey HSD tests and identify statistically significant differences among different treatments at a confidence level of 95%.

3. Results and discussion

3.1. Enzyme characterization

The enzyme preparations were characterized by measuring different enzymatic activities and protein concentration. Specific

enzyme activities and protein content are shown in Table 1. It was observed that XlnC and AF did not have side activities apart from their respective endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase activity; XlnC presented 46.7 IU xylanase/mg protein while AF presented 3.4 IU α -L-arabinofuranosidase/mg protein.

Cellulase preparations were also characterized. Higher cellulase (FPU) and specially β -glucosidase activities were detected in novel preparations (Cellic CTEC and Accellerase 1500) with respect to the former preparation NS 50013, which was necessarily supplemented with extra β -glucosidase (NS 50010). These enzymes preparations present some xylanase activity, but practically no α -L-arabinofuranosidase activity was detected in any cellulase preparation.

3.2. Raw material and pretreated wheat straw composition

Wheat straw had the following composition (% dry weight): cellulose, 40.5; hemicellulose, 26.1 (xylan, 22.7; arabinan, 2.1; and galactan, 1.3); lignin, 18.1; ash, 5.1; and extractives, 14.6. Two different pretreatment conditions were carried out, and subsequently two different substrates with different composition were obtained for the EH supplementation assays. Table 2 shows WIS and liquid fraction compositions. WIS pretreated at 220 °C contained higher proportion of cellulose (66.4%) since a significant proportion of hemicellulose fraction is hydrolyzed and degraded during the pretreatment. In the liquid fraction 3.4 g/L glucose and 23.6 g/L xylose were recovered, however a significant amount was degraded as can be deduced from the concentration of HMF (0.4 g/L, derived from hexoses) and furfural (1.8 g/L, derived from pentoses). Formic acid, coming from HMF and furfural degradation, was also present in the liquid from the pretreatment at 220 °C at a concentration of 2.6 g/L. Acetic acid (6.4 g/L) was produced from acetyl groups contained in the hemicellulose structure.

In case of pretreatment at lower severity (210 °C), higher proportion of hemicellulose (12.1%) remained in the insoluble fraction and less degradation of sugar was observed. Compared to the substrate pretreated at 220 °C the concentration of degradation products diminished: 0.7 g/L furfural, 0.2 g/L HMF, 4.0 g/L acetic acid and 1.7 g/L formic acid.

3.3. Effect of XlnC and AF supplementation on 220 °C–2.5 min pretreated substrate

The enzymatic mixture of NS 50013 and NS 50010 was supplemented, separately and in combination, with the enzymes XlnC and AF. After 72 h of EH it was observed that both accessory enzymes, applied separately, improved the sugar release compared to the control mixture (Fig. 1). Interestingly, the highest EH yields were obtained when supplementing with both enzymes. XlnC and AF supplementation not only improved xylose and arabinose production but also glucose, which shows the ability of these enzymes to improve cellulose digestibility and make the hydrolysis process more efficient. Several studies reported a strong relation between xylan removal and the extent of glucan digestion (Kumar and Wyman, 2009). Two hypothesized mechanisms are: enhanced accessi-

Table 1
Protein content and specific activities (IU/mg protein) of the different enzymes.

	Protein content ^a	Cellulase (FPU/mg)	β -Glucosidase (CBU/mg)	Xylanase (IU/mg)	β -Xylosidase (IU/mg)	α -L-arabinofuranosidase (IU/mg)
Xylanase C	15.7 \pm 1.4 ^a	<0.1	<0.1	46.7	<0.1	<0.1
α -L-arabinofuranosidase	15.8 \pm 0.6 ^a	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	3.4
NS 50013	140.2 \pm 5.1	0.44	0.08	0.87	0.35	0.14
NS 50010	188.7 \pm 8.1	<0.1	4.29	0.22	0.06	<0.1
Accellerase 1500	114.0 \pm 5.6	0.50	1.31	0.66	0.06	<0.1
Cellic CTEC	193.3 \pm 19.4	0.61	5.75	0.97	0.33	0.18

^a Protein content of XlnC and AF is expressed as mg/g of freeze-dried culture while other enzymes content are expressed as mg/mL of preparation.

Table 2

Composition of SE pretreated wheat straw at 220 °C, 2.5 min and 210 °C, 2.5 min (WIS and liquid fraction).

Pretreatment conditions	220 °C, 2.5 min	210 °C, 2.5 min		
Total solids (%)	23.0	29.4		
Insoluble solids	15.7	23.4		
Soluble solids	7.3	6.0		
<i>WIS fraction content (%)</i>				
Cellulose	66.4 ± 4.2	49.7 ± 1.1		
Hemicellulose	3.7 ± 0.8	12.1 ± 0.8		
Xylan	3.6 ± 0.6	10.5 ± 0.4		
Arabinan	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1		
Others	–	1.2 ± 1.2		
Lignin	29.4 ± 4.3	31.8 ± 0.3		
Ash	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.2		
<i>Liquid fraction content (g/L)</i>				
Glucose	0.7	2.7	1.3	2.0
Xylose	4.4	19.2	2.7	20.7
Arabinose	0.2	0.4	1.0	0.5
Galactose	0.4	0.4	0.5	0.9
Mannose	–	0.4	0.3	–
<i>Degradation products</i>				
Furfural		1.8		0.7
HMF		0.4		0.2
Acetic acid		6.4		4.0
Formic acid		2.6		1.7

bility of glucan chains due to xylan removal, and disruption of xylan linkages to glucan. Unfortunately these hypotheses are difficult to prove experimentally due to the complex nature of biomass. Xylan accessibility could in turn be limited by the presence of glucan microfibrils.

Regarding glucose a concentration of 11.3 mg/mL and a degree of synergism of 29.5% were determined. Compared to the control assay glucose, xylose and arabinose production increased in 19.5%, 18.6% and 22.1%, respectively after 72 h. These differences were supported statistically by Tukey HSD analysis with a confidence level of 95%. EH yield, referred as glucan conversion, was

9.9% higher when supplementing with XlnC and AF compared to the EH yield obtained with the control mixture and reached 58% at the end of the process.

The synergistic effect can be explained since AF removes arabinose residues from xylan chain creating more binding sites for endoxylanases. The arabinose molecules are believed to block the access to bonds β -1,4 in xylan chain (Raweesri et al., 2008). In addition, endoxylanase action could cause an increase in the accessibility of AF to the arabinose residues. A more effective degradation of hemicellulolytic matrix implies higher EH yields of cellulose. WIS pretreated at 220 °C presented a very small arabinose content, which suggests that AF effect was also significant on the EH of soluble oligomers present in the whole slurry (0.4 g/L arabinose in oligomeric form). In addition, it has been reported that xylooligomers have a higher inhibitory effect on the cellulase enzymes than monomeric sugars (Kumar and Wyman, 2008; Qing et al., 2010). Hydrolysis of these oligomers would lead to increase arabinose and xylose production and diminish a possible inhibitory effect. Results using the WIS fraction as substrate (not shown in this work) showed a less positive effect of XlnC and AF supplementation, which supports the activity of these enzymes on the soluble oligomers present in the slurry.

Once the positive effects of XlnC and AF were observed, the supplementation of two novel commercial preparations, Cellic CTEC and Accellerase 1500, was studied. As can be observed in Table 1 these mixtures show an insignificant proportion of α -L-arabinofuranosidase activity. These preparations are produced by strains of *Trichoderma* spp., which secrete a wide variety of enzymes involved in lignocellulose degradation including cellulases, xylanases, arabinosidases and β -xylosidase (Banerjee et al., 2010). However some of these activities are expressed in very low level, making difficult the evaluation of their effects on lignocellulose deconstruction. At the assay conditions (5 FPU/g cellulose), Accellerase 1500 and Cellic CTEC provide, respectively, 0.2 and 1.1 IU α -L-arabinofuranosidase activity and; 6.6 and 8.0 IU xylanase per gram of cellulose.

