

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ESTUDIO DE ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS EN LA  
TRANSFORMACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA EN  
BIOCOMBUSTIBLES

DESLIGNIFICACIÓN Y DESTOXIFICACIÓN

TESIS DOCTORAL DE:  
**ANTONIO DAVID MORENO GARCÍA**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:  
**MERCEDES BALLESTEROS PERDICES**  
**DAVID IBARRA TREJO**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



## **TESIS DOCTORAL**

---

**ESTUDIO DE ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS EN LA  
TRANSFORMACIÓN DE BIOMASA  
LIGNOCELULÓSICA EN BIOCOMBUSTIBLES:  
DESLIGNIFICACIÓN Y DESTOXIFICACIÓN**

---

**Antonio David Moreno García**

**Madrid, 2013**







Memoria presentada por Antonio David Moreno García para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los doctores Mercedes Ballesteros Perdices y David Ibarra Trejo.

Madrid, Junio de 2013.



**Fdo.: Antonio David Moreno García**  
IMDEA Energía



**Fdo.: Dra. Mercedes Ballesteros Perdices**  
Investigadora Principal  
Unidad mixta  
IMDEA Energía-CIEMAT



**Fdo.: Dr. David Ibarra Trejo**  
Científico Titular  
Dpto. Productos Forestales  
INIA





*A mi madre, padre y hermanos*

*A mis abuelos, tíos y primos*

*A Verónica*





*“No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho.”*

*Aristóteles (384 a.C. – 322 a.C.)*



## AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que de forma directa e indirecta han participado para que el trabajo que se expone en la presente Tesis Doctoral sea una realidad. A todos ellos no puedo estar más que agradecido, ya que han contribuido en gran medida a que fuera una experiencia muy satisfactoria tanto a nivel profesional como en lo personal.

En primer lugar quiero agradecerle a la Dra. Mercedes Ballesteros, codirectora de esta Tesis y persona a quien realmente admiro, por acogerme en su grupo y proporcionarme todos los medios necesarios para llevar a cabo un trabajo de investigación durante el cual, sus comentarios han servido de gran ayuda para guiarme a conseguir los objetivos propuestos.

También tengo mucho que agradecer al Dr. David Ibarra, codirector de esta Tesis, quien además de compartir sus conocimientos ha aportado numerosas ideas que han dado un origen y continuidad al trabajo. Sin su inestimable y desinteresada ayuda esta Tesis no hubiera sido posible.

Thanks to Professor Lisbeth Olsson for all comments and support and for making my stay at Chalmers unforgettable. It was a real pleasure sharing a little bit of *“science”*. In the end, I couldn't say goodbye.

A los Drs. Elia Tomás-Pejó, Pablo Alvira e Ignacio Ballesteros por “arrimar el hombro” en todo momento, ya que sin su colaboración y magnífica paciencia esta historia no habría salido adelante. A los Drs. María José Negro, José Miguel Oliva y Paloma Manzanares; a Felicia Sáez, José María Martínez y Alberto González por sus continuos ánimos y ayuda.

A la Dra. Ana Saborido, profesora titular del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, por su gran interés en esos últimos días de caos intrínsecos a la preparación de una Tesis.

Al Profesor David P. Serrano, director del Instituto IMDEA Energía y al Dr. Juan M. Coronado, Investigador Senior del Instituto IMDEA Energía, sin su apoyo el inicio y conclusión de esta tesis no se habrían logrado.

Por supuesto, gracias a Pili, Javi, Isabel, Olga, José Luis, Mónica, Arantxa, Miguel ati, Miguel, Jhoan, Cristian, José Manuel, Altagracia, Txema, Aleta, Luis, Antonio, Aloia

y otras muchas personas que forman o han formado parte de la Unidad de Biocarburantes del Ciemat y a quienes realmente aprecio. El día a día es mucho más ameno con su presencia.

A los miembros de la Unidad de Procesos Biotecnológicos del IMDEA Energía Cristina, Marie, Lara, Alfredo y Ahmed, por esas tonterías entre párrafo y párrafo que me hacían desconectar de vez en cuando. Al resto del personal investigador y de administración del IMDEA Energía Cristina, Alicia, “Lauras”, “Javieres”, Diego, Ana, Fernando, Enrique, Susana, Suheda... Nuria, Mabel, Carmen, Eloisa, Andrea, Marta... a todos, gracias.

Tampoco puedo dejarme atrás a la “comunidad” Elia, Clara, Marina, David, José y Alexio, sólo ellos saben que en Göteborg también hay una escultura a un astronauta. Quiero resaltar que aún sigo recordando todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y nunca dejaré de agradecerlos lo bien que os portasteis conmigo. De corazón, Gracias. I would also like to say thanks to all people I left in Sweden Rakesh, George, Ausra, Valeria, Maurizio, Charilaos, Carl, Jenny, Eugenio, Ana, Ximena... I really had a very good time.

A Emilio, César, Carlos, Luis, Giselle, Carmen, Marta, Laura... mi etapa en el CBGP sin vosotros no habría sido lo mismo.

A la peña de Alcorcón Patxi, Mazote, Carlos, Isaac, Bere, Jose, Pani, Victor, Oscar, Delpi, María, Lucía, Silvia, Ana, Pili y a otros miembros del C.D. Charrito; no puedo describir con palabras lo que supone estar a vuestro lado. Gracias.

Sin duda tengo a gente muy querida en muchos sitios, pero no me puedo olvidar de toda la gente que admiro en Trujillo y en Cáceres; Martin, Rubio, Sergio, Beto, Gustavo, Pedro, Juli, Pilar, Patricia, “Estefas”, “Cristinas”, Montaña, Ruben, Chema, Lolo, M<sup>a</sup> Paz, Luismi, Eugenio, David, Nacho, Bea, Esther... en numerosas ocasiones se os echa en falta.

Una parte fundamental para el desarrollo de esta tesis ha sido el apoyo económico recibido. Por ello me gustaría agradecer a la Comunidad de Madrid la beca para Contratos de Personal Investigador de apoyo que ha contribuido en gran parte a la financiación de mi período predoctoral. Asimismo, tengo que agradecer a la SEBBM y a FEBS por la ayuda recibida para cubrir los costes de mi estancia en Suecia. Y por supuesto, agradecer al Instituto IMDEA Energía y al CIEMAT por darme una posición

que me permitiese realizar este trabajo de investigación. I would also like to acknowledge Taurus Energy AB, Dr. Eva Albers and Rakesh Koppram for providing the *S. cerevisiae* KE6-12 strain.

Dicen que los últimos serán los primeros, por lo que para terminar tengo que dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, hermanos y abuelos, por permitirme decidir “*qué quiero ser de mayor*”, porque a pesar de su desconocimiento siempre han mostrado interés por querer saber “*qué es lo que estoy haciendo*” y porque en las etapas malas me han ayudado en todo lo que estaba a su alcance.

Por último, gracias a ti, Verónica. Gracias por entenderme y darme ánimos en las fases de bajón y aguantar estos meses finales de “*rarezas varias*”, pero sobre todo gracias por celebrar conmigo esos pequeños detalles que hacen que un día cualquiera se convierta en un día especial.



# ÍNDICE

	<u>Página</u>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. El sector del transporte y los biocombustibles</b> .....	13
<b>1.2. Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica</b> .....	16
1.2.1. <i>Composición y estructura de los materiales lignocelulósicos</i> .....	17
1.2.2. <i>Producción de bioetanol lignocelulósico mediante procesos bioquímicos</i> .....	25
1.2.2.1. <u>Pretratamiento</u> .....	26
<b>1.2.2.1.1. Procesos de biodeslignificación</b> .....	27
<b>1.2.2.1.2. Pretratamiento mediante explosión por vapor</b> .....	35
<b>1.2.2.1.3. Procesos de biodestoxificación</b> .....	39
1.2.2.2. <u>Hidrólisis enzimática (HE)</u> .....	48
1.2.2.3. <u>Fermentación</u> .....	53
1.2.3. <i>Integración de las etapas de proceso</i> .....	56
1.2.3.1. <u>Hidrólisis y (co)fermentación separadas (HFS)</u> .....	57
1.2.3.2. <u>Sacarificación y (co)fermentación simultáneas (SFS/SCFS)</u> .....	58
1.2.3.3. <u>Bioproceso consolidado (BPC)</u> .....	60
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>65</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>71</b>
<b>3.1. Materia prima</b> .....	71
<b>3.2. Pretratamiento mediante explosión por vapor (EV)</b> .....	71
<b>3.3. Enzimas y mediadores</b> .....	73



3.3.1. Lacasas.....	73
3.3.2. Enzimas celulolíticas.....	74
3.3.3. Mediadores.....	75
<b>3.4. Determinación de actividades enzimáticas.....</b>	<b>76</b>
3.4.1. Actividad lacasa.....	76
3.4.2. Actividad sobre papel de filtro.....	76
3.4.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	77
3.4.4. Actividad xilanasa.....	78
3.4.5. Actividad $\beta$ -xilosidasa.....	78
<b>3.5. Ensayos de hidrólisis enzimática (HE).....</b>	<b>79</b>
<b>3.6. Microorganismos y condiciones de cultivo.....</b>	<b>80</b>
3.6.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875.....	80
3.6.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ethanol Red.....	81
3.6.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F12.....	81
3.6.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KE6-12.....	82
<b>3.7. Ensayos de fermentación.....</b>	<b>82</b>
3.7.1. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).....	83
3.7.2. Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS).....	83
3.7.3. Presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS).....	83
<b>3.8. Ensayos con lacasas y sistemas lacasa-mediador.....</b>	<b>84</b>
3.8.1. Procesos de deslignificación.....	85
3.8.2. Procesos de destoxificación.....	86
3.8.2.1. <u>Tratamiento previo a los procesos de SFS/SCFS en discontinuo</u> .....	86
3.8.2.2. <u>Suplementación con lacasa a los procesos de SCFS en semicontinuo o fed-batch</u> .....	86
3.8.2.3. <u>Tratamiento con lacasa en los sistemas de PSFS</u> .....	86

3.8.2.4. <u>Tratamiento de la fracción líquida</u> .....	87
<b>3.9. Determinaciones analíticas</b> .....	<b>88</b>
3.9.1. <i>Composición de la materia prima, del material pretratado y de otros tratamientos</i> .....	88
3.9.2. <i>Determinación de azúcares</i> .....	89
3.9.3. <i>Determinación de productos de degradación</i> .....	90
3.9.4. <i>Determinación de etanol</i> .....	91
3.9.5. <i>Determinación de la viabilidad celular</i> .....	91
<b>3.10. Cálculo de rendimientos y productividades</b> .....	<b>91</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>97</b>
<b>4.1. Materia prima</b> .....	<b>97</b>
<b>4.2. Pretratamiento por explosión por vapor</b> .....	<b>98</b>
<b>4.3. Evaluación del tratamiento con lacasas y sistemas lacasa-mediador en la deslignificación de la paja de trigo pretratada</b> .....	<b>102</b>
4.3.1. <i>Efecto del tratamiento con lacasa y SLM en la hidrólisis enzimática</i> .....	104
4.3.2. <i>Efecto del tratamiento con lacasa y SLM en la composición de los materiales pretratados</i> .....	110
<b>4.4. Evaluación del tratamiento con lacasas en la producción de etanol a partir del MPC de paja de trigo</b> .....	<b>113</b>
4.4.1. <i>Diferentes estrategias de destoxificación con lacasas durante el proceso de producción de etanol con la cepa termotolerante Kluyveromyces marxianus CECT 10875 (Artículo II)</i> .....	114
4.4.1.1. <u>Efecto del tratamiento con lacasa en la hidrólisis enzimática</u> .....	116
4.4.1.2. <u>Efecto del tratamiento con lacasa en la fermentación</u> .....	119
4.4.2. <i>Influencia de las diferentes condiciones de pretratamiento, consistencia de sustrato y configuraciones de proceso durante</i>	

<i>la producción de etanol con Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875 (Artículo III).....	124
4.4.2.1. <u>Efecto del tratamiento con lacasa sobre los productos de degradación</u> .....	125
4.4.2.2. <u>Viabilidad celular y producción de etanol en los procesos de SFS</u> .....	128
4.4.2.3. <u>Viabilidad celular y producción de etanol en los procesos de PSFS</u> .....	134
4.4.3. <i>Comparación de la viabilidad celular y de los procesos de producción de etanol entre las cepas Kluyveromyces marxianus CECT 10875 y Saccharomyces cerevisiae Ethanol Red (Artículo IV).</i>	138
4.4.3.1. <u>Efecto del tratamiento con lacasa en la concentración de los compuestos inhibidores</u> .....	139
4.4.3.2. <u>Estudio comparativo durante los procesos de SFS</u> .....	141
4.4.3.3. <u>Estudio comparativo durante los procesos de PSFS</u> .....	143
4.4.4. <i>Mejora de la fermentabilidad del MPC en los procesos de SCFS a altas cargas de sustrato tras el tratamiento in situ con lacasa (Artículo V)</i> .....	144
4.4.4.1. <u>Efecto del tratamiento con lacasa en los compuestos fenólicos</u> .....	146
4.4.4.2. <u>Efectos del tratamiento con lacasa durante la etapa de sacarificación</u> .....	147
4.4.4.3. <u>Viabilidad celular y producción de etanol en los procesos de SCFS</u> .....	149
4.4.5. <i>Efecto de la suplementación con lacasas durante la sacarificación y co-fermentación simultánea en fed-batch (Artículo VI)</i> .....	157
4.4.5.1. <u>Estudio de fermentabilidad de la fracción líquida o prehidrolizado</u> .....	159

4.4.5.2. <u>Procesos de SCFS en discontinuo</u> .....	162
4.4.5.3. <u>Procesos de SCFS en semicontinuo o <i>fed-batch</i></u> .....	164
<b>4.5. Evaluación del tratamiento con lacasas en la producción de etanol a partir del RSI de paja de trigo a altas cargas (Artículo VII)</b> .....	169
4.5.1. <i>Suplementación con lacasa de la presacarificación enzimática</i> ....	170
4.5.2. <i>Sacarificación y fermentación simultáneas a altas cargas de sólidos</i> .....	175
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	183
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	187
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	193
<b>LISTADO DE PUBLICACIONES</b> .....	217
Artículo I	
Artículo II	
Artículo III	
Artículo IV	
Artículo V	
Artículo VI	
Artículo VII	



**ABREVIATURAS**

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural.

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

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

BPC: bioproceso consolidado.

CBD: dominio de unión a carbohidratos

CBH: celobiohidrolasa.

CDH: celobiosa deshidrogenasa

DAP: fosfato de diamonio

DNS: ácido dinitrosalicílico.

DP: grado de polimerización.

EG: endoglucanasa.

ETBE: etil ter-butyl éter.

EV: explosión por vapor.

FFV: vehículo de combustible flexible (“*flexible fuel vehicle*”)

GEI: gases de efecto invernadero

HA: hidrólisis ácida

HBT: 1-hidroxibenzotriazol

HE: hidrólisis enzimática.

HFS: hidrólisis y fermentación separadas.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

LAP: del inglés “*laboratory analytical procedures*”

MPC: material pretratado completo.

MTBE: metil ter-butyl éter.

NHA: N-hidroxi-N-fenilacetamida

p/p: relación peso/peso.

p/v: relación peso/volumen.

PMO: polisacárido-monooxigenasa

PSFS: presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas.

rpm: revoluciones por minuto.

RSI: residuo sólido insoluble.

RSU: residuos sólidos urbanos

SCFS: sacarificación y co-fermentación simultáneas.

SFS: sacarificación y fermentación simultáneas.

SI: sólidos insolubles

SLM: sistema lacasa-mediador

ST: sólidos totales.

UFC: unidad formadora de colonia

UI: unidades internacionales.

UPF: unidades sobre papel de filtro.

VIO: ácido violúrico

XDH: xilitol deshidrogenasa

XI: xilosa isomerasa

XK: xiluloquinasa

XR: xilosa reductasa

## **RESUMEN**

Atendiendo a criterios de sostenibilidad, diversas directivas gubernamentales, como la 2009/28/CE de la Unión Europea, proponen el reemplazo paulatino de los combustibles fósiles por otros de carácter renovables que permitan reducir al mismo tiempo la dependencia del petróleo y las emisiones de gases de efecto invernadero. Entre las alternativas disponibles hoy en día, los biocarburantes líquidos como el bioetanol o el biodiesel obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica (biocombustibles de segunda generación), representan una de las opciones más atractivas para lograr los objetivos propuestos en el sector transporte a corto-medio plazo. Dado su abundancia y distribución a nivel mundial, la paja de trigo utilizada como materia prima en esta Tesis Doctoral supone un sustrato interesante para la producción de bioetanol lignocelulósico, gracias a su alto contenido en carbohidratos y a su bajo coste. Asimismo, al tratarse de un residuo agrícola no compete con otros mercados como el de la alimentación humana, evitando así los conflictos éticos y morales que ello conlleva.

En la actualidad existen diferentes tecnologías para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Entre ellas, la plataforma bioquímica basada en la extracción de los azúcares por hidrólisis enzimática y su posterior conversión mediante un proceso de fermentación, representa una de las opciones más prometedoras para el escalado del proceso a nivel industrial. Sin embargo, se trata de un proceso complejo, ya que la estructura recalcitrante de la biomasa lignocelulósica dificulta la accesibilidad de las enzimas a los carbohidratos e impide la liberación de los azúcares. Por este motivo, es necesario realizar una etapa de pretratamiento para alterar la estructura de los diferentes componentes de la lignocelulosa y facilitar el ataque enzimático. De los diferentes procedimientos descritos para llevar a cabo el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, los métodos físico-químicos entre los que se encuentra el pretratamiento por explosión de vapor utilizado en este trabajo, han mostrado ser sistemas eficaces para aumentar la accesibilidad de la celulosa a la degradación enzimática, mejorando los procesos de producción de etanol.

A pesar de los enormes avances realizados en los últimos años en las tecnologías de producción de etanol lignocelulósico, aún existen obstáculos que deben ser superados para facilitar su comercialización. Entre ellos, una mejor integración de las diferentes etapas del proceso y el correcto aprovechamiento de todas las fracciones de la



biomasa, de manera que se pueda incrementar tanto los rendimientos de conversión como la concentración final de etanol.

Una de las etapas clave durante el proceso de producción de etanol es la hidrólisis enzimática. Durante esta etapa se liberan los azúcares que posteriormente se transforman en etanol, de manera que a mayores rendimientos de hidrólisis, mejores serán los rendimientos de etanol. Tras el pretratamiento por explosión de vapor, el material pretratado completo (MPC) normalmente es filtrado y lavado para obtener la fracción de residuos sólidos insolubles (RSI) rica en celulosa y lignina (la hemicelulosa es mayoritariamente solubilizada durante el pretratamiento). En este contexto, la lignina residual presente en el RSI supone una barrera para la hidrólisis enzimática de la celulosa favoreciendo la unión de forma inespecífica de las enzimas hidrolíticas y disminuyendo los rendimientos de sacarificación. Para mejorar la etapa de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, un proceso de deslignificación previo a la adición de las enzimas hidrolíticas podría disminuir las uniones improductivas de estas enzimas en los materiales pretratados, mejorando de ese modo los procesos de sacarificación. Con este objetivo, el uso de enzimas ligninolíticas como las lacasas o los sistemas lacasa-mediador (SLM) representan una opción interesante. Estas enzimas se han aplicado de forma eficaz como agentes deslignificantes en otros sectores industriales, como la etapa de blanqueo durante la fabricación de pastas de papel.

En la presente Tesis, la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* se utilizó por sí sola o en combinación con los mediadores sintéticos para el tratamiento del RSI de la paja de trigo pretratada. Sin embargo, en todos los casos ensayados, el tratamiento con lacasa o los SLM no produjo ningún incremento en la recuperación de glucosa. Por el contrario, presentó un efecto negativo, disminuyendo los rendimientos de sacarificación. Asimismo, los distintos tratamientos con lacasa/SLM no mostraron ningún efecto significativo en cuanto a la modificación del contenido de la lignina residual presente en el RSI. Los tratamientos lacasa/SLM también se combinaron con un proceso de extracción alcalina, no observándose ningún efecto sinérgico que potenciase la deslignificación. No obstante, la extracción alcalina por sí sola si produjo un efecto positivo en la recuperación de glucosa, mostrando asimismo una reducción del contenido en lignina del RSI.

Otro de los puntos clave para mejorar la rentabilidad del bioetanol lignocelulósico es el incremento de las concentraciones finales de producto. En este contexto, el uso del MPC en lugar del RSI, supondría ventajas significativas como el incremento en la concentración de azúcares (los azúcares hemicelulósicos solubilizados no se pierden), el ahorro en las cantidades de agua, la reducción de las aguas residuales generadas y la disminución de los requisitos de equipamiento. Sin embargo, el empleo del MPC como sustrato está limitado por la presencia de ciertos compuestos procedentes de la degradación de la materia prima durante el pretratamiento que actúan como inhibidores de las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentativos.

Entre los diversos métodos de destoxificación desarrollados a día de hoy, los tratamientos *in situ* con lacasas representan una opción muy apropiada, ya que se llevan a cabo bajo unas condiciones de reacción suaves, requieren poca energía, generan pocos subproductos y no necesitan de equipamiento adicional. En este contexto, en la presente Tesis se han valorado varias estrategias de destoxificación con lacasa para la mejora de los procesos de producción de etanol a partir del MPC y del RSI de paja de trigo pretratada por explosión por vapor. Los procesos de destoxificación se han evaluado en diferentes configuraciones de hidrólisis y fermentación (sacarificación y fermentación simultáneas [SFS], presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas [PSFS] y sacarificación y co-fermentación simultáneas [SCFS]), utilizando como microorganismos fermentativos la cepa termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, la cepa industrial *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red y las cepas co-fermentadoras de pentosas y hexosas *S. cerevisiae* F12 y *S. cerevisiae* KE6-12. Una parte de este trabajo se realizó en colaboración con el Dpto. de Ingeniería Química y Biológica de la Universidad Tecnológica de Chalmers en Suecia. De forma general, se puede establecer que el tratamiento con lacasa permitió mejorar la supervivencia celular de los microorganismos utilizados durante la fermentación del MPC, ofreciendo la posibilidad de trabajar a mayores consistencias de sustrato e incrementando tanto la concentración final de etanol como los rendimientos de conversión y las productividades volumétricas. Además, estos mismos efectos también se pudieron observar al utilizar el RSI, permitiendo la fermentación de los materiales a altas cargas de sustrato y alcanzando concentraciones de etanol superiores a la mínima requerida para un escalado industrial.



## **ABSTRACT**

In recent years, some policies, such as the European Union Directive 2009/28/EC, have been adopted under several binding sustainability standards to gradually replace fossil fuels with other renewable alternatives for the reduction of both the oil dependence and the greenhouse gas emissions. Among different available possibilities, liquid biofuels (bioethanol and biodiesel) obtained from lignocellulosic biomass (second generation biofuels) offers the most attractive options toward this goal in the short-medium term.

Used as raw material in this Doctoral Thesis, wheat straw can represent an abundant and widely distributed feedstock for lignocellulosic bioethanol production due to its high carbohydrate content and low price. Furthermore, wheat straw is considered as an agricultural waste and does not compete with food, avoiding ethical and moral conflicts.

Nowadays, there are different technologies for second generation bioethanol production. The biochemical platform, based on the enzymatic hydrolysis and the subsequent fermentation by microorganisms of the carbohydrates contained in the plant cell walls, is advantageous for scaling up the process to industrial levels. However, the main disadvantage of the process lies in the recalcitrant to hydrolysis of lignocellulosic biomass that hinders the accessibility of the enzymes to carbohydrates and, therefore, prevents the release of sugars. In this context, a pretreatment step is necessary to alter the structure of lignocellulose and to facilitate the enzymatic degradation. Among different pretreatment technologies, physico-chemical methods, such as steam explosion, used in the present work, have shown to be cost-effective to increase the accessibility of cellulose to enzyme action, improving ethanol production.

In spite of the developments made in recent years, there are still several challenges to overcome prior to a commercial lignocellulosic bioethanol production. These challenges include a better process integration as well as the increase of product concentration and final yields. Since the amount of sugars released is directly correlated with the product concentration, i.e., the better the sugar yield, the higher the ethanol production; the enzymatic hydrolysis constitutes one of the main bottlenecks during this process. After steam explosion pretreatment, the whole pretreated material (slurry) can be filtrated and washed in order to obtain the water insoluble solids (WIS) fraction,

which mainly contains cellulose and lignin due to the extensive hemicellulose solubilization during pretreatment. In this context, the residual lignin contained in the WIS fraction represents an important limiting factor during the enzymatic hydrolysis of cellulose, promoting the non-specific binding of hydrolytic enzymes and decreasing saccharification yields. Hence, a delignification step prior to the addition of hydrolytic enzymes may reduce unproductive bindings of these enzymes, enhancing the saccharification stage. With this purpose, the use of ligninolytic enzymes such as laccases or laccase-mediator system (LMS) can be a feasible option since these enzymes have been effectively used as delignifying agents in other industrial processes such as the biobleaching of paper pulps.

In the present work, *Pycnoporus cinnabarinus* laccase was used alone or in combination with different synthetic mediators (LMS) with the aim of increasing the sugar released from the WIS fraction by a delignification step. However, in all assayed samples, the treatment with laccase or LMS did not increase the glucose recovery. On the other hand, laccase/LMS treatment showed a negative effect by decreasing saccharification yields. In addition, WIS samples showed no significant differences in terms of lignin content. Laccase or LMS was also combined with an alkaline extraction, but the results did not show any synergistic effect on delignification. By contrast, the alkaline extraction alone led to a better glucose recovery, showing a reduction in the lignin content of WIS.

Another key aspect toward a suitable lignocellulosic bioethanol production is the increase of final product concentrations. In this context, the use of whole slurries instead of WIS fraction could offer several advantages such as increasing the concentration of sugars (soluble sugars from hemicellulose are not lost), saving freshwater and reducing wastewater and equipment requirements. However, the presence of certain degradation compounds limits the use of slurry for ethanol production as they can inhibit hydrolytic enzymes and fermenting microorganisms.

Compared to other detoxification methods, the use of laccases involves fewer inhibitory sub-products, little waste generation and mild reaction conditions. Moreover, laccases offer the possibility to be used directly (*in situ*), without the need of performing any additional step that increases the process costs. In this context, this Doctoral Thesis has assessed several laccase detoxification strategies for improving ethanol production

from the whole slurry or WIS fraction obtained after a steam explosion pretreatment of wheat straw. Detoxification processes have been evaluated in different configurations of hydrolysis and fermentation (simultaneous saccharification and fermentation [SSF], presaccharification and simultaneous saccharification and fermentation [PSSF] and simultaneous saccharification and co-fermentation [SSCF]), using the thermotolerant strain *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, the industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red and the xylose-consuming *S. cerevisiae* F12 and *S. cerevisiae* KE6-12 as fermentative microorganisms. Part of this work was performed in collaboration with the Department of Chemical and Biological Engineering of Chalmers University of Technology in Sweden. As main outcomes using the slurry, laccase treatment improved the survival of fermenting microorganisms, offering the possibility of working under higher substrate consistencies and increasing ethanol concentration, volumetric productivities and final yields. Furthermore, when using the WIS fraction the same effects were also observed, allowing the fermentation of broths at high dry matter consistencies and reaching higher ethanol concentrations than the minimum required for an industrial process.



# *INTRODUCCIÓN*





## 1. INTRODUCCIÓN

A pesar de la gran diversificación del sector energético en los últimos años, los combustibles fósiles continúan siendo a día de hoy la principal fuente de obtención de energía. Esta dependencia, junto al incremento en la demanda energética por el continuo desarrollo de la sociedad mundial, establece una situación delicada para el entorno en el que vivimos, dada la relación existente entre la utilización de estas fuentes de energía y diversos procesos perjudiciales para el medioambiente. Uno de los efectos claros derivados del uso masivo de estos recursos es el aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Por ejemplo, el CO<sub>2</sub>, que representa el 77% de los GEI, ha elevado sus emisiones en un 80% los últimos 40 años y ha contribuido al incremento en la temperatura media global, provocando el deshielo de los casquetes polares y el consiguiente aumento del nivel del mar (IPCC, 2008). Otro dato negativo a tener en cuenta es la imposibilidad de regeneración de los recursos fósiles, lo que limita su utilización a largo plazo y podría ocasionar una crisis energética a nivel mundial.

Ante esta perspectiva urge la necesidad de buscar y desarrollar alternativas renovables y más sostenibles con el medio ambiente. En los últimos años, se han propuesto diferentes opciones para el reemplazo de los recursos energéticos actuales entre los que podemos destacar la energía solar fotovoltaica, la energía eólica, la energía hidroeléctrica o la biomasa entre otros. El uso de estas alternativas implica principalmente el aprovechamiento de los recursos naturales por lo que sus procesos minimizan el peligro para el hábitat donde se generan y/o se utilizan.

### 1.1. El sector del transporte y los biocombustibles

Dentro del sector energético, el transporte presenta una dependencia del 98% de los combustibles derivados del petróleo y supone el 30% de las emisiones totales de GEI (Gómez y col., 2008). Con estos precedentes y atendiendo a criterios de sostenibilidad, diferentes organismos internacionales han establecido ciertos parámetros para la sustitución paulatina de estos carburantes de origen fósil por otros de naturaleza renovable. Concretamente, la directiva de la Unión Europea relativa al fomento y uso de energía procedente de fuentes renovables (Directiva 2009/28/CE, 2009) ha fijado una participación del 20% de estas energías en el consumo de energía primaria para el año 2020. Asimismo, esta directiva establece la participación de los biocombustibles y otros

carburantes renovables en un 10% dentro del sector transporte. Acorde a esta directiva, España ha determinado mediante el Plan de Energías Renovables (PER, 2011) una aportación de los biocarburantes del 9,2% en el sector transporte y del 11,3% en el conjunto de las energías renovables para el año 2020. Asimismo, este plan recoge una contribución del total de las energías renovables en el consumo energético final para dicho año del 20,8%, rebajando la cifra del 22,7% establecida en 2010 por el Plan de Acción Nacional de Energías Renovables (PANER, 2010).

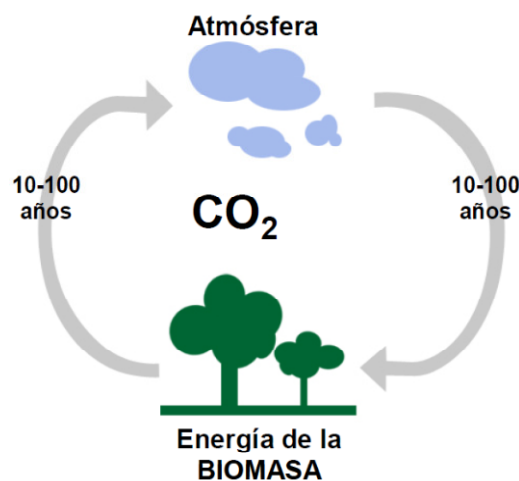
Entre las principales alternativas disponibles actualmente, los biocombustibles líquidos como el bioetanol y el biodiesel representan una opción viable para el remplazo de las energías tradicionales en un período medio-corto. Estos biocarburantes no sólo ayudan a combatir el cambio climático y a reducir la dependencia energética de los productos petrolíferos sino que, al igual que el resto de energías renovables, también contribuyen a la generación de empleo y al desarrollo del medio rural. Desde el punto de vista comercial, los biocombustibles pueden emplearse de forma directa o mezclados con los combustibles fósiles distribuidos a día de hoy (gasolina o gasóleo). Ante este escenario, el bioetanol, por ejemplo, puede emplearse de forma directa (E100) o mezclado a distintas proporciones con la gasolina, siendo las mezclas E10 (90% gasolina + 10% etanol) y E85 (15% gasolina + 85% etanol) las mezclas más comunes. Los motores para la utilización directa de bioetanol necesitan una modificación previa, mientras que para la utilización de mezclas E10 no se requiere ninguna transformación de los sistemas de combustión. Por otro lado, las mezclas comprendidas entre E10 y E85 se utilizan en los vehículos denominados FFV (*Flexible Fuel Vehicle*) que permiten detectar la proporción de la mezcla y adaptar los sistemas de inyección e ignición en cada situación. Además, el etanol también puede transformarse en etil ter-butyl éter (ETBE) y emplearse como sustituto del metil ter-butyl éter (MTBE) (usado como alternativa al tetraetilo de plomo) para mejorar el octanaje y eliminar los efectos dañinos del MTBE.

En un contexto histórico, el etanol ha sido utilizado como carburante desde los principios del transporte motorizado. A mediados del siglo XIX, Nicholas Otto utilizó este compuesto para el funcionamiento del primer motor de combustión interna, mientras que Henry Ford lo utilizaría como combustible para su cuadríciclo a finales del mismo siglo. Debido a la alta disponibilidad de petróleo, durante el siglo XX no pudo desarrollarse una tecnología de producción de etanol eficaz. Sin embargo, las

necesidades actuales han incrementado notablemente la síntesis de este biocombustible a partir de materias primas renovables, siendo explotado incluso de forma comercial en países como Brasil o Estados Unidos ([dos Santos-Bernardes, 2011](#)). En Europa, como se ha comentado con anterioridad, la Directiva de promoción de Energías Renovables ([Directiva 2009/28/CE, 2009](#)) fija un objetivo global del 20% de energías renovables en el consumo total de energía y una cuota del 10% de energías renovables en el transporte, incluidos los biocombustibles, en 2020. Para lograr esta meta sin provocar riesgos de alteración de precios de los productos alimentarios o pérdidas de biodiversidad, los biocarburantes deben cumplir unos criterios de sostenibilidad y, al menos el 40% de su producción, tendrá que estar basada en biocarburantes de segunda generación que no procedan de materias primas alimentarias. Los biocarburantes que se produzcan o importen en la UE deberán ofrecer al menos una reducción del 35% en las emisiones de carbono (que aumentará progresivamente al 45% en 2013 y 50% en 2017) y no deberán provenir de bosques, humedales ni áreas naturales protegidas. Sólo los biocombustibles que cumplan los requisitos de sostenibilidad recogidos en la Directiva podrán contabilizar para el cumplimiento de los objetivos europeos. En este contexto, la Unión Europea está apoyando la investigación sobre biocarburantes de segunda generación, tales como el biodiesel Fischer-Tropsch, el biodimetiléter (bio-DME) o el etanol lignocelulósico.

## 1.2. Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

La biomasa es definida como toda materia orgánica originada de forma inmediata en un proceso biológico espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Históricamente, la biomasa ha sido la mayor fuente energética para el ser humano desde sus orígenes y aún contribuye en un 10-14% al abastecimiento energético mundial (McKendry, 2002). A partir de la biomasa se pueden obtener diferentes tipos de biocombustibles tanto sólidos (astillas, pellets), líquidos (bioetanol, biodiesel) o gaseosos (metano). Como se observa en la Figura 1.1, gracias al proceso de fotosíntesis, el CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera puede ser fijado para la producción de biomasa, por lo que la posterior combustión de la biomasa o la de sus productos derivados genera unas emisiones netas de CO<sub>2</sub> nulas o cercanas a cero, permitiendo mitigar los incrementos de GEI (Gómez y col., 2008).



*Figura 1.1.- Ciclo del carbono relativo a las energías renovables procedentes de la biomasa.*

Teniendo en cuenta la materia prima de partida, los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa pueden clasificarse en primera, segunda, tercera y cuarta generación (Álvarez-Maciel C, 2009). La primera generación utiliza biomasa con alto contenido en azúcares, almidón o aceites, como son la caña de azúcar, el grano de maíz o de trigo o las semillas de girasol. Por el contrario, los combustibles de segunda generación derivan de productos de desecho como los residuos orgánicos y los materiales lignocelulósicos. Las fuentes empleadas para la producción de biocombustibles de segunda generación pueden clasificarse en residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, paja de arroz, etc.), maderas duras (álamo, chopo, etc.), maderas blandas (pino, abeto, píceas),

residuos celulósicos (residuos de papel, residuos de la industria de la madera y el papel, etc.), biomasa herbácea (alfalfa, alpiste, etc.) y residuos sólidos urbanos (RSU) (Cardona y Sánchez, 2007).

Entre estos materiales, la paja de trigo supone una opción interesante ya que está disponible a escala mundial y, tras tener en cuenta su uso en alimentación animal, el 60% de la producción anual estimada puede emplearse con fines energéticos. Por otro lado, la tercera generación representa una evolución de la segunda y utiliza materiales como cultivos bioenergéticos modificados de crecimiento rápido (árboles con menor contenido en lignina o lignina modificada) o las algas y las microalgas. Finalmente, la cuarta generación aún se encuentra en fase teórica y utiliza microorganismos genéticamente modificados para transformar directamente el CO<sub>2</sub> en el biocombustible deseado, principalmente etanol. Entre las diferentes generaciones, la segunda presenta ciertas ventajas en relación a diferentes conflictos éticos como la utilización de alimentos para fines energéticos (primera generación) y en cuanto a su disponibilidad inmediata (tercera y cuarta generación). Además, los materiales utilizados en la producción de biocombustibles de segunda generación son abundantes y se consideran productos de desecho, por lo que no representan un coste adicional elevado y el potencial para abaratar el precio final del producto tiene un margen mayor.

En el año 2011, el principal biocombustible obtenido a partir de biomasa fue el etanol, cuya producción mundial superó los 10<sup>11</sup> litros (Lichts, 2012). Sin embargo, el porcentaje actual de producción de bioetanol de segunda generación respecto al de primera representa una ínfima parte debido a que la tecnología no está totalmente desarrollada a nivel industrial por la complejidad que representa la conversión de los materiales lignocelulósicos.

### *1.2.1. Composición y estructura de los materiales lignocelulósicos*

La lignocelulosa es el componente estructural de la pared celular de las plantas y, con una producción anual estimada de 10<sup>9</sup> toneladas, se considera la mayor fuente de energía y materia orgánica renovable de la biosfera (Reddy and Yang, 2005). Los componentes principales que forman los materiales lignocelulósicos son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, y sus cantidades varían dependiendo del tipo de material así como de la especie. En la Tabla 1.1 se muestra la composición de diversos materiales

lignocelulósicos donde se puede observar la variación en el contenido de las distintas fracciones.

**Tabla 1.1.-** Composición de diferentes materiales lignocelulósicos utilizados en la producción de bioetanol

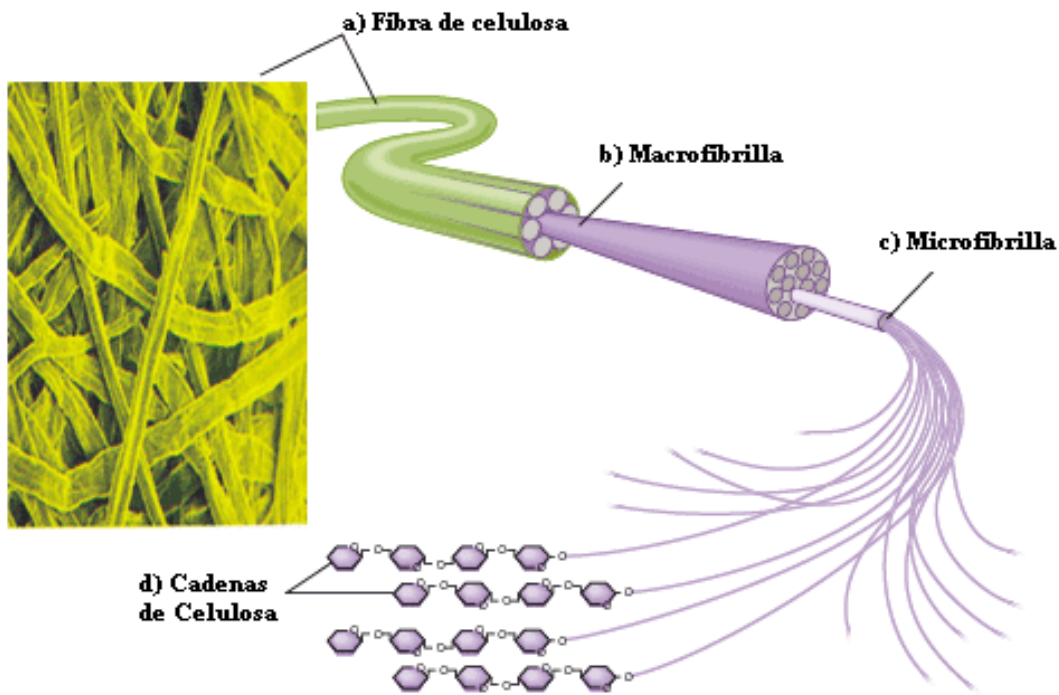
Materia Prima	Glucano	Xilano	Arabinano	Galactano	Manano	Lignina	Referencia
<b>Maderas blandas:</b>							
Picea	49,9	5,3	1,7	2,3	12,3	28,7	Söderström y col. 2003
Pino	41,9	5,5	1,7	2,9	11,7	28,6	Tian y col., 2010
<b>Maderas Duras:</b>							
Sauce	43,0	14,9	1,2	2,0	3,2	26,6	Sassner y col., 2006
Chopo	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
<b>Otros:</b>							
Paja de trigo	40,7	23,7	1,3	2,6	-	17,0	Tomás-Pejó y col., 2009a
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., 2006
Residuo de cañamo	40,1	18,4	-	0,3	0,9	21,7	Barta y col., 2010
Ramón de olivo	25,0	11,1	-	4,7*	-	16,6	Manzanares y col., 2011
RSU	37,5 – 43,9	5,0 – 5,8	-	-	-	21,9 – 29,1	Ballesteros y col., 2010

\* El dato representa los azúcares arabinosa, galactosa y manosa en conjunto

A pesar de las fluctuaciones entre las distintas fracciones, la **celulosa** es el componente estructural mayoritario. Se trata de un polímero lineal construido por residuos de glucosa que se unen entre sí mediante enlaces glucosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) cuyo grado de polimerización puede alcanzar las 15000 unidades. Durante su formación, dado que los enlaces tienen lugar entre el carbono anomérico 1 (C1) (con poder reductor) de uno de los residuos con el grupo hidroxilo del carbono en la posición 4 (C4) del otro, el carbono anomérico no involucrado en la unión puede continuar reaccionando con otras unidades de glucosa, permitiendo la elongación del polímero y generando a su vez dos extremos: uno reductor y otro no reductor.