AF (15 IU/g cellulose) and XlnC (100 IU/g cellulose) were supplemented to Accellerase 1500 and Cellic CTEC and the results clearly showed that higher proportion of both activities improved the EH of pretreated wheat straw. Fig. 2 shows the EH profiles of control and supplementation assays. In general, XlnC and AF addi-

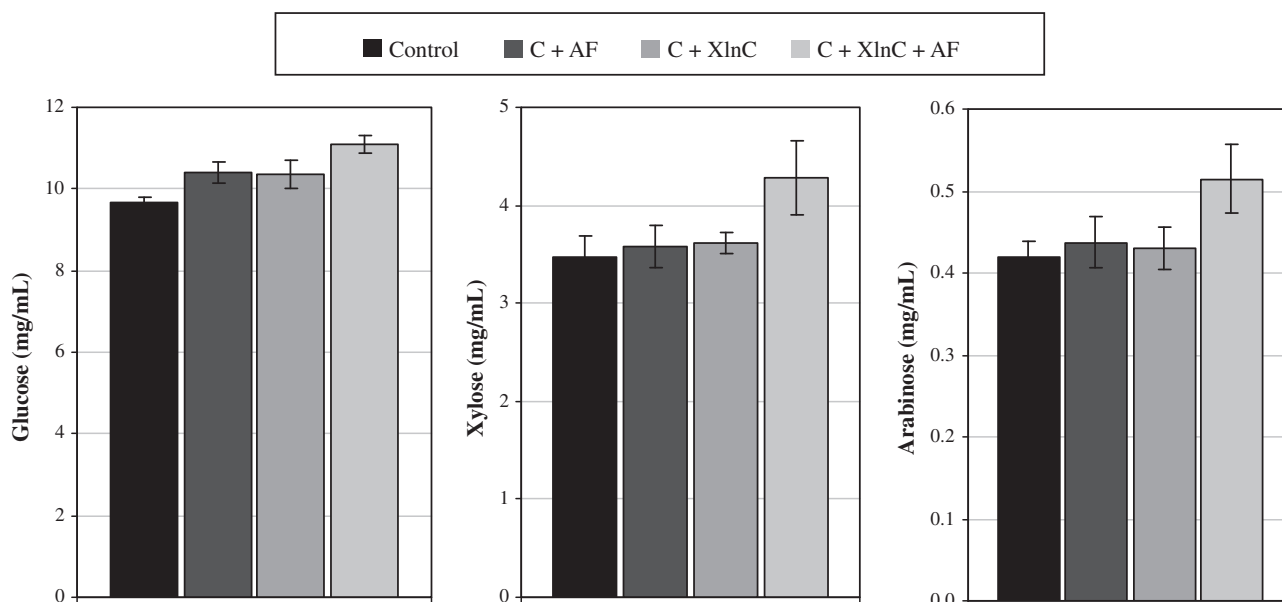


Fig. 1. Glucose, xylose and arabinose production in EH supplementation assays at 50 °C for 72 h. Substrate pretreated at 220 °C and 2.5 min.

tion resulted in higher production of xylose and especially glucose. Glucose production increased in 35.5% and 29.4% in case of Accellerase 1500 and Cellic CTEC, respectively, compared to the non-supplemented control. The EH yield (glucan) with respect to the control was 10.4% higher for Accellerase 1500 supplementation and 6.7% higher when Cellic CTEC was used. Less difference were observed in xylose production. XlnC and AF supplementation of Cellic CTEC resulted in slightly higher concentration, however these differences were not significant at 95% confidence level according to Tukey HSD test. In case of Accellerase 1500 xylose production showed a statistically significant increase.

The results show the potential of accessory activities such as endoxylanase or α -L-arabinofuranosidase, which are present in small proportions in commercial cellulase preparations, to improve the EH step and make the whole process more effective.

3.4. XlnC and AF supplementation on less severely pretreated substrate (210 °C, 2.5 min)

The potential of XlnC and AF supplementation was also studied using pretreated wheat straw at milder conditions: 210 °C and 2.5 min. Application of hemicellulases has the potential to reach high sugar conversion rates when the pretreatment severity condi-

tions are reduced to diminish loss of sugars and process costs. At these conditions a significant proportion of hemicellulose remains in the insoluble fraction (Table 2) and therefore the cellulase attack may be hindered. The hemicellulases could act synergistically to remove hemicellulose and enhance cellulose accessibility.

Figs. 3 and 4 show glucose and xylose production during the supplementation EH assays using different enzyme preparations (the mixture of NS 50013 and 50010, Accellerase 1500 and Cellic CTEC) and the substrate pretreated at 210 °C, 2.5 min. As a general trend it was observed that AF and XlnC, supplemented separately, increased the xylose and glucose production. In this case using a substrate with higher content of xylan, XlnC supplementation resulted in more significant improvement than AF supplementation. Endoxylanase supplementation had a positive effect when using the two substrates employed in this work, which showed different hemicellulose content. It was previously reported that xylanase supplementation improves the EH in pretreated materials with low xylan content, which shows the crucial role of hemicellulose structure and location even at low quantities (García-Aparicio et al., 2007). Xylanase activity could also be effective on the degradation of the soluble xylooligomers present in the slurry. These results illustrate that higher xylanase activity improves the EH yields for pretreated wheat straw.

The highest xylose and glucose production were obtained when XlnC and AF were supplemented simultaneously (Figs. 3 and 4). At 72 h, supplementation of the NS 50013–NS 50010 mixture, Accellerase 1500 and Cellic CTEC with XlnC and AF increased glucose production in 38.9%, 42.5% and 25.1%, respectively. EH yields (glucan) were 15.2%, 15.1% and 11.1% higher compared to non-supplemented preparations. Regarding xylose production, supplementation resulted in an increase of 9.6%, 9.5% and 2.2% for NS 50013–NS 50010 mixture, Accellerase 1500 and Cellic CTEC, respectively. Except xylose increase when supplementing Cellic CTEC, all the differences above stated were supported statistically by Tukey HSD tests, showing significant differences with a confidence level of 95%.

Lower pretreatment severity generally leads to reduce the accessibility of the cellulose fibres, therefore a decrease of the EH yields obtained with the substrate pretreated at 210 °C was observed comparing to the previous results using the substrate pretreated at 220 °C. The EH yield (glucan) was 11.7% higher when the NS 50013–NS 50010 mixture (without supplementation) was applied on the substrate pretreated at 220 °C and this trend was also observed for the assays with Accellerase 1500 and Cellic CTEC. Interestingly, the supplementation of the cellulase preparations with XlnC and AF on the substrate pretreated at milder conditions (210 °C) increased in all cases the EH yields obtained by the non-supplemented mixtures on the substrate pretreated at more severe conditions (220 °C). These differences were observed to be statisti-

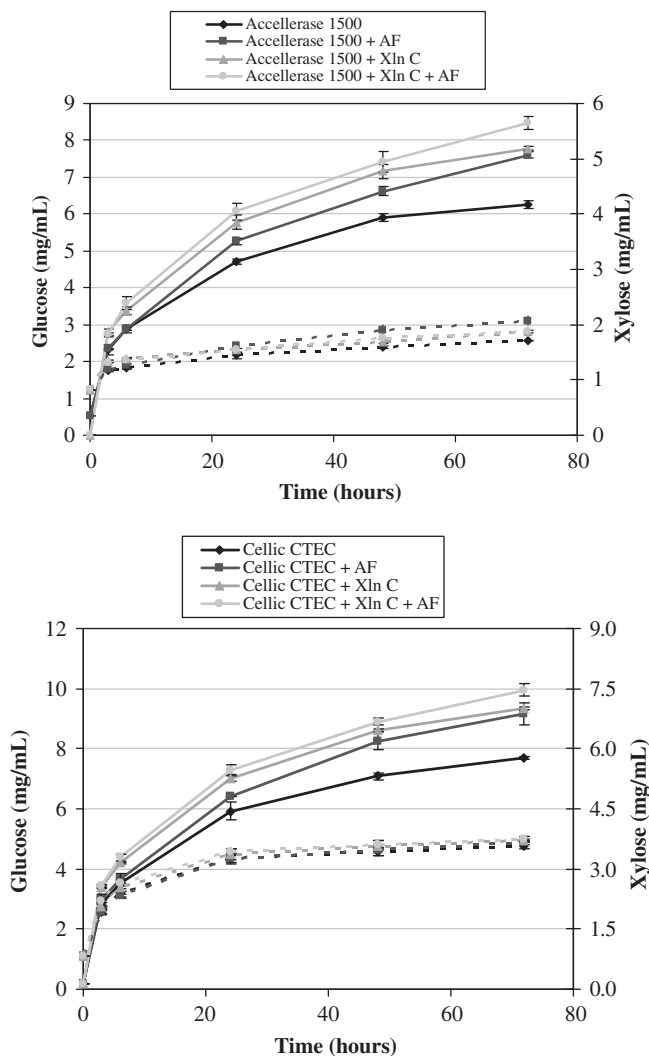


Fig. 2. EH. Glucose (continuous line) and xylose (discontinuous line) production. Supplementation assay at 3.8% TS (w/w), 50 °C. Substrate pretreated at 220 °C and 2.5 min. Enzymes: Accellerase 1500 and Cellic CTEC.

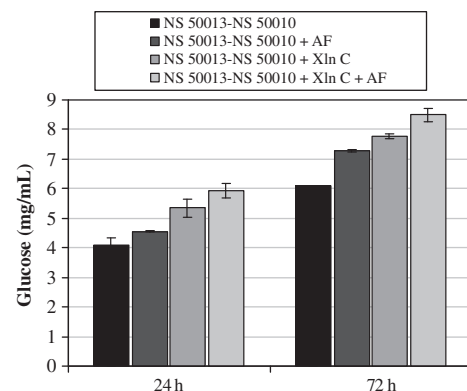


Fig. 3. EH. Glucose and xylose production. NS 50013–NS 50010 supplementation assay at 3.8% TS (w/w), 50 °C. Substrate pretreated at 210 °C and 2.5 min.

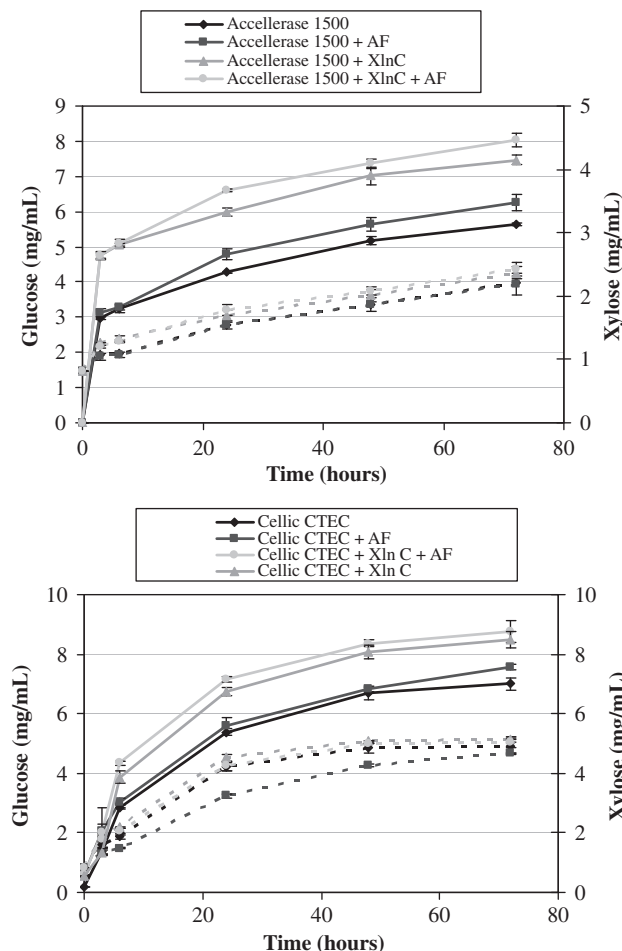


Fig. 4. EH. Glucose (continuous line) and xylose (discontinuous line) production. Supplementation assays at 3.8% TS (w/w), 50 °C. Substrate pretreated at 210 °C and 2.5 min. Enzymes: Accellerase 1500 and Cellic CTEC.

cally significant. In addition, the xylose production was higher when using the substrate pretreated at 210 °C since less xylan was degraded during the heat pretreatment and remains in the solid. These results show the potential of hemicellulolytic enzymes to apply milder pretreatments and not decrease the process yields. Commercial preparations are less efficient for hydrolysis of mildly pretreated substrates but supplementation with appropriate activities can yield more sugars with a milder pretreatment.

A comparison of the EH yields (glucan) obtained with the enzymatic preparation Cellic CTEC is shown in Fig. 5. As it was mentioned, when using the non-supplemented preparation the EH yield was higher on the substrate pretreated at 220 °C. Although supplementation improves the EH yield obtained with this substrate, addition of XlnC and AF resulted more effective on the substrate pretreated at 210 °C. As shown in Fig. 5 the highest yield was achieved in this case using the supplemented mixture on the substrate pretreated at less severe conditions, that is 210 °C, 2.5 min.

Both commercial preparations Cellic CTEC and Accellerase 1500 showed significantly higher cellulase and especially β -glucosidase specific activities than the preparation NS 50013, which is reflected in the EH results. At the studied conditions the glucose and xylose production during the EH were, in general, slightly higher with the commercial preparation Cellic CTEC compared to Accellerase 1500. As shown in Table 1, Cellic CTEC contains higher β -glucosidase, xylanase and β -xylosidase activities, which could explain the results. Xylanase and β -xylosidase activities can be especially relevant when substrates with high xylan content are employed.

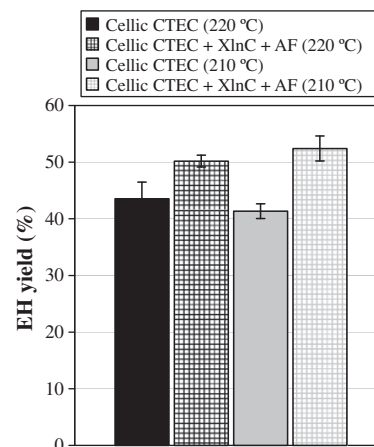


Fig. 5. Comparison of EH yields obtained with supplemented and non-supplemented Cellic CTEC on the two different substrates employed: 220 °C, 2.5 min and 210 °C, 2.5 min.

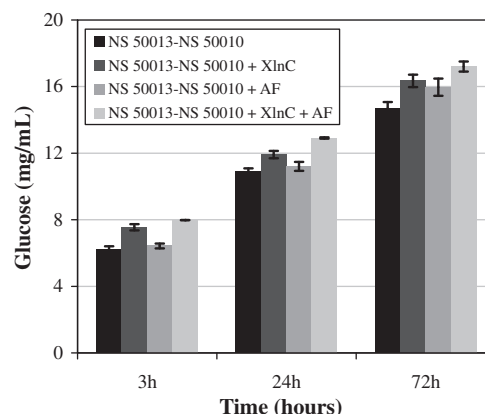


Fig. 6. Glucose production in EH supplementation assays at 10% TS (w/w) consistency using pretreated wheat straw at 210 °C, 2.5 min and 50 °C.

3.5. High solids content EH with XlnC and AF supplementation

Larger-scale application requires enzymatic systems evaluation at higher solids content. In this context, enzyme supplementation assays were also performed at higher substrate consistency (10% TS (w/w)) using wheat straw pretreated at 210 °C and 2.5 min. Fig. 6 shows glucose production at 3, 24 and 72 h. It was observed that supplementation with XlnC and AF activities improved glucose production. The best results were observed when both activities were supplemented simultaneously, producing a 17.2% increase in the glucose production. The EH yield at 72 h was 6% higher with respect to the non-supplemented mixture NS 50013–NS 50010, which implies a significant difference. Contrarily to previous experiments, xylose production was not significantly higher in supplementation assays (data not shown). However, higher accumulation of xylobiose and xylooligosaccharides could be observed when supplementing with XlnC and AF. This fact led us to identify an insufficient β -xylosidase activity in the mixture and to predict a higher xylose release when applying a higher dosage.

4. Conclusions

A positive effect of XlnC and AF supplementation on the EH of pretreated wheat straw was shown. Cellulase preparations including recently developed Cellic CTEC and Accellerase 1500 presented

a suboptimal endoxylanase activity and insignificant AF activity. Both activities work synergistically and their supplementation resulted in higher sugar release. XInC and AF were also tested using wheat straw pretreated at milder conditions, showing the possibility to reduce pretreatment severity not affecting the EH yields. The results support that supplementation of cellulase mixtures with specific enzymes has the potential to improve the EH of lignocellulose making the process more effective and competitive.