Gracias a la presencia de los grupos hidroxilos laterales de las unidades de glucosa, los polímeros de celulosa pueden interactuar entre sí a distintos niveles mediante la formación de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, conformando una fibra. La Figura 1.2 muestra las diferentes interacciones y

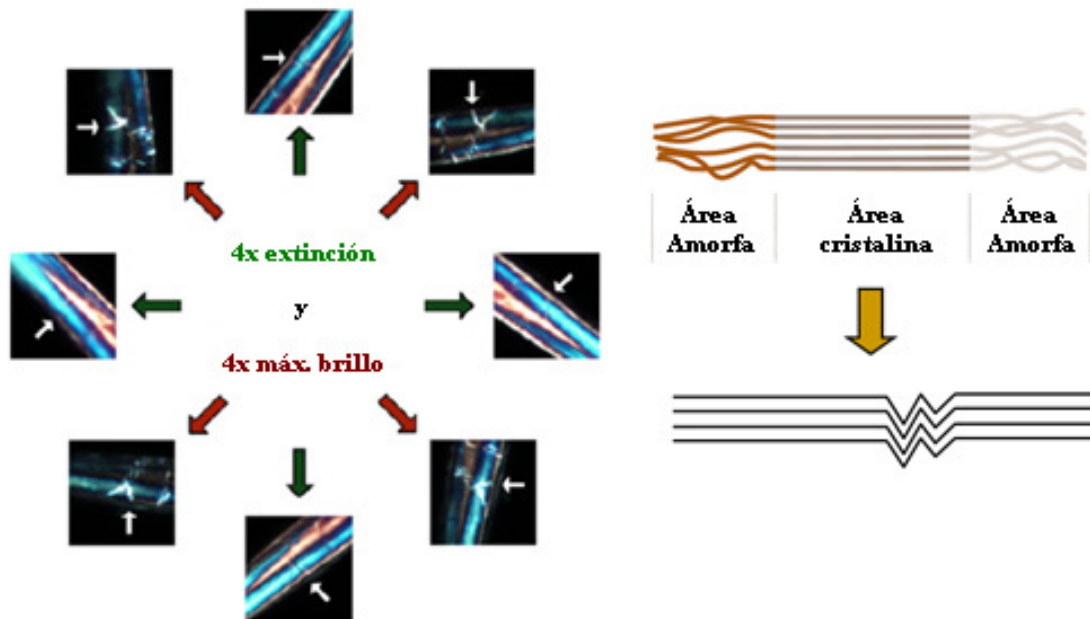
agrupaciones que ocurren durante la formación de una fibra de celulosa. En primer lugar, la interacción entre polímeros lineales genera la aparición de las microfibrillas, que en un nivel de orden superior se agrupan en macrofibrillas, que a su vez originan finalmente la fibra de celulosa.



**Figura 1.2.-** Estructura de la celulosa mostrando las distintas jerarquías de agrupación: (a) fibra de celulosa, (b) macrofibrilla, (c) microfibrilla y (d) polímeros lineales de celulosa. *Fuente:* <http://nutrition.jbpub.com/resources/chemistryreview9.cfm>

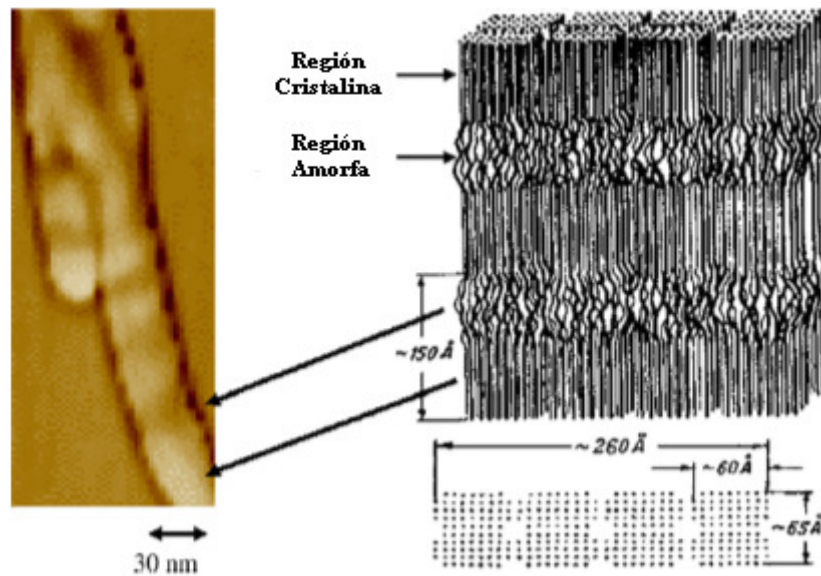
El alto grado de compactación descrito para la celulosa establece una estructura cristalina muy estable, ya que la función principal de esta fibra es la de conferir rigidez y firmeza. No obstante, la acción de diversas fuerzas mecánicas, como el viento o la compresión longitudinal durante el crecimiento, provocan ciertas alteraciones a lo largo de la fibra conocidas como dislocaciones (Terziev y col., 2005). Tradicionalmente se pensaba que estas zonas carecían de estructura definida, ya que presentan un grado de cristalinidad inferior y la susceptibilidad a la degradación es mayor en comparación al resto de la fibra (Dai y Fan, 2011; Thygesen y col., 2011). Sin embargo, como puede verse en la Figura 1.3, las dislocaciones manifiestan una refringencia típica de las estructuras cristalinas aunque en una orientación diferente, por lo que se puede entender que la estructura de la celulosa no se pierde y que el único mecanismo que tiene lugar es el cambio de dirección de la fibra (Thygesen y col., 2011; Hidayat y col., 2012).





**Figura 1.3.-** Fotografía de una fibra de celulosa bajo microscopía de luz polarizada en diferentes ángulos demostrando la cristalinidad de las dislocaciones (izquierda, adaptado de Thygesen y col., 2011). Adaptación del modelo tradicional de dislocaciones sin estructura definida a un modelo de estructura cristalina con una orientación diferente al resto de la fibra (derecha).

Algunos autores, realizando un estudio a escala inferior, han determinado que la fibra de celulosa presenta regiones desordenadas periódicas (cada 150 nm) a las que se conoce como celulosa amorfa (Bhattacharya y col., 2008). De esta manera, las fibras de celulosa se pueden dividir estructuralmente en zonas cristalinas y zonas amorfas. La Figura 1.4 muestra las zonas cristalinas y amorfas de la celulosa así como sus repeticiones secuenciales.



**Figura 1.4.-** Imagen de microscopía de fuerza atómica (izquierda) y esquema representativo (derecha) de las regiones cristalinas y amorfas observadas en la fibra de celulosa (adaptado de *Bhattacharya y col., 2008*).

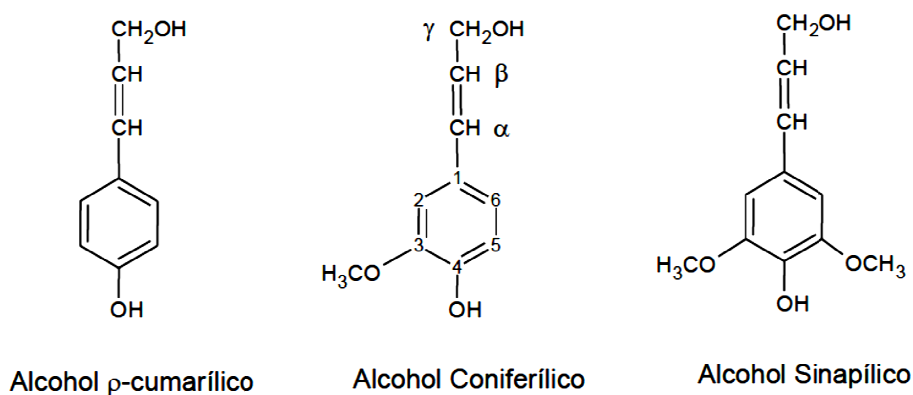
Junto a la celulosa, la **hemicelulosa** forma parte de la fracción azucarada de la pared celular de las plantas. Sin embargo, mientras que la celulosa conforma un homopolímero lineal con una estructura cristalina, la hemicelulosa constituye un heteropolímero con organización ramificada. El grado de polimerización de la hemicelulosa es muy inferior al de la celulosa, y varía entre 70 y 200 unidades. Al tratarse de un heteropolímero, los componentes monoméricos que forman la hemicelulosa son varios y pueden clasificarse en hexosas (glucosa, manosa, galactosa y ramnosa), pentosas (xilosa y arabinosa), ácidos urónicos y grupos acetilo (*Fengel y Wegener, 1989*). La cantidad de cada uno de estos componentes varía dependiendo del material lignocelulósico y en función de la unidad mayoritaria se pueden establecer distintos tipos de hemicelulosas. De esta manera, cuando la cadena principal está formada por un solo compuesto, podemos encontrar los xilanos, mananos, glucanos o galactanos, mientras que cuando la cadena principal presenta diferentes sustituciones aparecen los glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomananos, galactoglucomananos, xiloglucanos, arabinogalactanos, etc. (*Brett, y Waldron, 1996*).

Como se muestra en la Tabla 1.1, los materiales lignocelulósicos pueden clasificarse en maderas duras (plantas angiospermas), maderas blandas (plantas gimnospermas) y herbáceas. En las maderas duras, los polímeros hemicelulósicos más

abundantes son el xilano y el glucuronoxilano con sustituciones frecuentes de grupos acetilo, mientras que en las maderas blandas el galactoglucomanano y el arabinoglucuronoxilano son las cadenas mayoritarias (Dahlman y col., 2003; Fengel y Wegener, 1989). Por otro lado, los materiales herbáceos están constituidos por una fracción hemicelulósica similar a la que presentan las maderas duras, aunque las sustituciones con grupos acetilo se encuentran en menor proporción. Como ejemplo concreto, el polímero hemicelulósico mayoritario en la paja de trigo es el xilano, el cual, está frecuentemente sustituido por unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa formando cadenas de arabinoxilano (Sun y Tomkinson, 2002). Asimismo, también se pueden encontrar otros sustituyentes de la cadena de xilosa como son la galactosa, los grupos acetilo, el ácido glucurónico o el ácido 4-O-metil-glucurónico (Sun y col., 2005a, 2005b).

Debido a que el polímero de hemicelulosa se encuentra íntimamente ligado a la celulosa y a la lignina, su función es la de actuar como nexo de unión entre ambos componentes.

La **lignina** es el tercer constituyente mayoritario de los materiales lignocelulósicos y su función principal es la de proveer resistencia y protección frente a la degradación química y biológica. Las unidades a partir de las cuales se construye este polímero son el  $\rho$ -hidroxifenilo (H), el guayacilo (G) y el siringilo (S), que a su vez derivan de los respectivos alcoholes cinamílicos  $\rho$ -cumárico, coniferílico y sinapílico (Martínez y col., 2009). Como se puede observar en la Figura 1.5, la principal diferencia entre las tres unidades radica en las sustituciones de los grupos metoxilos presentes en el anillo aromático.



**Figura 1.5.-** Estructuras químicas de las unidades H (izquierda), G (centro) y S (derecha) que conforman el polímero de lignina.

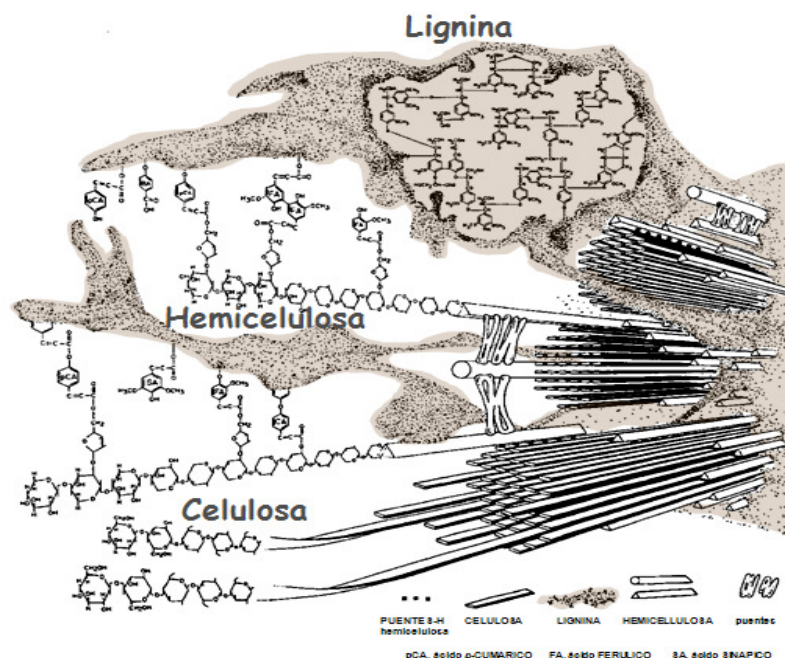
Durante la formación de la lignina, las distintas unidades se ensamblan unas con otras mediante un proceso de acoplamiento oxidativo. Al igual que se mencionó para la hemicelulosa, la extensión así como la composición en las distintas unidades de la lignina varían dependiendo de las especies. En este contexto, la lignina formada en las maderas duras presenta un contenido mayoritario en unidades S y G con pequeñas trazas de unidades H, mientras que la lignina presente en las maderas blandas contiene principalmente unidades G con pequeñas cantidades de unidades H (Sannigrahi y col., 2010). Los materiales herbáceos presentan un polímero de lignina que contiene las tres unidades en diferentes proporciones y, además, incorporan diferentes ácidos hidroxycinámicos (principalmente  $\rho$ -cumárico y ferúlico) que actúan como nexos de unión entre la lignina y la hemicelulosa. En el caso de la paja de trigo, la lignina puede representar hasta el 25% del peso seco total y está compuesta por aproximadamente un 5% de unidades H, un 49% de G y un 46% de S (Laureano-Pérez y col., 2005; Tomás-Pejó y col., 2008a; Buranov and Mazza, 2008). Asimismo, los porcentajes de ácido ferúlico y ácido  $\rho$ -cumárico pueden alcanzar alrededor del 5% de forma individual.

Como compuestos adicionales a los ya mencionados, los materiales lignocelulósicos incluyen otros elementos en menores proporciones: las pectinas, los extractivos y las cenizas. Las **pectinas** tienen una función relacionada con la porosidad de la pared celular y son polisacáridos formados principalmente por unidades de ácido galacturónico y, en menores proporciones, ramnosa, arabinosa y galactosa (Brett, y Waldron, 1996). Los **extractivos** son un grupo heterogéneo encargados del color, olor y/o la resistencia frente ataques microbianos e incluyen grasas, ceras, alcaloides, proteínas, mucílagos, gomas, resinas, etc. Por último, las **cenizas** representan el conjunto de compuestos inorgánicos, tales como las sales o los metales pesados.

Debido a la extensa variabilidad descrita en la composición química, la estructura tridimensional que conforman los diferentes componentes lignocelulósicos es muy compleja. Las uniones que tienen lugar durante la biosíntesis de la lignocelulosa pueden ser de carácter covalente (enlaces tipo glucosídico, éster o éter) o no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas o hidrofóbicas) y proporcionan una configuración muy compacta que confiere alta resistencia a la ruptura y desorganización (Carpita and Gibeaut, 1993; Brett, y Waldron, 1996).

De forma general, la pared celular de las plantas se divide en tres capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria (Bidlack y col., 1992; Brett y Waldron, 1996). La **lámina media** representa una capa delgada y rica en pectinas que se sitúa en la parte exterior, por lo que establece contacto entre las células adyacentes. A continuación de la lamina media se sitúan la **pared primaria** y la **pared secundaria**. La pared primaria tiene un grosor de 0,1-1  $\mu\text{m}$  y está compuesta por celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas. Por otro lado, la pared secundaria deriva a su vez de la pared primaria y, aunque no está presente en todos los tipos celulares, representa la capa más importante desde un punto de vista cuantitativo. A diferencia de la pared primaria, la pared secundaria incorpora la lignina entre sus elementos. Este compuesto se encarga de cubrir la celulosa y la hemicelulosa generando una matriz estructural con un grosor considerablemente superior al resto de capas. Dentro de la pared secundaria se distinguen a su vez tres subcapas: S1, S2 y S3, y la diferencia entre ellas radica en la orientación de las fibras de celulosa: transversal (S1 y S3) o longitudinal (S2).

La Figura 1.6 muestra un ejemplo de cómo los distintos componentes estructurales de los materiales lignocelulósicos pueden organizarse y establecer una configuración tridimensional.



**Figura 1.6.-** Esquema de interacción tridimensional entre los distintos componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) de una angiosperma herbácea (adaptado Bidlack y col., 1992).

### *1.2.2. Producción de bioetanol lignocelulósico mediante procesos bioquímicos*

Bajo un punto de vista operacional, en la actualidad existen dos vías que se diferencian en los procesos que involucran para la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos: la plataforma termoquímica y la bioquímica (Dwivedi y col., 2009). En el caso de la producción de etanol por procesos termoquímicos, la biomasa se somete a altas temperaturas (800-1400 °C) transformándose en gas de síntesis ( $H_2$  y CO), que es convertido posteriormente a etanol mediante la utilización de catalizadores químicos metálicos. Por otro lado, la conversión de biomasa lignocelulósica mediante procesos bioquímicos se basa principalmente en la obtención de los azúcares monoméricos y su posterior transformación a etanol tras un proceso de fermentación. A pesar de no existir una diferencia clara entre ambas plataformas, el empleo de catalizadores bioquímicos permite llevar a cabo el proceso a temperaturas más suaves y las reacciones tienen lugar con una alta especificidad sin generar subproductos derivados.

Composicionalmente, los materiales lignocelulósicos son una materia prima adecuada para la producción de etanol mediante procesos bioquímicos, ya que el porcentaje de azúcares puede representar hasta el 75% del peso seco total (Laureano-Pérez y col., 2005; Wyman, 1996). El proceso de hidrólisis mediante el cual se obtienen los azúcares fermentables (monómeros) puede llevarse a cabo tanto de forma química como enzimática. En el caso de la hidrólisis ácida (HA), la ruptura de los enlaces presentes entre los residuos azucarados se produce mediante el empleo en forma concentrada o diluida de catalizadores químicos como el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico, etc. Aunque la HA es un método rápido y efectivo, acarrea importantes desventajas como los elevados costes de recuperación del catalizador o la necesidad de una etapa de neutralización previa a la fermentación (Galbe y Zacchi, 2002; Olsson y col., 2005). En este contexto, la hidrólisis enzimática (HE) representa una alternativa sostenible que, en comparación a los procesos de HA, plantea las siguientes mejoras (Taherzadeh y Karimi, 2007; Tomás-Pejó y col., 2008a):

- Permite obtener mayores rendimientos de conversión.
- El proceso se lleva a cabo en condiciones suaves.
- Requiere menos energía.

- No es necesaria la utilización de equipamiento especial, como por ejemplo el uso de materiales resistentes a la corrosión.
- Genera menos subproductos inhibidores para la etapa de fermentación.

Como contrapunto a los beneficios de la HE, las etapas de obtención y purificación de enzimas suponen un coste importante del proceso que se traduce en un incremento del coste final del etanol. Asimismo, la estructura altamente organizada de los componentes de la biomasa lignocelulósica supone una barrera física que dificulta la accesibilidad de las enzimas a las fracciones azucaradas. En este contexto, la realización de una etapa de pretratamiento resulta imprescindible para mejorar los procesos de HE y, por consiguiente, incrementar los rendimientos del proceso global.

Actualmente, el proceso de producción de etanol mediante la ruta bioquímica consta de las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación.

#### 1.2.2.1. Pretratamiento

El pretratamiento es una etapa fundamental durante el proceso de producción de etanol, durante el que se altera la estructura nativa de las fibras para facilitar la accesibilidad de las enzimas a los materiales lignocelulósicos. Teniendo en cuenta este objetivo, el pretratamiento debe ser capaz de disminuir la cristalinidad de la celulosa y su grado de polimerización. Además, el área superficial accesible y el grado de porosidad del material pretratado deben ser superiores en relación al material de partida (Taherzdeh y Karimi, 2008).

A pesar de considerarse una etapa indispensable, el pretratamiento puede llegar a representar un tercio del coste global en la producción de etanol (Lynd, 1996). En este contexto, la comunidad científica ha llevado a cabo numerosos esfuerzos para el desarrollo de una tecnología que pueda usarse como método de pretratamiento eficaz y a un coste razonable (Alvira y col., 2010; Tomás-Pejó y col., 2011). Actualmente, los métodos de pretratamiento más utilizados pueden clasificarse en físicos, químicos, físico-químicos o biológicos.

Los pretratamientos **físicos**, como la molienda o la extrusión, se basan principalmente en el uso de fuerzas de impacto o cizalla. Estos procesos se encargan de



reducir el tamaño de partícula y desestructurar las fibras, aumentando el área superficial accesible. Por otro lado, durante los pretratamientos **químicos**, el uso de compuestos ácidos (diluidos o concentrados), bases, solventes orgánicos, compuestos oxidantes o líquidos iónicos, provoca una modificación en la composición y estructura de los materiales, aumentando su digestibilidad. En relación a los procesos **físico-químicos**, el efecto ocasionado por la combinación de la acción física (cambio de temperaturas, presiones, etc.) y química (empleo de ácidos, solventes, etc.), permite la modificación estructural de la biomasa lignocelulósica, facilitando la extracción de sus componentes. Los sistemas físico-químicos más empleados son la explosión por vapor (EV) (con o sin catalizador), el pretratamiento con agua caliente en fase líquida, la explosión por vapor con amoníaco (AFEX) y la oxidación húmeda. Por último, los procesos **biológicos** implican el uso de microorganismos ligninolíticos o sus enzimas.

En la elección del método adecuado de pretratamiento hay que tener en cuenta una serie de factores (Yang y Wyman, 2008). En primer lugar, el sistema debe ser versátil, es decir, que pueda ser utilizado con un amplio rango de materiales. Además, debe poder trabajar en reactores de bajo coste y con un tamaño adecuado. Los requerimientos energéticos tienen que ser bajos y debe facilitar la recuperación de todos los componentes de forma que ofrezca la posibilidad de obtener productos con valor añadido (futuras biorefinerías). Por último, la degradación de azúcares debe ser mínima, ya que son la materia prima para la producción de etanol y los compuestos derivados son inhibidores para las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

#### ***1.2.2.1.1. Procesos de biodeslignificación***

Entre los factores físico-químicos y de composición que contribuyen a la resistencia de la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos, la lignina juega un papel muy importante al ejercer de barrera física y formar uniones inespecíficas con las enzimas hidrolíticas. De esta manera, un proceso de deslignificación puede aumentar la accesibilidad de las enzimas mediante el incremento en el número de poros y del área superficial accesible, mejorando así los rendimientos de HE (Yu y col., 2011). Pretratamientos como la ozonólisis, la explosión con CO<sub>2</sub> o los métodos biológicos son capaces de disminuir el contenido de lignina de la biomasa (Alvira y col., 2010; Tomás-Pejó y col., 2011). Entre ellos, los sistemas de biodeslignificación suponen una opción prometedora frente al resto de métodos, gracias a que permite alcanzar altos



rendimientos con un impacto medioambiental bajo. Además, estos sistemas, y especialmente la deslignificación enzimática, se han aplicado con éxito en otros sectores de la industria lignocelulósica, incluyendo el proceso de blanqueo de pastas en la industria papelera (Ibarra y col., 2006a; Camarero y col., 2007). Todo ello hace que los sistemas biológicos de deslignificación estén generando gran atención en la transformación industrial de la biomasa lignocelulósica para la producción de materiales, productos químicos, biocombustibles y energía (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009).

En la naturaleza existen diferentes microorganismos capaces de degradar la lignina, entre los que se incluyen mayoritariamente hongos y algunas bacterias. Los hongos basidiomicetos son los principales responsables del inicio de la descomposición de la biomasa vegetal. Considerando aspectos macroscópicos, estos hongos pueden clasificarse como **basidiomicetos de podredumbre parda**, cuando generan un residuo de color parduzco tras la modificación parcial de la lignina y la degradación de los azúcares, o **basidiomicetos de podredumbre blanca**, donde una vasta degradación de la lignina deja al descubierto las fracciones de hemicelulosa y celulosa de color blanquecino (Martínez y col., 2005).

Los microorganismos de podredumbre blanca han desarrollado un sistema extracelular de enzimas oxidativas con actividad inespecífica, que les permite despolimerizar y mineralizar la lignina de forma muy eficiente. Este proceso puede realizarse simultáneamente a la degradación de la celulosa, o de manera secuencial y selectiva. Las proteínas que integran el sistema enzimático de estos microorganismos incluyen las lacasas, diferentes peroxidasas ligninolíticas y otras oxidasas y reductasas, así como compuestos de bajo peso molecular que actúan como mediadores (Martínez y col., 2005).

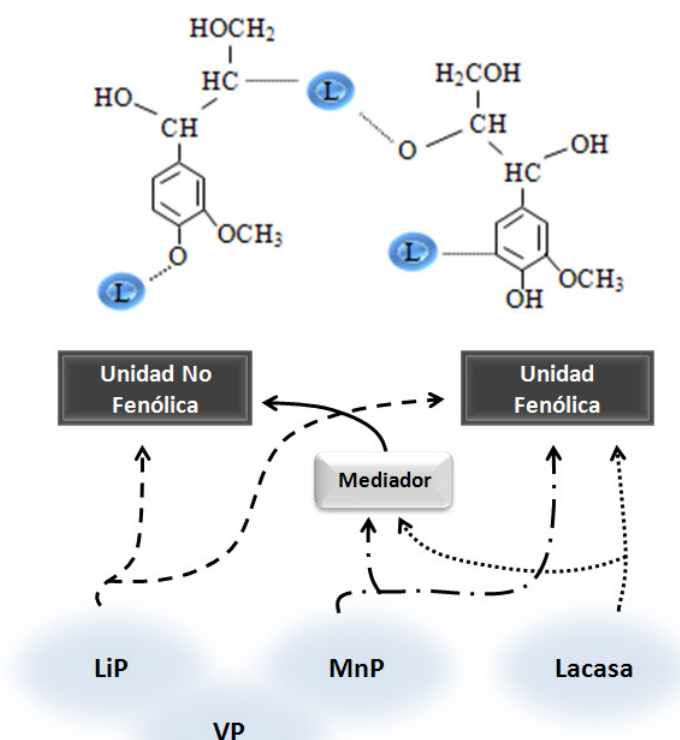
Las **lacasas** (EC 1.10.3.2) son proteínas multicobre que catalizan la oxidación de fenoles sustituidos, anilinas y tioles aromáticos a sus correspondientes radicales, con la consiguiente reducción del oxígeno molecular a agua (Mayer y Staples, 2002). Estas enzimas son producidas por algunas plantas, bacterias y hongos, siendo una característica típica de los basidiomicetos de podredumbre blanca (Käärrik, 1965). Debido a su bajo potencial redox, las lacasas sólo pueden actuar sobre las unidades fenólicas de la lignina, las cuales representan un pequeño porcentaje del total de la

lignina. Sin embargo, en presencia de compuestos de bajo peso molecular (**mediadores redox**) son también capaces de oxidar las unidades no fenólicas (Bourbonnais y Paice, 1990).

Por otro lado, el grupo relativo a las **peroxidasas ligninolíticas** engloba un conjunto de hemoperoxidasas de alto potencial redox que requieren la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como co-sustrato de la reacción. Estas proteínas se clasifican en tres grupos independientes: manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13), lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.16). La LiP y la MnP fueron descritas inicialmente en el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Gold y Alic, 1993; Cullen y Kerstern, 2004), mientras que la VP se identificó en una cepa de *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Dueñas y col., 2001). En función del grupo, los mecanismos de acción de estas peroxidasas son diferentes. La LiP es capaz de actuar indistintamente de forma directa tanto en los residuos fenólicos de la lignina, como en los no fenólicos. Por otro lado, la MnP actúa preferentemente sobre los residuos fenólicos tras generar Mn<sup>3+</sup>. Además, al igual que ocurre con las lacasas, mediante una reacción secundaria de peroxidación lipídica también pueden actuar sobre los residuos no fenólicos (Martínez y col., 2005). Por último, la VP se ha descrito como una peroxidasa capaz de compartir las propiedades catalíticas de la LiP y de la MnP (Ruiz-Dueñas y col, 1999).

Además de los diferentes grupos descritos, durante el proceso de deslignificación también están involucradas un conjunto de **oxidadas** (glioxal oxidasa, aril-alcohol oxidasa) y **reductasas** (aryl-alcohol deshidrogenasa, quinona reductasa) que se encargan respectivamente de generar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerido por las peroxidasas y reducir los compuestos fenólicos derivados para evitar su repolimerización (Martínez y col., 2005).

En la Figura 1.7 se indican las diferentes enzimas producidas por los microorganismos ligninolíticos así como los residuos de lignina sobre los que actúan.



**Figura 1.7.-** Enzimas involucradas en el proceso de deslignificación y su acción selectiva en los componentes de la lignina. LiP: lignina-peroxidasa; MnP: Manganeso-peroxidasa; VP: peroxidasa versátil; L: polímero de lignina.

La capacidad de los basidiomicetos de podredumbre blanca de degradar el polímero de lignina les convierte en potenciales herramientas como pretratamiento alternativo o complementario a los pretratamientos físico-químicos empleados en la producción de bioetanol lignocelulósico. Mediante un proceso de fermentación en estado sólido, diferentes especies han sido estudiadas para la **deslignificación microbiana** entre las que destacan los hongos *P. chrysosporium* (Kuhar y col., 2008; Shi y col., 2009; Singh y col., 2011), *Trametes versicolor* (Itoh y col., 2003; Zhang y col., 2008; Canam y col., 2011; Salvachúa y col., 2011), *Panus tigrinus* (Salvachúa y col., 2011), *Ceriporiopsis subvermispora* (Itoh y col., 2003; Muñoz y col., 2007; Wan y col., 2010), *Pycnoporus cinnabarinus* (Kuhar y col., 2008; Gupta y col., 2011), *Irpex lacteus* (Dias y col., 2010; Yu y col., 2010), *Ceriporia lacerata*, *Stereum hirsutum*, *Polyporus brumalis* (Lee y col., 2007), *Ganoderma austral* (Muñoz y col., 2007), *Dichomitus squalens* y *Pleurotus ostreatus* (Itoh y col., 2003). Los patrones de degradación varían entre las diferentes cepas y los rangos de deslignificación alcanzados se sitúan entre el 10% y el 75%.

Las mejoras conseguidas con el proceso de biodeslignificación se pueden observar en las etapas posteriores de hidrólisis (HE/HA) y/o fermentación. Lee y col. (2007) describieron un incremento del 21% en los rendimientos de HE usando astillas de pino rojo japonés tras reducir en un 14,5% el contenido en lignina con *S. hirsutum*. Asimismo, Gupta y col. (2011) determinaron unos rangos de deslignificación de 7,7-11,9% y 6,9-8,4% en la biomasa procedente de las plantas *Prosopis juliflora* y *Lantana camara*, respectivamente, tras el tratamiento con *P. cinnabarinus*, incrementando un 21,4-42,4% la HA y un 21,1-25,1% la HE. Además, el contenido fenólico obtenido tras el proceso de HA disminuyó un 18,5-19,9% en ambos materiales. Por otro lado, Kuhar y col. (2008) pretrataron paja de trigo y *P. juliflora* con la cepa RCK-1 de un basidiomiceto aislado por ellos mismos, observando respectivamente un aumento del 33% y del 10% en el rendimiento de etanol, y del 80% y del 57% en la productividad volumétrica de ambos materiales.

Como se ha mencionado con anterioridad, sólo los basidiomicetos de podredumbre blanca son capaces de degradar la lignina de una forma eficaz. Sin embargo, algunos ascomicetes pueden colonizar a su vez la biomasa lignocelulósica. En este contexto, *Trichoderma reesei* y *Aspergillus terreus* se han utilizado como microorganismos degradadores de lignina disminuyendo el contenido de este polímero en un 60% y un 92%, respectivamente (Singh y col., 2008). Además, algunas bacterias como *Bacillus macerans*, *Cellulomonas cartae*, *Cellulomonas uda* y *Zymomonas mobilis* también han mostrado cierta capacidad deslignificadora, promoviendo la eliminación de lignina hasta en un 50% (Singh y col., 2008).

La eficacia de los pretratamientos que utilizan microorganismos ligninolíticos depende tanto del tiempo de incubación como de sus actividades enzimáticas. En primer lugar, el tiempo de tratamiento puede variar desde 7 hasta 84 días (Canam y col., 2011; Salvachúa y col., 2011). Menores tiempos de tratamiento han sido descritos por Salvachúa y col. (2011), quienes observaron una reducción del 17% y del 24%, tras 7 días de tratamiento con los hongos *P. tigrinus* y *T. versicolor*, respectivamente. Sin embargo, cuando estos autores incrementaron el tiempo de residencia de 7 a 21 días, los porcentajes de delignificación se elevaron a su vez hasta el 47% y el 46%, respectivamente. Por otro lado, las actividades celulolíticas de los microorganismos empleados en los procesos de biodeslignificación deben ser lo más bajas posibles para reducir la pérdida de azúcares durante este pretratamiento. Así, el uso de cepas como *C.*

*subvermispora*, que consume menos del 6% de los azúcares totales (Wan y col., 2010), u otros microorganismos genéticamente modificados, como la cepa de *T. versicolor* deficiente en la enzima celobiosa deshidrogenasa (Canam y col., 2011), son alternativas prometedoras para lograr un pretratamiento biológico óptimo.

Una estrategia que permite incrementar la eficiencia de un pretratamiento es su combinación con otro. En este contexto, Zhang y col. (2008) combinaron el pretratamiento mediante EV y la biodeslignificación con *T. versicolor*, incrementando la reducción del contenido de lignina hasta un 75% en comparación al 31% alcanzado sólo con el uso de *T. versicolor*. Asimismo, el uso de microorganismos también se ha combinado con pretratamientos alcalinos. En este sentido, Yu y col. (2010) observaron un incremento en la pérdida de lignina del material pretratado con álcali desde un 76% hasta un 80% tras el uso de *I. lacteus*, mejorando a su vez el posterior proceso de sacarificación. De forma similar, Muñoz y col. (2007) combinaron la biodeslignificación con solventes orgánicos para pretratar astillas procedentes de las plantas *Pinus radiata* y *Acacia dealbata*. En comparación al tratamiento con solventes orgánicos, el tratamiento combinado de ambos materiales incrementó los rendimientos de etanol desde el 38% hasta el 55% y del 62% al 69%, respectivamente en un proceso de hidrólisis y fermentación separadas (HFS), y desde el 10% hasta el 65% y del 77% al 82%, respectivamente en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). Además de mejorar los procesos de sacarificación y de producción de etanol, el efecto sinérgico derivado de la combinación de los métodos biológicos y fisico-químicos permite reducir la severidad del pretratamiento físico-químico así como sus requerimientos energéticos y químicos (Itoh y col., 2003).

A pesar de todas las ventajas expuestas para la deslignificación microbiana, los largos tiempos de proceso requeridos y el consumo de azúcares derivado, dificultan la aplicación de estos procesos a escala industrial, por lo que la búsqueda de nuevos microorganismos o la mejora de las condiciones de cultivo resultan aspectos claves para obtener mejores resultados. Otra alternativa plausible a la utilización de microorganismos en los procesos de biodeslignificación es el uso de sus enzimas. Entre las principales ventajas de la **deslignificación enzimática** se encuentran las mayores velocidades de reacción y eficiencia, por lo que se produce una reducción del tiempo del proceso desde días a horas, y además, se evita el consumo de carbohidratos (Vivekanand et al., 2008).

De las principales enzimas ligninolíticas descritas, las lacasas, y especialmente los sistemas lacasa-mediador (SLM), han sido extensamente usados en numerosas aplicaciones industriales como el blanqueo de papel, la síntesis orgánica, la modificación de polímeros, degradación y destoxificación de compuestos contaminantes, etc. (Jurado y col., 2011). En cuanto a sus aplicaciones en la producción de etanol, estas enzimas están generando una atención considerable en los últimos años.

Las lacasas y los SLM han demostrado ser capaces de modificar o eliminar la lignina incrementando los rendimientos de HE y disminuyendo las dosis de enzima necesarias para obtener buenos rendimientos de hidrólisis, tanto si se emplean por sí solos o acoplados con otros pretratamientos. La Tabla 1.2 resume las principales lacasas y los SLM evaluados en el ámbito de la producción de etanol.

**Tabla 1.2.-** Uso de lacasas y sistemas lacasa-mediador (SLM) en procesos de biodeslignificación enzimática

Puntos Destacados	Tratamiento	Materia Prima	Observaciones	Referencia
Mejora del proceso de hidrólisis	Lacasa ( <i>Pleurotus</i> sp.)	<i>Bambusa bambos</i>	Disminución de la dosis de enzimas hidrolíticas	Kuila y col., 2011a
	Lacasa ( <i>Pleurotus</i> sp.)	<i>Lantana camara</i>		Kuila y col., 2011b
	Lacasa ( <i>C. unicolor</i> )	<i>Picea abies</i> <sup>1</sup>	Resultados contradictorios usando <i>Arundo donax</i> <sup>1</sup>	Moilanen y col., 2011
	Lacasa ( <i>Pleurotus</i> sp.)	<i>Ricinus communis</i>		Mukhopadhyay y col., 2011
	Lacasa ( <i>Sclerotium</i> sp.)	Paja de Trigo <sup>1</sup>		Qiu y col., 2012
	LMS ( <i>T. hirsuta</i> -NHA)	<i>Picea abies</i> <sup>1</sup>		Palonen y Viikari, 2004
	LMS ( <i>T. versicolor</i> -HBT)	Rastrojo de maíz		Chen y col., 2012
	LMS ( <i>T. villosa</i> -HBT)	<i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Pennisetum purpureum</i>	Altos rendimientos de producción de etanol	Gutiérrez y col., 2012
	LMS ( <i>M. thermophila</i> -HBT)	<i>Eucalyptus globulus</i>	Disminución de la dosis de enzimas hidrolíticas	Martín-Sampedro y col., 2012
Alto grado de deslignificación	LMS ( <i>P. sanguineus</i> -VIO)	Paja de Trigo y rastrojo de maíz <sup>2</sup>	Eliminación de hasta el 97% de la lignina Klason	Lu y col., 2010

<sup>1</sup> Material pretratado mediante explosión por vapor

<sup>2</sup> Materiales pretratados con agua líquida a alta temperatura. Posteriormente, se realizó una extracción en primer lugar con etanol, luego con agua fría y finalmente con agua caliente.

Mukhopadhyay y col. (2011) alcanzaron un porcentaje de deslignificación del 86% en un material molido de la planta *Ricinus communis* tras 4 h de tratamiento con la lacasa procedente de *Pleurotus* sp., triplicando los rendimientos de sacarificación. Unas

pérdidas de lignina similares (84-89%) se observaron tras 8 h de tratamiento con esta lacasa y los materiales molidos de las plantas *Bambusa bambos* (Kuila y col., 2011a) o *L. cámara* (Kuila y col., 2011b), permitiendo una reducción de la dosis enzimática. En combinación con pretratamientos alcalinos, la lacasa ha demostrado potenciar la sacarificación. A pesar de que no se observó ningún efecto positivo en la deslignificación, Li y col. (2012) demostraron que la porosidad y el área superficial accesible del rastrojo de maíz se incrementaron notablemente con el tratamiento combinado (1,5% de NaOH y la lacasa de *Trametes hirsuta*), doblando los rendimientos de sacarificación en comparación con el tratamiento alcalino por sí solo. Igualmente, Yang y col. (2011) establecieron que el tratamiento con la lacasa de *Ganoderma lucidum* incrementó en un 20% el rendimiento de sacarificación tras el pretratamiento alcalino de la paja de *Brassica campestris*. Otro pretratamiento al que se ha acoplado el tratamiento con lacasa ha sido la EV. Qiu y col. (2012) describieron la oxidación de la lignina por la lacasa de *Sclerotium* sp. en paja de trigo pretratada, lo que permitió incrementar el número de microporos del material y mejorar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Asimismo, Palonen y Viikari (2004) observaron que la lacasa de *T. hirsuta* mejoraba la HE de picea (*Picea abies*) gracias a la reducción de las uniones improductivas de las celulasas a la lignina. Por otro lado, Moilanen y col. (2011) observaron resultados contradictorios al tratar con la lacasa de *Cerrena unicolor* la biomasa de picea o de la caña (*Arundo donax*) pretratados mediante EV. En este contexto, el tratamiento con lacasa mejoró la HE de la picea en un 12% al reducir las uniones inespecíficas de las enzimas, mientras que el mismo tratamiento realizado en la caña redujo el proceso de hidrólisis en un 17%, observándose un aumento de las uniones improductivas.