Acknowledgements

This work was supported by “Abengoa Bioenergy New Technologies” within the CENIT I+DEA Project financed by CDTI (Spanish Ministry of Science and Innovation). The cellulase preparations used in this work were provided by Novozymes (Denmark) and Genencor (USA). Recombinant enzymes (AF and XInC) were kindly provided by Biopolis S.L. (Spain). Authors also thank O. De Juan and I. Higuera for their help in HPLC samples analysis.

References

- Alfani, F., Gallifuoco, F., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M., 2000. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiol.* 25, 184–192.
- Alvira, P., Negro, M.J., Sáez, F., Ballesteros, M., 2010a. Application of a microassay method to study enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1291–1297.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010b. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1991. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257–270.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130, 496–508.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J.S., Walton, J.D., 2010. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. *Bioenergy Res.* 3, 82–92.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F., 2004. Effect of inhibitors release during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnol. Progr.* 20, 200–206.
- Fernández-Espinar, M.T., Ramón, D., Piñaga, F., Vallés, S., 1992. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 91, 91–96.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129, 278–288.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 136–140, 353–365.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 937–953.
- Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Nieves, R.A., Thomas, S.R., 1996. Cellulases: structure, function, and applications. In: Wyman, C.E. (Ed.), *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor and Francis, pp. 143–161.
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1, 119–134.
- Kabel, M.A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., 2007. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 98, 2034–2042.
- Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy* 26, 361–375.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2008. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 457–467.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 4203–4213.
- Li, X., Kim, T.H., Nghiem, N.P., 2010. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresour. Technol.* 101, 5910–5916.
- NREL, 2007. Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
- Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., Zacchi, G., 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.* 98, 2503–2510.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33.
- Pérez-González, J.A., de Graaff, L.H., Visser, J., Ramón, D., 1996. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2179–2182.
- Poutanen, K., Rättö, M., Puls, J., Viikari, L., 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *J. Biotechnol.* 6, 49–60.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recy.* 50, 1–39.
- Qing, Q., Yang, B., Wyman, C.E., 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour. Technol.* 101, 9624–9630.
- Raweesri, P., Riangrunrojana, P., Pinphanichakarn, P., 2008. [alpha]-l-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 99, 8981–8986.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., Ramón, D., 1996. Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger abfB* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 189–194.
- Sun, X.F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *J. Agric. Food Chem.* 53, 860–870.
- Tabka, M.G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J.C., 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 897–902.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L., 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1122–1131.
- Väljamae, P., 2002. The Kinetics of Cellulose Enzymatic Hydrolysis. Implications of Synergism between Enzymes. Doctoral Thesis. Faculty of Science and Technology, Uppsala University.
- Várnai, A., Siika-Aho, M., Viikari, L., 2010. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 185–193.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapfel, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 1959–1966.

Strategies of Xylanase Supplementation for an Efficient Saccharification and Cofermentation Process from Pretreated Wheat Straw

AQ1 Pablo Alvira, Elia Tomás-Pejó, María José Negro, Mercedes Ballesteros

CIEMAT-Renewable Energies Div., Biofuels Unit, Madrid 28040, Spain

DOI 10.1002/btpr.623

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

*Ethanol production from lignocellulosic raw materials includes a pretreatment step before enzymatic hydrolysis (EH). Pretreated substrates contain complex hemicelluloses in the solid fraction that can protect the cellulose from enzymatic attack. In addition, soluble xylooligomers are contained in the pretreated materials and may have an inhibitory effect on cellulase activity. In this context, several approaches for xylanase supplementation have been studied to increase EH yields. In this study, the whole slurry obtained after steam explosion pretreatment of wheat straw has been used as substrate. EH experiments were performed using commercial cellulase preparations supplemented with an endoxylanase (XlnC) from *Aspergillus nidulans*. Among different strategies of XlnC supplementation, the 24-h xylanase treatment before cellulase addition yielded an increase of 40.1 and 10.1% in glucose and xylose production, respectively. Different XlnC addition strategies were integrated in a simultaneous saccharification and cofermentation process (SSCF) using the xylose fermenting strain *Saccharomyces cerevisiae* F12. Ethanol production in SSCF was 28.4% higher when comparing to a simultaneous saccharification and fermentation process. © 2011 American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 000: 000–000, 2011*

Keywords: bioethanol, enzymatic hydrolysis, xylanase, wheat straw, SSCF

Introduction

Biofuels, which are obtained from biomass, are one of the few alternatives for short-term diversification in the transportation sector and the only renewable products that can be easily integrated into current fuel distribution systems. To attain a competitive price compared with conventional fuels, cheap and abundant raw materials must be used, and production costs need to be reduced. In this context, second generation bioethanol from lignocellulosic raw materials becomes a real alternative to be developed. Agricultural by-products such as wheat straw provide an abundant and low-cost source of lignocellulosic biomass. According to Kim and Dale¹ under the 60% ground cover practice, about 354 Tg of wheat straw could be available globally and directed to energetic purposes.

Ethanol production process is based on the utilization of carbohydrates contained in the plant cell walls in a biological conversion process, which mainly consists of three steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis (EH), and alcoholic fermentation. Pretreatment of biomass is required to increase cellulose accessibility to the enzymes.² Among different pretreatment methods developed to date, steam explosion (SE) is considered as a very appropriate method for herbaceous biomass.^{3,4} After pretreatment, enzymes are applied to hydrolyze carbohydrates into monomeric sugars which can be fermented by microorganisms, mainly yeasts.

Enzyme production and subsequent EH are two critical steps to make the whole process cost-effective. Complex structure of lignocellulose requires not only cellulase activities for its complete degradation. After SE pretreatment, the substrate contains a significant proportion of insoluble hemicellulose and some solubilized xylooligomers, which have been reported to have an inhibitory effect on the EH.⁵ Hemicellulases and other specific accessory enzymes have shown their potential to optimize the EH process and reduce catalysts dosages and costs.⁶ Xylanase supplementation has been reported to improve EH of corn stover pretreated by different technologies^{7–9} and steam pretreated materials such as barley straw¹⁰ or spruce.^{6,11} Different approaches of enzyme addition strategies and process configurations have also been recently suggested to optimize the EH and obtain higher fermentation yields.^{12–14}

EH and fermentation can be performed separately (SHF) or simultaneously (SSF) to obtain ethanol as final product. During the EH, the accumulation of products (mainly glucose, cellobiose, and xylose) can inhibit the enzymes and reduce their hydrolytic activity.¹⁵ In an SSF process, the glucose released by the action of the enzymes can be converted simultaneously to ethanol relieving end-product inhibition of the enzymatic activity.^{16–18}

Saccharomyces cerevisiae is one of the most successful and widely used microorganisms to produce ethanol, because it shows high-ethanol productivity and tolerance to ethanol and toxics. *S. cerevisiae* is able to utilize hexoses as glucose but not pentoses such as xylose or arabinose. As xylose is present in a significant proportion in wheat straw (20–30%),

Correspondence concerning this article should be addressed to P. Alvira at pablo.alvira@ciemat.es.

the utilization of microorganisms capable of fermenting both hexoses and pentoses becomes an opportunity to increase ethanol yields and reduce costs. In this context, considerable research on metabolic engineering has been made to obtain glucose and xylose fermenting yeast strains.¹⁹ The modified strain *S. cerevisiae* F12 has been shown to consume successfully both glucose and xylose, improving the ethanol yields in simultaneous saccharification and cofermentation processes (SSCF) using pretreated wheat straw.^{20,21} Furthermore, *S. cerevisiae* F12 exhibits high-inhibitory tolerance compared with other xylose fermenting yeast strains.²²

In an industrial scale process, the use of the whole slurry obtained after SE pretreatment as media for EH and fermentation entails relevant advantages: the filtration step is avoided and concentration of potential fermentable sugars increases because of the presence of solubilized sugars. However, inhibitors released during SE pretreatment could have a negative effect on the EH and subsequent fermentation.^{23,24}

In this work, different strategies of xylanase supplementation have been studied to increase glucose and xylose production in the EH process using the whole slurry from steam exploded wheat straw. Subsequently, xylanase supplementation has also been integrated in SSF and SSCF processes using the wild-type strain *S. cerevisiae* Ethanol Red and the xylose fermenting *S. cerevisiae* F12.

Material and Methods

Raw material and SE pretreatment

Wheat straw having the following composition (% dry weight): cellulose, 40.5; hemicellulose, 26.1 (xylan, 22.7; arabinan, 2.1; and galactan, 1.3); lignin, 18.1; ash, 5.1; and extractives, 14.6 was used as raw material in this study.

SE pretreatment was carried out in a 10-L reactor at 210°C and 2.5 min. These conditions were selected according to previous optimization studies developed at CIEMAT based on optimal sugars recovery and EH yields.⁴ For analytical purposes, the whole slurry was filtered to obtain a solid fraction, which was thoroughly washed with tap water to obtain a water insoluble solids (WIS) fraction, and a liquid fraction or prehydrolyzate. Chemical composition of raw material and WIS fraction was determined using the standard Laboratory Analytical Procedures for biomass analysis (LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-017, and LAP-019) provided by the National Renewable Energies Laboratory.²⁵ Sugars and degradation compounds contained in the liquid fraction were also measured. A mild acid hydrolysis [4% (v/v) H₂SO₄, 120°C and 30 min] was performed to determine the total amount of sugars in monomeric form.

Enzymes

Commercial preparations NS 50013 (62.3 FPU/mL, 140.2 mg protein/mL) and NS 50010 (809.4 IU β -glucosidase/mL, 188.7 mg protein/mL) were used as cellulase mixture in the EH, SSF, and SSCF assays. NS 50013 is a cellulase preparation from *Trichoderma reesei*, which presents low β -glucosidase activity; supplementation with NS 50010, a preparation from *Aspergillus niger* which mainly presents β -glucosidase activity, is typically applied in enzymatic processes to produce ethanol. A recombinant endoxylanase (XInC) from *Aspergillus nidulans*,²⁶ produced and provided

by Biopolis S.L. (Spain), has been studied in combination with cellulase enzymes to evaluate its effect on the EH pretreated wheat straw. XInC was expressed heterologously and produced in *S. cerevisiae* strains under the control of a constitutive yeast promoter. It presented mainly XInC activity (46.7 IU/mg protein) and a total protein content of 15.7 mg/g of freeze-dried culture.

Enzymatic hydrolysis

EH assays were carried out in 100-mL shake flasks using the whole slurry as substrate at 10% total solids (TS, w/w) consistency. The assays were run in triplicates for 96 h using citrate buffer 0.05 M at pH 5, 50°C and agitation of 150 rpm in a shaking incubator (CERTOMAT IS, 25 mm shaking amplitude). Samples were periodically withdrawn and analyzed for sugars concentration in the supernatant. A dosage of 10 FPU (NS 50013) and 15 IU β -glucosidase (NS 50010) per gram of cellulose was used, and XInC was supplemented at a dosage of 100 IU (XInC) per gram of cellulose, which corresponds to 2 mg protein/g cellulose. This dosage was fixed according to previous results (not published). Four different strategies of XInC supplementation were studied: (1) cellulases and XInC added simultaneously at 0 h (C0X0), (2) XInC supplemented at 24 h of the process (C0X24), (3) after 48 h (C0X48), and (4) XInC added at 0 h before cellulases addition at 24 h (C24X0). An assay with no XInC addition was used as control (Control).

EH experiments using WIS as substrate were also carried out to evaluate XInC effect. Substrate concentration was 10% TS (w/w), and EH conditions and enzyme dosages were the same as indicated for slurry assays. A control without XInC supplementation was compared with simultaneous addition of cellulases and XInC (C0X0), and XInC addition before cellulases (C24X0).

EH assays with bovine serum albumin (BSA) were performed to ensure that the increased digestibility using XInC was due to xylanase activity and not to nonspecific protein effect. A control assay (Control) with only cellulase addition, a XInC supplementation assay (C + XInC), and a BSA supplementation assay (C + BSA) were performed. XInC and BSA treatments were run during 24 h before cellulase addition. The same protein loading, 2 mg/g cellulose, was applied for both BSA and XInC. EH assay conditions were as described above.

Microorganisms and media

Two strains of *S. cerevisiae* were used in this work. *S. cerevisiae* Ethanol Red (Lesaffre, Fermentis, WI) is an industrial strain used in the fuel alcohol industry, which ferments glucose but not xylose. *S. cerevisiae* F12 is an engineered strain that has been modified by over-expressing the endogenous gene encoding xylulokinase and by introduction of the genes for xylose reductase and xilitol dehydrogenase from *Pichia stipitis*.²¹

Preinoculum was prepared taking a colony from YPD-agar plates and inoculating into 500-mL flasks containing 200 mL of Delft medium as follows: 7.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 14 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 2 mL/L trace metal solution, and 1 mL/L vitamin solution.²⁷ Sugar concentration was 40 g/L of glucose for *S. cerevisiae* Ethanol Red and 20 g/L of glucose and 20 g/L of xylose for F12. The preculture was grown on a shaking incubator at 150 rpm and 35°C.

253 After 24 h, the preculture was centrifuged and the superna-
254 tant discarded. The cells were weighed and diluted to obtain
255 an inoculum size of 2 g/L for starting the fermentation.

257 SSF and SSCF

258 SSF and SSCF were run in triplicates in 100-mL shake
259 flasks for 144 and 192 h, respectively, using citrate buffer at
260 pH 5, 35°C and 150 rpm agitation in a shaking incubator.
261 The whole slurry at 10% TS (w/w) was used as medium,
262 which was supplemented with 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 3 g/L
263 KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 mL/L trace metal solu-
264 tion, and 1 mL/L vitamin solution. An inoculum size of 2 g/
265 L was used for SSF and SSCF experiments using *S. cerevi-*
266 *siae* Ethanol Red and *S. cerevisiae* F12, respectively. Sam-
267 ples were withdrawn and analyzed for sugars and ethanol
268 concentration. The enzyme loading was the same as
269 employed in EH assays: 10 FPU/g cellulose (NS 50013), 15
270 IU β-glucosidase/g cellulose (NS 50010), and 100 IU xyla-
271 nase/g cellulose (XInC). According to the results observed in
272 the EH assays, three different strategies of enzyme addition
273 were studied in the SSF and SSCF: a control with cellulase
274 but not XInC addition (Control), simultaneous cellulase and
275 XInC addition at the beginning of the fermentation (COX0)
276 and 24 h hydrolysis with XInC at 50°C before addition of
277 cellulases (C24X0). In all cases, yeast was added at the
278 same time that cellulase supplementation.

281 Analytical methods and calculations

282 Cellulase activity was determined using filter paper (What-
283 man No.1 filter paper strips) and β-glucosidase activity was
284 measured using cellobiose²⁸ as substrate. XInC activity was
285 determined on 30 g/L birch xylan²⁹ and β-xylosidase was
286 measured using 2 g/L p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside.³⁰
287 For protein content quantification, BCA protein assay kit
288 (Pierce Ref. 23225) was used using bovine serum albumin
289 (BSA) as standard.

290 Sugar concentration was measured by high-performance
291 liquid chromatography (HPLC) using a Waters device (Mild-
292 ford, MA) equipped with a 2414 refractive index detector
293 (Waters). A Transgenomic CarboSep CHO-682 carbohydrate
294 analysis column operated at 80°C with deionized water as a
295 mobile-phase (0.5 mL/min) was used for the separation.

296 Furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) were ana-
297 lyzed by HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany), using an
298 Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column
299 (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) at 65°C equipped with a 1050
300 photodiode-array detector (Agilent, Waldbronn, Germany).
301 As mobile phase, 89% 5 mmol/L H₂SO₄ and 11% acetonitrile
302 at a flow rate of 0.7 mL/min were used. Acetic and formic
303 acid were also quantified by HPLC (Waters) with a
304 2414 refractive index detector (Waters) using a Bio-Rad
305 Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs) column maintained at
306 65°C and a mobile phase (5 mmol/L H₂SO₄) at a flow rate
307 of 0.6 mL/min.

308 Ethanol concentration was determined by gas chromatog-
309 raphy, using a HP 5890 Series II apparatus equipped with an
310 Agilent 6890 series injector, a flame ionization detector and
311 a column of Carbowax 20M at 85°C. Injector and detector
312 temperature were maintained at 150°C.

313 EH yields were calculated taking into account the glucose
314 and xylose content in the WIS fraction as well as the glucose
315 and xylose content in oligomeric form in the liquid fraction.