En cuanto al tratamiento con los SLM, Guitiérrez y col (2012) han descrito recientemente la capacidad de la lacasa de *Trametes villosa*, junto con el mediador sintético 1-hidroxibenzotriazol (HBT), seguido de una extracción alcalina para disminuir el contenido de lignina (30-50%) de madera de eucalipto o de hierba de elefante (*Pennisetum purpureum*) previamente molidas. Consecuentemente, se incrementó la producción de glucosa en un 61% y en un 12% y la concentración de etanol en 4 g/L y 2 g/L, respectivamente. Por otro lado, Lu y col. (2010) mostraron una deslignificación casi completa (97%) de la paja de trigo o el rastrojo de maíz, al combinar el tratamiento con la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* y el mediador sintético



ácido violúrico, junto al pretratamiento con agua caliente en fase líquida. [Martín-Sampedro y col. \(2012\)](#) observaron un incremento en los rendimientos de glucosa desde el 24,7% hasta el 27,1% al tratar madera de eucalipto pretratada mediante EV con el sistema formado por la lacasa de *Myceliophthora thermophila* y el mediador HBT. En otro ejemplo de SLM descrito por [Palonen y Viikari \(2004\)](#), la lacasa de *T. hirsuta* en combinación con el mediador sintético N-hidroxi-N-fenilacetamida (NHA) y el pretratamiento mediante EV en condiciones ácidas, mejoraron la sacarificación de la píceas en un 21%. Asimismo, estos autores también observaron cambios en las características polares de la superficie del material, así como una reducción de la hidrofobicidad de la lignina.

A pesar de los beneficios derivados del uso de enzimas para la biodesignificación, los costes derivados de la purificación y/o adición de mediadores sintéticos son el principal inconveniente para su aplicación en la producción de etanol. Sin embargo, el empleo de materiales alternativos para el crecimiento de los microorganismos productores de enzimas y la sustitución de mediadores sintéticos por otros naturales podrían reducir de manera significativa los problemas mencionados ([Camarero y col., 2005](#); [Martínez y col., 2009](#); [Jun y col., 2011](#)).

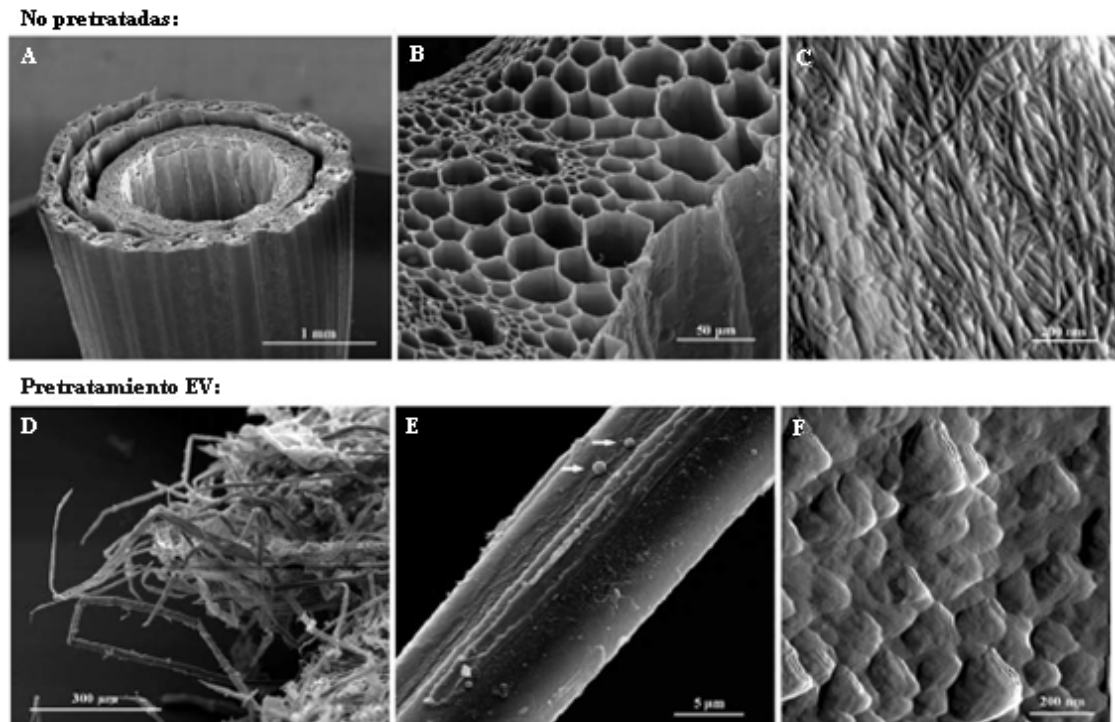
#### **1.2.2.1.2. Pretratamiento mediante explosión por vapor**

Los métodos hidrotérmicos como la EV, por su efectividad y coste, constituyen actualmente la opción más prometedora para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica en los procesos de producción de bioetanol. Por ello, ha sido el método elegido para mejorar la accesibilidad de la materia prima en la presente Tesis.

Durante el pretratamiento mediante EV, la biomasa se somete a la acción de vapor saturado a cierta temperatura y presión. Tras un tiempo de residencia previamente establecido, durante el cual el vapor de agua hidrata el material lignocelulósico, la cámara del reactor sufre una despresurización brusca que provoca la expansión del vapor de agua a modo de explosión y la consecuente ruptura de las fibras lignocelulósicas. Además de la acción física descrita, durante este pretratamiento la biomasa se somete a su vez a una acción química de autohidrólisis. Este proceso se debe a una solubilización de los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa que, tras transformarse en ácido acético, provoca la disminución del pH dentro del reactor y



facilita la ruptura de los enlaces establecidos entre las unidades que constituyen la hemicelulosa. Durante la EV se produce una ligera solubilización del polímero de lignina. El principal efecto es la pérdida de su estructura nativa y su reorganización en la superficie. (Kristensen y col., 2008; Alvira y col., 2010). En la Figura 1.8 se muestran diferentes imágenes tanto de microscopía electrónica de barrido como de microscopía de fuerza atómica de la paja de trigo antes y después del pretratamiento mediante EV.



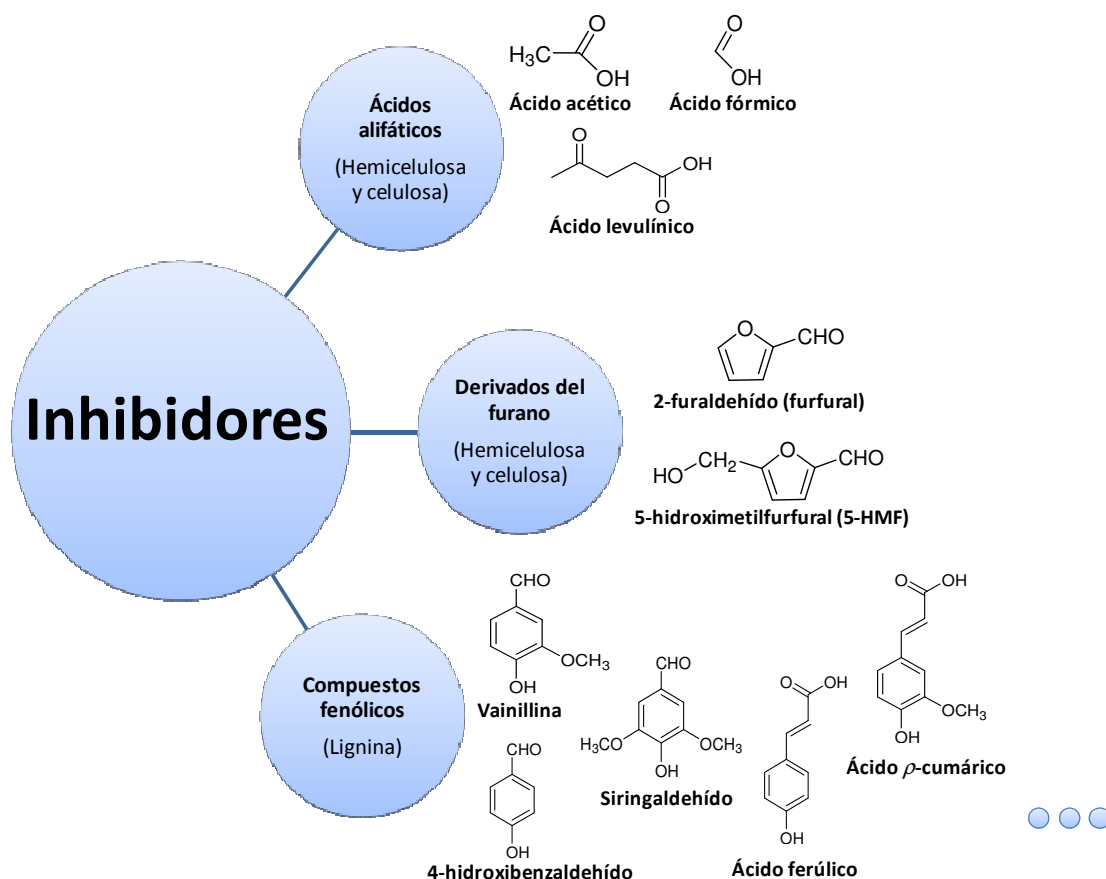
**Figura 1.8.-** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (A, B, D y E) y AMF (C y F) de paja de trigo sin tratar (A, B y C) y pretratada mediante explosión por vapor (D, E y F). La figura A muestra la paja de trigo sin tratar. A mayor aumento (B) se identifican las células individuales de la pared celular. En la figura C se intuyen las fibras de celulosa parcialmente recubiertas por polímeros no celulósicos. Como consecuencia del pretratamiento, las fibras se separan y se desordenan (D). En la figura E se muestra una fibra individual con diferentes gotas adheridas a la superficie (flechas) y en la figura F se observan los depósitos globulares característicos de la lignina que ocultan las microfibrillas de celulosa (adaptado de Kristensen y col., 2008).

En resumen, el pretratamiento mediante EV favorece la accesibilidad de la fibra de celulosa mediante la desestructuración física de los materiales, la solubilización de la hemicelulosa por autohidrólisis y la solubilización parcial y reorganización de la

lignina. En cuanto a su versatilidad, el pretratamiento mediante EV ha demostrado ser eficaz con distintos tipos de materiales: maderas duras (Cara y col., 2006; Oliva y col., 2003), maderas blandas (Monavari y col., 2010) y plantas herbáceas (Ballesteros y col., 2006), y en diferentes escalas (laboratorio, piloto y demostración), por lo que representa una de las mejores opciones para la producción de etanol a corto plazo. En el caso de las maderas blandas, la escasa acetilación de la hemicelulosa obliga a realizar el proceso de EV con la adición externa de un ácido que actúa como catalizador. De esta forma se incrementa principalmente la solubilización de las hemicelulosas, disminuyendo al mismo tiempo la temperatura óptima de pretratamiento y provocando una hidrólisis parcial de la celulosa (Alvira y col., 2010). Sin embargo, la adición de ácido debe evitarse para reducir los gastos derivados de la necesidad de un equipamiento especial (materiales resistentes a la corrosión) y minimizar la generación de subproductos no deseados (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a, 2000b).

La generación de diferentes compuestos inhibidores durante el proceso, derivados principalmente de la solubilización parcial de la lignina y de la degradación de azúcares, supone la principal desventaja de esta tecnología de pretratamiento (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b; Klinke y col., 2004; Panagiotou y Olsson, 2007). Estos compuestos afectan principalmente a los procesos de hidrólisis y fermentación y se pueden clasificar dependiendo de su naturaleza en derivados del furano, ácidos alifáticos y derivados fenólicos. Los derivados del furano están constituidos principalmente por el 2-furaldehído (furfural) y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) que se generan por la degradación de las pentosas y las hexosas respectivamente. Por otro lado, los ácidos alifáticos que se generan son mayoritariamente el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido levulínico. El ácido acético deriva de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa, mientras que el ácido levulínico y el ácido fórmico se originan a su vez de la degradación del 5-HMF y del furfural. Por último, dentro de los compuestos fenólicos se incluyen una gran variedad de sustancias derivadas de la lignina como el siringaldehído, la vainillina, el hidroxibenzaldehído, el ácido ferúlico, el ácido cumárico, etc.

La Figura 1.9 muestra una agrupación de los distintos compuestos inhibidores indicando su procedencia.



**Figura 1.9.-** Compuestos inhibidores formados durante el pretratamiento mediante explosión por vapor de los materiales lignocelulósicos.

La severidad del pretratamiento y el tipo de biomasa son factores que influyen directamente en la concentración de los distintos compuestos. Por otro lado, los efectos inhibidores derivados de estas sustancias pueden observarse tanto en las enzimas hidrolíticas como en los microorganismos fermentativos. De esta manera, los ácidos alifáticos provocan la inhibición del crecimiento celular, reduciendo los rendimientos de etanol. Este efecto se atribuye a la acumulación intracelular de iones que provoca un descenso en los niveles energéticos de la célula, ya que el mantenimiento del equilibrio interior del pH se lleva a cabo mediante bombas dependientes de ATP (Almeida y col., 2007). Los derivados del furano reducen el poder reductor celular disminuyendo los niveles de NAD(P)H. Además, el furfural y el 5-HMF pueden afectar a diferentes enzimas intracelulares, descendiendo la productividad y los rendimientos de etanol mediante la inhibición del crecimiento o la prolongación de la fase de adaptación (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b). Por último, los compuestos fenólicos pueden afectar la hidrólisis y la fermentación. En cuanto a los efectos sobre las enzimas hidrolíticas, los compuestos fenólicos pueden inhibirlas o desactivarlas, afectando los

rendimientos de HE (Ximenes y col., 2010, 2011). Además, estos compuestos alteran la integridad de las membranas biológicas, provocando una disminución en la velocidad del crecimiento del microorganismo y, consecuentemente, afectando negativamente la producción de etanol (Almeida y col., 2007). Junto a los derivados del furano, algunos de los fenoles generados pueden ser metabolizados por la mayoría de los microorganismos fermentativos, lo que condiciona el crecimiento y prolonga a su vez la fase de latencia.

Además de los tres grupos mencionados, los extractivos (resinas, taninos o terpenos) y los iones de metales pesados (hierro, cromo, níquel o cobre), también son considerados como compuestos inhibidores. Estos elementos poseen un modo de acción similar al de los fenoles provocando el incremento en la permeabilidad de las membranas. Sin embargo, en comparación a los compuestos anteriores, sus niveles de toxicidad son inferiores (Mussatto y Roberto, 2004).

Dada la estrecha relación que existe entre las condiciones a las que se realiza el pretratamiento y la formación de tóxicos, la optimización de las condiciones de pretratamiento es imprescindible en la mejora global del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Esta optimización implica alcanzar un compromiso entre las condiciones de pretratamiento que conducen a elevados rendimientos de HE y la generación de compuestos inhibidores, ya que si aumentamos mucho la severidad, los rendimientos de HE van a ser mayores, pero también se aumenta la concentración de inhibidores. Por el contrario a menor severidad de pretratamiento, menor cantidad de compuestos inhibidores, pero también se disminuye los rendimientos de HE.

#### ***1.2.2.1.3. Procesos de biodestoxificación***

Otra posibilidad para reducir los tóxicos presentes en los materiales pretratados es la realización de una etapa de destoxificación previo a la HE y/o la fermentación. Con este objetivo se han desarrollado diversos métodos físicos o químicos entre los que se incluyen la evaporación, separación mediante membranas, neutralización, utilización de carbón activo, resinas cromatográficas de intercambio iónico, etc. Los procesos de filtración y lavado son las tecnologías más usadas. Sin embargo, estos sistemas de destoxificación conllevan la pérdida de azúcares solubles, la necesidad de equipamiento

adicional y el aumento tanto en el gasto de agua como en el de aguas residuales generadas. En este contexto, el empleo de microorganismos o enzimas para la destoxificación (**biodestoxificación**) de la biomasa lignocelulósica pretratada, ofrece ventajas frente al resto de los métodos mencionados, ya que se lleva a cabo bajo condiciones suaves de reacción y con una menor demanda química y energética (Parawira and Tekere, 2011).

En la **destoxificación microbiana**, hongos, bacterias o levaduras, son los encargados de asimilar los compuestos inhibidores. Según esta definición, la etapa de biodestoxificación puede llevarse a cabo como un paso adicional y previo a la etapa de fermentación. El microorganismo más estudiado con este fin ha sido el hongo filamentoso *T. reesei*. Con esta cepa, Palmqvist y col. (1997) redujeron considerablemente la fracción fenólica, los derivados del furano y los ácidos alifáticos presentes en un hidrolizado ácido de sauce pretratado mediante EV, incrementando tanto la productividad volumétrica como los rendimientos de etanol. Por otro lado, Larsson y col. (1999) observaron una mejora de la fermentabilidad tras el tratamiento con *T. reesei* de un hidrolizado de píceas (obtenido tras un pretratamiento con ácido diluido) al eliminar los furanos y una pequeña parte de la fracción fenólica.

Además de *T. reesei*, los procesos de biodestoxificación también se han practicado con otros hongos. López y col. (2004) aislaron una nueva cepa, *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616, con capacidad para metabolizar el furfural y el 5-HMF así como los ácidos alifáticos y los aldehídos. Esta cepa fue usada a su vez por Nichols y col. (2008, 2010) para tratar los hidrolizados procedentes tras el pretratamiento con ácido diluido del rastrojo de maíz, vástagos de alfalfa, hierba cinta (*Phalaris arundinacea*) y pasto varilla (*Panicum virgatum*), favoreciendo la utilización de xilosa (Nichols y col., 2008) y acortando la fase de latencia del microorganismo fermentativo (Nichols y col., 2010). Asimismo, también se han usado las cepas *Amorphotheca resinae* ZN1 y *Aspergillus nidulans* FLZ10. En el caso de *A. resinae* ZN1, Zhang y col. (2010a) observaron que este microorganismo era capaz de actuar frente las diferentes clases de tóxicos presentes en el rastrojo de maíz pretratado mediante EV y en los materiales obtenidos tras el pretratamiento con ácido diluido del rastrojo de maíz, arroz, paja de trigo y paja de colza. Por otro lado, Yu y col. (2011) utilizaron *A. nidulans* FLZ10, mostrando una eliminación completa del furfural y del 5-HMF y una disminución

parcial del ácido fórmico y del ácido acético presentes en el rastrojo de maíz pretratado mediante EV.

Un aspecto a tener en cuenta en la destoxificación microbiana es la capacidad que presentan algunos microorganismos para la producción de enzimas durante el proceso (Palmqvist y col., 1997; Yu y col., 2011). De esta manera, al mismo tiempo que se produce la destoxificación, el microorganismo puede secretar proteínas hidrolíticas, permitiendo la disminución de las dosis de enzimas añadidas externamente. Palmqvist y col. (1997) determinaron una actividad celulolítica de 0,2 UPF/mL tras la destoxificación de un hidrolizado de sauce con *T. reesei*. Además, dicha actividad incrementó hasta valores de 0,6 UPF/mL tras la adición de sauce pretratado como fuente de celulosa. Asimismo, Yu y col. (2011) obtuvieron unos datos de actividad similares (0,2 UPF/mL sin celulosa y 0,5 UPF/mL tras la adición de celulosa) usando *A. nidulans* FLZ10 como agente destoxificante.

Aunque su uso ha sido menos estudiado, algunas bacterias y levaduras también pueden actuar frente a los distintos compuestos inhibidores. En este contexto, la bacteria termófila *Ureibacillus thermophaercus* fue capaz de eliminar el furfural y el 5-HMF de un hidrolizado sintético, así como los compuestos fenólicos presentes en un hidrolizado procedente del pretratamiento con ácido diluido de madera (Okuda y col., 2008). De igual forma, López y col. (2004) aislaron cinco cepas bacterianas pertenecientes a las especies *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium indologenes*, *Acinetobacter* sp. y *Arthrobacter aureescens* con capacidad para actuar frente el ácido ferúlico, el 5-HMF y el furfural en un medio mineral definido. Fonseca y col. (2011) describieron la capacidad de la levadura *Issatchenkia occidentalis* CCTCCM 206097 para eliminar el siringaldehído, el ácido ferúlico, el furfural y el 5-HMF de un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.

La destoxificación microbiana también puede llevarse a cabo *in situ* gracias a la habilidad natural de diversos microorganismos fermentativos para eliminar algunos de los compuestos tóxicos. La utilización del microorganismo fermentativo como agente destoxificador puede evitar el consumo secundario de azúcares por otros microorganismos ajenos al proceso de fermentación y reducir los costes derivados de la necesidad de equipamiento adicional. Como se ha descrito con anterioridad, la mayoría de las cepas utilizadas en la producción de etanol pueden convertir de forma natural a

sustancias menos tóxicas los derivados del furano y algunos compuestos fenólicos (Palmqvist y col., 2000a; Thomsen y col., 2009; Ferreira y col., 2011; Lee y col., 2011). En este contexto, el furfural puede reducirse a furfural alcohol mientras que el 5-HMF es transformado a 2,5-HMF alcohol (Liu y col., 2005). Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden metabolizarse a derivados vinílicos mediante la enzima ácido fenilacético descarboxilasa (Goodey y Tubbs, 1982). Schneider (1996) observó la acción selectiva por parte de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YGSCD 308.3 en la asimilación del ácido acético en leñas negras procedentes de la cocción kraft de maderas duras, permitiendo la conversión de todos los azúcares a etanol. De la misma forma, Lee y col. (2011) observaron una alta tolerancia a inhibidores y un consumo cercano al 100% de la glucosa disponible en hidrolizados de álamo amarillo y residuos de madera cuando usaron la cepa *S. cerevisiae* K35. Además de *S. cerevisiae*, esta tolerancia innata también se ha observado en *Scheffersomyces stipitis* (antes conocida como *Pichia stipitis*). Según Ferreira y col. (2011), *S. stipitis* CBS5773 presenta alta tolerancia a los tóxicos presentes en un hidrolizado de *A. dealbata*, observándose una eliminación completa del furfural y del 5-HMF.

Aprovechando la resistencia natural y las capacidades para reducir la concentración de los inhibidores, los procesos de destoxificación microbiana pueden abordarse mediante diferentes procedimientos o estrategias entre las que se incluyen:

- **Co-cultivo de microorganismos**: algunos consorcios de microorganismos (desde dos especies diferentes hasta agregaciones multi-especie) pueden interactuar entre sí ayudándose mutuamente (Zuroff y Curtis, 2012). De esta manera, el crecimiento simultáneo de dos o varios microorganismos se puede llevar a cabo para que la destoxificación y la fermentación tengan lugar al mismo tiempo. Sin embargo, la principal desventaja de utilizar varios microorganismos a la vez radica en la complejidad de producir un único producto derivado del proceso (Zuroff y Curtis, 2012). Con el objetivo de mejorar el proceso de producción de bioetanol, Yu y col. (2011) emplearon un co-cultivo con las cepas de *A. nidulans* FLZ10 y *S. cerevisiae* para destoxificar y fermentar el rastrojo de maíz pretratado mediante EV. Esta estrategia incrementó en más de 3 veces la producción de etanol, alcanzándose una concentración final de 34 g/L. Además, dada la capacidad



de *A. nidulans* FLZ10 para producir enzimas celulolíticas, el rendimiento de sacarificación se elevó hasta un 95%.

- **Evolución por adaptación**: la adaptación de un microorganismo consiste en la exposición constante de las células a concentraciones subletales de inhibidores para proporcionar una mejor resistencia. Este sistema establece una presión selectiva del crecimiento de aquellas células capaces de soportar las condiciones adversas, favoreciendo la evolución de la cepa e incrementando la tasa de destoxificación. Debido a la diferente naturaleza de los tóxicos obtenidos tras el pretratamiento, el uso de esta estrategia es muy común en el desarrollo de nuevas cepas para la producción de etanol. [Liu y col. \(2005\)](#) desarrollaron un conjunto de cepas evolucionadas (*S. cerevisiae* 307-12H60, *S. cerevisiae* 307-12H120 y *S. stipitis* 307 10H60) mediante transferencia de las células a cultivos sintéticos con concentraciones crecientes de compuestos inhibidores, fomentando la conversión del furfural y el 5-HMF y acelerando el consumo de glucosa. De igual modo, [Stoutenburg y col. \(2011\)](#) obtuvieron diferentes cepas evolucionadas de *S. stipitis* tras una adaptación en un hidrolizado de madera que mejoró el proceso de fermentación en un 75% en comparación con la cepa nativa. Asimismo, [Yang y col. \(2011\)](#) adaptaron *S. stipitis* para fermentar hidrolizados enzimáticos procedentes de caña de maíz pretratada mediante EV, obteniendo un 92% de la producción teórica de etanol.

Los procesos de ingeniería evolutiva también se han estudiado con diferentes cepas fermentadoras de pentosas. En este contexto, [Martín y col. \(2007\)](#) adaptaron una cepa de *S. cerevisiae* capaz de fermentar la xilosa para crecer en hidrolizados de bagazo de caña de azúcar, incrementando las tasas de conversión del furfural así como la producción de etanol (de 0,18 g/g a 0,38 g/g) y la productividad volumétrica (de 1,2 g/L h a 2,6 g/L h). Por otro lado, [Tomás-Pejó y col. \(2010\)](#) desarrollaron una cepa evolucionada de *S. cerevisiae* F12 capaz de tolerar los inhibidores presentes en la paja de trigo pretratada mediante EV, mejorando el consumo de xilosa en un 65% y un 20% la producción final de etanol, en comparación a la cepa parental. Los procesos de adaptación pueden realizarse en cultivos discontinuos o en sistemas en continuo. De esta forma, [Koppram y col. \(2012\)](#) obtuvieron



diferentes cepas evolucionadas fermentadoras de xilosa a partir de la cepa de *S. cerevisiae* TMB3400, las cuales mostraron un incremento en las tasas de conversión del furfural y el 5-HMF presentes en un hidrolizado de píceas, mejorando a su vez el consumo de los azúcares y acortando el tiempo de fermentación.

- **Ingeniería genética**: mediante la modificación genética se pueden transferir ciertas características particulares en un microorganismo que *a priori* no las presenta. En este contexto, se pueden introducir genes en un determinado microorganismo para conferirle resistencia frente a un inhibidor específico (Larsson y col., 2001a, 2001b). Del mismo modo, también se puede potenciar la sobreexpresión o la represión de genes endógenos proporcionando fenotipos mejorados frente al estrés producido por la presencia de los inhibidores. Una de las alternativas estudiada por diversos autores ha sido la sobreexpresión de los genes que codifican para reductasas y/o deshidrogenasas involucradas en la conversión de diversos tóxicos. Petersson y col. (2006) atribuyeron la reducción del furfural y el 5-HMF en *S. cerevisiae* a la enzima deshidrogenasa NADPH-álcool dependiente (ADH6p). En este sentido, la sobreexpresión de esta enzima permitió a la cepa modificada incrementar en cuatro veces la velocidad de conversión del 5-HMF. Además, Almeida y col., (2008) utilizaron esta cepa para fermentar un hidrolizado de píceas, mejorando la productividad de etanol en comparación a la cepa parental. Con un esquema similar, Gorsich y col. (2006) mejoraron la tolerancia de la levadura frente a los derivados del furano al sobreexpresar el gen ZWF1 de la ruta de las pentosas fosfato en *S. cerevisiae*.

En cuanto al diseño de cepas resistentes a los compuestos fenólicos, Larsson y col. (2001a) sobreexpresaron el gen Pad1p que codifica la enzima ácido fenilacrilico descarboxilasa en *S. cerevisiae*. Esta cepa fue capaz de crecer más rápidamente en un medio básico suplementado con ácido ferúlico y ácido cinámico y en un hidrolizado de píceas, incrementando la tasa de producción de etanol. Otra estrategia estudiada con este fin, ha sido la expresión heteróloga de lacasas en microorganismos fermentativos. Larsson y col. (2001b) introdujeron en *S. cerevisiae* el gen de la lacasa procedente del

hongo de podredumbre blanca *T. versicolor* a la vez que sobreexpresaron el gen endógeno t-SNARE Sso2p. De esta forma, la cepa que tenía sobreexpresado el gen t-SNARE Sso2p presentaba una mayor actividad lacasa en comparación a la cepa de *S. cerevisiae* que incorporó únicamente el gen de la lacasa. Además, los transformantes fueron capaces de fermentar un hidrolizado obtenido tras el pretratamiento de píceas con ácido diluido, incrementando las productividades de etanol en relación al control.

- **Otros procesos:**

- *Retención celular:* en esta estrategia se mantiene una alta densidad de células dentro del reactor gracias a un sistema de recirculación, por lo que la etapa de destoxificación se mejora debido a que hay un mayor número de células que pueden realizar el proceso. Con este sistema, [Brandberg y col. \(2005\)](#) mejoraron la conversión de los derivados del furano, incrementando el porcentaje de conversión de azúcares por parte de *S. cerevisiae* hasta un 99%.
- *Encapsulación:* las células se encuentran retenidas en una matriz de alginato con alta densidad celular. De esta manera, las células cercanas a la membrana están forzadas a convertir los inhibidores, mientras que las células en el interior de la cápsula se encargan de mantener la supervivencia de la población y de llevar a cabo la fermentación. [Talebnia y Taherzadeh \(2006\)](#) utilizaron células de *S. cerevisiae* encapsuladas para fermentar un hidrolizado de píceas obtenido tras un pretratamiento con ácido diluido, obteniendo un rendimiento de etanol de 0,44 g/g y manteniendo la viabilidad celular en más de un 75%. Por otro lado, en un estudio reciente, [Westman y col. \(2012\)](#) han descrito una protección selectiva de la encapsulación frente a los diferentes tóxicos. A pesar del efecto positivo que tiene la encapsulación sobre la toxicidad a los derivados del furano, ésta es incapaz de garantizar la supervivencia contra los ácidos alifáticos. Además, en la encapsulación se puede producir la desactivación gradual de las células e incrementarse los costes finales de proceso.
- *Floculación:* la floculación es la habilidad que tienen ciertos microorganismos para formar agregados y protegerse, por lo que sus

ventajas son similares a las observadas para la encapsulación. Purwadi y col. (2007) emplearon una cepa floculante de *S. cerevisiae* y observaron la eliminación del 5-HMF y el furfural presentes en un hidrolizado de píceas obtenido tras un pretratamiento con ácido diluido. Además, el rendimiento de etanol alcanzado fue similar al reportado con las células encapsuladas (0,44 g/g) (Talebnia y Taherzadeh, 2006).

Como alternativa a los procesos de destoxificación microbianos, los procesos de **destoxificación enzimática** representan una de las aplicaciones biotecnológicas más estudiadas para disminuir la toxicidad de los medios de fermentación. Al igual que ocurría en los procesos de deslignificación, el uso de enzimas purificadas elimina el consumo de azúcares, reduce los tiempos de reacción e incrementa la eficiencia catalítica al realizar el proceso bajo condiciones óptimas (Parawira y Tekere, 2011). Sin embargo, los costes de purificación de las enzimas representan un gran inconveniente para su escalado industrial.

Las enzimas comúnmente usadas para la destoxificación enzimática de los materiales lignocelulósicos pretratados han sido las lacasas y peroxidasas fúngicas procedentes de diversos hongos de podredumbre blanca como *T. versicolor*, *T. villosa*, *Coriolopsis rigida*, *P. cinnabarinus*, *Coriolopsis perennis*, *Cyathus stercoreus*, etc. Estas enzimas actúan de forma selectiva sobre los compuestos fenólicos y se han aplicado eficazmente en diferentes materiales pretratados. Jönsson y col. (1998) emplearon la lacasa y la peroxidasa procedentes de *T. versicolor* para destoxificar la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento mediante EV de sauce impregnado con ácido. Los resultados obtenidos fueron un incremento de los rendimientos y la productividad de etanol, así como una tasa mayor de consumo de glucosa por parte de *S. cerevisiae*. Del mismo modo, Larsson y col. (1999) utilizaron la lacasa de *T. versicolor* para tratar la fracción líquida procedente de un material de píceas pretratado mediante EV en condiciones ácidas, observándose un aumento en el crecimiento celular.

En la Tabla 1.3 se citan algunos ejemplos de tratamientos enzimáticos para la destoxificación de diferentes materias primas pretatadas.

**Tabla 1.3.-** Uso de enzimas ligninolíticas para la eliminación de los compuestos fenólicos en diferentes materias primas pretratadas

Tratamiento	Materia Prima	Observaciones	Referencia
Lacasa y lignina peroxidasa ( <i>T. versicolor</i> )	Sauce pretratado mediante explosión por vapor con SO <sub>2</sub>	Mejora del consumo de glucosa y de la productividad de etanol	Jönsson y col., 1998
Lacasa ( <i>T. versicolor</i> )	Hidrolizado de píceas pretratada con ácido diluido		Larsson y col., 1999
Lacasa ( <i>T. versicolor</i> )	Bagazo de caña de azúcar pretratada mediante explosión por vapor	Incremento en los rendimientos de etanol	Martín y col., 2002
Lacasa ( <i>C. stercoreus</i> )	Hidrolizado de bagazo de caña de azúcar pretratado con ácido		Chandel y col., 2007
Lacasa ( <i>C. rigida</i> and <i>T. villosa</i> )	Paja de trigo pretratada mediante explosión de vapor <sup>1</sup>	Menor concentración de azúcares tras el tratamiento con lacasa	Jurado y col., 2009
Lacasa ( <i>C. perennis</i> SKU0322)	Paja de arroz pretratada con ácido	Mejora de la productividad volumétrica de etanol	Kalyani y col., 2012
Lacasa ( <i>T. versicolor</i> )	Paja de trigo pretratada con agua líquida a altas temperaturas	Incremento en los rendimientos de sacarificación	Kolb y col., 2012

En comparación con otros sistemas de destoxificación, el tratamiento de un hidrolizado ácido de bagazo de caña de azúcar con la lacasa de *C. stercoreus* produjo un incremento en los rendimientos de etanol durante el proceso de fermentación con la levadura *Candida shehatae*, semejante a los obtenidos tras la destoxificación con carbón activo (Chandel y col., 2007). Por otro lado, Martín y col. (2002) compararon los procesos de “overliming” (aumento del pH del material mediante el uso de Ca(OH)<sub>2</sub> durante un tiempo determinado, tras el cual se procede a la neutralización) y el tratamiento con la lacasa de *T. versicolor* en la destoxificación de un hidrolizado enzimático de bagazo de caña de azúcar pretratado mediante EV. Ambos tratamientos mejoraron de forma análoga los rendimientos de etanol, así como la productividad volumétrica, por parte de una cepa recombinante de *S. cerevisiae* capaz de fermentar la xilosa.

A diferencia del efecto positivo que sobre la acción de los microorganismos fermentativos tiene la destoxificación con lacasas, el efecto sobre la HE ha mostrado resultados contradictorios (Moilanen y col., 2011). En este sentido, Jurado y col. (2009) usaron las lacasas de *C. rigida* y *T. villosa* para destoxificar hidrolizados enzimáticos

procedentes de paja de trigo pretratada mediante EV con agua y en condiciones ácida. En ambos casos, la fermentabilidad del material mejoró respecto a las muestras que no habían sido tratadas con lacasa. Sin embargo, la concentración de glucosa liberada tras la hidrólisis fue menor en las muestras que previamente se habían tratado. Por el contrario, [Kalyani y col. \(2012\)](#) observaron un incremento en los rendimientos de sacarificación, además de una disminución en el contenido fenólico, tras tratar la paja de arroz pretratada con ácido con una nueva lacasa procedente de *C. perennis*.

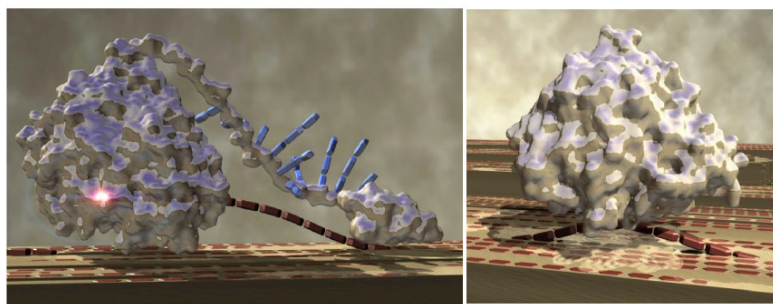
#### 1.2.2.2. Hidrólisis enzimática (HE)

Tras el pretratamiento, el siguiente paso en la producción de etanol es la obtención de los azúcares en forma monomérica mediante hidrólisis enzimática. Este proceso representa una etapa limitante del proceso global, ya que la concentración del producto final, el etanol, depende directamente de la concentración inicial de azúcares fermentables.

Teniendo en cuenta la complejidad en la composición de los materiales lignocelulósicos, las enzimas involucradas en su hidrólisis deben proporcionar una óptima combinación de actividades que facilite su completa despolimerización. En este sentido, la utilización de complejos enzimáticos que engloben una mezcla de actividades adecuada y cuya preparación no suponga costes elevados, resulta esencial para poder incrementar la eficiencia del proceso así como disminuir el precio del producto final ([Banerjee y col., 2010](#)). Entre los microorganismos productores de enzimas hidrolíticas, se han utilizado mayoritariamente especies de hongos y/o bacterias entre los que cabe destacar aquellas pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium* en hongos; y *Thermobifida*, *Clostridium*, *Cellulomonas* o *Bacillus* en bacterias. Sin embargo, entre todos los microorganismos descritos, la especie *T. reesei* (también conocida como *Hypocrea jecorina*), y concretamente la cepa RUTC30, es el microorganismo productor de enzimas con aplicación en la industria lignocelulósica por excelencia. Actualmente, se están llevando a cabo numerosos esfuerzos económicos y científicos con el fin de mejorar dicha cepa tanto en sus niveles de producción de enzimas como en la obtención de mezclas equilibradas que incrementen la eficiencia de hidrólisis ([Banerjee y col., 2010](#)).

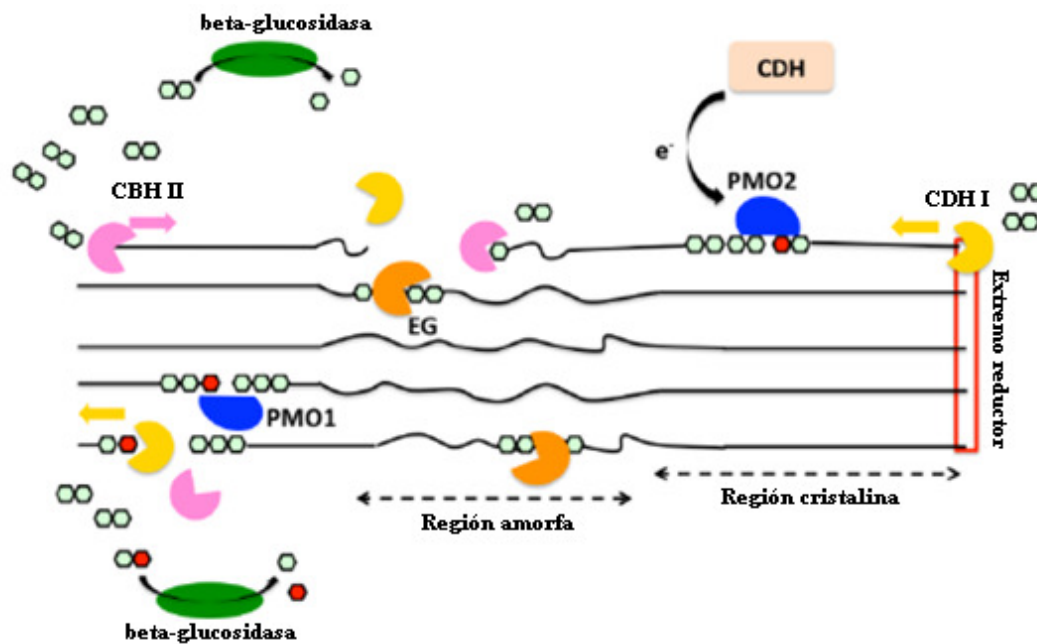
Entre los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica, la glucosa es la fuente de carbono preferida por la mayoría de microorganismos fermentativos. Las celulasas (endoglucanasas y celobiohidrolasas) y la  $\beta$ -glucosidasa, representan el conjunto de enzimas encargadas de la degradación de la celulosa a glucosa. Las **endoglucanasas** (EG, EC 3.2.1.4) se encargan de hidrolizar enlaces glucosídicos internos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) de forma aleatoria, mientras que por otro lado, las **celobiohidrolasas** (CBH), también conocidas como exoglucanasas, degradan la cadena de celulosa a partir del extremo reductor (CBH I, EC 3.2.1.176) y del no reductor (CBH II, EC 3.2.1.91). Finalmente, el producto de las CBH, la celobiosa, es a su vez el sustrato de la  **$\beta$ -glucosidasa** (EC 3.2.1.21), que se encarga de romper el enlace  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) y liberar las dos unidades de glucosa. Las tres enzimas mencionadas actúan de forma sinérgica y, normalmente, su estructura está dividida en dos dominios: el dominio catalítico y el dominio de unión a carbohidratos (CBD). El dominio de unión a carbohidratos no tiene una función catalítica y está implicado en la aproximación e identificación del sustrato (Suurnäkki y col., 2000). El dominio catalítico es el encargado de llevar a cabo el mecanismo de reacción, por lo que dependiendo de la actividad que desempeñe su estructura será diferente. En este contexto, las CBH presentan un dominio catalítico en forma de túnel, mientras que por el contrario, las EG manifiestan un dominio catalítico en forma de surco (Henriksson y col., 1996).

La figura 1.10 muestra las estructuras tridimensionales en forma de túnel y de surco de ambos dominios catalíticos.



**Figura 1.10.-** Estructura tridimensional de una celobiohidrolasa (izquierda) y de una endoglucanasa (derecha). En la CBH se puede observar un CBD glicosilado y un dominio catalítico en forma de túnel; mientras que la EG no muestra CBD y el dominio catalítico es en forma de surco. *Fuente:* NREL.

Los mecanismos de acción del complejo enzimático encargado de la degradación de la celulosa se muestran en la Figura 1.11.