317 **Table 1. Composition of Wheat Straw SE Pretreated at 210°C, 2.5**
318 **min (WIS and Liquid Fraction)**

Pretreatment Conditions		210°C, 2.5 min	
<i>WIS fraction content (%)</i>			
Cellulose		49.7 ± 1.1	
Hemicellulose		12.1 ± 0.8	
Xylan		10.5 ± 0.4	
Arabinan		0.4 ± 0.1	
Others		1.2 ± 1.2	
Lignin		31.8 ± 0.3	
Ash		4.3 ± 0.2	
<i>Liquid fraction content (g/L)</i>			
Sugars			
	Monomeric form	Oligomeric form	
Glucose	1.3	2.0	
Xylose	2.7	20.7	
Arabinose	1.0	0.5	
Galactose	0.5	0.9	
Mannose	0.3	-	
Degradation products			
Furfural		0.7	
HMF		0.2	
Acetic acid		4.0	
Formic acid		1.7	

319 Ethanol yields were determined considering the potential
320 glucose and xylose in the slurry as well as ethanol fermenta-
321 tion yields of the yeasts. For *S. cerevisiae* F12 (SSCF pro-
322 cesses) ethanol yields on glucose and xylose of 0.46 and 0.26
323 were assumed, respectively.²¹ An ethanol yield on glucose of
324 0.46 was determined in our laboratory and assumed for *S.*
325 *cerevisiae* Ethanol Red. In this case, xylose was not consid-
326 ered for ethanol yields, because Ethanol Red is not capable
327 to utilize it.

350 Results

351 Steam explosion pretreatment

352 The slurry obtained after SE pretreatment of wheat straw
353 at 210°C and 2.5 min presented a total solid content of
354 29.4%, with a WIS content of 23.4% and a soluble solid
355 content of 6.0%. Table 1 shows the composition of both
356 WIS and liquid fraction obtained after SE. At the selected
357 pretreatment conditions, a significant proportion of hemicel-
358 lulose remained in the solid fraction (12.1%; 10.5% xylan),
359 however, certain solubilization of hemicellulosic sugars also
360 occurred and subsequently cellulose and lignin are concen-
361 trated in WIS. In the liquid fraction, a concentration of
362 xylose of 23.4 g/L and a concentration of glucose of 3.3 g/L
363 were determined. As shown in Table 1, 90% of xylose and
364 61% of glucose were found in oligomeric form. Furfural (0.7
365 g/L) and HMF (0.2 g/L) were detected as a consequence of
366 xylose and glucose degradation, respectively. Formic acid
367 (1.7 g/L) comes from furfural and HMF further degradation,
368 and acetic acid (4.0 g/L) is produced because of the solubili-
369 zation of acetyl groups contained in the hemicellulose
370 structure.

374 Enzymatic hydrolysis

375 *Effect of XInC Supplementation.* Commercial cellulase
376 preparations usually present certain xylanase activity. At the
377 assayed cellulase loading (10 FPU–15 IU β-glucosidase/g
378 cellulose), NS 50013 provided 19.4 IU xylanase/g cellulose
379 and NS 50010 0.7 IU xylanase/g cellulose, but supplementa-
380 tion with higher xylanase activity (100 IU xylanase/g

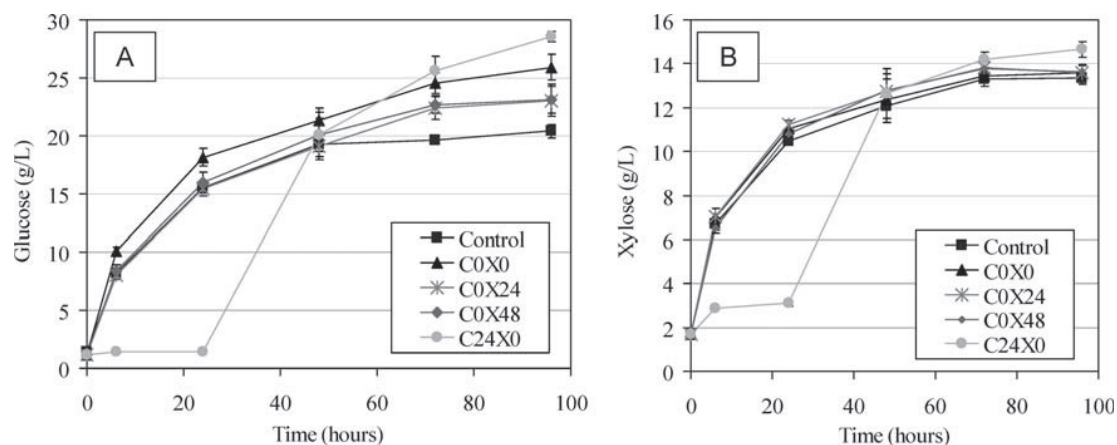


Figure 1. EH. Glucose (A) and xylose (B) production (g/L) by different XlnC supplementation strategies.

Dosages: NS 50013, 10 FPU/g cellulose; NS 50010, 15 IU β -glucosidase/g cellulose; XlnC, 100 IU xylanase/g cellulose. 50°C, 150 rpm.

cellulose) was observed to increase the EH yields in this work. Figure 1 shows the glucose and xylose production during the EH using the different enzyme addition configurations: a control without XlnC addition; COX0, with cellulases and XlnC added simultaneously at 0 h; COX24 and COX48, in which XlnC was supplemented at 24 and 48 h, respectively, and C24X0, in which XlnC was added for 24 h before cellulases. In all the conditions assayed, most of xylose was found in monomeric form after 24 h with cellulases, which shows that xylanase activity contained in cellulase preparations can hydrolyze hemicellulose-derived oligomers present in the liquid fraction.

In general, XlnC addition resulted in slightly higher xylose production, but the main effect was observed on glucose production, which increased significantly in all conditions assayed in comparison to the control assay without XlnC supplementation (20.4 g/L glucose). When XlnC and cellulases were added simultaneously (COX0), 25.9 g/L of glucose was obtained, which represents an increase of 26.9%. XlnC supplementation at 24 h (COX24) or 48 h (COX48) also improved the EH (23.0–23.1 g/L glucose) with respect to the control assay, but glucose and xylose production was reduced when compared with the COX0 assay. XlnC not only showed an effect after several hours of EH process by improving hydrolysis of the most recalcitrant cellulose contained in the lignocellulose but also acted synergistically with cellulases at the beginning of the process by altering the hemicellulosic matrix and increasing the accessibility of the cellulolytic enzymes.

Interestingly, the highest enzymatic hydrolysis yields were achieved, when XlnC was added 24 h before the addition of the cellulase mixture (C24X0; Figure 2). EH rate increased after cellulase addition, improving glucose and xylose production at the end of the process with respect to the other assays (28.6 g/L glucose and 14.7 g/L xylose at 96 h). Compared with the control and COX0 assays, glucose production in C24X0 increased by 40.1 and 10.3%, whereas xylose production increased by 10.1 and 8.1% at 96 h, respectively. EH yield adding XlnC before cellulases reached 67.1% for glucose and 82.8% for xylose. A higher dosage of non-supplemented cellulase mixture (15 FPU/g cellulose and 15 IU/g cellulose) resulted in very similar glucose production at 72 and 96 h (data not shown in figure) comparing to the C24X0 assay (10 FPU–15 IU β -glucosidase/g cellulose). These results showed the potential of xylanases and other accessory

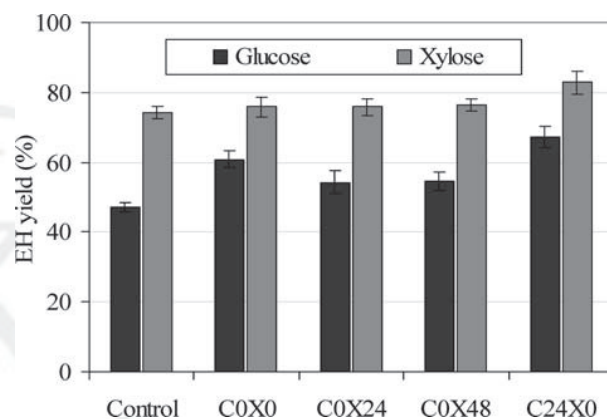


Figure 2. EH yields (%) for glucose and xylose obtained with the different XlnC supplementation strategies.

Dosages: NS 50013, 10 FPU/g cellulose; NS 50010, 15 IU β -glucosidase/g cellulose; XlnC, 100 IU xylanase/g cellulose.

enzymes to reduce the cellulase loadings and obtain high yields.

Kumar and Wyman¹³ approached the impact of adding xylanase before cellulases in EH, because xylanase treatment might increase pore size and accessibility of cellulose.³¹ However, in this case, authors observed slight differences with respect to the addition of cellulases and xylanases simultaneously. In this work, the whole slurry obtained after SE pretreatment was used, therefore certain amount of oligomeric soluble sugars, mainly xylooligomers, remained in the substrate (see Table 1). Although monomeric sugars as xylose have been shown to inhibit cellulases,²⁴ it has been recently reported that xylooligomers are stronger inhibitors of cellulase activity than xylose.^{5,15} Interestingly, XlnC belongs to family 10 xylanases, which are not inhibited by the presence of oligomers.³² As can be observed in Figure 1, glucose and xylose production slightly increased (from 1.7 to 3.1 g/L) when the substrate was incubated for 24 h with XlnC, which only presents XlnC activity and insignificant β -xylosidase, β -glucosidase, or cellulase activities.³³ It was also determined that little xylan from the insoluble fraction was hydrolyzed during that period of time. However, it was detected that soluble xylooligomers with high degree of polymerization (DP) were hydrolyzed to a considerable extent to xylotriose and xylobiose during the 24 h hydrolysis with XlnC (assay C24X0, Figure 3). The chromatograms clearly showed an increase in

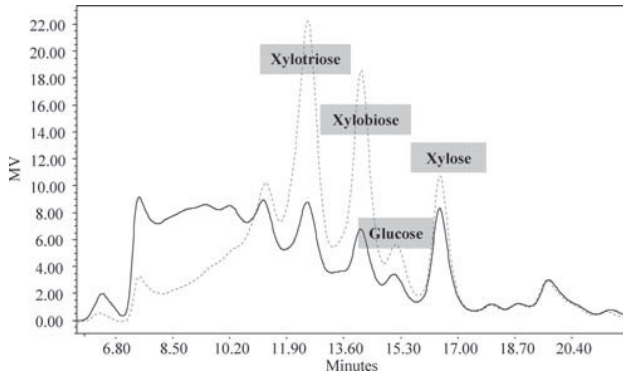


Figure 3. HPLC chromatogram (Transgenic CarboSep CHO-682 carbohydrate analysis column).

Sugars profile in C24X0 assay. Black continuous line: 0 h, before addition of XInC. Gray dotted line: 24 h after addition of XInC. XInC dosage: 100 UI xylanase/g cellulose.

xylobiose and xylotriose concentration, which was 3 and 2.4 times higher, respectively. This fact would subsequently decrease the inhibitory effect of high-DP xylooligosaccharides on the EH, when the cellulases are added. Contrary to XInC, NS 50013 and NS 50010 show certain β -xylosidase activity (7.2 and 0.2 IU/g cellulose in the assay), which resulted in a rapid increase of xylose after cellulase addition.

An EH assay using WIS as substrate and XInC addition before cellulase was also carried out (C24X0) and compared with the simultaneous addition of cellulases and XInC (C0X0). In this case, a slight increase of glucose and xylose release was observed in case of C24X0 in which glucose production increased by 4.4%, obtaining a glucose concentration of 38.2 g/L, and an EH yield of 78.1% at 96 h. The positive effect of XInC treatment was significantly higher using the whole slurry, which supported its positive effect on large soluble oligomers present in the pretreated material.

BSA-XInC Comparison. It has been reported that proteins as BSA can attach to lignin and significantly reduce nonspecific adsorption of enzymes, leaving more cellulase free in solution and improving the EH.³⁴ BSA and XInC effects on the EH were compared with show whether the effect of xylanase enzymes could be due to adsorption to lignin instead of its catalytic effect.

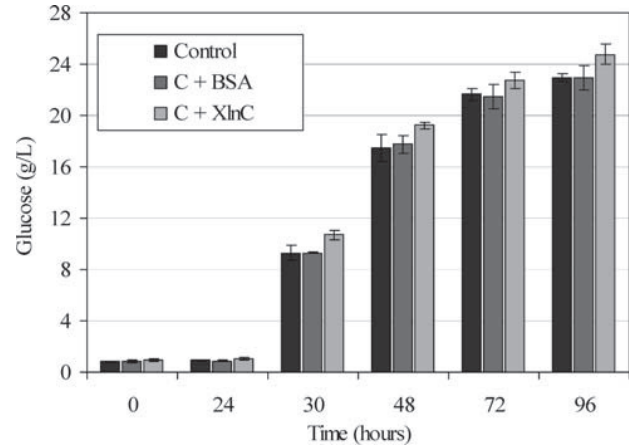


Figure 4. EH. BSA-XInC comparison.

Glucose production (g/L) at different times. Dosages: NS 50013, 10 FPU/g cellulose; NS 50010, 15 IU β -glucosidase/g cellulose; XInC, 2 mg/g cellulose (100 IU xylanase/g cellulose); and BSA, 2 mg/g cellulose. 50°C, 150 rpm.

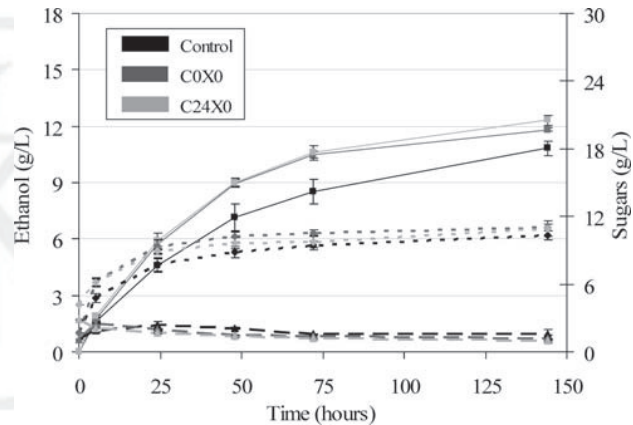


Figure 5. SSF. *S. cerevisiae* Ethanol Red. Inoculum size: 2 g/L. Ethanol (■), glucose (▲), and xylose (◆) concentration (g/L).

Dosages: NS 50013, 10 FPU/g cellulose; NS 50010, 15 IU β -glucosidase/g cellulose; and XInC, 100 IU xylanase/g cellulose.

capable of metabolizing glucose to ethanol but not xylose, glucose concentration remained at low level in all the assays, whereas xylose increased and remained at higher concentration in the medium. The positive effect of XInC addition on glucose release detected in the EH assays was also observed in the SSF, and the ethanol production was higher, when the cellulase mixture was supplemented with XInC. Between the two different XInC supplementation strategies, slight differences were observed, however, at 144 h the highest ethanol concentration (12.3 g/L) was detected in the C24X0 assay. Compared with control ethanol concentrations in C0X0 and C24X0 assays were 9.2% and 13.9% higher, respectively. Ethanol yield when XInC was applied as a previous step before cellulases (C24X0) reached 60.9%.

Simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF)

SSCF assays were carried out using the xylose fermenting strain *S. cerevisiae* F12 and the three enzyme addition strategies performed in SSF experiments. Figure 6 shows the time course for SSCF. XInC supplementation resulted in

Figure 4 shows glucose production in the different assays. According to our results, BSA seems not to have a positive effect with respect to the control (Control), whereas XInC supplementation (C + XInC) resulted in improved EH yields compared with both control and BSA assay (C + BSA). As it was observed previously, xylose concentration slightly increased during the 24-h treatment with XInC, however, xylobiose and xylotriose concentration increased significantly (data not shown). In case of BSA, these concentrations remained constant, which would confirm that XInC effect is not only due to adsorption to lignin but also due to its catalytic action on the hemicellulosic fraction.