**Figura 1.11.-** Esquema simplificado relativo a la degradación enzimática de la celulosa. En este proceso participan las celobiohidrolasas (CBH), las endoglucanasas (EG), la  $\beta$ -glucosidasa y las polisacárido-monooxigenasas (PMO). Por otro lado, la celobiosa deshidrogenasa (CDH) está involucrada indirectamente en el proceso al tratarse de un potencial donador de electrones para las PMO (adaptado de Dimarogona y col., 2012).

Como puede observarse, las EG actúan sobre la parte amorfa de la celulosa generando nuevos puntos de acción para las CBH, las cuales se encargan de hidrolizar las hebras de celulosa hasta celobiosa, que posteriormente es transformada en dos residuos de glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -glucosidasa. Además de las EG, las CBH o la  $\beta$ -glucosidasa, recientemente se han identificado otras enzimas clave en la HE de la celulosa. Estas proteínas son las **polisacárido-monooxigenasas** (PMO), que han sido previamente incluidas dentro de la familia GH61 (Dimarogona y col., 2012). Aunque todavía se conoce poco de estas enzimas, dependiendo de su mecanismo de acción se pueden clasificar en tres grupos (Li y col., 2012): aquellas que producen la oxidación en el extremo reductor (PMO I), las que producen la oxidación en el extremo no reductor (PMO II) o las que presentan menor especificidad pudiendo generar ambos extremos oxidados (PMO III). Al igual que las EG, las PMO generan nuevos sitios de unión para

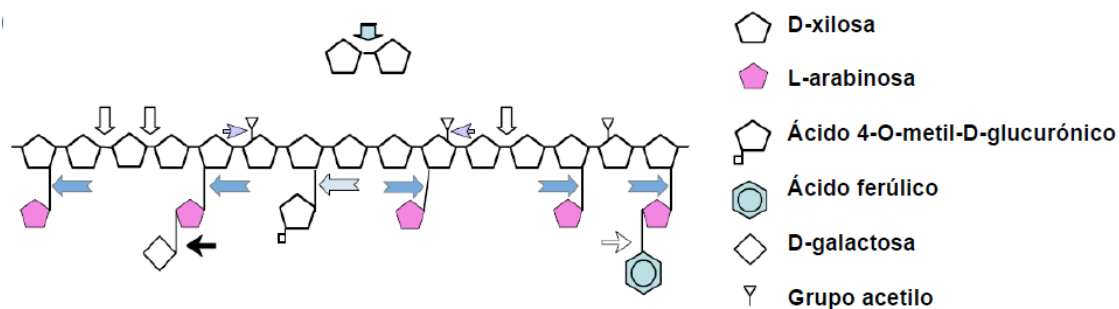


las CBH, pero mientras las EG actúan en la zona amorfa, las PMO ejercen su actividad catalítica en la zona cristalina. De esta manera, las PMO estimulan de forma sinérgica las otras actividades celulolíticas, lo que podría traducirse en una reducción de las dosis de enzimas requeridas durante la HE (Merino y Cherry, 2007; Harris y col., 2010). Las PMO requieren de un sustrato que actúe como donador de electrones. En este contexto, las **celobiosa-deshidrogenasas** (CDH) se han propuesto como enzimas potencialmente donadoras de radicales hidroxilos, contribuyendo así en el proceso de degradación de la celulosa (Dimarogona y col., 2012).

Junto a las enzimas descritas, existe un número bastante amplio de enzimas accesorias necesarias para la total degradación de los materiales lignocelulósicos. Estas enzimas son hemicelulasas, enzimas degradadoras de lignina o ligninasas y otras proteínas relacionadas sin actividad catalítica conocida (Alvira y col., 2013). Las **hemicelulasas** comprenden un conjunto de actividades encargadas de degradar la hemicelulosa hasta sus correspondientes monómeros. Existen diversas especies de hongos, levaduras y bacterias capaces de sintetizar y producir hemicelulasas. Debido a que la hemicelulosa se encuentra envolviendo a la celulosa, su degradación facilita el acceso del sistema celulolítico a éste polímero. Sin embargo, la gran variabilidad de las unidades que comprenden la hemicelulosa hace que el grupo de enzimas que forman el conjunto de las hemicelulasas sea bastante amplio. De esta manera podemos encontrar xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, esterases, etc.

En el caso de la paja de trigo la hemicelulosa está compuesta mayoritariamente por cadenas de arabinoxilano. Las principales enzimas implicadas en su hidrólisis son las endoxilanasas y las  $\beta$ -xilosidasas. No obstante, la presencia de sustituyentes en la cadena principal hace necesaria la presencia de otras actividades como las arabinofuranosidasas, las glucuronosidasas y las galactosidasas, así como las acetil esterases, las feruloil esterases y las  $\rho$ -cumaroil esterases (Alvira y col., 2013). La figura 1.12 indica las diferentes actividades necesarias para la degradación de una cadena tipo de arabinoxilano.





Símbolo	Enzima	EC	Enlace hidrolizado
↓	Endo-1,4-β-xilanasas	3.2.1.8	β-1,4
⬇	β-D-xilosidasas	3.2.1.37	β-1,4
→	α-L-arabinofuranosidasas	3.2.1.55	α-L-1,2; α-L-1,3
⇨	α-D-glucuronosidasas	3.2.1.131	α-L-1,2
→	α-D-galactosidasas	3.2.1.22	α-L-1,6
⇨	Feruloil esterasa	3.1.1.73	Éster
⇨	Acetil esterasa	3.1.1.72	Éster

**Figura 1.12.-** Enzimas implicadas en la degradación de una cadena de arabinoxilano, componente mayoritario de la hemicelulosa en la paja de trigo (adaptado de *Alvira y col., 2013*).

Por otro lado, las ligninasas, que han sido extensamente descritas en el punto 1.2.2.1 (apartado de deslignificación enzimática) son las enzimas encargadas de degradar el polímero de lignina, ya que a pesar de que este componente no está formado por unidades azucaradas, representa una barrera física para la hidrólisis y, por tanto, debe eliminarse.

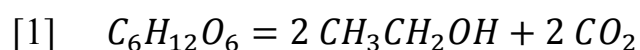
Por último, se han descrito otras proteínas que no poseen actividad catalítica, pero que mejoran la accesibilidad de los materiales lignocelulósicos. Entre ellas se encuentran las expansinas, de origen vegetal, y las “swolleninas”, de origen fúngico (Cosgrove, 2000; Saloheimo y col., 2002). Según el modelo de Cosgrove (2000), estas proteínas son capaces de relajar las uniones presentes entre las cadenas de polisacáridos que se encargan de agrupar las microfibrillas de celulosa, separando las microfibrillas entre sí y facilitando el acceso a las enzimas hidrolíticas.

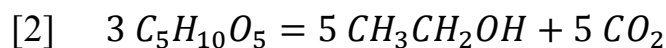
Además de una correcta mezcla de actividades enzimáticas, el proceso de HE está afectado por diversos factores. Estos factores están relacionados tanto con el sustrato como con los propios mecanismos de acción de las enzimas involucradas

(Jørgensen y col., 2007a; Zhu y col., 2008; Kristensen y col., 2009; Ximenes y col., 2010, 2011; Wang y col. 2011). En relación a los **factores dependientes del sustrato**, podemos encontrar efectos relacionados con sus propiedades intrínsecas como el contenido en lignina y hemicelulosa, la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, el tamaño de los poros y el área superficial accesible. Asimismo, también hay que considerar aspectos relacionados con la reología de los medios, ya que al tratarse de un sustrato insoluble se pueden presentar problemas de interacción de las enzimas con el sustrato. En cuanto a los **factores relacionados con los mecanismos de acción de las enzimas**, se pueden encontrar efectos de sinergia y pérdida de sinergia entre las distintas actividades enzimáticas a lo largo de la HE, la desnaturalización de las enzimas, las uniones inespecíficas y no productivas con la lignina, la inhibición por producto final o el efecto negativo de los compuestos de degradación obtenidos tras el pretratamiento. En el caso de la inhibición por producto final, el efecto adverso puede verse agravado por la consistencia inicial de la muestra, por lo que también puede incluirse dentro de los factores dependientes de sustrato. Este efecto se produce tras el incremento en la concentración de glucosa y celobiosa durante el proceso de sacarificación, ya que estos compuestos ejercen un impacto negativo sobre las propias enzimas hidrolíticas que los producen. Asimismo, la presencia de xilosa y xilooligómeros derivados de las hemicelulosas también tienen efectos inhibidores sobre las celulasas, disminuyendo los rendimientos de hidrólisis (Xiao y col., 2004; García-Aparicio y col., 2006; Qing y col., 2010).

### 1.2.2.3. Fermentación

Durante el proceso de fermentación, los azúcares liberados durante la etapa de HE son convertidos en etanol y CO<sub>2</sub> gracias a las rutas bioquímicas presentes en los microorganismos fermentativos. Teniendo en cuenta la estequiometría de las reacciones [1] y [2], que indican los procesos de conversión a etanol de las hexosas y las pentosas respectivamente, el rendimiento teórico para ambos compuestos es de 0,51 gramos de etanol por cada gramo de azúcar. Sin embargo, dichos rendimientos son difíciles de alcanzar en la práctica, ya que los microorganismos fermentativos derivan parte del consumo de carbono hacia el metabolismo celular y el crecimiento.

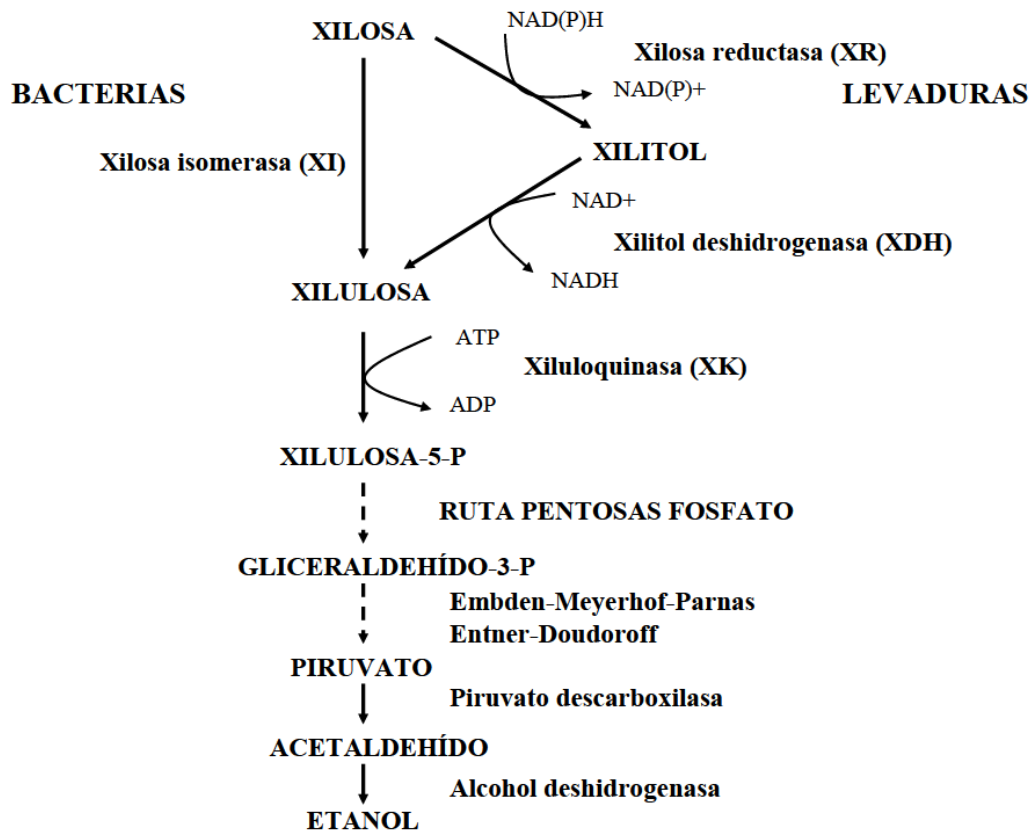




Los procesos de fermentación se conocen desde hace miles de años (producción de vino o cerveza) y los microorganismos más empleados en la industria fermentativa son las levaduras *S. cerevisiae* y *S. stipitis* y las bacterias *Escherichia coli* y *Z. mobilis* (Cheng and Timilsina, 2011). Entre los microorganismos mencionados, *S. cerevisiae* es el utilizado universalmente en la industria, ya que sus rendimientos son cercanos al teórico (0,51 g/g). Su elevada tolerancia a diversos inhibidores (como los derivados tras el pretratamiento) en relación a otras especies, hace que sea también una levadura óptima para su aplicación en la producción de bioetanol lignocelulósico. Sin embargo, la cepa nativa de *S. cerevisiae* es incapaz de fermentar a etanol las pentosas, como la xilosa, lo que representa una limitación significativa teniendo en cuenta que estos azúcares se encuentran en una proporción significativa en los materiales lignocelulósicos. Por ejemplo, en la paja de trigo, la xilosa es el principal componente hemicelulósico y puede representar cerca del 30% del peso seco total.

En la naturaleza sólo las bacterias entéricas y algunas levaduras como *C. shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *S. stipitis* son capaces de incorporar y fermentar la xilosa a etanol, pero sus rendimientos son relativamente bajos (Hahn-Hägerdal y col., 1994). En la actualidad, mediante la utilización de técnicas de ingeniería metabólica se han desarrollado diferentes cepas modificadas genéticamente con capacidad para fermentar xilosa (Sonderegger y col., 2004; Olsson y col., 2006; Gírio y col., 2010; Tomás-Pejó y col., 2010; Koppram y col., 2012). En este contexto, las cepas de *S. cerevisiae* F12 (Sonderegger y col., 2004; Tomás-Pejó y col., 2010) y KE6-12 (Wahlbom y col., 2003; Koppram y col., 2013) son ejemplos de cepas recombinantes capaces de realizar la co-fermentación de las hexosas y las pentosas. Ambas cepas recombinantes tienen como origen cepas industriales, *S. cerevisiae* F y *S. cerevisiae* USM21, respectivamente, a la que se han incorporado los genes *XYL1* y *XYL2* procedentes de la levadura *S. stipitis*, que codifican las enzimas xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH) respectivamente, junto a la sobreexpresión del gen endógeno *XKS1* que codifica para la xiluloquinasa (XK). Otra estrategia de modificación consiste en la introducción del gen que codifica la enzima xilosa isomerasa (XI) presente en algunas bacterias y hongos junto a la sobreexpresión de la XK. Con este sistema se han obtenido cepas como *S. cerevisiae* TMB3066, aunque la ruta de asimilación XR-XDH presenta mejores productividades volumétricas que la ruta

XI (Karhumaa y col., 2007). Ambos procesos de asimilación de la xilosa, así como su posterior transformación a etanol, se explican de forma gráfica en la Figura 1.13.



**Figura 1.13.-** Ruta de asimilación y fermentación de la xilosa donde se indican diferentes intermediarios y enzimas involucradas.

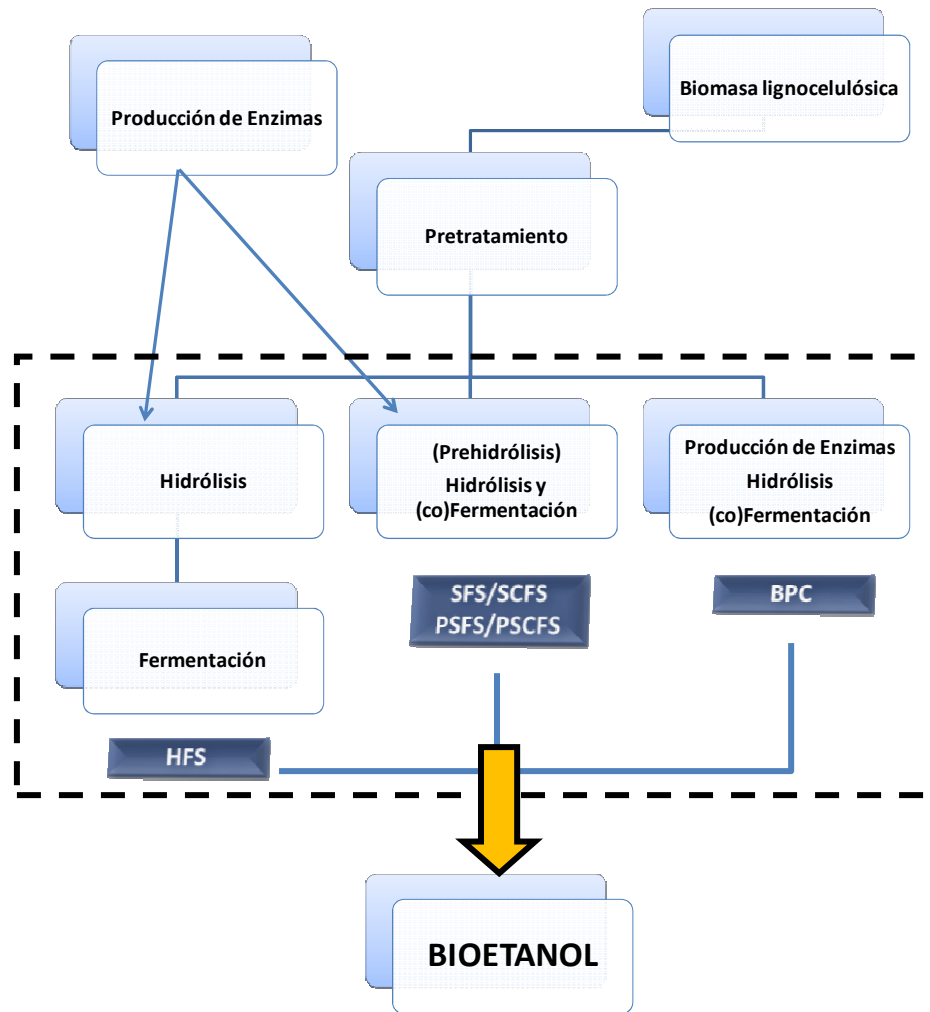
Otro punto que debe tenerse en cuenta en la utilización de cepas recombinantes para la co-fermentación de hexosas y pentosas es el transporte de estos azúcares al interior celular. La glucosa y la xilosa son incorporadas a la célula a través de los mismos transportadores. Sin embargo, la afinidad de estos transportadores por la glucosa es superior que para la xilosa, por lo que en presencia de ambos azúcares la glucosa tiene preferencia (Meinander y col., 1999). Por ello, se han obtenido cepas que sobreexpresan los genes de la familia HXT que codifican las proteínas transportadoras endógenas en *S. cerevisiae* (Chu y Lee, 2007). Con este fin, también se han introducido genes en *S. cerevisiae* codificantes para transportadores con una mayor afinidad por la xilosa, como Sut1 procedente de *S. stipitis* (Katahira y col., 2008), Trx1t1 de *T. reesei* (Saloheimo y col., 2007) y Gxf1 de *Candida intermedia* (Runquist y col., 2009).

### 1.2.3. Integración de las etapas de proceso y modos de operación

Como se describe en los apartados anteriores, las condiciones en las que se realiza cada etapa involucrada en la producción de bioetanol lignocelulósico tiene una gran influencia sobre las demás. En este sentido, la integración de las etapas debe optimizarse para que el proceso se lleve a cabo de la forma más eficiente posible, es decir, favoreciendo los rendimientos altos y disminuyendo la inversión en equipamiento (Tomás-Pejó y col., 2008a). Tras la etapa de pretratamiento, en nuestro caso la EV, se obtiene un material pretratado completo (MPC) que se compone de una fracción insoluble (RSI), rica en celulosa y lignina, y una fracción líquida que contiene fundamentalmente azúcares procedentes de la solubilización de la hemicelulosa así como diferentes productos de degradación. En aquellos casos en los que tras el pretratamiento la concentración de inhibidores es muy elevada, resulta indispensable la realización de un proceso de destoxificación. De forma general, se suelen utilizar sistemas de filtración y lavado enfocados a trabajar con el RSI. Sin embargo, estos sistemas además de disminuir los tóxicos, también reducen la cantidad de azúcares fermentables e incrementan la cantidad de agua utilizada en el proceso. En este sentido, la utilización del MPC podría suponer un aumento de la concentración final de etanol, ya que podrían fermentarse todos los azúcares producidos durante el pretratamiento y la HE. Para ello, es necesario realizar una destoxificación *in situ*, siendo los sistemas de biodestoxificación con lacasas una alternativa prometedora para mejorar los procesos de producción de biocombustibles de segunda generación.

Tras el pretratamiento, las etapas de producción de enzimas, hidrólisis y fermentación, pueden integrarse de varias maneras, dando lugar a distintos procesos: hidrólisis y fermentación separadas (HFS), sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) o bioproceso consolidado (BPC) (Olsson y col., 2005; Tomás-Pejó y col., 2008a). Además, cuando los procesos de SFS se llevan a cabo a altas cargas, la viscosidad de la muestra suele ser elevada, por lo que normalmente se realiza una etapa de prehidrólisis (P) o licuefacción que reduce la viscosidad. Este proceso se denomina presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS).

La Figura 1.14 esquematiza los niveles de integración de las etapas de HE y fermentación durante la producción de etanol lignocelulósico.



**Figura 1.14.-** Diferentes niveles de integración de las etapas del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Actualmente, dentro del concepto de biorrefinería, la integración de procesos resulta fundamental para el completo aprovechamiento de todos los componentes de los materiales lignocelulósicos. En este contexto, además de para la producción de etanol, la biomasa puede ser utilizada para la obtención de otras energías (calor, biogás) o subproductos con valor añadido, como diferentes compuestos aromáticos, aumentando la eficiencia y rentabilidad del proceso global (Ragauskas y col., 2006; Martínez y col., 2009; FitzPatrick y col., 2010).

### 1.2.3.1. Hidrólisis y fermentación separadas (HFS)

En la estrategia de HFS, las etapas de HE y fermentación se realizan bajo condiciones óptimas de temperatura, pH o agitación, ya que ambos procesos se realizan de forma separada y secuencial, es decir, cada paso se ejecuta de forma independiente y

hasta que la etapa anterior no finaliza, no se comienza con la siguiente. En este sentido, las condiciones óptimas para la HE son en torno a los 50 °C de temperatura y un pH aproximado a 5. La fermentación se realiza a un pH similar, pero a una temperatura inferior, entre los 30-37 °C (Olsson y col., 2005). Además de proporcionar unas condiciones adecuadas para cada proceso, el modelo de HFS ha sido comúnmente utilizado durante la producción de etanol, ya que tras la HE los sólidos insolubles que no han sido hidrolizados pueden retirarse fácilmente, por lo que el proceso de fermentación se lleva a cabo en medio líquido, permitiendo una posible reutilización de las células. La principal desventaja de la HFS es la inhibición por producto final de las enzimas celulolíticas, lo que disminuye los rendimientos del proceso.

### 1.2.3.2. Sacarificación y (co)fermentación simultáneas (SFS/SCFS)

En un nivel de integración superior al de HFS se encuentra la estrategia de SFS, en la cual, los procesos de HE y de fermentación tienen lugar de forma simultánea (Ballesteros y col., 2004). En este proceso, las diferentes condiciones óptimas de temperatura y pH para la HE y la fermentación son uno de los principales inconvenientes de la SFS. Sin embargo, en esta configuración la glucosa se consume al mismo tiempo que se libera, mitigando los efectos de la inhibición por producto final. Por consiguiente, pueden alcanzarse mayores rendimientos en la HE con menores dosis de enzimas, incrementándose la concentración del producto final. Asimismo, dado que ambas etapas transcurren de manera simultánea, el proceso global puede acortarse, reduciendo los costes del producto final.

Respecto a las diferencias en las temperaturas óptimas de HE y fermentación, el empleo de microorganismos termotolerantes, como por ejemplo *Kluyveromyces marxianus*, capaces de realizar la etapa de fermentación a temperaturas superiores a los 40 °C, resulta una alternativa muy interesante y que debe ser tenida en cuenta. Ballesteros y col. (2004) emplearon la cepa *K. marxianus* CECT 10875 en los procesos de SFS de diferentes materiales lignocelulósicos pretratados mediante EV, alcanzando unos rendimientos finales entre el 50% y el 72% del teórico en 72-82 h de proceso. Usando esta misma cepa, García-Aparicio y col. (2011) compararon la producción de etanol a partir de paja de cebada pretratada mediante EV en diferentes estrategias (HFS, SFS y PSFS), estableciendo los procesos de SFS como la mejor opción. Asimismo, Tomás-Pejó y col. (2009a) alcanzaron una concentración de etanol cercana a la mínima

requerida en un proceso industrial (4% (p/v)) bajo un sistema de SFS en semicontinuo o *fed-batch* con *K. marxianus* CECT 10875 y usando paja de trigo pretratada mediante EV. Junto al incremento en la concentración y en los rendimientos finales de producción, el empleo de cepas resistentes a temperaturas relativamente elevadas en SFS también reporta otros beneficios como la reducción de los riesgos de contaminación por microorganismos secundarios o la disminución de los costes de refrigeración de los reactores (Abdel-Banat y col., 2010). Sin embargo, como aspecto negativo, cabe mencionar que el aumento en la temperatura de fermentación provoca una fluidificación de las membranas biológicas que conlleva un incremento en la susceptibilidad de estos microorganismos frente a los inhibidores derivados del pretratamiento, limitando de esta forma su uso (Oliva y col., 2003, 2004, 2006; Tomás-Pejó y col., 2009a; Abdel-Banat y col., 2010).

En relación al consumo de azúcares, el uso del MPC implica la presencia de azúcares hemicelulósicos en los medios de fermentación. Por ello, para la utilización eficiente de biomasa con alto contenido en pentosas, como es el caso de la paja de trigo, es deseable emplear cepas capaces de co-fermentar la glucosa y la xilosa, aumentando así la producción de etanol (Olsson y col., 2006; Tomás-Pejó y col., 2008b, 2010). Este proceso, denominado sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS), permite mantener bajos niveles de glucosa, por lo que los mecanismos de competición de los azúcares por el transportador se reducen, favoreciendo a su vez la asimilación de la xilosa. Además, los procesos de SCFS puesto que no acumulan las pentosas contribuyen a reducir el efecto negativo que generan los azúcares hemicelulósicos sobre las celulasas, aumentando también el rendimiento de HE (Qing y col., 2010).

Desde un punto de vista industrial, para reducir los costes derivados de los procesos de destilación y evaporación durante la posterior purificación del producto, la concentración de etanol tras la fermentación debe ser superior al 4% (p/v) (Sun y Cheng, 2002; Wingren y col., 2003; Ballesteros y col., 2004). En este contexto, el uso de altas concentraciones de sustrato que permitan obtener altas concentraciones de azúcares fermentables resulta fundamental. Sin embargo, operar a altas consistencias implica un aumento en la viscosidad que dificulta el mezclado homogéneo de las enzimas con el sustrato en el interior de los reactores. Una alternativa para reducir la viscosidad del medio es la realización de los procesos de PSFS/PSCFS. Durante la etapa de prehidrólisis o presacarificación, la ausencia del microorganismo fermentativo



permite que las enzimas puedan actuar bajo condiciones óptimas de temperatura y pH, reduciendo la viscosidad al fluidificar el medio y facilitando el mezclado del mismo (Jørgensen y col., 2007b; Tomás-Pejó y col., 2009a; Manzanares y col., 2011). Otra posible alternativa de los procesos de PSFS/PSCFS que permite trabajar a altas cargas de sólidos es la adición del sustrato por pulsos o procesos *fed-batch* (Rudolf y col., 2005; Tomás-Pejó y col., 2010). En este modo de operación, el sustrato se añade a diferentes tiempos, con lo que el incremento de la consistencia es gradual. Además, la adición por pulsos permite que el material sea hidrolizado por tandas, por lo que la viscosidad con cada nueva adición no se eleva excesivamente.

### 1.2.3.3. Bioproceso consolidado (BPC)

Un paso importante en la optimización de los procesos de producción de etanol es el bioproceso consolidado (BPC). El BPC supone la integración de todas las etapas que tienen lugar tras el pretratamiento. De esta manera, el microorganismo o conjunto de microorganismos encargados de llevar a cabo los procesos de BPC, son capaces de producir las enzimas necesarias para realizar la hidrólisis a la vez que co-fermentan de forma simultánea las hexosas y las pentosas en un único reactor. La configuración BPC no puede realizarse con los microorganismos disponibles actualmente, por lo que se requiere el desarrollo de nuevos microorganismos mediante el empleo de ingeniería genética y metabólica. Entre los microorganismos que se están estudiando para los procesos de BPC destacan aquellos del género *Clostridium*. Estas bacterias presentan un sistema enzimático extracelular denominado celulosoma, capaz de llevar a cabo la HE, a la vez que el metabolismo celular interno es capaz de fermentar la glucosa y la xilosa para producir etanol y otros subproductos (Lynd y col., 2005; Cardona y Sánchez, 2007). Otra estrategia consiste en convertir un buen fermentador, como *S. cerevisiae*, en un organismo celulolítico mediante la expresión heteróloga de las enzimas responsables de la hidrólisis de la celulosa (Lynd y col., 2005). En la actualidad, los procesos BPC aún están lejos de representar una estrategia efectiva. En este sentido, diversos microorganismos están siendo modificados mediante ingeniería genética para optimizar en ellos un metabolismo fermentativo, así como dotarlos de un sistema adecuado de expresión enzimática.





## *OBJETIVOS E HIPÓTESIS*



## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

El trabajo realizado en el presente estudio se enmarca dentro de las actividades de la Unidad Mixta IMDEA Energía – CIEMAT, formada por la Unidad de Procesos Biotecnológicos del IMDEA Energía y la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT. La Unidad mixta tiene como objetivo el desarrollo de procesos y tecnologías para la producción de biocombustibles a partir de materiales renovables, entre los que se encuentra el bioetanol lignocelulósico. Parte del trabajo experimental se ha desarrollado en el Dpto. de Ingeniería Química y Biológica de la Universidad Tecnológica de Chalmers (Suecia). Para la realización de este trabajo se ha contado con una ayuda para Contratos de Investigador de Apoyo de la Comunidad de Madrid (2009-2013) y con una “Short-Term Fellowship” (Mayo-Julio 2012), concedida por la “Federation of European Biochemical Societies” para la realización de la estancia en la Universidad Tecnológica de Chalmers.

Teniendo en cuenta los antecedentes comentados en la introducción, entre las diferentes tecnologías que se están desarrollando para la producción de biocarburantes de segunda generación, los procesos de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, basados en hidrólisis enzimática, son los que ofrecen mejores perspectivas de comercialización. No obstante, para que estos procesos puedan ser rentables todavía son necesarias mejoras significativas. En este contexto, es necesario el incremento de los rendimientos de la etapa de hidrólisis y fermentación y simplificar el proceso global integrando parte de las etapas. La hidrólisis enzimática representa una etapa clave del proceso, ya que el incremento en los rendimientos de esta etapa repercuten de forma directa en la producción final de etanol. Una deslignificación previa de los materiales pretratados antes de la hidrólisis que reduzca el contenido en lignina, podría facilitar la liberación de azúcares mediante el incremento del área superficial accesible y la reducción de las uniones improductivas de las enzimas hidrolíticas. Por otro lado, la etapa de fermentación puede mejorarse mediante el desarrollo de cepas que puedan convertir de forma simultánea todos los azúcares contenidos en los materiales lignocelulósicos a etanol y que presenten además, una mayor tolerancia frente a los diferentes tóxicos generados durante el pretratamiento. La integración de etapas supone también un avance fundamental, ya que permitiría ahorrar costes en equipamiento y acortar el tiempo global del proceso.

En este trabajo se seleccionó la paja de trigo como materia prima, ya que es un residuo agrícola abundante tanto en España como a nivel mundial y presenta un alto contenido en azúcares que pueden ser convertidos a etanol. Para alterar la estructura recalcitrante y facilitar la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas, la biomasa fue pretratada mediante explosión por vapor bajo diferentes condiciones de presión y temperatura. Los aspectos innovadores propuestos en esta Tesis doctoral para la mejora del proceso de producción de etanol a partir de paja de trigo pretratada mediante explosión por vapor, implican el uso del material pretratado completo en lugar del residuo sólido insoluble, el empleo de cepas fermentadoras termotolerantes y/o co-fermentadoras de pentosas y hexosas y la optimización de la configuración del proceso global.

En base a estas consideraciones, el objetivo principal de esta investigación es la integración de las etapas de proceso mediante la utilización del material pretratado completo así como la evaluación de las posibles aplicaciones de las lacasas en los procesos de biodeslignificación y biodesintoxicación durante la producción de etanol a partir de la paja de trigo pretratada mediante explosión por vapor. Además, de forma más específica el trabajo incluye las siguientes propuestas:

- Evaluación de la explosión por vapor como etapa de pretratamiento de la paja de trigo en el proceso de producción de etanol.
- Evaluación de lacasas y/o sistemas lacasa-mediador como una etapa de deslignificación complementaria a la explosión por vapor: efecto sobre la composición e hidrólisis del residuo sólido insoluble de la paja de trigo pretratada.
- Uso del material pretratado completo en la producción de etanol lignocelulósico: evaluación de diferentes cepas fermentadoras (microorganismos termotolerantes y/o co-fermentadores de hexosas y pentosas) y configuraciones de procesos.
- Evaluación de lacasas como una etapa de desintoxicación del material pretratado completo integrada en las diferentes configuraciones de proceso: efecto sobre los compuestos inhibidores, sacarificación y comportamiento de las diferentes cepas fermentadoras.
- Evaluación de lacasas en la producción de etanol a partir del residuo sólido insoluble a altas concentraciones de sustrato.







## *MATERIALES Y MÉTODOS*



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materia prima

La paja de trigo (*Triticum aestivum*) utilizada como materia prima en la presente Tesis, fue suministrada por “Ecocarburantes de Castilla y León” (España). Tras su recepción, la biomasa fue molida hasta obtener un tamaño de partícula entre 2 y 10 mm mediante la utilización de un molino de cuchillas y posteriormente, almacenada a temperatura ambiente.

El análisis de composición de la biomasa de partida se realizó según los pasos descritos en el apartado 3.9.1.

#### 3.2. Pretratamiento mediante explosión por vapor (EV)

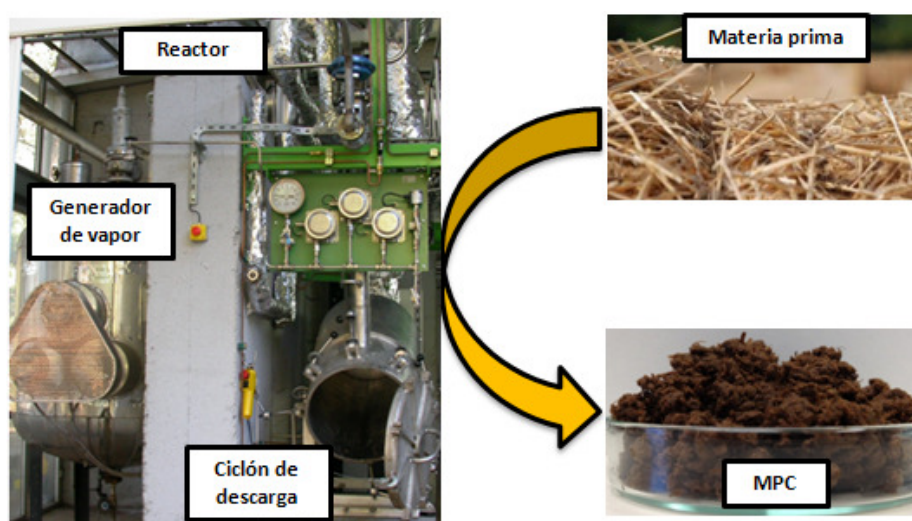
Con un nivel de humedad inferior al 10%, la paja de trigo molida se sometió a un pretratamiento mediante explosión por vapor (EV) en una unidad piloto que opera en discontinuo. La instalación está situada en el CIEMAT y se basa en la tecnología “Masonite”, aplicada en la producción industrial de pastas de papel (Marchessault y col., 1983). El equipo consta de un generador de vapor, un reactor y un ciclón de descarga. En nuestro caso, se han utilizado dos reactores diferentes: uno de 10 L y otro inferior con 2 L de capacidad. El mecanismo de funcionamiento de este equipo radica principalmente en el suministro de vapor por parte del generador al reactor, donde la biomasa se mantiene bajo condiciones controladas de presión y temperatura. Tras un tiempo de residencia determinado, se produce una despresurización instantánea y el material es dirigido espontáneamente al ciclón de descarga.

Según análisis de optimización previos llevados a cabo en el CIEMAT (resultados no publicados), las temperaturas óptimas de pretratamiento para la paja de trigo en base a rendimientos de hidrólisis enzimática (HE), se sitúan en el rango de 200-230 °C. Para alcanzar dichas temperaturas, las presiones que debe soportar el reactor en su interior se hallan entre las 15 y las 30 atmósferas, respectivamente. Por otro lado, como se observa en la ecuación [3], el factor de severidad del pretratamiento ( $\text{Log}(R_o)$ ) y por consiguiente la generación de productos inhibidores, también está influenciada por el tiempo de residencia, por lo que para estas temperaturas es aconsejable no superar los 5 min de pretratamiento:

$$[3] \quad \text{Log}(R_0) = \log \left[ t \times e^{\left( \frac{T - T_{\text{ref}}}{14,75} \right)} \right]$$

donde  $\text{Log}(R_0)$  es el factor de severidad,  $t$  el tiempo de residencia (min),  $T$  la temperatura de reacción ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $T_{\text{ref}}$  la temperatura de referencia ( $100^{\circ}\text{C}$ ). Ante estas observaciones, la materia prima utilizada en la presente Tesis se sometió a las siguientes condiciones de pretratamiento:  $200^{\circ}\text{C}$ ,  $210^{\circ}\text{C}$  y  $220^{\circ}\text{C}$ , manteniendo el tiempo de residencia en todos los casos en 2,5 min.

En la figura 3.1 se muestra una fotografía del equipo de EV ubicado en el CIEMAT así como una comparación del material antes y después del pretratamiento.



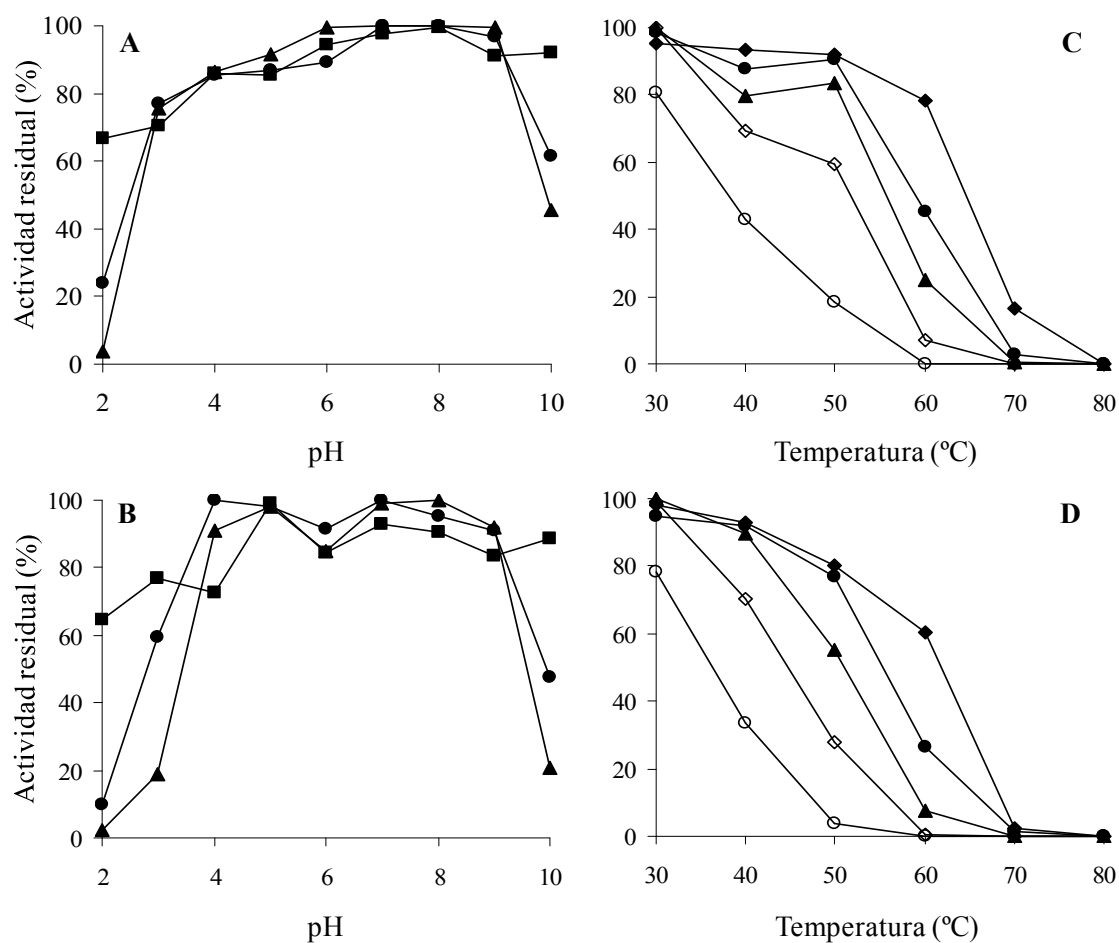
*Figura 3.1.- Equipo de explosión por vapor a escala piloto del CIEMAT y ejemplo de material pretratado completo (MPC) donde se pueden observar los cambios físicos producidos durante esta técnica.*

Posteriormente, el material pretratado completo (**MPC**) recogido fue analizado en relación a su contenido en sólidos totales. Asimismo, dicho material fue filtrado en parte o en su totalidad para separar una fracción sólida o residuo sólido insoluble (**RSI**) y una fracción líquida o prehidrolizado. La composición química de ambas fracciones se determinó respectivamente siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 3.9.1 (**RSI**) y 3.9.2 y 3.9.3 (fracción líquida). Tanto el MPC como el RSI y la fracción líquida, fueron utilizados en esta Tesis como sustrato en los diferentes ensayos.

### 3.3. Enzimas y mediadores

#### 3.3.1. Lacasas

Las lacasas evaluadas en los procesos de deslignificación y destoxificación se obtuvieron a partir de los hongos *Pycnoporus cinnabarinus* y *Trametes villosa*. Ambas enzimas fueron producidas respectivamente por “Beldem” (Bélgica) y “Novozymes” (Dinamarca). Sus actividades y estabilidades frente a diferentes pH y temperaturas han sido previamente caracterizadas por Ibarra y col. (2006b).



**Figura 3.2.-** Comparación de la estabilidad a diferentes pH (izquierda) y temperaturas (derecha) de las lacasas de *P. cinnabarinus* (A y C) y *T. villosa* (B y D). La estabilidad enzimática frente al pH fue estimada a 24 °C en tampón citrato-fosfato-borato (pH2-10) tras 0 h (■), 8 h (●) y 24 h (▲). Por otro lado, la termoestabilidad fue calculada tras incubación de ambas lacasas en tampón citrato-fosfato-borato pH 4 a diferentes temperaturas (30-80 °C) durante 1 h (■), 2 h (●), 4 h (▲), 8 h (□) y 24 h (○). Adaptado de Ibarra y col. (2006b).

La Figura 3.2 muestra las actividades residuales de las lacasas empleadas en la presente Tesis bajo diferentes pH y temperaturas tras un tiempo de incubación determinado. En relación al pH, estos autores observaron una alta estabilidad para las dos lacasas en un rango amplio de pH de 4 a 9. Por el contrario, los datos de termoestabilidad indicaron una mayor sensibilidad frente a la temperatura por parte de la lacasa de *T. villosa* en comparación con la lacasa de *P. cinnabarinus*. Asimismo, en la Figura 3.3 se pueden observar los pH y temperaturas óptimas establecidas tanto para la lacasa de *P. cinnabarinus* como para la de *T. villosa*. Las dos lacasas mostraron una actividad óptima en el rango de pH 3-4,5, mientras que en relación a la temperatura óptima, la lacasa de *P. cinnabarinus* mostró un incremento de actividad en el rango de 40-90 °C, que no se observó con la lacasa de *T. villosa*.

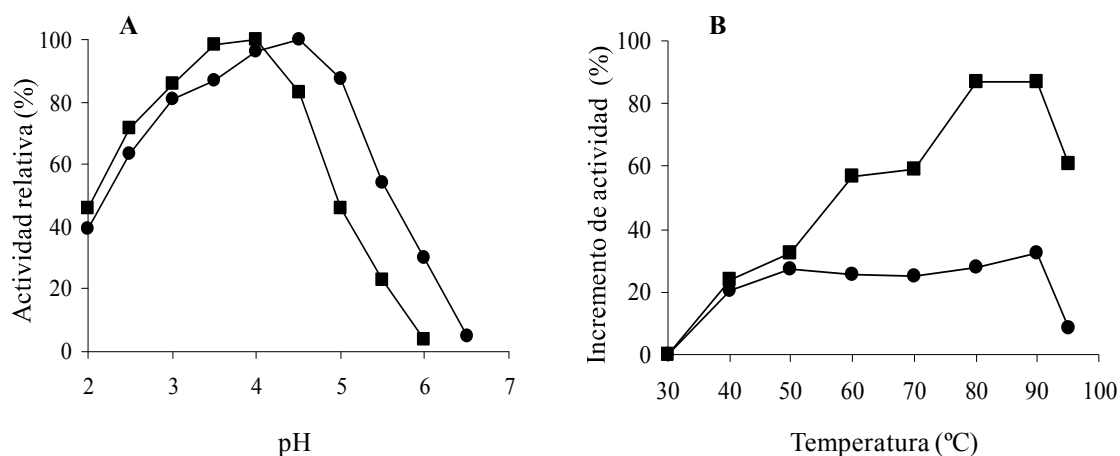


Figura 3.3.- pH (A) y temperaturas (B) óptimas de las lacasas de *P. cinnabarinus* (■) y *T. villosa* (●). Para el cálculo de la actividad lacasa en función del pH, dicha actividad se normalizó en relación al pH óptimo. Por otro lado, para el cálculo de la actividad lacasa en función de la temperatura se tomó como referencia la actividad observada a 30 °C.

### 3.3.3. Enzimas celulolíticas

Los procesos de HE o sacarificación se han llevado a cabo mediante la utilización de dos mezclas producidas por “Novozymes” (Dinamarca). Ambos sistemas hidrolíticos son comúnmente utilizados en la producción de etanol lignocelulósico y para diferenciarlos entre sí, se hablará de **mezcla estándar** y de **mezcla Cellic**.

En primer lugar, la mezcla estándar implica la combinación de las preparaciones enzimáticas NS 50013 y NS 50010. El complejo NS 50013 es un preparado celulolítico producido por *Trichoderma reesei* con actividad celobiohidrolasa y endoglucanasa, pero baja actividad  $\beta$ -glucosidasa. NS 50010, en cambio, es una preparación producida por *Aspergillus niger* y presenta principalmente actividad  $\beta$ -glucosidasa, por lo que resulta un complemento fundamental del complejo NS 50013 en la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos (Tomás-Pejó y col., 2009a; Ballesteros y col., 2010; García-Aparicio y col., 2011). Además de estas actividades principales, estas preparaciones muestran cierta proporción de otras actividades enzimáticas como xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas o  $\alpha$ -L-arabinofuranosidas (Alvira y col., 2011).

Por otro lado, en la mezcla Cellic están incluidos los complejos Cellic CTec2 y Cellic HTec2, preparados celulolíticos recientemente desarrollados a partir de *Trichoderma* spp. En este caso, la preparación enzimática Cellic CTec2 proporciona las actividades celulasa y  $\beta$ -glucosidasa, por lo que no necesita de una suplementación de esta última. Además, también presentan cierta proporción de otras actividades como xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas o  $\alpha$ -L-arabinofuranosidas (Alvira y col., 2011). Mientras, el complejo Cellic HTec2 presenta fundamentalmente actividad xilanasas y apenas celulasa o  $\beta$ -glucosidasa. La aparición de estas nuevas mezclas supone un avance en la producción de complejos celulolíticos, ya que mejoran las actividades presentes en los complejos anteriores e incorporan otras nuevas como por ejemplo las polisacárido-monooxigenasas (Horn y col., 2012), contribuyendo a mejorar la hidrólisis de los carbohidratos e incrementar los rendimientos de sacarificación.

### 3.3.3. Mediadores

Los reactivos utilizados como mediadores de la lacasa en los sistemas lacasa-mediador fueron los siguientes compuestos sintéticos: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS; Roche); 1-hidroxibenzotriazol (HBT; Sigma); y ácido violúrico (VIO; Sigma).

La concentración final a la que se emplearon estos compuestos fue del 1,5% (p/p), considerando el peso seco de la muestra en todos los casos.



### 3.4. Determinación de actividades enzimáticas

#### 3.4.1. Actividad lacasa

Las actividades de las diferentes lacasas empleadas se determinaron mediante el seguimiento por espectrofotometría del radical catiónico obtenido tras la oxidación del ABTS. Las reacciones se desarrollaron a temperatura ambiente en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5 y a una concentración de sustrato (ABTS) de 5 mM. La formación del radical catiónico se midió a una longitud de onda de 436 nm (espectrofotómetro V-530, “software” JASCO) en un volumen final de reacción de 1 mL (0,1 mL de la enzima previamente diluida y 0,9 mL de reactivo). Por otro lado, el cálculo de actividad se realizó mediante la fórmula [4] teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del radical catiónico formado a 436 nm ( $\epsilon_{436}$ ) es de  $2,93 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ :

$$[4] \quad A \text{ (UI/mL)} = \frac{\Delta \text{Abs} \times V_{\text{rea}} \times 10^6}{\epsilon \times V_{\text{enz}} \times \Delta t \times L}$$

donde A es la actividad (UI/mL),  $\Delta \text{Abs}$  la diferencia entre la absorbancia final e inicial,  $V_{\text{rea}}$  el volumen de reacción (L),  $10^6$  el factor de conversión de mol a  $\mu\text{mol}$ ,  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{enz}}$  el volumen de enzima (mL),  $\Delta t$  el tiempo de reacción (min) y L el espesor de la cubeta (cm). De esta manera, una unidad internacional (UI) se define como la cantidad de enzima requerida para la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto.

Tras los cálculos oportunos, las actividades dieron un resultado de 60,63 UI/mL y 470 UI/mL para las lacasas de *P. cinnabarinus* y *T. villosa*, respectivamente.

#### 3.4.2. Actividad sobre papel de filtro

La actividad celulolítica de las preparaciones enzimáticas NS 50013 y Cellic CTec2 se estableció mediante la cuantificación de los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática del papel de filtro “Whatman” nº 1 (Ghose, 1987). El resultado de la medida de esta actividad se expresó como unidades de papel de filtro por mililitro de preparación enzimática (UPF/mL). La unidad de papel de filtro se define como una unidad internacional (UI), por lo que representa la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores liberados por minuto. Los ensayos realizados para la medida de esta actividad se llevaron a cabo en tampón citrato 0,05 M, pH 5, con una tira de papel

“Whatman” n° 1 a 50 °C durante 1 h, en un volumen final de 1 mL y con una dilución apropiada de enzima. Posteriormente se añadieron 3 mL de una preparación con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y la mezcla se llevó a ebullición durante 5 min. En esta reacción, los grupos aldehído o cetona de los azúcares se oxidan dando lugar a derivados ácidos mientras que el DNS se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Miller, 1959). Al enfriarse, las soluciones se diluyeron con 20 mL de agua destilada, midiendo la densidad óptica de la disolución a 540 nm.

Para determinar la concentración de azúcares reductores se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de glucosa, por lo que todos los azúcares reductores fueron considerados como glucosa. De esta manera, una vez determinada la concentración de glucosa liberada tras la acción enzimática, se calculó la actividad en UPF/mL según se describe por Goshe (1987).

Según este sistema, las actividades para las preparaciones NS 50013 y Cellic CTec2 fueron respectivamente 63 UPF/mL y 100 UPF/mL.

### 3.4.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa

Dado que la enzima  $\beta$ -glucosidasa es la encargada de hidrolizar la molécula de celobiosa en glucosa, la actividad de dicha enzima se midió a 50 °C de temperatura utilizando una solución de celobiosa 0,015 M en tampón citrato 0,05 M, pH 5. La reacción se llevó a cabo tras mezclar 1 mL de celobiosa con 1 mL de enzima (previamente diluida) durante 30 min (Ghose, 1987). Para detener la reacción, la temperatura se aumentó hasta los 100 °C durante 5 min y a continuación se calculó la concentración de glucosa mediante un ensayo enzimático comercial (Test enzimático de determinación de glucosa GAHK20, Sigma). Este método se basa en la acción de las enzimas hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que fosforilan y oxidan la glucosa respectivamente formándose una cantidad equimolar de NADH que se detecta a una longitud de onda de 340 nm. La concentración de NADH obtenida permite estimar la concentración de glucosa con un  $\epsilon_{340}$  de  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , mediante la siguiente relación [5]:

$$[5] \quad C \text{ (g/L)} = \frac{\Delta Abs \times V_T \times 180}{\epsilon \times V_m \times L}$$

donde  $C$  es la concentración de glucosa (g/L),  $\Delta\text{Abs}$  la diferencia de absorbancia final e inicial,  $V_T$  el volumen total de la reacción (L), 180 el peso molecular de la glucosa (g/mol),  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_m$  el volumen de muestra (L) y  $L$  el espesor de la cubeta (cm). A continuación, siguiendo los pasos descritos por Ghose (1987) se puede determinar la actividad  $\beta$ -glucosidasa, que en el caso de las preparaciones NS 50013, NS 50010 y Cellic CTec2 fue de 11 UI/mL, 810 UI/mL y 3950 UI/mL, respectivamente.

#### 3.4.4. Actividad xilanasa

La actividad xilanasa se determinó utilizando 30 mg/mL de xilano de abedul (Sigma) en tampón citrato 0,05 M, pH 5 (Bailey y col., 1991). Para la reacción se usaron 0,2 mL del sustrato y 0,8 mL de enzima convenientemente diluida y se incubaron en agitación a 50 °C durante 15 min. Tras detener la reacción por desnaturalización de la enzima, la concentración de azúcares reductores se estimó por el método “Somogyi-Nelson” mediante la aproximación a una recta patrón con glucosa (Somogyi, 1945). Para esta técnica, cada muestra se incubó con el reactivo I (“Somogyi”) durante 15 min a 100 °C tras lo cual, en frío, se añadió el reactivo II (“Nelson”). Posteriormente la mezcla se diluyó con agua en proporción 1:12 y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Tras determinar la concentración de azúcares reductores, se estableció la actividad xilanasa según Bailey y col. (1991).

La actividad xilanasa se determinó en las preparaciones NS 50013 y Cellic HTec2 dando unos valores de 122 UI/mL y 1300 UI/mL, respectivamente.

#### 3.4.5. Actividad $\beta$ -xilosidasa

Para determinar la actividad  $\beta$ -xilosidasa se incubaron 0,1 mL de enzima con 0,1 mL del sustrato  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido (Sigma) diluido en tampón citrato 0,05 M, pH 5 a una concentración de 2 mg/mL (Poutanen y col., 1987). La reacción transcurrió durante 30 min a 50 °C en agitación, y a continuación se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de carbonato sódico al 2% para detener la reacción y potenciar la coloración del  $p$ -nitrofenol. La absorbancia del  $p$ -nitrofenol liberado se observó a 410 nm y la actividad (UI/mL) se calculó con un  $\epsilon_{410}$  de  $1,52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  según la fórmula [4] indicada en el apartado 3.4.1.

En las preparaciones Cellic CTec2 y HTec2 la actividad  $\beta$ -xilosidasa fue de 81 UI/mL y 201 UI/mL, respectivamente. Por otro lado, el complejo NS 50013 presentó una actividad de 45 UI/mL.

### 3.5. Ensayos de hidrólisis enzimática (HE)

Los procesos de HE o sacarificación de las diferentes fracciones lignocelulósicas resultantes del pretratamiento mediante EV de la paja de trigo (MPC y RSI) se llevaron a cabo utilizando bien la mezcla estándar o en su lugar, la mezcla Cellic. Antes de comenzar la fase de HE, el sustrato a hidrolizar se diluyó en concentraciones variables según los diferentes ensayos con tampón citrato 0,05 M, pH 5-5,5 en base a la cantidad de sólidos totales (ST) o sólidos insolubles (SI), expresando los valores como % ST (p/v) ó % SI (p/p). A continuación, en los casos en los que se utilizó la mezcla estándar se tuvieron en cuenta las actividades celulasa y  $\beta$ -glucosidasa, por lo que se añadieron 15 UPF/g sustrato (peso seco) de la preparación NS 50013 y 15 UI/g sustrato (peso seco) de la preparación NS 50010. Por otro lado, en aquellas muestras en las que se usó la mezcla Cellic se tuvieron en cuenta las actividades celulasa y xilanasa, de manera que se añadieron 15 UPF/g sustrato (peso seco) de Cellic CTec2 y 60 UI/g sustrato (peso seco) de Cellic HTec2. Estas dosis enzimáticas se establecieron en relación a estudios de optimización previos llevados a cabo por [Tomás-Pejó y col. \(2009b\)](#) en el caso de la mezcla estándar y según [Barta y col. \(2011\)](#) para la mezcla Cellic.

La Tabla 3.1 establece un resumen de todas las actividades enzimáticas añadidas para la hidrólisis de los diferentes sustratos, indicándose en negrita los valores de referencia.

**Tabla 3.1.-** Actividades hidrolíticas añadidas con las mezclas estándar o Cellic

Preparación enzimática	Celulasa (UPF/g sustrato)	$\beta$ -glucosidasa (UI/g sustrato)	Xilanasa (UI/g sustrato)	$\beta$ -xilosidasa (UI/g sustrato)
<b>Mezcla estándar:</b>				
NS 50013	<b>15</b>	2,6	29	10
NS 50010	-	<b>15</b>	n.d.	n.d.
<b>Mezcla Cellic:</b>				
Cellic CTec2	<b>15</b>	592,5	n.d.	12
Cellic HTec2	n.d.	n.d.	<b>60</b>	9,3

n.d. no determinado

Por otro lado, la fracción líquida o prehidrolizado también se sometió a un proceso de HE para transformar los azúcares oligoméricos en monómeros fermentables. En primer lugar, se llevó a cabo su dilución con tampón citrato 0,05 M, pH 5,5. Para ello, se tuvo en cuenta el contenido en sólidos totales del MPC de partida, por lo que los valores se expresaron como % ST (p/v) equivalentes. Tras la dilución, el proceso de hidrólisis se llevó a cabo con la mezcla Cellic a una carga enzimática de 0,5 UPF/mL de Cellic CTec2 y 2 UI/mL de Cellic HTec2, según Barta y col. (2011).

Independientemente de la mezcla enzimática y de la muestra de partida, el proceso de sacarificación se llevó a cabo en un incubador orbital durante 8-72 h en función del ensayo, a una temperatura de 50 °C y con una agitación constante entre 150 y 180 rpm. Además, para evitar la contaminación con microorganismos que puedan modificar la concentración de azúcares, las muestras se suplementaron con 0,01% de azida sódica. Todos los ensayos se realizaron por triplicado expresándose los valores medios correspondientes junto a su desviación típica.

### 3.6. Microorganismos y condiciones de cultivo

Para la conversión de los azúcares presentes en las diferentes fracciones lignocelulósicas resultantes del pretratamiento mediante EV de la paja de trigo (MPC y RSI) se han usado diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa termotolerante de *Kluyveromyces marxianus*, las cuales se describen a continuación. Asimismo, en cada apartado también se indican los distintos medios de cultivo empleados para el crecimiento y preparación del inóculo necesario.

#### 3.6.1. *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875

La cepa *K. marxianus* CECT 10875 fue seleccionada en los laboratorios de la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Ballesteros y col, 1991). Al tratarse de una cepa termotolerante, este microorganismo es capaz de fermentar la glucosa de forma eficiente a temperaturas superiores a los 40 °C. En este contexto, la preparación del preinóculo tuvo lugar a 42 °C y 150 rpm durante 16 h, empleando el siguiente medio definido: 30 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,3 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

Tras el crecimiento, el cultivo se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y las células contenidas en el “pellet” se lavaron con agua destilada una vez. A continuación, el “pellet” celular se pesó y se diluyó con agua destilada para obtener el tamaño de inóculo deseado.

### 3.6.2. *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red

*S. cerevisiae* “Ethanol Red” es una cepa industrial suministrada por la empresa “Fermentis” (Francia). Al igual que *K. marxianus* CECT 10875, esta cepa es capaz de fermentar las hexosas pero no las pentosas, por lo que la preparación del preinóculo se realizó a partir de la levadura liofilizada utilizando el mismo protocolo descrito en el apartado 3.6.1. Sin embargo, al tratarse de un microorganismo mesófilo, *S. cerevisiae* “Ethanol Red” no es capaz de resistir temperaturas elevadas y el crecimiento se llevó a cabo a 35 °C.

### 3.6.3. *Saccharomyces cerevisiae* F12

Al contrario que los dos microorganismos anteriores, *S. cerevisiae* F12 es una cepa capaz de fermentar las hexosas y las pentosas. Esta cepa tiene integrada en su genoma los genes XYL1 (gen que codifica para la enzima xilosa reductasa (XR)) y XYL2 (gen que codifica para la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH)) de *Scheffersomyces stipitis* y a su vez, el gen endógeno XKS1 (gen que codifica para la enzima xiluloquinasa (XK)) está modificado para su sobreexpresión (Sonderegger y col., 2004). Asimismo, la cepa empleada fue previamente sometida a un proceso de ingeniería evolutiva mediante su exposición a concentraciones crecientes de los compuestos inhibidores presentes en la fracción líquida o prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento mediante EV de la paja de trigo (Tomás-Pejó y col., 2010).

El crecimiento de este microorganismo se llevó a cabo en medio “Delf” modificado con la siguiente composición: 20 g/L glucosa, 20 g/L xilosa, 7,5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,75 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 mL/L de una solución conteniendo trazas de metales y 1 mL/L de una solución con vitaminas. Las condiciones de cultivo fueron 30 °C y 150 rpm. Tras 24 h de incubación, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y se lavaron y diluyeron a la concentración deseada con agua destilada.

### 3.6.4. *Saccharomyces cerevisiae* KE6-12

Otra cepa co-fermentadora de hexosas y pentosas usada en el presente trabajo fue *S. cerevisiae* KE6-12 (Albers y col., resultados no publicados; Koppram y col., 2013). Esta cepa se ha obtenido a partir de una cepa industrial, *S. cerevisiae* TBM 3400 suministrada por la empresa “Taurus AB” (Suecia), mediante la aplicación secuencial de los procesos de mutagénesis al azar y evolución por adaptación. Al igual que *S. cerevisiae* F12, *S. cerevisiae* KE6-12 tiene integrados en su cromosoma los genes XYL1 y XYL2 de *S. stipitis* y sobreexpresado el gen XKS1 endógeno (Wahlbom y col., 2003). Para la obtención del volumen de preinóculo deseado, los cultivos de esta cepa se realizaron en las mismas condiciones señaladas en el punto 3.6.3.

## 3.7. Ensayos de fermentación

Las distintas estrategias usadas para la integración de las fases de HE y fermentación de las diferentes fracciones resultantes del pretratamiento mediante EV de la paja de trigo (MPC, RSI y fracción líquida o prehidrolizado) fueron principalmente los sistemas de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). Dada la versatilidad en los modos de operación de estos sistemas, los procesos de SFS se llevaron a cabo bajo diferentes configuraciones: en discontinuo, semicontinuo o *fed-batch* y con una etapa de presacarificación (PSFS). En cualquier caso, los ensayos se realizaron por triplicado usando matraces de 100 mL con tapones de goma perforados con una aguja para facilitar la salida del CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación.

Salvo en aquellas muestras donde se especifique lo contrario, los diferentes ensayos de producción de etanol se suplementaron con sales para facilitar el crecimiento del microorganismo fermentativo. De esta forma, los medios sometidos a un proceso de fermentación con los microorganismos *K. marxianus* CECT 10875 o *S. cerevisiae* “Ethanol Red”, se complementaron con 5 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,3 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Por otro lado, en aquellos casos donde se usaron las cepas co-fermentadoras de pentosas *S. cerevisiae* F12 o *S. cerevisiae* KE6-12, se añadieron 5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (DAP).

### 3.7.1. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

El MPC obtenido tras el pretratamiento mediante EV de la paja de trigo ha sido utilizado como sustrato en los sistemas de SFS. En los procesos de SFS realizados en discontinuo, los sustratos se diluyeron con tampón citrato 0,05 M, pH 5-5,5 a la consistencia deseada y expresada como % ST (p/v). Posteriormente, las muestras se suplementaron con la cantidad correspondiente de mezcla estándar o mezcla Cellic siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.5. Al mismo tiempo, el microorganismo fermentativo se incorporó a las muestras con un volumen de inóculo de 1 g/L (peso seco) y los matraces se mantuvieron en agitación constante entre 150-180 rpm durante 72-144 h a 42 °C ó 35 °C, dependiendo del microorganismo inoculado.

### 3.7.2. Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SCFS)

Del mismo modo, el MPC también se sometió a diferentes ensayos de SCFS en discontinuo y en semicontinuo o *fed-batch*. Para los ensayos en discontinuo, el procedimiento seguido fue el mismo al descrito en el apartado 3.7.1.

Por otro lado, para los ensayos de SCFS en semicontinuo, el MPC se diluyó a una consistencia inicial del 6% ST (p/v). A continuación, las muestras se suplementaron con la dosis adecuada de mezcla Cellic (apartado 3.5) y con 3 g/L (peso seco) de *S. cerevisiae* KE6-12. El proceso tuvo una duración total de 168 h, donde los matraces se mantuvieron a 35 °C y 180 rpm. Transcurridas 25 h y 50 h desde el inicio del proceso, la consistencia se incrementó al 12% y al 16% ST (p/v), respectivamente. Con cada adición de sustrato, las actividades enzimáticas se ajustaron nuevamente para alcanzar 15 FPU/g sustrato (peso seco) de Cellic CTec2 y 60 UI/g sustrato (peso seco) de Cellic HTec2. Asimismo, el pH se mantuvo en valores de 5-5,5 con una solución de NaOH 10 M y el DAP a una concentración de 5 g/L.

### 3.7.3. Presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS)

Los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas en los cuales se realizó una etapa de presacarificación (PSFS), se llevaron a cabo utilizando bien el MPC, el RSI o la fracción líquida o prehidrolizado. En los casos donde se utilizó el



MPC y el RSI, ambas fracciones se diluyeron con tampón citrato 0,05 M, pH 5-5,5 a diferentes consistencias referidas como % ST (p/v) o % SI (p/p). Posteriormente, las muestras se suplementaron con la mezcla hidrolítica correspondiente tal y como se indica en el apartado 3.5 y se incubaron a 50 °C y 150-180 rpm durante 8 h ó 72 h en el caso del MPC, y 24 h ó 48 h en el caso del RSI. Tras la fase de prehidrólisis, la temperatura de incubación se disminuyó a 42 °C ó 35 °C y la fermentación comenzó con la adición de 1 g/L (peso seco) del microorganismo correspondiente, prolongándose el proceso durante 72 h más.

Por otro lado, la fracción líquida, además de los productos de degradación, también presenta una concentración variable de azúcares que pueden ser fermentados a etanol. Sin embargo, estos azúcares solubles pueden encontrarse en forma oligomérica, por lo que previo al proceso de fermentación se realizó una etapa de prehidrólisis durante 24 h tal y como se describe en el apartado 3.5. Una vez finalizado el proceso de sacarificación, las muestras se inocularon con 1, 3 ó 5 g/L (peso seco) de *S. cerevisiae* KE6-12 y se incubaron a una temperatura de 35 °C en agitación constante a 150 rpm durante 120 h.

### **3.8. Ensayos con lacasas y sistemas lacasa-mediador**

Las lacasas y los sistemas lacasa-mediador estudiados en la presente Tesis se utilizaron bajo diferentes estrategias para el tratamiento de las fracciones lignocelulósicas (MPC y RSI) obtenidas tras el pretratamiento mediante EV de la paja de trigo, evaluando sus efectos en diversos puntos de los procesos. Asimismo, la fracción líquida o prehidrolizado y los hidrolizados obtenidos tras la sacarificación del MPC o del RSI, también fueron sometidos a un tratamiento con lacasa. Teniendo en cuenta los datos de estabilidad al pH y termoestabilidad mencionados con anterioridad (apartado 3.3.1), los tratamientos con la lacasa de *P. cinnabarinus* se llevaron a cabo a 50 °C en un rango de pH 5-5,5. Por otro lado, dada la sensibilidad a la temperatura de la lacasa de *T. villosa*, el tratamiento con esta enzima se realizó en un mismo rango de pH a 30 °C (Ibarra y col., 2006b). Asimismo, de forma independiente al tipo de proceso o a la lacasa utilizada, para el tratamiento de las fracciones lignocelulósicas se empleó una carga enzimática de 10 UI/g sustrato (peso seco) ó 1 UI/mL, teniendo en cuenta el peso seco o el volumen final de la muestra (sustratos líquidos), respectivamente.

En todos los casos, en paralelo al tratamiento se realizó un proceso de control bajo las mismas condiciones, añadiendo un volumen equivalente de tampón citrato 0,05 M, pH 5-5,5 en lugar de la enzima correspondiente. Tanto los tratamientos con lacasa como las muestras control se llevaron a cabo por triplicado.

### 3.8.1. Procesos de deslignificación

Con el fin de mejorar la digestibilidad de los materiales pretratados mediante EV y poder aumentar por consiguiente la producción global de etanol, el RSI se sometió a diferentes estudios de deslignificación con lacasa y sistemas lacasa-mediador (SLM). En este sentido, los tratamientos se evaluaron en base a la recuperación de azúcares fermentables durante un proceso de hidrólisis enzimática y en base a un análisis de composición del material tratado. Las etapas de deslignificación e hidrólisis enzimática se llevaron a cabo de forma secuencial, con etapas de filtración y lavado entre el tratamiento con lacasa o SLM y el proceso de sacarificación, o de forma consecutiva sin etapas de filtración y lavado entre los tratamientos mencionados. En cualquier caso, previo a la adición de la lacasa o SLM el sustrato se diluyó con tampón citrato 0,05 M, pH 5.

En los ensayos realizados de forma secuencial, los tratamientos con lacasa o SLM se llevaron a cabo durante 3 h en condiciones óptimas de temperatura: 50 °C para la lacasa de *P. cinnabarinus*. A continuación, las muestras se filtraron y lavaron y se dividieron para realizar la correspondiente hidrólisis enzimática (apartado 3.5) y el análisis de composición (apartado 3.9.1). Por otro lado, en los ensayos realizados de forma consecutiva, sin las etapas de filtración y lavado, los tratamientos con lacasa o SLM se llevaron a cabo como etapa previa al proceso de sacarificación durante 3 h. A continuación se añadió la mezcla hidrolítica correspondiente para comenzar con el proceso de sacarificación, el cual se prolongó durante 72 h.

Como se ha mencionado durante la introducción, la combinación de tratamientos con lacasa o SLM con tratamientos alcalinos mejoran los procesos de deslignificación en relación a la ejecución de ambos tratamientos por separado. Para evaluar el efecto sinérgico de las lacasas utilizadas en este trabajo con un tratamiento alcalino posterior, en algunos casos se realizó una extracción con NaOH de forma secuencial al tratamiento con lacasa o SLM. El proceso de extracción se llevó a cabo a 60 °C durante

1 h, tras diluir las muestras control y tratadas (que previamente habían sido filtradas y lavadas) al 5% (p/v) en agua con una cantidad de NaOH correspondiente al 1,5% del peso seco de la muestra. Tras la extracción alcalina, las muestras se filtraron y lavaron y se dividieron para realizar un proceso de hidrólisis enzimática y análisis de composición.

### 3.8.2. *Procesos de destoxificación*

Los tratamientos con lacasa también se han evaluado en la presente Tesis para la destoxificación de los materiales pretratados con el fin de mejorar su fermentabilidad e incrementar a su vez la producción de etanol. En este contexto, el tratamiento con lacasa se llevó a cabo bajo diferentes estrategias en relación al tipo de proceso en estudio.

#### 3.8.2.1. Tratamiento previo a los procesos de SFS/SCFS en discontinuo

En los procesos de SFS/SCFS llevados a cabo en discontinuo, el tratamiento con lacasa se realizó como etapa previa a la adición de la mezcla hidrolítica y de la inoculación del microorganismo fermentativo. En este contexto, el MPC diluido a la consistencia deseada se incubó en presencia de la lacasa de *P. cinnabarinus* durante 8 h ó 12 h a una temperatura de 50 °C y en agitación constante (150-180 rpm).

#### 3.8.2.2. Suplementación con lacasa a los procesos de SCFS en semicontinuo o *fed-batch*

Cuando los procesos de SCFS a partir del MPC se realizaron en semicontinuo o *fed-batch*, la lacasa de *P. cinnabarinus* se incorporó a las muestras una vez había comenzado el proceso. De esta manera, la suplementación con lacasa se realizó en dos puntos diferentes: a las 21 h ó a las 33 h desde la inoculación, es decir, 4 h antes y 8 h después respecto a la primera adición de sustrato (ver apartado 3.7.2).

#### 3.8.2.3. Tratamiento con lacasa en los sistemas de PSFS

Los tratamientos con lacasa en los sistemas de PSFS a partir del MPC o el RSI se realizaron a su vez bajo diferentes estrategias: antes, durante o después del proceso de presacarificación (ver apartado 3.7.3). En una primera aproximación, los sistemas de

PSFS donde la presacarificación se prolongó 8 h, el tratamiento con lacasa del MPC se llevó a cabo de forma simultánea a este proceso. De esta manera, tras la adición de la lacasa de *P. cinnabarinus* y la mezcla de enzimas hidrolíticas, las muestras se incubaron bajo las condiciones de presacarificación.

Por otro lado, en aquellos casos donde la prehidrólisis tuvo una duración de 72 h, el tratamiento con lacasa del MPC se evaluó de forma previa o posterior a esta etapa de presacarificación. En este sentido, cuando el tratamiento se realizó antes, las lacasas de *T. villosa* o *P. cinnabarinus* se añadieron a las muestras diluidas y se incubaron durante 3 h en agitación constante a temperatura óptima (30 °C ó 50 °C, respectivamente), para a continuación añadir la mezcla hidrolítica y continuar con el proceso de PSFS. Del mismo modo, el tratamiento posterior a la presacarificación se realizó bajo condiciones óptimas de temperatura, por lo que mientras el tratamiento con la lacasa de *P. cinnabarinus* se llevó a cabo a las mismas condiciones que la prehidrólisis, para el tratamiento con la lacasa de *T. villosa* la temperatura se redujo a los 30 °C.

En última instancia, los sistemas de PSFS en los cuales se utilizó como sustrato el RSI, la etapa de presacarificación tuvo una duración total de 24 h ó 48 h en función de la mezcla hidrolítica a utilizar. De esta manera, las muestras bajo la primera configuración (24 h de presacarificación) se suplementaron con la lacasa de *P. cinnabarinus* tras las 21 h de proceso, por lo que el tratamiento tuvo lugar 3 h antes de la inoculación. Por otro lado, las muestras pertenecientes a la segunda configuración (48 h de presacarificación) se suplementaron con esta misma lacasa a las 36 h de comenzar la incubación con la mezcla hidrolítica, permitiendo así un tratamiento de 12 h.

#### 3.8.2.4. Tratamiento de la fracción líquida

En el caso de los ensayos realizados con la fracción líquida, el tratamiento con lacasa de los medios obtenidos tras un proceso de sacarificación (ver apartados 3.5 y 3.7.3) se llevó a cabo en función del volumen final, con una carga enzimática de 1 UI/mL. La lacasa se añadió tras las 21 h del proceso de sacarificación, es decir, 3 h antes de la adición del inóculo.

Dado que para estos experimentos se empleó la lacasa de *P. cinnabarinus* en todos los casos, las condiciones de tratamiento fueron las mismas al proceso de hidrólisis (50 °C, 150 rpm).

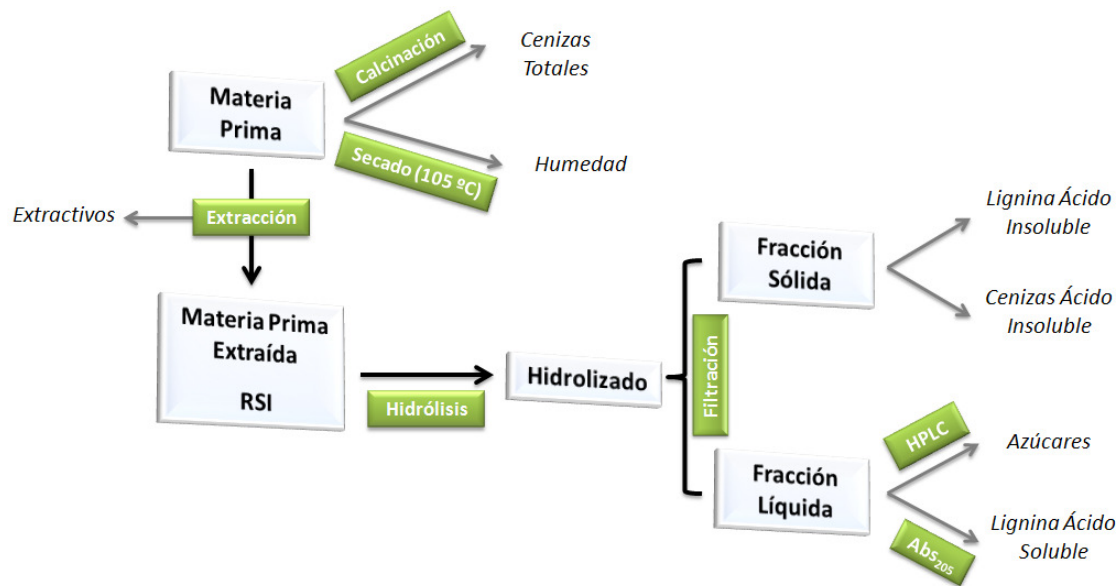
### 3.9. Determinaciones analíticas

#### 3.9.1. Composición de la materia prima, del material pretratado y de otros tratamientos

La composición química de la paja de trigo así como sus variaciones tras el pretratamiento mediante EV o los posteriores tratamientos con lacasas, se determinó según los métodos analíticos estándar (LAP: “*Laboratories Analytical Procedures*”) desarrollados por el “National Renewable Energy Laboratory” de EE.UU. (NREL, 2011). Esta metodología permite establecer los porcentajes relativos a los diferentes componentes: extractivos, carbohidratos estructurales, lignina y cenizas.

En primer lugar, los extractivos se determinan mediante una doble extracción con agua y etanol. Por otro lado, el contenido en carbohidratos se establece mediante una correlación de los azúcares monoméricos obtenidos tras una hidrólisis con ácido sulfúrico en dos fases: la primera con ácido concentrado al 72% (30 min a 30 °C) y la segunda con ácido diluido al 4% (1 h a 121 °C). Tras la hidrólisis se determina la lignina ácido soluble por espectrofotometría a 205 nm y los azúcares monoméricos mediante HPLC (“*High-Performance Liquid Chromatography*”). Asumiendo que toda la glucosa procede de la celulosa mientras que la xilosa, arabinosa, manosa y galactosa proceden de la hemicelulosa se realizan los cálculos oportunos para establecer ambas fracciones. 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), de modo que se tenga en cuenta la molécula de agua que se desprende al formarse el enlace glucosídico.

Asimismo, el residuo sólido insoluble generado tras la hidrólisis ácida, se emplea para determinar la lignina y cenizas ácido insolubles mediante gravimetría y calcinación respectivamente. La Figura 3.3 muestra de forma esquemática los pasos seguidos durante el análisis de composición de los diferentes materiales.



**Figura 3.3.-** Esquema representativo de los métodos aplicados para el análisis de composición de los residuos sólidos de los materiales lignocelulósicos.

Junto al análisis de la fracción insoluble, en la fracción líquida obtenida tras la filtración del MPC se determinó la presencia de azúcares monoméricos y oligoméricos así como ciertos productos de degradación (ver apartado 3.8.3). En este contexto, los azúcares monoméricos se establecieron directamente por HPLC, mientras que tras una hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% (v/v) durante 30 min a 121 °C se determinó el contenido en azúcares totales. La diferencia entre las dos concentraciones de azúcares (totales y monoméricos) indica la concentración de azúcares en forma oligomérica.

### 3.9.2. Determinación de azúcares

Excepto en los casos establecidos para la determinación de alguna de las actividades enzimáticas, la concentración de los distintos azúcares fue analizada mediante HPLC. Los equipos usados fueron proporcionados por las compañías Waters (EE.UU.), Agilent Technologies (Alemania) y Dionex (EE.UU.), mientras que las columnas CarboSep CHO-682 (Transgenomic, EE.UU.) y Aminex HPX-87H (Biorad, EE.UU.) fueron empleadas para la separación e identificación de los distintos monómeros. En los casos en los que se utilizó la columna CarboSep CHO-682, la separación se llevó a cabo a 80 °C utilizando agua ultrapura desgasificada por ultrasonidos como fase móvil a una velocidad de elución de 0,5 mL/min. Por otro lado, en los casos en los que se utilizó la columna Aminex HPX-87H, la temperatura de

operación fue de 45 °C y como eluyente se empleó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM con un flujo de 0,6 mL/min.

Tras la separación, los azúcares se identificaron y cuantificaron mediante un detector de índice de refracción en relación a una curva con patrones estándar.

### 3.9.3. Determinación de productos de degradación

Algunos de los productos de degradación generados durante los diferentes pretratamientos de la paja de trigo fueron analizados cualitativa y cuantitativamente mediante HPLC. De esta manera, el furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico fueron analizados usando una columna Coregel 87H3 (Transgenomic, EE.UU.) o la columna Aminex HPX-87H. En ambos casos, la columna se mantuvo a 65 °C con una fase móvil de 89% de 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 11% de acetonitrilo y un flujo constante de 0,7 mL/min. La detección de los compuestos se llevó a cabo mediante un fotodiodo multicanal 1050 (Agilent Technologies, Alemania). En algunos casos, la detección del furfural y del 5-HMF se llevó a cabo con la columna Aminex HPX-87H a 45 °C con una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo constante de 0,6 mL/min.

Por otro lado, los ácidos acético y fórmico se determinaron empleando un detector de índice de refracción mediante la utilización de la columna Aminex HPX-87H a 65 °C con una fase móvil de 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y un flujo de elución de 0,6 mL/min.

Dado que los compuestos fenólicos están formados por un gran número de sustancias, la cantidad de fenoles totales también se analizó en diferentes etapas. La técnica empleada con este fin fue una versión modificada del método de Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927; Zhang y col., 2006). Para estos análisis, se usó una microplaca de 96 pocillos donde se mezclaron 20 µL de muestra (previamente diluida en consonancia a las concentraciones de los patrones estándar) con 88 µL de agua destilada y 12 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu. A continuación, la placa se incubó 5 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, tras lo cual se añadieron 80 µL de carbonato sódico al 7,5% para detener la reacción y favorecer a su vez la coloración de la muestra. Antes de la lectura, la placa se mantuvo durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad y finalmente se determinó la absorbancia a 765 nm con un lector de microplacas (Anthos Zenyth, Reino Unido).