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

SSF assays were performed using the yeast strain *S. cerevisiae* Ethanol Red. Figure 5 shows glucose, xylose, and ethanol concentration during the SSF process using three enzyme addition strategies: control with cellulases but no XInC (Control), simultaneous addition of cellulases and XInC at initial time (C0X0), and XInC treatment before cellulases addition and inoculation (C24X0). As *S. cerevisiae* is

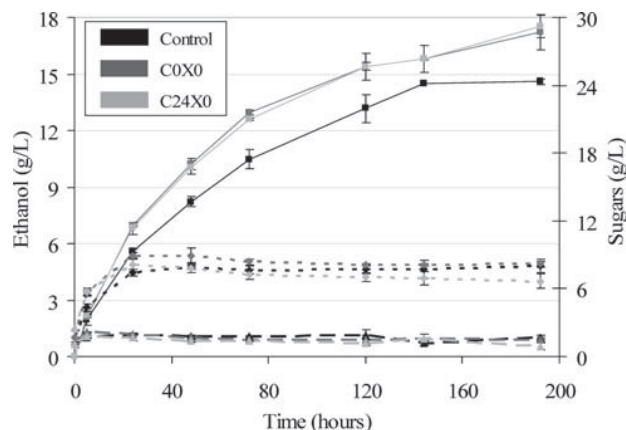


Figure 6. SSCF. *S. cerevisiae* F12. Inoculum size: 2 g/L. Ethanol (■), glucose (▲), and xylose (◆) concentration (g/L). Dosages: NS 50013, 10 FPU/g cellulose; NS 50010, 15 IU β -glucosidase/g cellulose; and XlnC, 100 IU xylanase/g cellulose.

higher glucose and xylose availability for the yeast and subsequently higher ethanol production. Final ethanol concentration (at 192 h) increased compared with the control in 18.0% and 20.3% for C0X0 and C24X0 assays, respectively. The highest ethanol concentration (17.5 g/L) at the end of the process was obtained when adding XlnC before cellulases (C24X0), having an ethanol yield of 63.9% at 144 h and 70.9% at the end of the SSCF. In this case, very slight differences (not significant) were observed with respect to the supplementation at 0 h (C0X0).

Although some xylose was detected as residual monosaccharide at the end of the process, xylose consumption by F12 was clearly observed. Ethanol production at 144 h in SSCF when XlnC was supplemented before cellulases reached 15.8 g/L, a 28.4% higher than ethanol production in SSF process with the same enzymatic strategy (13.1 g/L). These results probe the efficiency of using the xylose fermenting strain *S. cerevisiae* F12 and its potential to enhance ethanol production and yields.

Conclusions

XlnC supplementation improved EH yields as well as ethanol production in SSF and SSCF processes. The most appropriate EH configuration was the supplementation of XlnC for 24 h before the addition of the cellulase mixture, which significantly increased the production of glucose and xylose. Our results suggest that xylanase acts not only on the insoluble hemicellulosic fraction but also on the soluble xyloligomers present in the slurry, which may have an important inhibitory effect.

Xylanase addition was integrated in SSF and SSCF processes. Compared with SSF process using *S. cerevisiae* Ethanol Red, the utilization of the recombinant strain *S. cerevisiae* F12 in a SSCF resulted in significantly higher ethanol production, because glucose and xylose are co-fermented to ethanol.

Acknowledgment

This work was supported by "Abengoa Bioenergy New Technologies" within the CENIT I + DEA Project financed by CDTI (Spanish Ministry of Science and Innovation). The cellu-

lase preparations and the enzyme XlnC used in this work were kindly provided by Novozymes (Denmark) and Biopolis S.L. (Spain), respectively.

Literature Cited

- Kim S, Dale BE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* 2003;26:361–375.
- Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol* 2005;96:1959–1966.
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour Technol.* 2010;101:4851–4861.
- Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006;130:496–508.
- Qing Q, Yang B, Wyman CE. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol.* 2010;101:9624–9630.
- Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Okunev O, Gusakov A, Maximenko V, Gregg D, Saddler J. Evaluation of novel fungal cellulase preparation for ability to hydrolyze softwood substrate-evidence of the role of accessory enzymes. *Enzyme Microbial Technol.* 2005;37:175–184.
- Kumar R, Wyman CE. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol.* 2009;100:4203–4213.
- Li X, Kim TH, Nghiem NP. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresour Technol.* 2010;101:5910–5916.
- Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour Technol.* 2007;98:2503–2510.
- García-Aparicio MP, Ballesteros M, Manzanares P, Ballesteros I, González A, Negro MJ. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;136-140:353–365.
- Várnai A, Siika-Aho M, Viikari L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme Microbial Technol.* 2010;46:185–193.
- Jin M, Lau MW, Balan V, Dale BE. Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). *Bioresour Technol.* 2010;101:8171–8178.
- Kumar R, Wyman CE. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog.* 2009;25:302–314.
- Rémond C, Aubry N, Crônier D, Noël S, Martel F, Roge B, Rakotoarivonina H, Debeire P, Chabbert B. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. *Bioresour Technol.* 2010;101:6712–6717.
- Kumar R, Wyman CE. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnol Bioeng.* 2008;102:457–467.
- Alfani A, Gallifuoco F, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2000;25:184–192.
- Ballesteros M, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.* 2004;39:1843–1848.
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J Sci Ind Res.* 2008;67:874–884.

- 765 19. Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, 829
766 Gorwa-Grauslund MF. Towards industrial pentose-fermenting 830
767 yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74:937–953. 831
768 20. Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M, Olsson L. Comparison 832
769 of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw 833
770 for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose- 834
771 fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol Bio-* 835
772 *eng.* 2008;100:1122–1131. 836
773 21. Sonderegger M, Jeppsson H, Larsson C, Gorwa-Grauslund MF, 837
774 Boles E, Olsson L, Spencer-Martins I, Hahn-Hägerdal B, Sauer 838
775 V. Fermentation performance of engineered and evolve xylose- 839
776 fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol Bio-* 840
777 *eng.* 2004;90–98. 841
778 22. Panagiotou G, Olsson L. Effect of compounds released during 842
779 pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic 843
780 hydrolysis rate. *Biotechnol Bioeng.* 2007;96:250–258. 844
781 23. Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A, Alfani F. 845
782 Effect of inhibitors release during steam-explosion treatment of 846
783 poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Bio-* 847
784 *technol Prog.* 2004;20:200–206. 848
785 24. García-Aparicio MP, Ballesteros I, González A, Oliva JM, Bal- 849
786 lesteros M, Negro MJ. Effect of inhibitors released during 850
787 steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hy- 851
788 drolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006;129:278–288. 852
789AQ5 25. NREL. National Renewable Energy Laboratory. Chemical 853
790 analysis and testing laboratory analytical procedures: LAP- 854
791 001, LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-017, LAP-019. 855
792 Golden CO; 2007. [www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_](http://www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html) 856
793 [procedures.html](http://www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html). 857
794 26. Fernández-Espinar MT, Ramón D, Piñaga F, Vallés S. Xylanase 858
795 production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett.* 859
796 1991;91:91–96. 860
797 27. Verduyn C, Postma E, Scheffers A, Van Dijken JP. Physiology 861
798 of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited che- 862
799 mostat cultures. *J Gen Microbiol.* 1990;136:395–403. 863
800 28. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl* 864
801 *Chem.* 1987;59:257–268. 865
802 29. Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of 866
803 methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* 867
804 1991;23:257–270. 868
805 30. Poutanen K, Rättö M, Puls J, Viikari L. Evaluation of different 869
806 microbial xylanolytic systems. *J Biotechnol.* 1987;6:49–60. 870
807 31. Suurnäkki A, Li TQ, Buchert J, Tenkanen M, Viikari L, Vuori- 871
808 nen T, Ödberg L. Effects of enzymatic removal of xylan and 872
809 glucomannan on the pore size distribution of Kraft fibres. *Holz-* 873
810 *forschung.* 1997;51:27–33. 874
811 32. Vries RP, Visser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation 875
812 of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev.* 876
813 2001;65:497–522. 877
814 33. Alvira P, Negro MJ, Ballesteros M. Effect of endoxylanase and 878
815 α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hy- 879
816 drolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour Technol.* 880
817 2011;102:4552–4558. 881
818 34. Yang B, Wyman CE. BSA treatment to enhance enzymatic hy- 882
819 drolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnol* 883
820 *Bioeng.* 2006;94:611–617. 884
821 885
822 886
823 887
824 888
825 889
826 890
827 891
828 892

Manuscript received Dec. 22, 2010, and revision received Apr. 1, 2011.

Author Proof