#### 3.9.4. Determinación de etanol

Para la determinación de la producción de etanol se han empleado dos métodos cromatográficos diferentes. Por un lado, se utilizó el cromatógrafo de gases 7890<sup>a</sup> (Agilent Technologies, Alemania) equipado con un sistema de inyección automático Agilent 7683B y un detector de ionización de llama (FID). En este caso, para la separación de la muestra se empleó la columna Carbowax-20M operando a 85 °C y utilizando helio como gas transportador. Asimismo, el inyector y el detector se mantuvieron a una temperatura constante de 175 °C. Una vez analizadas las muestras, la determinación de la concentración de etanol se obtuvo en base a una curva con patrones estándar.

Por otro lado, la concentración de etanol también fue analizada en algunos casos mediante HPLC utilizando la columna Aminex HPX-87H en las condiciones establecidas anteriormente para la determinación de azúcares (45 °C y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a 0,6 mL/min).

#### 3.9.5. Determinación de la viabilidad celular

El seguimiento de la viabilidad celular de las muestras en las distintas estrategias de producción de etanol se llevó a cabo mediante el recuento en placa, representándose de esta manera la viabilidad como unidades formadoras de colonia por unidad de volumen (UFC/mL). Para el crecimiento de las colonias, las placas se rellenaron con el siguiente medio de cultivo: 20-30 g/L de glucosa, 20 g/L de agar, 5 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 0,3 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; y el recuento se llevó a cabo tras una incubación de 24-48 h a 30-42 °C, dependiendo del microorganismo fermentativo empleado.

### 3.10. Cálculo de rendimientos y productividades

El rendimiento de HE se determinó teniendo en cuenta el contenido total de azúcares en los sustratos empleados, es decir, los azúcares procedentes tanto de la fracción sólida como aquellos en forma soluble. Además, en los casos en los que se usó la mezcla Cellic, se tuvo en cuenta el contenido en glucosa que presentan estos cócteles. La ecuación [6] fue la utilizada para el cálculo de los rendimientos:



$$[6] \quad R_{HE}(\%) = \frac{\text{Azúcares liberados} \times 100}{\text{Azúcares totales}}$$

En cuanto al cálculo de los rendimientos para valorar la producción final de etanol en base al material de partida es la relación de gramos de etanol producido por gramos de azúcar presente en el medio. Este tipo de rendimiento puede calcularse teniendo en cuenta los azúcares potenciales (sólo glucosa o glucosa + xilosa dependiendo del microorganismo utilizado), o los azúcares medidos antes de la fermentación. En el caso de tenerse en cuenta todos los azúcares potenciales, la ecuación [7] se empleó para el cálculo de los rendimientos:

$$[7] \quad Y_{E/TS}(g/g) = \frac{\text{Etanol obtenido}}{\text{Azúcares Totales}}$$

Por otro lado, cuando se tuvo en cuenta sólo los azúcares medidos antes de la fermentación, se empleó la ecuación [8]:

$$[8] \quad Y_{E/S}(g/g) = \frac{\text{Etanol obtenido}}{\text{Azúcares Medidos}}$$

Los rendimientos anteriores se pueden comparar con el rendimiento teórico dando lugar a un porcentaje. Dado que el rendimiento estequiométrico de transformación de glucosa y xilosa es de 0,51 g/g respectivamente, los cálculos de porcentaje se realizaron mediante la fórmula [9]:

$$[9] \quad Y_{E/ET}(\%) = \frac{Y_{E/TS} \times 100}{0,51 \text{ g/g}}$$

En el caso de *K. marxianus* CECT 10875, el rendimiento máximo observado en condiciones óptimas de crecimiento se ha establecido en 0,45 g/g (Tomás-Pejó y col., 2009a), por lo que también se ha utilizado este dato para el cálculo de porcentaje según la ecuación [10]:

$$[10] \quad Y_{E/ET'}(\%) = \frac{Y_{E/TS} \times 100}{0,45 \text{ g/g}}$$

Desde un punto de vista industrial, uno de los datos más interesantes es el de productividad volumétrica, ya que establece una relación entre la producción de etanol y el tiempo empleado para obtener dichos niveles. En este contexto, la productividad volumétrica de etanol se determinó mediante la utilización de la siguiente ecuación:

$$[11] \quad Q_E(g/L \cdot h) = \frac{Etanol_{Obtenido}}{\Delta t}$$

En la ecuación anterior, el tiempo al cual se estableció la productividad dependió del momento donde se obtuvo la concentración máxima. Igualmente, en algunos casos el cálculo se determinó a un tiempo fijo concreto.



## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Materia prima

La composición química de la biomasa lignocelulósica es un factor muy importante en la elección del material para la producción de etanol. Con objeto de conocer la composición de la paja de trigo empleada como materia prima en este trabajo, se caracterizó siguiendo los protocolos desarrollados por el “National Renewable Energies Laboratory” (NREL, EE.UU.), descritos con detalle en Materiales y Métodos (apartado 3.9.1). Como se observa en la Tabla 4.1, la composición de paja de trigo mostró unos contenidos similares a los determinados en anteriores trabajos (Ballesteros y col., 2006; Pérez y col., 2007; Tomás-Pejó y col., 2008b). Las fracciones mayoritarias corresponden a la celulosa (40,5%) y hemicelulosa (26,1%), elevando el contenido total de carbohidratos hasta el 66,6% del peso seco. El azúcar mayoritario de la hemicelulosa de paja de trigo es el xilano (22,7%), como corresponde a la estructura de las herbáceas. El alto contenido en azúcares potencialmente fermentables hace que la paja de trigo sea un sustrato apropiado para la producción de etanol.

**Tabla 4.1.-** Composición de la paja de trigo empleada como materia prima

Componente	% (peso seco)
Celulosa	40,5
Hemicelulosa:	26,1
<i>Xilano</i>	22,7
<i>Arabinano</i>	2,1
<i>Galactano</i>	1,3
Lignina	18,1
Cenizas	5,1
Extractivos	14,6

La lignina representa el tercer componente mayoritario (18,1%). Este polímero se une mediante enlaces tipo éster a los sustituyentes presentes en la hemicelulosa a través del ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico que actúan como intermediarios (Buranov y Mazza, 2008). Asimismo, la compleja red que constituye la lignina de la paja de trigo está formada, aproximadamente, por un 5% de unidades *p*-hidroxifenilo, un 46% de unidades siringilo y un 49% de unidades guayacilo (Buranov y Mazza, 2008). Por otro lado, el conjunto de resinas, grasas, ceras, ácidos grasos, etc., que engloban los extractivos (14,6%), también representa un porcentaje considerable en la

paja de trigo. Por último, el elevado contenido en cenizas (5,1%) resulta un indicador claro del uso de fertilizantes durante el cultivo del cereal (Olanders y Steenari, 1995).

## 4.2. Pretratamiento por explosión por vapor

La primera etapa en un proceso de producción de etanol vía enzimática a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento de la materia prima. El objetivo es alterar la estructura de la fibra lignocelulósica, de tal forma que se facilite la accesibilidad de las enzimas a los carbohidratos contenidos en la biomasa. Debido a la compleja estructura de la lignocelulosa, la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a la celulosa es muy limitada. Por esta razón, la realización de una etapa de pretratamiento resulta fundamental para incrementar de forma sustancial la digestión de estos materiales (Ballesteros y col., 2006; Alvira y col., 2010). Entre las diferentes tecnologías existentes para llevar a cabo el pretratamiento, los métodos físico-químicos, entre los que se encuentra la EV, son los más comúnmente usados para la producción de bioetanol. Uno de los principales efectos del pretratamiento es la modificación de la estructura de la lignocelulosa, preferentemente de la lignina, lo que permite el incremento en la eficiencia de las enzimas para generar azúcares fermentables. En el caso del pretratamiento mediante EV, el efecto principal que se produce es la solubilización de la hemicelulosa y una redistribución y solubilización parcial de lignina, lo que permite el incremento de la digestibilidad de la lignocelulosa.

En el presente trabajo se ha utilizado el pretratamiento por explosión por vapor (EV) bajo diferentes condiciones de temperatura (200 °C, 210 °C y 220 °C). Durante este pretratamiento, la biomasa lignocelulósica se somete a altas presiones y temperaturas en presencia de vapor de agua saturado. En estas condiciones se produce la solubilización de los grupos acetilo de las hemicelulosas, lo que provoca un descenso del pH y activa un mecanismo de autohidrólisis de la hemicelulosa. Por otro lado, tras una despresurización brusca del reactor, el agua que ha quedado impregnada en las fibras sufre un cambio repentino de estado líquido a gaseoso, generando fuerzas de cizalla y desestructurando físicamente las uniones entre los distintos componentes de la biomasa.

Tras el pretratamiento se obtiene un material pretratado completo (MPC), que puede dividirse por filtración para separar el residuo sólido insoluble (RSI) y una

fracción líquida o prehidrolizado. Los componentes que conforman el RSI son principalmente las fracciones de celulosa y lignina y la parte no solubilizada de la hemicelulosa, mientras que el prehidrolizado contiene los azúcares solubilizados así como diferentes productos de degradación procedentes, mayoritariamente, de la hemicelulosa.

La eficiencia del pretratamiento está influida por diferentes factores como la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula o la humedad (Ballesteros y col., 2002). La temperatura y el tiempo de residencia a los que se realiza el pretratamiento definen su severidad ( $\text{Log}(R_0)$ ). Cuando el pretratamiento se realiza bajo condiciones más severas, es decir, a temperaturas y tiempos de residencia superiores, la biomasa experimenta cambios más significativos que conducen a una mayor desestructuración de las fibras, aumentando la solubilización de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina y, por tanto, facilitando la mayor accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a la fracción celulósica. Sin embargo, condiciones de severidad excesivamente altas también conducen a la formación de productos de degradación de los carbohidratos y la lignina, reduciendo el contenido de azúcares potencialmente fermentables. Además, los productos de degradación generados resultan ser compuestos inhibidores de las enzimas y los microorganismos fermentativos en las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a, 2000b).

Para establecer unas condiciones óptimas de pretratamiento, como se ha mencionado con anterioridad, se han de tener en cuenta diversos factores como la composición del RSI, los rendimientos de hidrólisis enzimática (HE) o la concentración de azúcares solubles y productos de degradación de la fracción líquida. En la presente Tesis se han evaluado tres temperaturas de pretratamiento: 200 °C (Materiales IV y V), 210 °C (Materiales I, II, III y VI) y 220 °C (Materiales VII y VIII). Por otro lado, el tiempo de residencia se mantuvo en 2,5 min en todos los casos, dando lugar a unos valores de severidad  $\text{Log}(R_0)$  (ecuación [3]) de 3,34 (200 °C; 2,5 min), 3,64 (210 °C; 2,5 min) y 3,93 (220 °C; 2,5 min). Previo a la utilización de los materiales pretratados (RSI o MPC) se determinó su composición y los resultados se indican en las Tablas 4.2 y 4.3.

Como se observa en la Tabla 4.2, tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo, los diferentes RSI obtenidos a 210 °C; 2,5 min y que se emplearon en los ensayos



de deslignificación (RSI I y II) y destoxificación (RSI III), mostraron un mayor contenido en las fracciones de celulosa y lignina en comparación a la paja de trigo sin pretratar. De esta forma, el contenido en celulosa incrementó desde un 40,5%, en la materia prima, hasta valores comprendidos entre el 51,1% y el 60,3%, mientras que el contenido en lignina aumentó del 18,1% al 30%. Estos resultados se obtuvieron como consecuencia de la solubilización parcial de la de hemicelulosa durante el pretratamiento, tal y como refleja la baja proporción de esta fracción (<10%).

**Tabla 4.2.-** Composición de la paja de trigo pretratada por explosión por vapor de la que el residuo sólido insoluble (RSI) fue empleado en estudios de deslignificación (I y II) y destoxificación (III)

	210 °C; 2,5 min		
	I	II	III
<b>RSI (% p/p):</b>			
<i>Celulosa</i>	60,3	56,8	51,1
<i>Hemicelulosa</i>	6,6	9,2	7,8
<i>Lignina</i>	30,0	29,2	30,5

Valores expresados como porcentajes respecto al RSI

Por otro lado, en la Tabla 4.3 se puede observar la composición de los materiales pretratados (MPC) obtenidos a diferentes temperaturas y que se utilizaron como sustrato en los ensayos de destoxificación. El contenido en sólidos totales de los MPC estuvo en el rango 21,6-33,2%, de los cuales, un 16,1-21,6% correspondían a sólidos insolubles (RSI). Analizando con más detalle esta última fracción, como ocurría en los sustratos descritos previamente, el contenido en celulosa incrementó desde un 40,5%, en la materia prima, hasta valores del 48,2% y el 66,6%, correspondiéndose respectivamente con los pretratamientos de menor (200 °C; 2,5 min) y mayor (220 °C; 2,5 min) severidad. Asimismo, en la fracción líquida o prehidrolizado se pudieron identificar diversos azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa) procedentes principalmente de la fracción hemicelulósica, de los cuales, la mayor concentración corresponde a la xilosa. La mayoría de estos azúcares se encontraron en forma oligomérica y, por lo general, el incremento de la severidad del pretratamiento produjo una reducción de los oligómeros y mayor presencia de azúcares monoméricos. También se pudieron identificar diversos compuestos solubles procedentes de la degradación, entre los que podemos señalar en forma mayoritaria el ácido acético, el ácido fórmico, el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). En menor cantidad (<0,01 g/L en la mayoría de los casos) también se identificaron varios compuestos de carácter fenólico

entre los que destacan el siringaldehído, la vainillina, el ácido ferúlico y el ácido  $p$ -cumárico.

**Tabla 4.3.-** Composición de la paja de trigo pretratada por explosión por vapor de la que el material pretratado completo (MPC) fue empleado en estudios de destoxificación

	200 °C; 2,5 min		210 °C; 2,5 min		220 °C; 2,5 min	
	IV	V	VI	VII	VIII	
<b>MPC (% p/p):</b>	<b>27,6</b>	<b>33,2</b>	<b>26,0</b>	<b>21,6</b>	<b>22,6</b>	
<i>RSI</i>	18,1	21,6	21,5	16,1	16,6	
<i>Sólidos solubles</i>	9,5	11,6	4,5	5,5	6,0	
<b>RSI (% p/p):</b>						
<i>Celulosa</i>	53,5	48,2	57,3	66,6	63,0	
<i>Hemicelulosa</i>	11,7	14,3	10,4	1,9	2,7	
<i>Lignina</i>	30,4	28,1	30	36,7	35,3	
<b>PREHIDROLIZADO: AZÚCARES (g/L)</b>						
	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>
<i>Glucosa</i>	2,3	12,4	1,7	11,6	1,0	3,7
<i>Xilosa</i>	2,8	29,2	2,2	28,6	2,6	23,6
<i>Arabinosa</i>	1,3	1,1	0,3	2,5	0,8	1,3
<i>Galactosa</i>	0,4	1,4	1,1	2,0	1,5	0,4
<i>Manosa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>
<i>Glucosa</i>	2,3	12,4	1,7	11,6	1,0	3,7
<i>Xilosa</i>	2,8	29,2	2,2	28,6	2,6	23,6
<i>Arabinosa</i>	1,3	1,1	0,3	2,5	0,8	1,3
<i>Galactosa</i>	0,4	1,4	1,1	2,0	1,5	0,4
<i>Manosa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>	<i>Monó.</i>	<i>Olig.</i>
<i>Glucosa</i>	2,3	12,4	1,7	11,6	1,0	3,7
<i>Xilosa</i>	2,8	29,2	2,2	28,6	2,6	23,6
<i>Arabinosa</i>	1,3	1,1	0,3	2,5	0,8	1,3
<i>Galactosa</i>	0,4	1,4	1,1	2,0	1,5	0,4
<i>Manosa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>PREHIDROLIZADO: PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN (g/L)</b>						
<i>Ácido fórmico</i>	6,3		7,0		7,8	
<i>Ácido acético</i>	6,9		6,6		5,6	
<i>5-HMF</i>	0,32		0,3		0,3	
<i>Furfural</i>	0,8		0,7		0,7	
<i>Vainillina</i>	0,04		0,04		0,04	
<i>Siringaldehído</i>	0,01		0,01		0,02	
<i>Ácido p-cumárico</i>	0,02		0,01		0,02	
<i>Ácido ferúlico</i>	0,03		n.d.		n.d.	

n.d., no determinado; RSI, residuo sólido insoluble

Dependiendo de la severidad del pretratamiento, la solubilización de la hemicelulosa y la formación de compuestos de degradación es diferente. De esta forma, a medida que se incrementa la severidad del pretratamiento, la solubilización de la hemicelulosa es mayor, pero a su vez, la concentración de los productos de degradación también aumenta (Tabla 4.3). Por otro lado, la naturaleza de los productos de degradación está en relación con el compuesto del que provienen. De este modo, el furfural y el 5-HMF derivan de la deshidratación de las pentosas y las hexosas, respectivamente. Además, estos compuestos pueden seguir degradándose y generar ácido fórmico. Por otro lado, la hidrólisis de los grupos acetilo presentes en la

hemicelulosa da lugar a la formación del ácido acético, mientras que los compuestos fenólicos se producen como consecuencia de la solubilización parcial de las diferentes unidades de la lignina (Oliva y col., 2003; Alvira y col., 2010). Dada la presencia de diversos compuestos ácidos, el pH de los diferentes prehidrolizados se situó en el rango de 3,5-3,9.

En general, los resultados obtenidos tras la caracterización del RSI y los MPC correspondientes a los diversos sustratos empleados en la presente Tesis son comparables a los rangos descritos en trabajos anteriores que utilizan paja de trigo pretratada por explosión por vapor (Tomás-Pejó y col., 2008b; 2009a; 2010; Gyalai-Korpos y col., 2011; Alvira y col., 2011).

### **4.3. Evaluación del tratamiento con lacasas y sistemas lacasa-mediador en la deslignificación de la paja de trigo pretratada**

Como se ha visto en el apartado anterior, la cantidad de lignina no se ve modificada durante el pretratamiento y las enzimas hidrolíticas pueden unirse de forma inespecífica a esta lignina, disminuyendo los rendimientos de sacarificación. La adsorción de las enzimas hidrolíticas a la lignina se piensa que es debida a las interacciones hidrofóbicas entre ambos componentes, aunque también podrían tener lugar algunas interacciones de tipo iónico (Jørgensen y col., 2007a). Asimismo, el grado de adsorción de una enzima es dependiente del origen botánico de la lignina y de la estructura de la enzima, por lo que cada enzima puede unirse a la lignina en una mayor o menor proporción. El pretratamiento de la biomasa también puede influir en que las enzimas queden unidas de forma improductiva al polímero de lignina. En este sentido, Rahikainen y col. (2013) han establecido recientemente que el pretratamiento mediante EV altera la estructura de la lignina, incrementando la adsorción de las enzimas hidrolíticas a este componente lignocelulósico y contrarrestando el efecto positivo en la mejora de la accesibilidad de los polisacáridos. Este fenómeno podría tener lugar debido a que el pretratamiento por EV favorece la condensación de la lignina y provoca la pérdida de los grupos hidroxilos y carboxilos, aumentando así la hidrofobicidad de este polímero.

Teniendo en cuenta lo anterior, una etapa de deslignificación previa a los procesos de HE podría mejorar la recuperación de azúcares fermentables,

incrementando de esta manera la producción final de etanol. Existen diversas alternativas para la deslignificación de los materiales lignocelulósicos, de las cuales, la deslignificación enzimática es una opción prometedora (Palonen y Viikari, 2004; Lu y col., 2010; Camarero y col., 2007; Ibarra y col., 2006b). Entre las diferentes enzimas ligninolíticas, las lacasas y los sistemas lacasa-mediador (SLM) han sido usados de forma eficaz en la industria papelera como agentes deslignificantes para la sustitución de los compuestos clorados empleados durante el blanqueo de las pastas de papel (Ibarra y col., 2006a).

Las lacasas son enzimas multicobre que catalizan la oxidación de fenoles sustituidos, anilinas y tioles aromáticos a sus correspondientes radicales con la consiguiente reducción del oxígeno molecular a agua (Mayer y Staples, 2002; Parawira y Tekere, 2011). El interés en el uso de las lacasas se incrementó tras el descubrimiento del efecto que algunos compuestos sintéticos de bajo peso molecular (mediadores) ejercían en la acción de estas enzimas, permitiendo su actuación frente a los residuos no fenólicos de la lignina (Paice y col., 1995). El mecanismo de actuación de los SLM se centra en un ciclo de oxidación/reducción. En primer lugar, la enzima produce la oxidación del mediador, generando radicales inestables que actúan como intermediarios redox. De esta manera, tras interaccionar con el sustrato diana (compuestos sobre los cuales la lacasa no puede actuar de forma directa), el mediador recupera su estado inicial reducido provocando la oxidación de dicho compuesto. Desde la descripción del primer mediador, el ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS), hasta el uso reciente de mediadores sintéticos del tipo  $-NOH^+$ , como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el ácido violúrico (VIO) o el N-hidroxiacetanilida (NHA), se han producido un gran número de estudios para evaluar el mecanismo de oxidación de los residuos no fenólicos (Camarero et al., 2005; Ibarra et al., 2006a).

En la presente Tesis, la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* se utilizó por sí sola o en combinación con los mediadores ABTS, HBT y VIO para su evaluación como agentes deslignificantes del RSI obtenido tras el pretratamiento mediante EV de la paja de trigo. Asimismo, también se evaluó un proceso de extracción alcalina como etapa posterior al tratamiento con lacasa para estudiar un posible efecto sinérgico que potencie la acción deslignificadora.

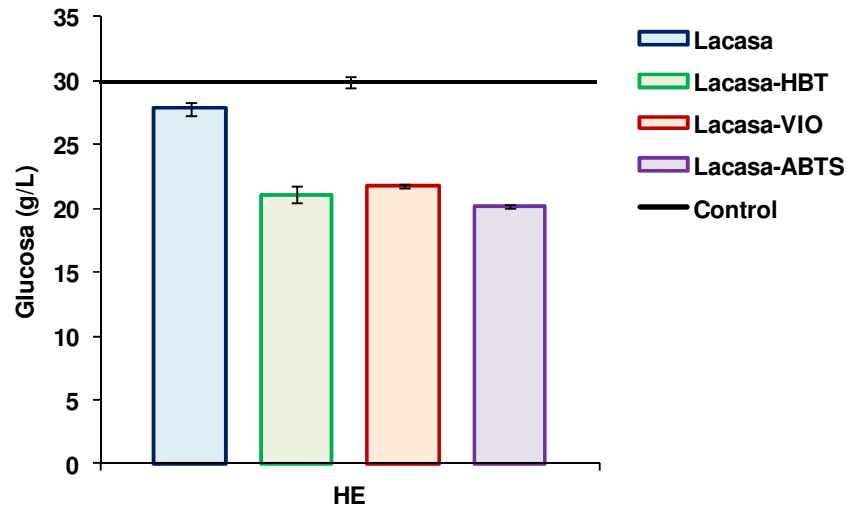
#### 4.3.1. Efecto del tratamiento con lacasa y SLM en la hidrólisis enzimática

Teniendo en cuenta que el principal objetivo para la realización de una etapa de deslignificación se centraba en poder aumentar el contenido de los azúcares fermentables obtenidos durante el proceso de sacarificación, los tratamientos con lacasa y SLM se evaluaron en primer lugar en función de la concentración de glucosa liberada tras una hidrólisis de 72 h. Dichos tratamientos se llevaron a cabo junto los procesos de hidrólisis bajo dos configuraciones. En una primera aproximación, el tratamiento con lacasa o SLM y la etapa de HE se realizaron de forma consecutiva, mientras que en un segundo conjunto de ensayos los procesos de deslignificación y sacarificación se llevaron a cabo de manera secuencial, efectuando un paso de filtración y lavado entre ambas etapas.

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron las fracciones correspondientes al RSI de los materiales pretratados I y II (210 °C; 2,5 min). Asimismo, la mezcla hidrolítica estándar se empleó para llevar a cabo la sacarificación tanto de las muestras control como de las muestras tratadas con lacasa o los SLM.

En aquellos casos donde los procesos de deslignificación enzimática y sacarificación se realizaron de forma consecutiva, los tratamientos con lacasa/SLM se llevaron a cabo durante 3 h bajo las condiciones descritas en los Materiales y Métodos (apartado 3.8.1). A continuación, las muestras se suplementaron con la mezcla hidrolítica estándar para comenzar con los procesos de HE. En todos los casos, los ensayos se realizaron utilizando el RSI I al 5% (p/v) de consistencia como sustrato.

Como se observa en la Figura 4.1, el tratamiento con lacasa/SLM produjo una disminución en la recuperación de glucosa en comparación a las muestras control. Asimismo, también se pudo observar una diferencia significativa entre el tratamiento con lacasa y los SLM.



**Figura 4.1.-** Concentración de glucosa liberada tras 72 h de hidrólisis enzimática (HE) de las muestras tratadas y sin tratar (control) del RSI I (210 °C; 2,5 min) al 5% (p/v) de consistencia. En estos ensayos, el tratamiento con lacasa o SLM y la etapa de HE se realizaron de forma consecutiva.

Diferentes mecanismos han sido descritos para explicar el efecto negativo de la lacasa o SLM en los rendimientos de hidrólisis enzimática:

- *Inhibición o desactivación de las enzimas hidrolíticas:*

Tras el tratamiento con lacasa, los productos y subproductos derivados de la acción fenoloxidasasa podrían ser inhibidores de las actividades presentes en la preparación celulolítica (Tabka y col., 2006; Jurado y col., 2009; Tejirián y Xu, 2011). De esta forma, la actividad lacasa podría estar liberando algún compuesto presente en el RSI de la paja de trigo que podría provocar una inhibición o desactivación de las celulasas (Tabka y col., 2006; Jurado y col., 2009). En este sentido, Tejirian y Xu (2011) observaron que los fenoles en forma oligomérica formados tras el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos pueden ejercer un mayor efecto inhibitorio sobre la hidrólisis enzimática en comparación a los fenoles en forma monomérica. En este contexto, dado que el mecanismo de acción de la lacasa implica la generación de radicales que pueden reaccionar entre sí, la formación de polímeros fenólicos podría ejercer un mayor poder inhibitorio sobre la acción de las enzimas hidrolíticas.

Asimismo, este mecanismo de inhibición puede explicar las menores concentraciones de glucosa obtenidas en las muestras tratadas con los SLM. [Palonen y Viikari \(2004\)](#) observaron que el mediador NHA, tras ser oxidado por la lacasa, ejercía una acción inhibitoria sobre las celulasas y hemicelulasas presentes en las preparaciones hidrolíticas. De esta forma, al realizar el proceso de hidrólisis de forma consecutiva al tratamiento con los SLM, la presencia de derivados oxidados tanto del ABTS, HBT o VIO, podrían ejercer de inhibidores de las celulasas, disminuyendo los rendimientos de hidrólisis.

- *Cambio de las propiedades superficiales de la fibra:*

Dado que las lacasas pertenecen al grupo de las denominadas enzimas ligninolíticas, además de poder actuar sobre los fenoles solubles, estas enzimas son capaces de llevar a cabo reacciones sobre los residuos fenólicos del polímero de lignina. Asimismo, en combinación con los mediadores, las lacasas pueden potenciar su acción de manera que los SLM pueden actuar a la vez sobre los residuos fenólicos y los no fenólicos de la lignina. En este contexto, las reacciones derivadas del tratamiento con lacasa podrían provocar cambios en las propiedades físico-químicas de la superficie de la lignina, alterando la concentración de las enzimas hidrolíticas que quedan unidas al material de forma inespecífica ([Palonen y Viikari, 2004](#); [Moilanen y col., 2011](#)). Dado que la lignina presenta una gran variabilidad entre los materiales lignocelulósicos, el tratamiento con lacasa ha mostrado resultados contradictorios en este punto. [Palonen y Viikari \(2004\)](#) mostraron que el tratamiento de píceas pretratadas por EV con la lacasa de *Trametes hirsuta* incrementaba los grupos carboxilos de la lignina, reduciendo su hidrofobicidad y aumentando la carga superficial. Como consecuencia, las uniones improductivas de las celulasas a la lignina disminuyeron, mejorando los rendimientos de HE. En el mismo sentido, [Moilanen y col. \(2011\)](#) obtuvieron unos resultados similares tras tratar píceas pretratadas por EV con la lacasa de *Cerrena unicolor*. Sin embargo, con la misma lacasa pero utilizando como sustrato caña pretratada por EV, estos autores observaron que el tratamiento con lacasa aumentaba las uniones improductivas de las celulasas, restringiendo la sacarificación de este material. Teniendo en

cuenta estos datos y dado que la estructura química de la lignina de la paja de trigo se asemeja más a la caña que a la píceca, el tratamiento con la lacasa de *P. cinnabarinus* y los SLM podrían estar incrementando las uniones inespecíficas de las celulasas a la lignina de la paja de trigo pretratada, reduciendo así los rendimientos de sacarificación.

- *Fortalecimiento de las uniones lignina-carbohidrato:*

Otro aspecto que podría tener lugar durante el tratamiento con lacasa es el fortalecimiento de las uniones relativas a los complejos lignina-carbohidrato. En este sentido, Moilanen y col. (2011) observaron que las muestras de caña pretratada por EV y sometidas a un tratamiento con la lacasa de *C. unicolor* presentaban un mayor contenido de glucano residual tras un proceso de HE, sugiriendo que los carbohidratos presentes en las muestras tratadas están unidos con una fortaleza mayor y son menos accesibles a la degradación enzimática.

Para descartar posibles interacciones de las lacasas con las enzimas hidrolíticas y confirmar la acción inhibitoria de los compuestos mediadores, se llevó a cabo un ensayo donde se determinó la actividad residual en papel de filtro de las preparaciones enzimáticas que componen la mezcla hidrolítica estándar en presencia de lacasa y de lacasa-HBT. Los resultados relativos a este ensayo se indican en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4.-** Medida de la actividad residual de las preparaciones NS 50013 y NS 50010 en presencia de concentraciones creciente de lacasa y lacasa-HBT.

Lacasa (U/mL)	HBT (mM)	Actividad residual NS 50013 (% UPF)	Actividad residual NS 50010 (% UI)
0	0	100	100
0,5	0	100	99
1	0	98	95
2	0	99	93
0,5	5,5	66	49

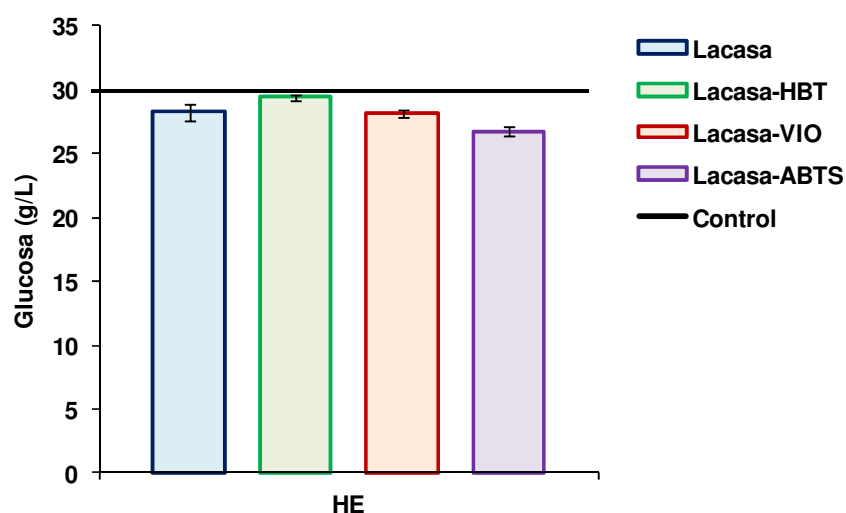
Actividad residual calculada en base al resultado obtenido sin la adición de lacasa o lacasa-HBT

Como se puede observar, en el caso de la preparación NS 50013, independientemente a la concentración de lacasa, la actividad residual fue cercana al 100% de la establecida en los ensayos que no habían sido suplementados con esta enzima. Sin embargo, al emplear el sistema lacasa-HBT, la actividad enzimática residual descendió hasta valores del 66%, corroborando el poder inhibitorio de los SLM



sobre las celulasas. Por otro lado, los ensayos donde se empleó la preparación NS 50010 establecieron un ligero descenso de la actividad residual a medida que la concentración de lacasa aumentó de 0,5 a 2 U/mL, sugiriendo un posible efecto de la lacasa sobre la actividad  $\beta$ -glucosidasa. Asimismo, al igual que ocurría con la preparación NS 50013, el uso del sistema lacasa-HBT también disminuyó la actividad residual de la preparación NS 50010 hasta un valor del 49%.

Los procesos de deslignificación y de hidrólisis enzimática también se llevaron a cabo de forma secuencial, efectuando un paso de filtración y lavado entre ambas etapas. En este caso, el sustrato empleado fue también el RSI I diluido al 5% (p/v) y, al igual que en el caso anterior, el tratamiento con la lacasa de *P. cinnabarinus* y los SLM se realizaron durante 3 h bajo condiciones óptimas. A continuación, el material tratado fue filtrado y lavado hasta no observar color y diluido de nuevo al 5% (p/v) de consistencia con tampón citrato. Posteriormente, se añadió la mezcla hidrolítica estándar y el proceso de sacarificación se prolongó durante otras 72 h. Los resultados obtenidos bajo configuración secuencial se indican en la Figura 4.2.



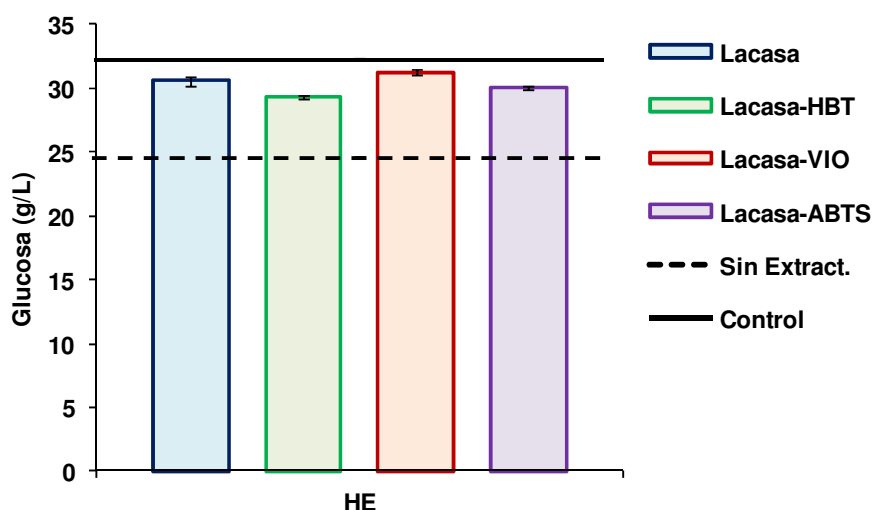
**Figura 4.2.-** Concentración de glucosa liberada tras 72 h de hidrólisis enzimática (HE) de las muestras tratadas y sin tratar (control) del RSI I (210 °C; 2,5 min) al 5% (p/v) de consistencia. En estos ensayos, el tratamiento con lacasa o SLM y la etapa de HE se realizaron de forma secuencial.

Como se observa, al igual que ocurría con los tratamientos en forma consecutiva, las muestras tratadas con lacasa o los SLM presentaron una menor recuperación de glucosa respecto a las muestras control. Por otro lado, cabe mencionar

que con la estrategia secuencial el mediador se elimina en su gran mayoría tras los procesos de filtración y lavado, evitando el mayor descenso en la concentración de glucosa observada con los SLM en la estrategia consecutiva (Figura 4.1).

Para intentar obtener alguna mejora de los tratamientos con lacasa o los SLM en los procesos de sacarificación, se propuso llevar a cabo una extracción con NaOH al 1,5% (p/p) (respecto al peso seco de la muestra) como etapa posterior al tratamiento con lacasa/SLM (Gutierrez y col., 2012). Para estos ensayos, el sustrato empleado fue el RSI II al 5% (p/v) de consistencia y tras cada etapa (tratamiento con lacasa/SLM y posterior extracción alcalina) se efectuó un paso de filtración y lavado con agua destilada.

Como se puede visualizar en las muestras control de la Figura 4.3, la extracción alcalina incrementó la recuperación de glucosa de 24,6 a 32,3 g/L con respecto a las muestras sin extraer.



**Figura 4.3.-** Concentración de glucosa liberada tras 72 h de hidrólisis enzimática (HE) de las muestras tratadas y sin tratar (control) y extraídas con álcali del RSI II (210 °C; 2,5 min) al 5% (p/v) de consistencia. En estos ensayos, el tratamiento con lacasa o SLM, la extracción con NaOH y la etapa de HE se realizaron de forma secuencial. Asimismo, también se indica como referencia el valor medio correspondiente a las muestras sin tratamiento con lacasa y sin extracción (Sin Extract.).

Del mismo modo, las muestras que habían sido tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus* o los SLM y posteriormente extraídas con NaOH, también mostraron un incremento en la recuperación de glucosa (29,3-31,2 g/L) respecto a las muestras sin

extraer. Por el contrario, la concentración de glucosa nunca fue superior a la concentración alcanzada con las muestras control que habían sufrido sólo el proceso de extracción. En este sentido se puede decir que, bajo las condiciones ensayadas, la combinación del tratamiento lacasa/SLM con la extracción alcalina no presentó ningún efecto sinérgico en la paja de trigo pretratada por EV.

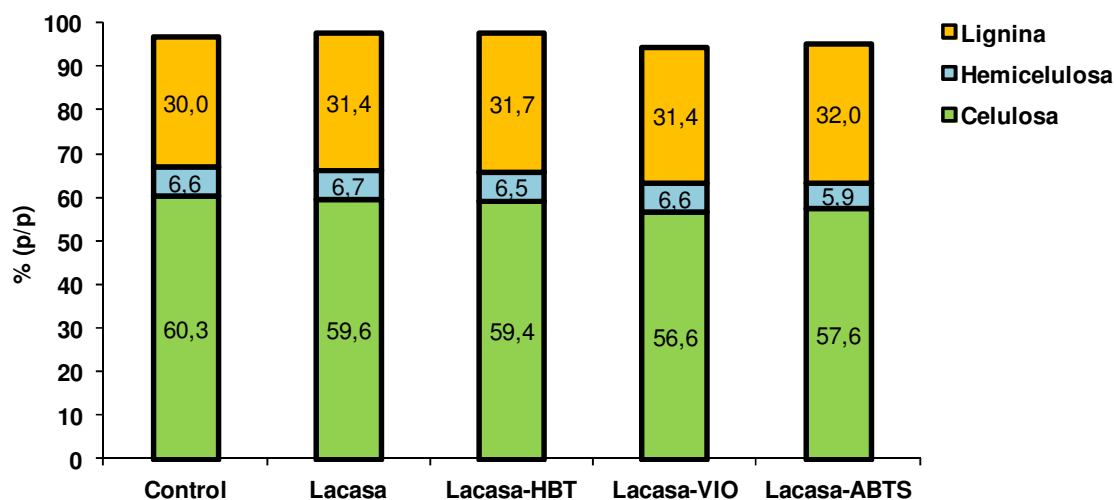
A la vista de los resultados obtenidos en la presente Tesis así como los descritos en otros trabajos, los efectos contradictorios que producen las lacasas/SLM sobre la hidrólisis enzimática parecen tener el mismo origen: las uniones inespecíficas de las enzimas hidrolíticas. De esta manera, en los casos en los que se mejoró la sacarificación, el tratamiento con lacasa/SLM produjo una disminución de las uniones inespecíficas, mientras que en los casos en los que los rendimientos de HE fueron menores se produjo el efecto contrario (Palonen y Viikari, 2004; Moilanen y col., 2011). Por otro lado, además de la dependencia en el material a tratar, también parece haber una correlación en la lacasa utilizada. En este contexto, al contrario de lo expuesto anteriormente para las plantas herbáceas, el tratamiento de la paja de trigo pretratada mediante EV con la lacasa de *Sclerotium* sp., produjo un efecto positivo en la sacarificación del material al facilitar el acceso de las enzimas hidrolíticas mediante el incremento del número de microporos (Qiu y Chen, 2012).

#### *4.3.2. Efecto del tratamiento con lacasa y SLM en la composición de los materiales pretratados*

A pesar de no observar ninguna mejora en la recuperación de azúcares, el tratamiento con lacasa y los SLM también se evaluaron en función de la composición química de los materiales pretratados. De esta forma, los materiales procedentes del tratamiento con lacasa (RSI I) y posterior extracción con NaOH (RSI II) se caracterizaron tras un proceso de filtración y lavado según los métodos desarrollados por el “National Renewable Energies Laboratory” (NREL, EE.UU.), descritos con detalle en Materiales y Métodos (apartado 3.9.1).

Como se observa en la Figura 4.4, los porcentajes respecto al peso seco de los distintos componentes de las muestras tratadas con lacasa/SLM mostraron un ligero descenso de los valores de celulosa (alrededor de un 2%). A su vez, el porcentaje de

lignina aumentó levemente de forma equivalente. Respecto al porcentaje de hemicelulosa, los valores permanecieron en rangos similares a las muestras control.

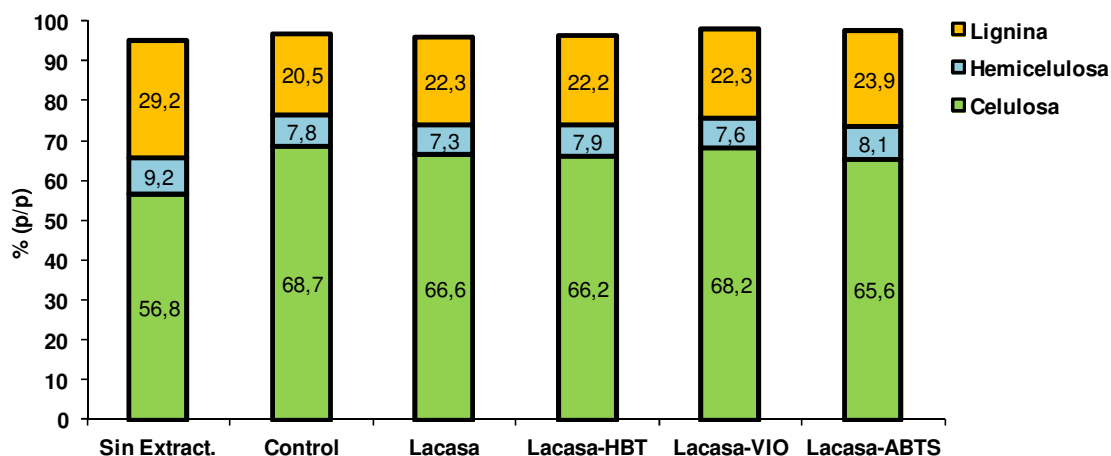


**Figura 4.4.-** Composición de las muestras sin tratar (control) o tratadas con lacasa/SLM del RSII (210 °C; 2,5 min).

El ligero incremento en el porcentaje de la fracción de lignina podría sugerir una repolimerización de los compuestos fenólicos solubles que quedan embebidos en los materiales pretratados incluso después de una etapa de filtración y lavado (García-Aparicio y col., 2006). En este contexto, la lacasa y los SLM podrían estar oxidando dichos compuestos fenólicos para formar sus correspondientes radicales que, a su vez, pueden reaccionar con las fibras y aumentar el porcentaje de lignina residual. Estos resultados refuerzan la hipótesis relativa al incremento de las uniones improductivas de las celulasas, ya que al incrementar el porcentaje de lignina de las muestras hay una mayor probabilidad de que las celulasas queden unidas de forma inespecífica a la lignina, anulando en una mayor parte la actividad hidrolítica.

En cuanto al segundo conjunto de ensayos, la Figura 4.5 muestra que tras la extracción alcalina el porcentaje de lignina de las muestras control disminuyó desde un 29,2% hasta un 20,5%. Estos resultados implican que el proceso de extracción alcalina es capaz de eliminar parte de la lignina residual de la paja de trigo pretratada por EV, corroborando el efecto negativo que supone su presencia en la HE. Asimismo, el porcentaje de hemicelulosa disminuyó ligeramente desde el 9,2% al 7,8%, mientras que el contenido en celulosa se incrementó notablemente del 56,8% al 68,7%.

En comparación a las muestras control extraídas, al igual que ocurría en los ensayos donde no tuvo lugar la extracción alcalina, tras el tratamiento con lacasa/SLM y la posterior extracción con NaOH el porcentaje en lignina fue algo superior. Mientras tanto el contenido en hemicelulosa permaneció constante y el de celulosa disminuyó ligeramente.



**Figura 4.5.-** Composición de las muestras sin tratar (control) o tratadas con lacasa/SLM y extraídas con NaOH del RSI II (210 °C; 2,5 min). Asimismo, también se indica como referencia el valor medio correspondiente a las muestras sin tratamiento con lacasa y sin extracción alcalina (Sin Extract.).

En base a los resultados obtenidos, se puede establecer que bajo estas condiciones de ensayo, el tratamiento con la lacasa de *P. cinnabarinus* o los SLM no produjeron ningún efecto deslignificador de la paja de trigo pretratada por EV.

#### 4.4. Evaluación del tratamiento con lacasas en la producción de etanol a partir del MPC de paja de trigo

Además de los procesos de deslignificación, otra de las posibilidades de aplicación de las lacasas en la producción de bioetanol es la destoxificación de los compuestos inhibidores presentes en los materiales pretratados. Actualmente, la obtención de una mayor concentración de producto, la integración eficiente de las distintas etapas y la mejora en la economía del agua, son los principales retos que deben superarse para lograr una producción rentable de bioetanol a nivel industrial. En este contexto, el uso del MPC obtenido tras el pretratamiento mediante EV es considerado una de las alternativas más adecuadas para la consecución de estos objetivos. Mediante la utilización del MPC se puede evitar la necesidad de utilizar equipamiento adicional, como los sistemas de filtración y lavado, reduciendo asimismo el gasto en agua potable y la producción de aguas residuales. Además, la concentración de azúcares fermentables durante el proceso es mayor, ya que los azúcares solubles presentes en el MPC no se pierden y pueden ser transformados en etanol durante la etapa de fermentación. Sin embargo, el principal inconveniente en el uso del MPC deriva de la presencia de los diferentes compuestos de degradación generados durante el pretratamiento y que actúan como inhibidores de las enzimas hidrolíticas y de los microorganismos fermentadores en las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a, 2000b; Klinke y col., 2004; Panagiotou y Olsson, 2007).

Entre los diversos métodos de destoxificación desarrollados para superar los efectos inhibitorios de los compuestos generados tras el pretratamiento por EV, los tratamientos *in situ* con lacasas representan una opción muy conveniente. Estos procesos se llevan a cabo bajo unas condiciones de reacción suaves, por lo que requieren poca energía y generan pocos subproductos derivados (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a, 2000b). Además, el tratamiento *in situ* con lacasa se lleva a cabo en el mismo recipiente que la HE y/o la fermentación, por lo que no es necesario el empleo de equipamiento adicional.

#### 4.4.1. Diferentes estrategias de destoxificación con lacasas durante el proceso de producción de etanol con la cepa termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 (Artículo II)

A pesar de que las lacasas han sido previamente utilizadas en los procesos de producción de etanol como etapa de destoxificación, sus aplicaciones se han llevado a cabo principalmente en prehidrolizados (fracción líquida) o hidrolizados (resultante de hidrólisis enzimática o ácida), por lo que hay pocos estudios realizados sobre la destoxificación del MPC. En este contexto, se propuso tratar el MPC obtenido tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo con las lacasas de *P. cinnabarinus* y *Trametes villosa*, evaluando la eficiencia del tratamiento tanto a nivel de sacarificación como a nivel de fermentación. Asimismo, también se llevó a cabo una identificación y cuantificación de los diferentes inhibidores con el fin de establecer sobre qué grupos son capaces de actuar las lacasas.

En este estudio, el MPC VII (220 °C; 2,5 min) se escogió como sustrato, ya que las condiciones de pretratamiento a las que se obtuvo se correspondían con una severidad alta y la concentración de productos inhibidores era mayor. Respecto a los tratamientos con lacasa, éstos se llevaron a cabo bajo diferentes estrategias y con concentraciones crecientes del MPC. De este modo, en la estrategia 1 (Est. 1) el tratamiento con lacasa se realizó durante 3 h como etapa previa al proceso de hidrólisis y con una carga de sólidos totales (ST) del 5%, 6% y 7% (p/v). Por otro lado, en la estrategia 2 (Est. 2) el tratamiento con lacasa (3 h) se llevó a cabo tras un proceso de sacarificación de 72 h a las mismas consistencias de sustrato mencionadas. En ambos casos las muestras control se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones en ausencia de lacasa. Independientemente de la estrategia utilizada, los procesos de sacarificación de las muestras se realizaron con la mezcla hidrolítica estándar.

De forma preliminar a la realización de los procesos de hidrólisis y fermentación, el efecto de ambas lacasas se evaluó en relación a su actuación frente a los distintos compuestos inhibidores y los resultados obtenidos se indican en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.-** Compuestos inhibidores presentes en las muestras control y en las tratadas con lacasa del MPC VII (220 °C; 2,5 min) al 5% ST (p/v)

Inhibidores	MPC 5% ST (p/v)		
	C	PC	TV
Furfural	427	395	395
5-HMF	158	125	124
Ácido acético	2024	1852	1830
Ácido fórmico	1508	n.d.	1309
Vainillina	21	9	6
Siringaldehído	10	0	0
Ácido $p$ -cumárico	17	0	0
Ácido ferúlico	26	0	0

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

n.d., no determinado; C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; TV, muestras tratadas con la lacasa de *T. villosa*.

En comparación a las muestras control, los resultados mostraron que el tratamiento con lacasa reduce de forma significativa el contenido en fenoles solubles (reducción entre el 88% y el 92%), mientras que la concentración relativa a los ácidos alifáticos y a los derivados del furano permanece constante. Esta especificidad de sustrato ya ha sido descrita por otros autores y es una de las características diferenciales del tratamiento con lacasa respecto a otros métodos de destoxificación (Wilson y col. 1989; Larsson y col., 1999; Martín y col. 2002; Chandel y col., 2007). Por ejemplo, el tratamiento mediante resinas cromatográficas de intercambio aniónico a pH 10 fue capaz de disminuir más del 80% de los fenoles totales, un 100% de los ácidos alifáticos y un 70% de los derivados del furano presentes en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de píceas por EV (Larsson y col., 1999). En este mismo estudio, el uso de “overliming” (tratamiento con Ca(OH)<sub>2</sub>) o de NaOH redujo un 20% los derivados del furano y los fenoles totales, mientras que los ácidos alifáticos no se vieron afectados por el tratamiento. Asimismo, Palmqvist y col. (1997) demostraron la capacidad de *Trichoderma reesei* para eliminar el ácido acético, el furfural y el ácido benzoico presentes en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de sauce por EV.

El mecanismo mediante el cual las lacasas ejercen la función de destoxificación es la polimerización oxidativa. Tras la oxidación de los compuestos fenólicos por parte de las lacasas se generan los denominados radicales fenoxilos, los cuales, debido a su gran inestabilidad pueden reaccionar entre sí, desencadenando un mecanismo de polimerización que da lugar a la formación de compuestos aromáticos que son menos tóxicos para el microorganismo (Jönsson y col., 1998; Jurado y col., 2009). Entre los



compuestos fenólicos identificados en el MPC de la paja de trigo (Tabla 4.5), la vainillina fue menos susceptible a la oxidación de la lacasa debido a su mayor potencial redox (Camarero y col., 2005). El efecto donador de electrones relativo a los sustituyentes metoxilos del anillo bencénico permite la disminución del potencial redox de los compuestos sustituidos, favoreciendo la actuación de la actividad lacasa. En este sentido, la vainillina, que presenta un único sustituyente metoxilo, es oxidada en tasas menores a como lo hace el siringaldehído con dos grupos metoxilos como sustituyentes. Además, las lacasas son más activas frente a los ácidos  $\rho$ -hidroxicinámicos en comparación a los fenoles simples, lo que explica a su vez la eliminación completa del ácido ferúlico y el ácido  $\rho$ -cumárico. En este caso, la mejor reactividad de las lacasas se debe a la presencia de dobles enlaces conjugados en las cadenas laterales de estos compuestos, lo que facilita la sustracción de electrones (Camarero y col., 2008).

#### 4.4.1.1. Efecto del tratamiento con lacasa en la hidrólisis enzimática

Un aspecto importante durante la producción de etanol es la consistencia del sustrato. Al incrementar la consistencia, la concentración de azúcares presentes en el medio tras la etapa de HE es mayor, lo que a su vez puede aumentar la producción de etanol durante la fermentación. Además, esta estrategia permite reducir los costes operacionales de la hidrólisis y la fermentación y minimizar el consumo de energía en las etapas posteriores de destilación y evaporación, haciendo factible la producción de etanol lignocelulósico desde un punto de vista económico (Banerjee y col., 2009). En este contexto, las muestras sometidas a ambas estrategias de destoxificación se analizaron de forma previa a la inoculación del microorganismo en cuanto a la concentración de glucosa y a la presencia de diferentes tóxicos, resultados que se indican en las Tablas 4.6 y 4.7, respectivamente. Como era de esperar, en el caso de los controles la concentración de glucosa se incrementó en función de la consistencia del sustrato (Tabla 4.6), por lo que la mayor concentración (32.2 g/L y 31.9 g/L) se alcanzó con las muestras al 7% ST (p/v).

**Tabla 4.6.-** Resumen relativo a los ensayos de hidrólisis y fermentación (*K. marxianus* CECT 10875) de las muestras control y tratadas con lacasa del MPC VII (220 °C; 2,5 min) bajo diferentes estrategias: Est. 1 (tratamiento con lacasa previo a sacarificación); Est. 2 (tratamiento con lacasa posterior a sacarificación).

	Consistencia de sustrato (p/v)	Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Glu (g/L)	Y <sub>E/S</sub> (g/g)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
Est. 1	5%	C	8,1	22,6	0,36	0,47 <sup>□</sup>
		PC	8,0	21,4	0,37	0,89 <sup>□</sup>
		TV	8,1	21,5	0,38	0,89 <sup>□</sup>
	6%	C	8,8	27,0	0,32	0,13 <sup>†</sup>
		PC	8,9	23,4	0,38	0,71 <sup>†</sup>
		TV	9,5	25,8	0,37	0,77 <sup>†</sup>
	7%	C	1,3	32,3	0,04	0,05 <sup>‡</sup>
		PC	9,8	26,6	0,37	0,40 <sup>‡</sup>
		TV	10,8	30,4	0,36	0,45 <sup>‡</sup>
Est. 2	5%	C	8,1	22,4	0,36	0,16 <sup>†</sup>
		PC	8,3	22,8	0,37	0,69 <sup>†</sup>
		TV	8,5	22,5	0,38	0,45 <sup>†</sup>
	6%	C	8,2	27,5	0,30	0,05 <sup>‡</sup>
		PC	9,5	27,4	0,35	0,40 <sup>‡</sup>
		TV	9,5	27,4	0,35	0,39 <sup>‡</sup>
	7%	C	0,8	31,9	0,03	0,02 <sup>§</sup>
		PC	10,4	31,7	0,33	0,22 <sup>§</sup>
		TV	10,9	30,9	0,35	0,23 <sup>§</sup>
RSI <sup>a</sup>	5,2%		10,7	29,2	0,36	1,69 <sup>*</sup>

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; TV, muestras tratadas con la lacasa de *T. villosa*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Glu, glucosa liberada tras 72 h de HE; Y<sub>E/S</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa liberada tras 72 h de HE; Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada en base al tiempo donde la concentración de etanol fue máxima: 6 h (\*), 9 h (□), 12 h (†), 24 h (‡) y 48 h (§).

<sup>a</sup>La muestra de RSI al 5,2% (p/v) de consistencia equivale a un 7% ST (p/v) del MPC, según la composición del material empleado.

Por otro lado, tras incrementar la consistencia del sustrato también se observó un aumento en la concentración de los productos de degradación (Tabla 4.7). Estos compuestos no sólo están presentes en la fracción líquida, sino que incluso pueden quedar atrapados en la biomasa pretratada y liberarse durante el proceso de HE (García-Aparicio y col., 2006; Gurram y col., 2011). Este incremento en la concentración de los productos de degradación puede resultar en un mayor efecto de inhibición de la HE. Entre los diferentes compuestos identificados en estos ensayos, los compuestos fenólicos han sido relacionados con una disminución de las tasas y los rendimientos de la hidrólisis de la celulosa (Ximenes y col., 2010, 2011). De esta forma, la vainillina y el siringaldehído pueden inhibir las enzimas hidrolíticas, especialmente la  $\beta$ -glucosidasa, mientras que el ácido ferúlico y el ácido  $\rho$ -cumárico las pueden desactivar. Por otro lado, el resto de compuestos identificados así como la acumulación de los azúcares

liberados durante el proceso, también han mostrado ser inhibidores de las celulasas (García-Aparicio y col., 2006; Panagiotou y Olsson, 2007). Sin embargo, a pesar de los efectos mencionados, el incremento en la concentración de los compuestos de degradación tras aumentar la consistencia del sustrato no afectó en gran medida los rendimientos de hidrólisis, observándose unos rendimientos del 81% y del 79% en las muestras al 5% y al 7% ST (p/v), respectivamente.

En relación a las muestras tratadas con lacasa, tras el proceso de destoxificación el contenido de los fenoles identificados se redujo de forma drástica, alcanzando la mayor reducción (93-94%) con la Est. 1 (Tabla 4.7). Por otro lado, el tratamiento con lacasa posterior al proceso de sacarificación (Est. 2), resultó en un menor efecto reductor (73-84%), probablemente debido a un menor tiempo de reacción.

**Tabla 4.7.-** Concentración de los compuestos inhibidores identificados en las muestras control y tratadas con lacasa obtenidas tras el proceso de hidrólisis del MPC VII (220 °C; 2,5 min): Est. 1 (tratamiento con lacasa previo a sacarificación); Est. 2 (tratamiento con lacasa posterior a sacarificación)

Inhibidores	MPC 5% ST (p/v)			MPC 6% ST (p/v)			MPC 7% ST (p/v)		
	C	PC	TV	C	PC	TV	C	PC	TV
<b>Est. 1</b>									
<b>Furfural</b>	534	448	511	621	617	536	631	600	537
<b>5-HMF</b>	168	152	161	201	177	189	233	206	217
<b>Ácido acético</b>	2474	2355	2334	2947	2913	2896	3538	3445	3418
<b>Ácido fórmico</b>	1454	n.d.	1370	1764	n.d.	1709	2093	n.d.	2038
<b>Vainillina</b>	26	3	3	27	4	3	29	4	4
<b>Siringaldehído</b>	12	0	0	13	0	0	14	0	0
<b>Ácido <math>\rho</math>-cumárico</b>	24	0	0	26	0	0	28	0	0
<b>Ácido ferúlico</b>	46	0	0	48	0	0	49	0	0
<b>Est. 2</b>									
<b>Furfural</b>	670	608	624	833	778	793	911	876	846
<b>5-HMF</b>	168	166	164	206	201	199	235	230	231
<b>Ácido acético</b>	2692	2605	2612	3368	3247	3270	3863	3786	3769
<b>Ácido fórmico</b>	1500	n.d.	1446	1879	n.d.	1730	2171	n.d.	2107
<b>Vainillina</b>	22	16	9	28	15	11	31	14	10
<b>Siringaldehído</b>	10	0	0	15	0	0	16	0	0
<b>Ácido <math>\rho</math>-cumárico</b>	27	0	0	30	0	0	38	0	0
<b>Ácido ferúlico</b>	35	0	0	61	0	0	66	0	0

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; TV, muestras tratadas con la lacasa de *T. villosa*; n.d., no determinado.

A pesar de la reducción en el contenido fenólico, el tratamiento con lacasa bajo la Est. 1 produjo una menor recuperación de glucosa (Tabla 4.6), al igual que lo observado durante los estudios de designificación (apartado 4.3). Como ya se ha explicado, respecto a este fenómeno se han publicado resultados contradictorios. Por una parte, Tabka y col. (2006) y Jurado y col. (2009) describieron una menor

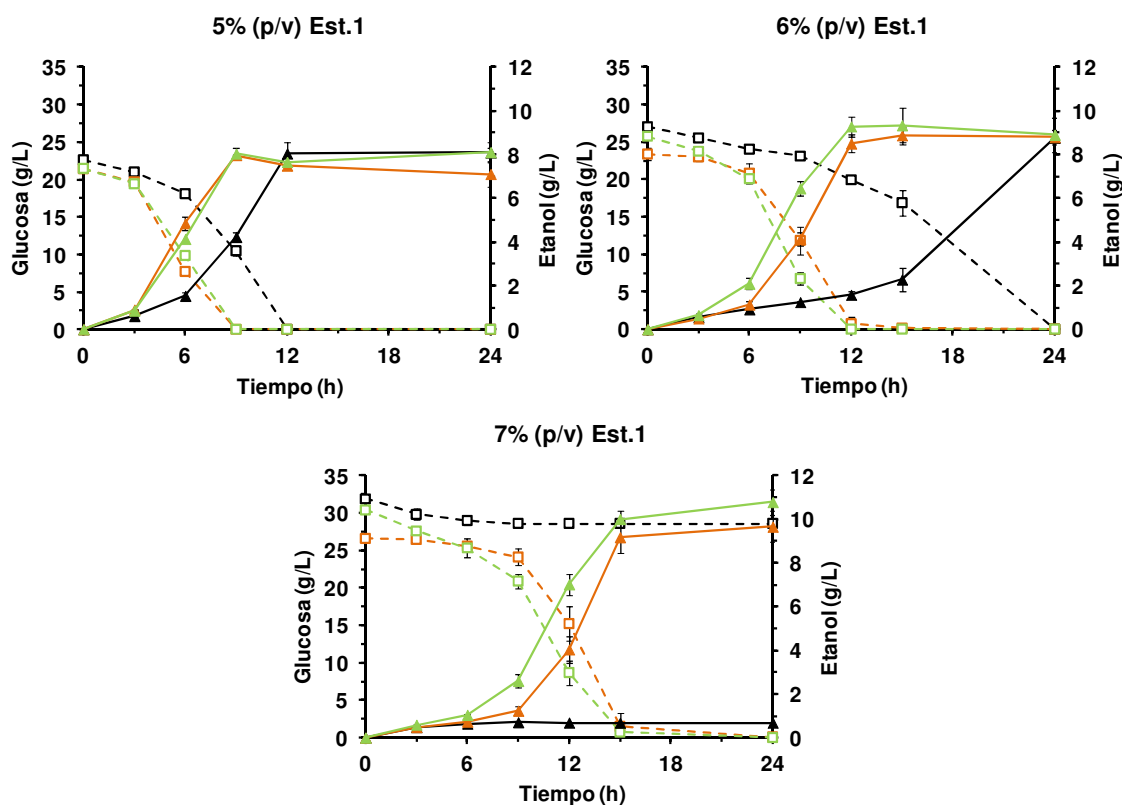
recuperación de glucosa durante el proceso de HE en las muestras de paja de trigo pretratada por EV que habían sido tratadas con lacasa. Estos autores atribuyeron dicho fenómeno a la posible liberación de ciertos compuestos fenólicos por parte de las lacasas, los cuales pueden resultar tóxicos para las celulasas. Asimismo, [Martín y col. \(2002\)](#) observaron un efecto similar al tratar con lacasa una muestra de bagazo de caña de azúcar pretratada mediante EV. Sin embargo, el tratamiento con lacasa no es el único método de destoxificación que puede reducir el contenido en glucosa de las muestras. En este contexto, el uso de resinas cromatográficas de intercambio aniónico a pH 10 o el uso de hongos como *T. reesei* también han mostrado una pérdida considerable de azúcares fermentables tras el proceso de destoxificación ([Palmqvist y col., 1997](#); [Larsson y col., 1999](#)). En contraste a esta menor recuperación de glucosa, el tratamiento con lacasa de madera de picea pretratada por EV mejoró los rendimientos de conversión de celulosa en glucosa durante los procesos de HE ([Palonen y Viikari, 2004](#)). Dicha mejora fue atribuida a la disminución de los inhibidores o a la reducción de las uniones improductivas por parte de las enzimas celulolíticas a la lignina remanente.

En comparación a la estrategia 1, el tratamiento con lacasa posterior al proceso de hidrólisis no afectó el contenido en glucosa de los hidrolizados, observándose unas concentraciones similares tanto en las muestras control como en las tratadas con lacasa (Tabla 4.6).

#### 4.4.1.2. Efecto del tratamiento con lacasa en la fermentación

Tras el proceso de HE, las muestras control y tratadas con lacasa al 5%, 6% y 7% ST (p/v) de consistencia, se sometieron a un proceso de fermentación usando la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Esta levadura, junto a otras que han sido descritas recientemente ([Kwon y col., 2011](#)), están ganando una gran importancia dada su capacidad para crecer y fermentar a temperaturas cercanas al óptimo de HE (alrededor de los 40 °C), por lo que permiten una mejor integración de los procesos. En este estudio, tras la inoculación de *K. marxianus* a los medios previamente hidrolizados y destoxificados, las muestras se sometieron a una etapa de fermentación de 72 h, durante la cual se llevó a cabo un seguimiento de la concentración de glucosa y del etanol.

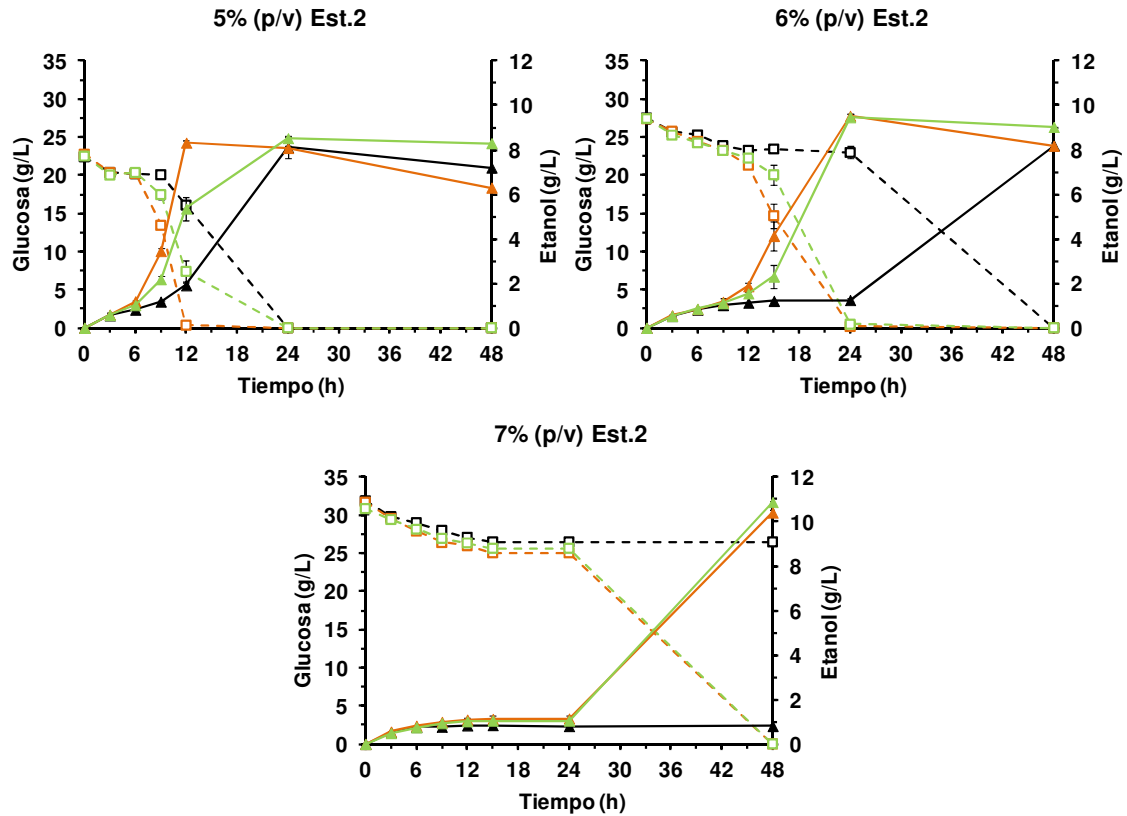
Las Figuras 4.6 y 4.7 representan tanto el consumo de glucosa como la producción de etanol durante el proceso de fermentación con la Est. 1 y la Est. 2, respectivamente. Como se puede observar, las muestras control en ambas estrategias manifestaron un menor consumo de glucosa y de producción de etanol por parte de *K. marxianus* tras incrementar la consistencia en sólidos totales.



**Figura 4.6.-** Consumo de glucosa (líneas discontinuas y cuadrados abiertos) y producción de etanol (líneas continuas y triángulos cerrados) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante la fermentación de los hidrolizados obtenidos del MPC VII (220 °C; 2,5 min) mediante la Est. 1 (tratamiento con lacasa previo a la sacarificación). En negro se identifican las muestras control, en naranja las muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus* y en verde las muestras tratadas con la lacasa de *T. villosa*.

En el caso de la Est. 1, las tasas de consumo de glucosa y de producción de etanol fueron superiores para las muestras control al 5% ST (p/v) en comparación a los controles diluidos al 6% ST (p/v). Este resultado provocó un retraso a la hora de alcanzar la producción máxima de etanol de las 12 h al 5% ST (p/v) hasta las 24 h al 6% ST (p/v) (Figura 4.6). De forma análoga, las muestras control de la Est. 2 mostraron

unos resultados similares aunque en este caso el retraso observado fue superior, alcanzándose los máximos de concentración de etanol tras 24 y 48 h de proceso en las muestras al 5% y al 6% ST (p/v), respectivamente (Figura 4.7).



**Figura 4.7.-** Consumo de glucosa (líneas discontinuas y cuadrados abiertos) y producción de etanol (líneas continuas y triángulos cerrados) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante la fermentación de los hidrolizados obtenidos del MPC VII (220 °C; 2,5 min) mediante la Est. 2 (tratamiento con lacasa posterior a la sacarificación). En negro se identifican las muestras control, en naranja las muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus* y en verde las muestras tratadas con la lacasa de *T. villosa*.

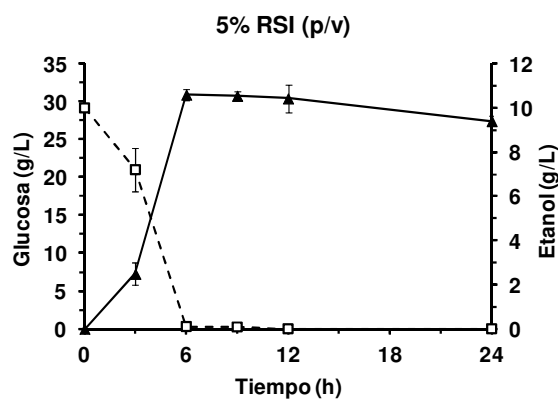
Estos patrones en la producción de etanol dependen de la fase de adaptación del microorganismo a las condiciones de fermentación, cuya duración está íntimamente relacionada con la naturaleza de los compuestos inhibidores y su concentración (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b; Klinke y col., 2004). Por otro lado, independientemente a la estrategia seguida, el incremento de la consistencia del sustrato al 7% ST (p/v) en las muestras control produjo una inhibición completa del crecimiento

del microorganismo, no observándose ni consumo de glucosa ni producción de etanol durante las 72 h de proceso.

Con respecto a la eficiencia de conversión de glucosa a etanol en las muestras control al 5% y al 6% ST (p/v) de consistencia, se pudo observar una disminución de los rendimientos del 0,36 al 0,32 g/g con la Est. 1 y del 0,36 al 0,30 g/g en el caso de la Est. 2 (Tabla 4.6), respectivamente. Este efecto adverso puede explicarse por el aumento en la concentración de los productos de degradación alcanzado tras incrementar la consistencia de sustrato (Tabla 4.7). A pesar de que de forma individual los compuestos de degradación identificados en este estudio no han mostrado ningún efecto en *K. marxianus* a las concentraciones observadas (Oliva y col., 2003), la combinación entre los diferentes compuestos puede generar un efecto de sinergia entre ellos, incrementando su poder inhibitorio (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b; Klinke y col., 2004; Panagiotou y Olsson, 2007; da Cunha-Pereira y col., 2011). Entre los diferentes compuestos identificados, el furfural ha mostrado ser un inhibidor del crecimiento y de la producción de etanol de *K. marxianus*, dado que produce una inactivación directa tanto de las enzimas glicolíticas como de las no glicolíticas. Por otro lado, en comparación al furfural, *K. marxianus* ha mostrado una mayor resistencia frente al 5-HMF. Respecto a los ácidos alifáticos, como el ácido acético y el ácido fórmico, estos producen un desequilibrio intracelular del pH que afecta a la producción de biomasa. No obstante, las condiciones de pH usadas en estos ensayos (pH 5.5) reducen considerablemente la toxicidad de estos ácidos. Por último, los compuestos fenólicos han mostrado un efecto tóxico similar al furfural, aunque con unos mecanismos de inhibición diferentes. En *K. marxianus* se ha descrito que la vainillina y el siringaldehído pueden afectar la integridad de las membranas celulares, alterando su habilidad para actuar como barreras físicas y como matrices enzimáticas (Oliva y col., 2003). Asimismo, aunque el efecto no ha sido descrito en *K. marxianus*, el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico han mostrado efectos similares en *S. cerevisiae* (Almeida y col., 2007).

Con respecto a las muestras control, ambas estrategias de tratamiento con lacasa mejoraron los rendimientos de fermentación de *K. marxianus*, siendo estas mejoras más evidentes con la Est. 1 (mayor porcentaje de eliminación del contenido fenólico). Como se puede observar en las Figuras 4.6 y 4.7, en general el tratamiento con lacasa incrementó las tasas relativas al consumo de glucosa y a la producción de etanol. Esta

mejora puede explicarse gracias a la reducción observada en el contenido fenólico de las muestras por parte de la lacasa, lo que disminuye la carga inhibitoria del medio y reduce la fase de adaptación de la levadura. En el caso de las muestras al 5% ST (p/v), la mejora en los rendimientos con ambas estrategias fue poco significativa (de 0,36 g/g a 0,37-0,38 g/g). Por el contrario, al 6% ST (p/v) el incremento en los rendimientos finales fue más pronunciado, aumentando del 0,32 g/g al 0,37-0,38 en el caso de la Est. 1 y del 0,30 al 0,35 en el caso de la Est. 2. Finalmente, al 7% ST (p/v) de consistencia, el tratamiento con lacasa fue capaz de evitar la inhibición del crecimiento con ambas estrategias, favoreciendo la fermentación de las muestras por parte de *K. marxianus* y obteniendo las concentraciones más altas de etanol con valores cercanos a los 11 g/L (Tabla 4.6). Además, los resultados obtenidos bajo estas condiciones en cuanto a rendimientos y concentración de etanol, son comparables con los parámetros de fermentación relativos al usar el RSI (tras filtración y lavado del MPC VII (220 °C; 2,5 min)) a una misma consistencia de sólidos insolubles (5,2% (p/v) de sólidos insolubles (SI)). No obstante, como se puede observar en la Figura 4.8, las tasas de consumo de glucosa y de producción de etanol fueron mejores en los procesos donde se utilizó el RSI (Tabla 4.6).



**Figura 4.8.-** Consumo de glucosa (líneas discontinuas y cuadrados abiertos) y producción de etanol (líneas continuas y triángulos cerrados) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante la fermentación de los hidrolizados obtenidos a partir del RSI (tras filtración y lavado del MPC VII (220 °C; 2,5 min)) al 5,2% SI (p/v).

Las mejoras observadas en los procesos de fermentación tras el tratamiento con lacasa se han descrito previamente con otros microorganismos y otros tipos de materiales. Jönsson y col. (1998) y Larsson y col. (1999) mostraron que el tratamiento con lacasa incrementó los valores relativos a las tasas de consumo de glucosa, a la



productividad volumétrica y a los rendimientos de etanol durante la fermentación con *S. cerevisiae* de diferentes hidrolizados de madera pretratada mediante EV en condiciones ácidas. En el mismo sentido, Martín y col. (2002) describieron mejoras similares cuando los hidrolizados procedentes del bagazo de caña pretratado mediante EV se trataron con lacasa y se fermentaron con una cepa de *S. cerevisiae* fermentadora de xilosa. Asimismo, Chandel y col. (2007) observaron resultados similares al fermentar con *Candida shehatae* un hidrolizado ácido de bagazo de caña de azúcar que había sido tratado con lacasa.

En comparación con otros métodos de destoxificación, los resultados obtenidos tras el tratamiento con lacasa en relación a los rendimientos y las productividades de etanol, sólo han sido superados por el empleo de resinas cromatográficas de intercambio aniónico a pH 10, el “overliming” o el carbón activo (Larsson y col., 1999; Martín y col., 2002; Chandel y col., 2007). Sin embargo, estos métodos requieren equipamientos y procesos adicionales que incrementan los costes de procesamiento. Por el contrario, las lacasas ofrecen la posibilidad de usarse directamente (*in situ*), antes o después de la HE y en el mismo recipiente donde se realiza este proceso y/o el de fermentación.

#### 4.4.2. Influencia de las diferentes condiciones de pretratamiento, consistencia de sustrato y configuraciones de proceso durante la producción de etanol con *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 (Artículo III)

A pesar de las mejoras observadas mediante el tratamiento con lacasas descritas en el apartado anterior, la concentración máxima alcanzada tras el proceso de fermentación fue inferior a los 11 g/L. En este contexto, desde el punto de vista económico la concentración de producto tras la fermentación debe ser mucho mayor para que la producción de bioetanol sea rentable. Además, el nivel de integración de las distintas etapas debe evolucionar hacia un único proceso donde la destoxificación, la sacarificación y la fermentación tengan lugar de forma simultánea o con una configuración que permita reducir los tiempos del proceso global.

En este sentido, para optimizar la producción de etanol mediante el uso de *K. marxianus* en combinación con un proceso de destoxificación con lacasas, nos propusimos evaluar diferentes aspectos como las condiciones de pretratamiento, la

configuración del proceso o la carga del sustrato. Para este propósito se utilizaron como sustrato el MPC IV y VIII que se obtuvieron bajo las condiciones de 200 °C; 2,5 min y 220 °C; 2,5 min, respectivamente. Asimismo, se emplearon diferentes cargas de sustrato (5-14% ST (p/v)) bajo dos configuraciones de proceso: sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS). Durante los procesos de SFS, la glucosa liberada por la acción de las enzimas hidrolíticas es convertida simultáneamente a etanol por el microorganismo fermentativo, lo que permite reducir la inhibición de las enzimas por producto final (celobiosa o glucosa). Sin embargo, el principal inconveniente de los procesos de SFS es que se llevan a cabo bajo temperaturas inferiores a las óptimas para las enzimas hidrolíticas. En este sentido, la realización de una etapa de presacarificación anterior a los procesos de SFS (PSFS), permite a las enzimas hidrolíticas actuar bajo condiciones óptimas, mejorando los rendimientos de hidrólisis y, por consiguiente, los de etanol. Además, el uso de levaduras termotolerantes, como es el caso de *K. marxianus* CECT 10875, permiten que el proceso de SFS se lleve a cabo bajo temperaturas próximas a la óptima de las enzimas, disminuyendo al mismo tiempo el riesgo de contaminación por otros microorganismos y el coste de refrigeración.

#### 4.4.2.1. Efecto del tratamiento con lacasa sobre los productos de degradación

Tanto el MPC IV como el MPC VIII fueron sometidos a diferentes ensayos de destoxificación con lacasa, dependiendo de la configuración de proceso de producción de etanol. En los procesos de SFS, el tratamiento con lacasa se llevó a cabo durante las 8 h previas a la adición del microorganismo y las enzimas hidrolíticas. En los procesos de PSFS, el tratamiento con lacasa se realizó de forma simultánea al proceso de presacarificación. Los tratamientos fueron realizados a diferentes cargas de sólidos (5-14% ST (p/v)), utilizando la lacasa de *P. cinnabarinus* y la mezcla hidrolítica estándar. En ambas configuraciones las muestras control se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones en ausencia de lacasa.

El efecto de ambos ensayos de destoxificación (tratamiento con lacasa sin presacarificación o presacarificación y destoxificación simultáneas) se evaluó sobre los productos de degradación. Como se muestra en la Tabla 4.8 para el MPC VIII a bajas

cargas de sólidos, bajo la configuración del tratamiento con lacasa sin presacarificación, las muestras control incrementaron la concentración de los inhibidores a medida que la carga de sustrato fue mayor. Sin embargo, las muestras tratadas con lacasa mostraron una reducción notable de los compuestos fenólicos (86-92%). Por el contrario, los ácidos alifáticos o los derivados del furano no se vieron afectados por la acción de la lacasa, como ya se ha descrito previamente. En cuanto a la eliminación de los fenoles, el patrón de comportamiento de la lacasa fue similar al observado en el apartado anterior, de manera que el siringaldehído, el ácido  $\rho$ -cumárico y el ácido ferúlico se eliminaron de forma completa, mientras que la vainilla fue menos susceptible a la acción de la lacasa.

**Tabla 4.8.-** Concentración de los compuestos inhibidores identificados en el MPC VIII (220 °C; 2,5 min) tras un tratamiento con lacasa sin presacarificación

Inhibidores	5% ST (p/v)		6% ST (p/v)		7% ST (p/v)	
	C	PC	C	PC	C	PC
Furfural	500	430	650	635	715	675
5-HMF	120	120	140	150	165	165
Ácido acético	2360	2357	2256	2233	2699	2608
Ácido fórmico	1536	n.d.	1684	n.d.	2102	n.d.
Vainillina	20	8	28	14	28	14
Siringaldehído	8	0	11	0	12	0
Ácido $\rho$ -cumárico	27	0	23	0	28	0
Ácido ferúlico	30	0	36	0	40	0

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; n.d., no determinado.

Al igual que ocurría con el MPC VIII, las muestras control del MPC IV a altas cargas de sólidos mostraron mayores concentraciones de inhibidores a medida que se incrementó la consistencia de sustrato (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9.-** Concentración de los compuestos inhibidores identificados en el MPC IV (200 °C; 2,5 min) tras un tratamiento con lacasa sin presacarificación

Inhibidores	10% ST (p/v)		12% ST (p/v)		14% ST (p/v)	
	C	PC	C	PC	C	PC
Furfural	288	271	311	290	348	347
5-HMF	98	97	111	110	155	140
Ácido acético	2295	2248	2925	2880	4018	3823
Ácido fórmico	1852	n.d.	2310	n.d.	3496	n.d.
Vainillina	20	20	22	22	25	19
Siringaldehído	8	5	10	7	9	2
Ácido $\rho$ -cumárico	30	22	37	28	39	30
Ácido ferúlico	26	0	33	0	30	0

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; n.d., no determinado.

Sin embargo, en comparación con la reducción observada en las muestras del MPC VIII, la eficacia del tratamiento con lacasa para reducir el contenido fenólico disminuyó, observándose una eliminación de fenoles de aproximadamente un 44%. Este efecto negativo podría ser atribuido al incremento en la viscosidad de los medios cuando se utiliza un mayor contenido de sólidos, lo que dificulta la mezcla de la lacasa con el material.

En el segundo conjunto de experimentos, las muestras se sometieron a una etapa de presacarificación y destoxificación simultánea. Una etapa de prehidrólisis permite que la enzimas hidrolíticas actúen a temperatura óptima durante un cierto tiempo anterior a la adición de la levadura (Öhgren y col., 2007). Además, esta etapa favorece la fluidez del medio, facilitando su manipulación y permitiendo un correcto mezclado (Manzanares y col. 2011). En comparación a las muestras control de la estrategia anterior, la etapa de presacarificación supuso un incremento del contenido de inhibidores (Tablas 4.10 y 4.11).

**Tabla 4.10.-** Concentración de los compuestos inhibidores identificados en el MPC VIII (220 °C; 2,5 min) tras una etapa de presacarificación y destoxificación simultánea

Inhibidores	5% ST (p/v)		6% ST (p/v)		7% ST (p/v)	
	C	PC	C	PC	C	PC
Furfural	443	413	522	410	737	697
5-HMF	127	120	143	144	173	177
Ácido acético	2433	2344	2913	2808	3508	3300
Ácido fórmico	1228	n.d.	1472	n.d.	1872	n.d.
Vainillina	19	12	25	12	26	16
Siringaldehído	5	0	12	0	10	0
Ácido $\rho$ -cumárico	29	0	39	0	42	0
Ácido ferúlico	62	0	66	0	65	0

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; n.d., no determinado.

**Tabla 4.11.-** Concentración de los compuestos inhibidores identificados en el MPC IV (200 °C; 2,5 min) tras una etapa de presacarificación y destoxificación simultánea

Inhibidores	10% ST (p/v)		12% ST (p/v)		14% ST (p/v)	
	C	PC	C	PC	C	PC
Furfural	253	229	318	286	346	318
5-HMF	95	98	104	104	136	120
Ácido acético	3272	3172	3875	3559	5139	4726
Ácido fórmico	1863	n.d.	2144	n.d.	3337	n.d.
Vainillina	22	10	23	17	24	9
Siringaldehído	8	0	9	0	9	0
Ácido $\rho$ -cumárico	77	0	94	0	93	0
Ácido ferúlico	110	0	122	0	123	0

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; n.d., no determinado.

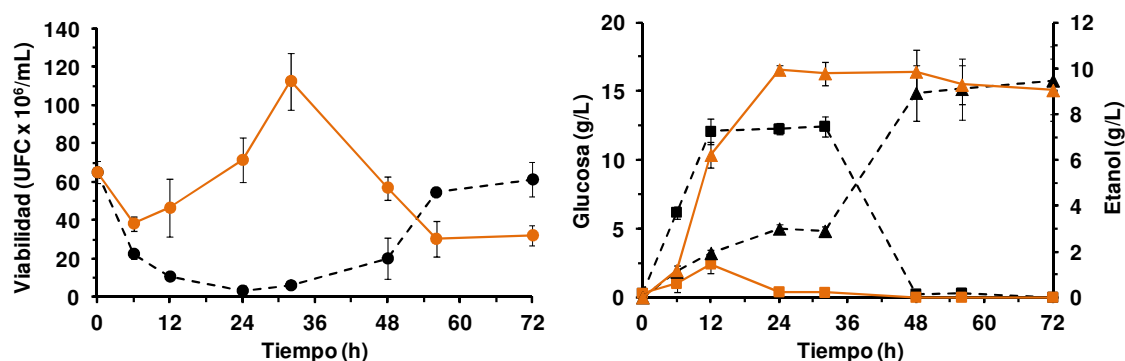
Este incremento en la concentración de inhibidores tras una etapa de hidrólisis también ha sido descrito por [Thomsen y col. \(2009\)](#), quienes observaron un incremento en el contenido del ácido acético, del ácido  $\rho$ -cumárico y del ácido ferúlico tras una etapa de presacarificación de paja de trigo pretratada. El ácido acético puede liberarse por la acción sinérgica de las actividades acetil esterasa y hemicelulasa sobre los grupos acetilos contenidos en la hemicelulosa. En este sentido, la preparación NS 50013, producida a partir de cepas del género *Trichoderma*, presenta de forma minoritaria actividad xilanasa y acetil esterasa que podrían explicar la liberación del ácido acético ([Juhász y col., 2005](#)). Además, la acción complementaria de las xilanasas junto a otras actividades esterasas de ácidos fenólicos, podrían explicar la liberación del ácido  $\rho$ -cumárico y del ácido ferúlico. Dentro de las actividades esterasas, la feruloil esterasa se produce de forma natural en *Aspergillus niger*, cepa a partir de la cual se obtiene la preparación NS 50010 ([Dien y col., 2008](#)).

A pesar del incremento en la concentración de fenoles producido por la etapa de presacarificación, la eliminación de fenoles al suplementar con lacasa las muestras fue similar o incluso mejor que el tratamiento con lacasa sin presacarificación. En este contexto, las muestras del MPC VIII diluidas a consistencias de sustrato bajas (5-7% ST (p/v)) presentaron una reducción de fenoles muy similar (86-92%). Sin embargo, en el caso de las muestras del MPC IV diluidas a consistencias más altas (10-14% ST (p/v)), la etapa de presacarificación aumentó la eficiencia del tratamiento con lacasa del 44% al 95%. Este resultado, puede deberse a que la etapa de presacarificación disminuye la viscosidad de las muestras y permite un mejor mezclado de todos los componentes ([Manzanares y col., 2011](#)), facilitando el acceso de los compuestos fenólicos a la acción de la lacasa.

#### 4.4.2.2. Viabilidad celular y producción de etanol en los procesos de SFS

Las muestras relativas al MPC IV y VIII resultantes del tratamiento con lacasa sin presacarificación se sometieron a procesos de SFS. En el caso de las muestras del MPC VIII al 5% ST (p/v) de consistencia, la fase de adaptación de la levadura en las muestras control tuvo una duración de 32 h, lo que retrasó el consumo de glucosa y la producción de etanol (Figura 4.9). Como ya se ha mencionado, la fase de adaptación de un microorganismo depende tanto de las condiciones de fermentación como de la presencia y concentración de los distintos compuestos inhibidores y de su efecto

sinérgico (Oliva y col., 2003, 2004, 2006). Tras superar el período de adaptación, *K. marxianus* mostró un incremento gradual de la viabilidad celular, alcanzando el mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) entre las 56 y las 72 h del inicio del proceso de SFS. Sin embargo, la concentración de glucosa descendió por completo entre las 32 h y las 48 h, obteniendo una concentración máxima de etanol de 9,6 g/L (Tabla 4.12). Esta concentración de etanol se corresponde con un rendimiento del 83% del teórico, teniendo en cuenta la glucosa potencial presente en el material pretratado y un rendimiento descrito de 0,45 g/g para *K. marxianus* en condiciones óptimas (Tomás-Pejó y col., 2009a).



**Figura 4.9.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de SFS al 5% ST (p/v) utilizando el MPC VIII (220 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

**Tabla 4.12.-** Resumen relativo a los procesos de SFS (*K. marxianus* CECT 10875) en los que se utilizó como sustrato el MPC VIII (220 °C; 2,5 min)

Consistencia de sustrato (p/v)	Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Y <sub>E/ET</sub> (%)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
5% ST	C	9,6	0,37	83,2	0,09
	PC	10,2	0,40	88,6	0,31
6% ST	C	1,7	0,06	12,3 (10,8 <sup>a</sup> )	0,05 (0,07 <sup>b</sup> )
	PC	10,7	0,35	78,4 (69,2 <sup>a</sup> )	0,32 (0,36 <sup>b</sup> )

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente en el MPC; Y<sub>E/ET</sub>, porcentaje de etanol teórico asumiendo un rendimiento de 0,45 g/g para *K. marxianus*; Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada en base al tiempo donde la concentración de etanol fue máxima (32 h).

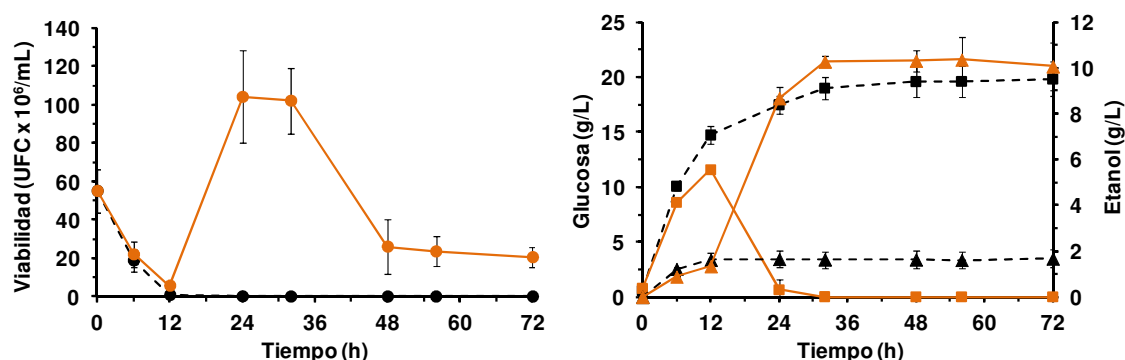
<sup>a</sup>Porcentaje de etanol obtenido respecto al máximo teórico estequiométrico (0,51 g/g).

<sup>b</sup>Productividad volumétrica a las 24 h.

<sup>a,b</sup>Estos datos se utilizarán para comparar los procesos de fermentación con *K. marxianus* CECT 10875 y *S. cerevisiae* Ethanol Red en el apartado 4.4.3.

Actualmente se conocen diferentes cepas salvajes y mutantes de ciertas especies de levaduras que pueden producir etanol con eficiencias entre el 75% y el 90% a temperaturas superiores a los 40 °C (Kwon y col., 2011). No obstante, la mayoría de los ejemplos citados en el mencionado estudio fueron evaluados en un medio sintético sin presencia de inhibidores, por lo que se desconoce su comportamiento frente a un medio real como pueden ser el MPC o el RSI.

Cuando la consistencia de sustrato se aumentó del 5% al 6% ST (p/v), el crecimiento de la levadura en las muestras control se inhibió completamente, probablemente debido al incremento en el contenido de compuestos inhibidores (Tabla 4.8). Como puede observarse en la Figura 4.10, en las primeras 12 h de proceso se produjo una reducción significativa del número de UFC/mL que ocasionó una pérdida completa de la viabilidad. Consecuentemente, en estas muestras no se observó ni consumo de glucosa ni producción de etanol tras 72 h de proceso.



**Figura 4.10.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de SFS al 6% ST (p/v) utilizando el MPC VIII (220 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

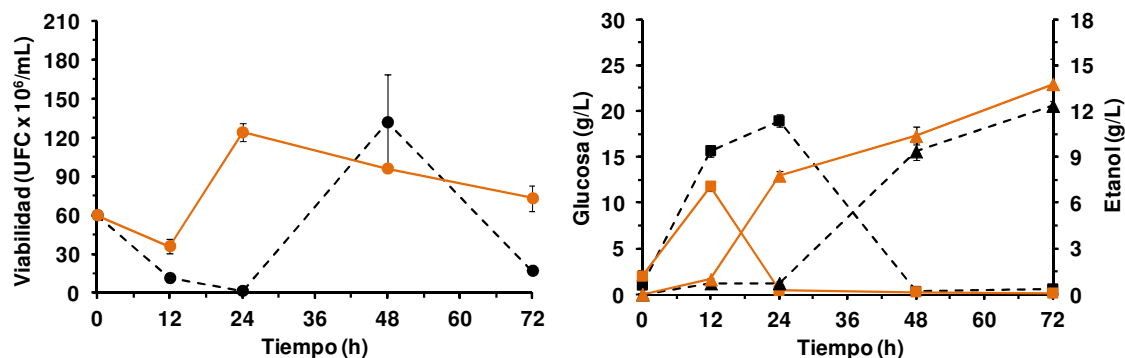
Otros autores también han descrito estos efectos negativos al utilizar otros materiales pretratados y otros microorganismos fermentadores. Stenberg y col. (2000) mostraron una inhibición total de *S. cerevisiae* usando un 10% (p/v) del MPC de píceas obtenido por EV. Sin embargo, al cambiar el MPC por el RSI, la levadura fue capaz de crecer a la misma consistencia de sustrato. Resultados similares se han obtenido usando como sustrato el MPC y el RSI procedentes de la paja de cebada pretratada por EV (Linde y col., 2007). Con el MPC se observó una alta inhibición celular al utilizar una



consistencia del 7,5% (p/v). Por el contrario, con el RSI no se mostró dicha inhibición a la misma carga de sustrato. En cuanto a la utilización del MPC obtenido por EV de la paja de trigo, la cepa industrial *S. cerevisiae* Ethanol Red fue capaz de crecer en una muestra al 10% (p/v) de consistencia (Tomás-Pejó y col., 2008b). Sin embargo, cabe mencionar que estos resultados se obtuvieron al utilizar un material pretratado a menor severidad (210 °C; 2,5 min), por lo que la concentración de inhibidores pudo ser menor en comparación con lo observado en esta Tesis a 220 °C; 2,5 min.

Dada la excesiva toxicidad observada para el MPC VIII (220 °C; 2.5 min), se decidió trabajar con un sustrato obtenido bajo condiciones menos severas. En este contexto, al utilizar el MPC IV (200 °C; 2,5 min), *K. marxianus* pudo fermentar los medios hasta una consistencia del 10% ST (p/v). A esta consistencia, la viabilidad celular disminuyó drásticamente durante las primeras 24 h de proceso, por lo que la glucosa liberada por la acción de las enzimas hidrolíticas comenzó a acumularse en el medio (Figura 4.11). Sin embargo, una vez transcurrido el tiempo de adaptación, se pudo observar un incremento pronunciado de la viabilidad, obteniéndose el máximo número de UFC/mL a las 48 h. Asimismo, la concentración de glucosa se redujo completamente entre las 24 y las 48 h, obteniéndose un valor máximo de concentración de etanol de 12,3 g/L (Tabla 4.13). A pesar de que esta concentración de etanol es superior a la observada (9,6 g/L) cuando se utilizó el MPC VIII al 5% ST (p/v) de consistencia, el rendimiento en etanol, por el contrario, se redujo del 83% al 65,5% (Tablas 4.12 y 4.13). Esta disminución puede explicarse debido a que existe una correlación entre el incremento de la carga de sustrato y un descenso en los rendimientos de HE. Entre los distintos mecanismos que provocan este fenómeno se incluyen la inhibición por producto final de las enzimas hidrolíticas, cambios en la reactividad del sustrato durante la etapa de HE, limitaciones en la transferencia de masa, la adsorción improductiva de las enzimas por el sustrato y la disminución de la capacidad de unión de las enzimas a la celulosa (Jørgensen y col., 2007a; Rosgaard y col., 2007; Kristensen y col., 2009; Wang y col. 2011).





**Figura 4.11.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de SFS al 10% ST (p/v) utilizando el MPC IV (200 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

**Tabla 4.13.-** Resumen relativo a los procesos de SFS (*K. marxianus* CECT 10875) en los que se utilizó como sustrato el MPC IV (200 °C; 2,5 min)

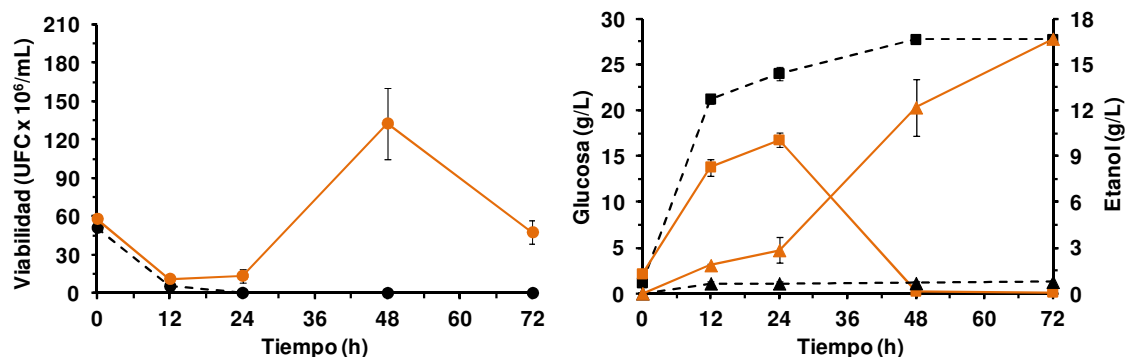
Consistencia de sustrato (p/v)	Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Y <sub>E/ET'</sub> (%)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
10% ST	C	12,3	0,29	65,5	0,17
	PC	13,8	0,33	73,1	0,19
12% ST	C	1,4	0,03	6,0	0,02
	PC	16,7	0,33	74,2	0,23

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente en el MPC; Y<sub>E/ET'</sub>, porcentaje de etanol teórico asumiendo un rendimiento de 0,45 g/g para *K. marxianus*; Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada en base al tiempo donde la concentración de etanol fue máxima (72 h).

Cuando el MPC IV se utilizó a consistencias superiores al 10% (12% y 14% ST (p/v)), el contenido de los diferentes tóxicos incrementó, inhibiendo por completo el crecimiento de *K. marxianus* e impidiendo el consumo de glucosa y la producción de etanol (Figura 4.12).

En comparación a las muestras control, el tratamiento con lacasa mejoró los procesos de fermentación realizados con la levadura *K. marxianus*, al igual que había ocurrido en el apartado anterior. En el caso del MPC VIII al 5% ST (p/v), el tratamiento con lacasa redujo la fase de adaptación de la levadura de 32 h a 6 h. Además, la viabilidad celular mejoró significativamente, alcanzando el máximo valor de UFC/mL tras 32 h del inicio del proceso de SFS (Figura 4.9). Asimismo, las tasas de consumo de glucosa y de producción de etanol también mejoraron tras el tratamiento con lacasa. La acumulación de glucosa en las etapas iniciales del proceso fue escasa y la máxima

concentración de etanol (10,2 g/L) se alcanzó tras 24 h de proceso, incrementando la productividad volumétrica de 0,09 a 0,31 g/L h y los rendimientos finales desde 0,37 hasta 0,40 g/g (Tabla 4.12).



**Figura 4.12.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de SFS al 12% ST (p/v) utilizando el MPC IV (200 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

Por otro lado, como se observó previamente, cuando la consistencia del MPC VIII se aumentó del 5% al 6% ST (p/v), las muestras no tratadas con lacasa sufrieron una inhibición completa. Sin embargo, tras el tratamiento con lacasa dicha inhibición no se observó y la levadura fue capaz de fermentar el medio, alcanzando una producción de etanol de 10,7 g/L a las 32 h de SFS (Tabla 4.12). En estas muestras, durante las primeras 12 h de proceso se produjo un descenso de la viabilidad, tras el cual *K. marxianus* mostró un incremento significativo hasta lograr el máximo número de colonias entre las 24 y las 32 h (Figura 4.10). Teniendo en cuenta estos antecedentes se intentó incrementar la consistencia de sustrato del 6% al 7% ST (p/v). En este caso a pesar de la reducción en el contenido fenólico por parte de la lacasa (Tabla 4.8), *K. marxianus* sufrió una rápida inhibición del crecimiento y fue incapaz de consumir glucosa y producir etanol.

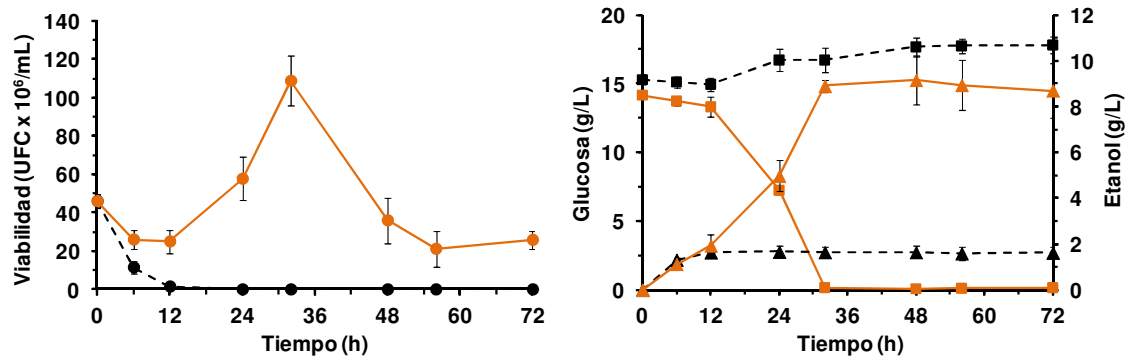
Resultados muy similares se obtuvieron tras el tratamiento con lacasa del MPC IV. Al 10% ST (p/v) de consistencia, el tratamiento con lacasa redujo la fase de adaptación del microorganismo de 24 a 12 h, permitiendo alcanzar el mayor número de UFC/mL a las 24 h de SFS (Figura 4.11). Además de la disminución de la fase de adaptación, el tratamiento con lacasa incrementó ligeramente la productividad

volumétrica de 0,17 a 0,19 g/L h en comparación a las muestras control (Tabla 4.13). Asimismo, la producción de etanol obtenida fue de 13,8 g/L, lo que aumentó los rendimientos de etanol de 0,29 hasta 0,33 g/g. En el caso de las muestras al 12% ST (p/v) de consistencia, el tratamiento con lacasa permitió superar la inhibición del crecimiento observado en las muestras control. Como se muestra en la Figura 4.12, tras superar una fase de adaptación de 24 h, donde la viabilidad celular disminuyó considerablemente, *K. marxianus* creció de forma significativa, obteniendo el máximo número de UFC/mL a las 48 h. Durante este proceso se pudo alcanzar una concentración máxima de etanol de 16,7 g/L (Tabla 4.13), superando las concentraciones alcanzadas con el MPC VIII y VII (apartado 4.4.1) obtenidos bajo una mayor severidad de pretratamiento. Finalmente, consistencias superiores al 12% ST (p/v) no pudieron ser fermentadas a pesar de la disminución en el contenido fenólico tras el tratamiento con lacasa (Tabla 4.9).

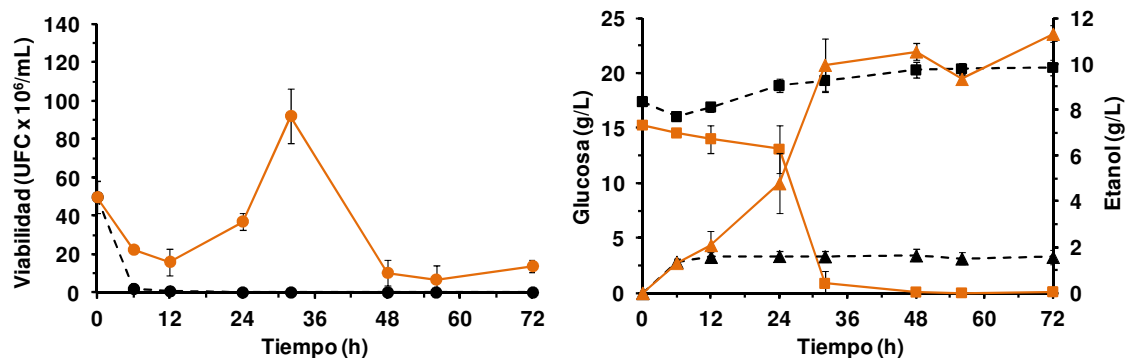
Estos resultados son comparables a los publicados por otros autores como [Jurado y col. \(2009\)](#), quienes observaron una mayor concentración de levadura, un mayor consumo de glucosa y una mayor producción de etanol tras la detoxificación con lacasa de la paja de trigo pretratada por EV en un proceso consecutivo de HFS con la levadura *S. cerevisiae*.

#### 4.4.2.3. Viabilidad celular y producción de etanol en los procesos de PSFS

En comparación con las muestras control donde no se había realizado ninguna etapa de prehidrólisis, el incremento del contenido de los productos de degradación observado tras la presacarificación afectó de forma negativa el proceso de fermentación, inhibiendo por completo el crecimiento de la levadura bajo consistencias del 5% y del 6% ST (p/v) con el MPC VIII (Figuras 4.13 y 4.14 y Tabla 4.14). Estos resultados son similares a los obtenidos por [Tomás-Pejó y col. \(2009a\)](#), quienes describieron una inhibición del crecimiento de *K. marxianus* al utilizar una suspensión al 5% (p/v) de consistencia de un MPC (220 °C; 2.5 min) de paja de trigo en una configuración PSFS. En contraste, en este mismo estudio se logró una alta concentración de etanol (30,2 g/L) cuando se usó la fracción del RSI como sustrato a una consistencia del 14% (p/v).



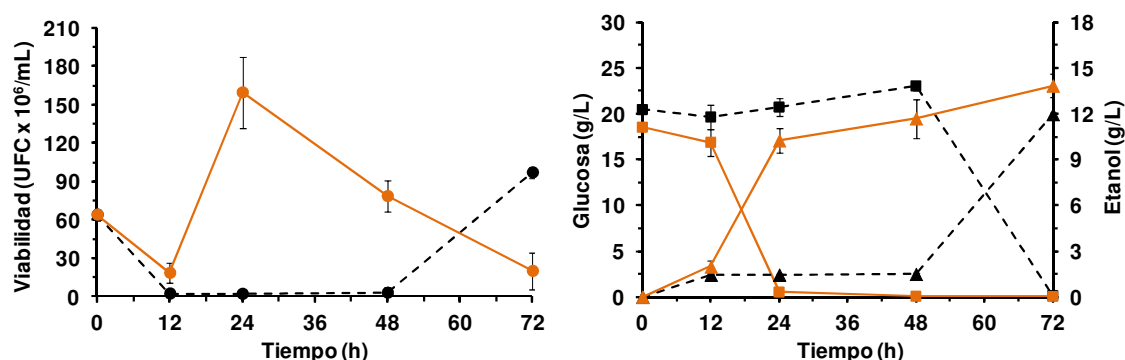
**Figura 4.13.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de PSFS al 5% ST (p/v) utilizando el MPC VIII (220 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja. La concentración de glucosa inicial en las muestras control fue de 15,3 g/L, mientras que en las muestras tratadas fue de 14,2 g/L.



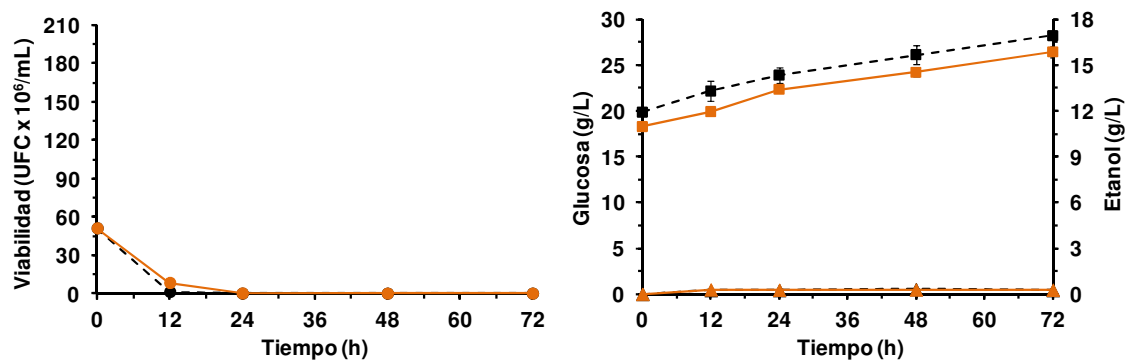
**Figura 4.14.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de PSFS al 6% ST (p/v) utilizando el MPC VIII (220 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja. La concentración de glucosa inicial en las muestras control fue de 17,4 g/L, mientras que en las muestras tratadas fue de 15,3 g/L.

Estos efectos negativos también se observaron en las muestras control con el MPC IV, como se observa en las Figuras 4.15 y 4.16. En el caso de las muestras cuya consistencia de sustrato fue del 10% ST (p/v), la fase de adaptación se extendió hasta las

48 h (Figura 4.15), en comparación a las 24 h observadas durante el proceso de SFS (Figura 4.11).



**Figura 4.15.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de PSFS al 10% ST (p/v) utilizando el MPC IV (200 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja. La concentración de glucosa inicial en las muestras control fue de 20,4 g/L, mientras que en las muestras tratadas fue de 18,5 g/L.



**Figura 4.16.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *K. marxianus* CECT 10875 durante los procesos de PSFS al 12% ST (p/v) utilizando el MPC IV (200 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja. La concentración de glucosa inicial en las muestras control fue de 20,4 g/L, mientras que en las muestras tratadas fue de 18,5 g/L.

Sin embargo, como se observa en las Tablas 4.13 y 4.15, los resultados entre ambas configuraciones de proceso no mostraron diferencias significativas en relación a la concentración de etanol (12 g/L) ni a los rendimientos (0,29 g/g). Por otro lado, las muestras control al 12% ST (p/v) de consistencia también inhibieron por completo el crecimiento del microorganismo, no observando producción de etanol (Figura 4.16).

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede decir que en las condiciones ensayadas la configuración de SFS resulta ser un proceso más conveniente que los procesos de PSFS. Apoyando esta hipótesis, [García-Aparicio y col. \(2011\)](#) mostraron un mejor comportamiento de *K. marxianus* sobre el RSI de paja de cebada pretratada mediante EV utilizando la configuración de SFS frente al proceso de PSFS. Entre los mecanismos que podrían influir en el peor funcionamiento de la configuración de PSFS, además de la presencia de una mayor concentración de inhibidores, también podrían estar involucrados otros factores como la inhibición por producto final o la desactivación térmica de las enzimas ([Linde y col., 2007](#)).

El tratamiento con lacasa en los procesos de PSFS se llevó a cabo de forma simultánea a la etapa de prehidrólisis, de forma que la lacasa se añadió al mismo tiempo que las enzimas hidrolíticas. Como ya se ha mencionado, a pesar de que los compuestos fenólicos pueden disminuir las tasas y los rendimientos de sacarificación ([Ximenes y col., 2010, 2011](#)), la eliminación de fenoles por parte de la lacasa no sólo no mejoró el proceso de HE, sino que lo afectó de forma negativa dando lugar a una menor recuperación de glucosa en todos los casos (Figuras 4.13-4.16).

**Tabla 4.14.-** Resumen relativo a los procesos de PSFS (*K. marxianus* CECT 10875) en los que se utilizó como sustrato el MPC VIII (220 °C; 2,5 min)

Consistencia de sustrato (p/v)	Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Y <sub>E/ET</sub> (%)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
5% ST	C	1,7	0,07	14,5	0,05
	PC	9,3	0,36	81,0	0,28
6% ST	C	1,7	0,05	12,2 (10,7 <sup>a</sup> )	0,05 (0,07 <sup>b</sup> )
	PC	11,1	0,36	80,3 (70,9 <sup>a</sup> )	0,31 (0,20 <sup>b</sup> )

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente en el MPC; Y<sub>E/ET</sub>, porcentaje de etanol teórico asumiendo un rendimiento de 0,45 g/g para *K. marxianus*; Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada en base al tiempo donde la concentración de etanol fue máxima (32 h).

<sup>a</sup>Porcentaje de etanol obtenido respecto al máximo teórico estequiométrico (0,51 g/g).

<sup>b</sup>Productividad volumétrica a las 24 h.

<sup>a,b</sup>Estos datos se utilizarán para comparar los procesos de fermentación con *K. marxianus* CECT 10875 y *S. cerevisiae* Ethanol Red en el apartado 4.4.3.

**Tabla 4.15.-** Resumen relativo a los procesos de PSFS (*K. marxianus* CECT 10875) en los que se utilizó como sustrato el MPC IV (200 °C; 2,5 min)

Consistencia de sustrato (p/v)	Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Y <sub>E/ET</sub> (%)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
10% ST	C	12,0	0,29	63,6	0,17
	PC	13,8	0,33	73,5	0,18
12% ST	C	0,3	0,01	2,2	0
	PC	0,3	0,01	2,4	0

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente en el MPC; Y<sub>E/ET</sub>, porcentaje de etanol teórico asumiendo un rendimiento de 0,45 g/g para *K. marxianus*; Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada en base al tiempo donde la concentración de etanol fue máxima (72 h).

A pesar de una menor recuperación de glucosa, el tratamiento con lacasa fue capaz de evitar la inhibición del crecimiento de *K. marxianus*, tanto al 5% como al 6% ST (p/v) en las muestras procedentes del MPC VIII. En estas muestras se obtuvo una concentración de etanol de 9,3 y 11,1 g/L, respectivamente (Tabla 4.14), que representan unos rendimientos de 0,36 g/g en ambos casos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con la configuración de SFS, por lo que en estas condiciones la etapa de presacarificación no supuso ninguna ventaja. Respecto al empleo del MPC IV, la suplementación con lacasa de las muestras al 10% ST (p/v) acortó la fase de adaptación de la levadura de 48 a 12 h, observándose el máximo de UFC/mL a las 24 h del proceso (Figura 4.15). Además, las tasas de consumo de glucosa y de producción de etanol fueron mayores, obteniéndose unos rendimientos finales de 0,33 g/g (Tabla 4.15). Sin embargo, al intentar aumentar la consistencia de sustrato y a pesar de la gran reducción en el contenido de los fenoles identificados (cercano al 95%), *K. marxianus* sufrió una pérdida de la viabilidad en las primeras 24 h que impidió la fermentación de los medios.

#### 4.4.3. Comparación de la viabilidad celular y de los procesos de producción de etanol entre las cepas *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 y *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red (Artículo IV)

A pesar de que el uso de cepas termotolerantes representa diferentes ventajas en la industria del etanol, las temperaturas a las cuales se realizan los procesos de fermentación pueden elevar la susceptibilidad de estas levaduras frente a los compuestos de degradación (Tomás-Pejó y col, 2009; Abdel-Banat y col., 2010). Por ello, como se ha podido observar en los apartados anteriores, la utilización de estos microorganismos es muy limitada en cuanto al empleo de materiales pretratados con un



alto contenido en inhibidores. En este contexto, nos propusimos evaluar los rendimientos obtenidos con la levadura termotolerante *K. marxianus* CECT 10875, comparándolos con una cepa industrial empleada comúnmente en la producción de etanol, *S. cerevisiae* Ethanol Red. Para ello, *S. cerevisiae* se estudió bajo las dos configuraciones de proceso descritas con anterioridad (SFS y PSFS), realizando un seguimiento de la viabilidad celular y de la producción de etanol. Asimismo, se realizó un proceso de destoxificación con la lacasa de *P. cinnabarinus*, de forma que también se pudo evaluar su potencial de combinación con diferentes cepas.

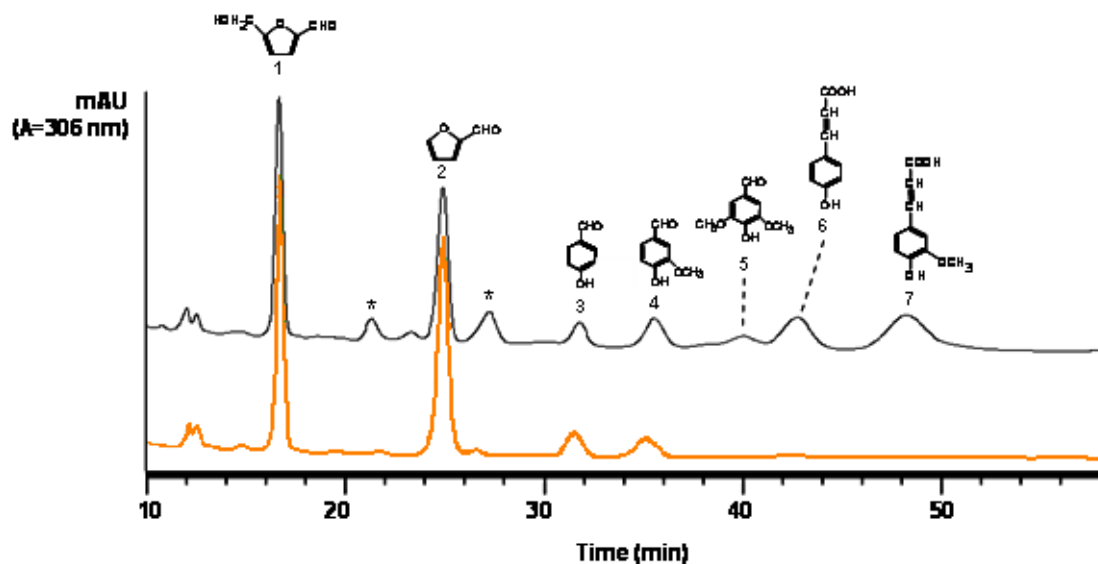
Al igual que en los procesos descritos en el apartado 4.4.2, la mezcla hidrolítica empleada para la sacarificación fue la mezcla estándar, mientras que como sustrato se utilizó el MPC VIII, ya que al obtenerse bajo unas condiciones de severidad alta (220 °C; 2,5 min), el contenido en productos de degradación es más importante y puede afectar en mayor medida a los microorganismos fermentativos. Asimismo, el tratamiento con lacasa fue similar al realizado en el anterior apartado. Así, en los procesos de SFS, el tratamiento con lacasa se llevó a cabo durante las 8 h previas a la adición del microorganismo y las enzimas hidrolíticas, mientras que en los procesos de PSFS el tratamiento con lacasa se realizó de forma simultánea al proceso de presacarificación. En cuanto a la consistencia de sustrato, las muestras inoculadas con *S. cerevisiae* se diluyeron al 6% ST (p/v) debido a que a esta concentración *K. marxianus* mostró una inhibición total del crecimiento. Además, *K. marxianus* no fue capaz de tolerar consistencias superiores, ni siquiera en aquellas muestras que habían sido tratadas con lacasa.

#### 4.4.3.1. Efecto del tratamiento con lacasa en la concentración de los compuestos inhibidores

En primer lugar, tras la etapa de destoxificación correspondiente, el tratamiento con lacasa se evaluó previo a la adición del microorganismo. Sin embargo, durante este estudio en lugar de identificar compuestos fenólicos individuales, se realizó una estimación del contenido fenólico total de las muestras, ya que como se puede observar en el cromatograma de la Figura 4.17 hay ciertos fenoles sobre los cuales puede actuar la lacasa y que no han sido identificados. En este sentido, el tratamiento con lacasa sin presacarificación disminuyó el contenido de los fenoles totales en un 67% (de 2,3 g/L



en las muestras control a 0,75 g/L en las muestras tratadas). Asimismo, las muestras que habían sido suplementadas con lacasa durante la etapa de presacarificación mostraron una reducción del contenido fenólico total del 73% (de 2,55 g/L a 0,70 g/L). Por el contrario, como en los apartados anteriores, la concentración de ácidos alifáticos y derivados del furano permaneció constante, como se indica en la Tabla 4.16.



**Figura 4.17.-** Comparación de los perfiles de cromatografía obtenidos mediante HPLC de los compuestos inhibidores presentes en las muestras control (negro) y tratadas con lacasa sin presacarificación (naranja). Compuestos identificados: 1, 5-HMF; 2, furfural; 3, 4-hidroxibenzaldehído; 4, vainillina; 5, siringaldehído; 6, ácido *p*-cumárico; 7, ácido ferúlico; \*, fenoles no identificados.

**Tabla 4.16.-** Concentración de los compuestos inhibidores identificados tras 8 h de tratamiento con lacasa, con y sin presacarificación, en las muestras del MPC VIII al 6% ST (p/v)

	Muestra	Furfural	5-HMF	Ácido acético	Ácido fórmico
Lacasa	C	579	152	2769	2098
	PC	566	150	2845	n.d.
Lacasa + Presacarificación	C	593	148	3032	2011
	PC	557	144	3064	n.d.

Los valores de concentración se expresan como mg/L.

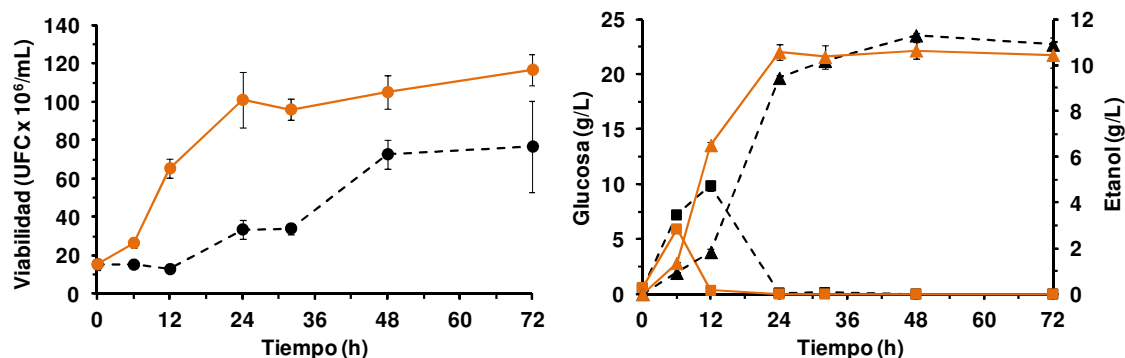
n.d., no determinado; C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*

Como se ha comentado previamente, la mejora de la acción de la lacasa por parte de la presacarificación se puede atribuir al efecto de fluidificación del medio por la acción de las enzimas hidrolíticas (Manzanares y col. 2011), lo que facilita el acceso de la lacasa a los fenoles. No obstante, la eliminación completa de todos los fenoles no fue posible dado que como ya se ha descrito y como se puede observar en la figura 4.17,

existe una acción selectiva de las lacasas frente a los diferentes compuestos fenólicos que limita su actuación (Jönsson y col., 1998; Larsson y col., 1999; Martín y col., 2002; Chandel y col., 2007; Jurado y col., 2009; Kolb y col., 2012).

#### 4.4.3.2. Estudio comparativo durante los procesos de SFS

Una vez evaluado el tratamiento con lacasa, las muestras obtenidas tras el tratamiento con lacasa sin presacarificación, se sometieron a un proceso de SFS utilizando la cepa *S. cerevisiae* Ethanol Red. Como se puede observar en la Figura 4.18, la fase de adaptación de *S. cerevisiae* en las muestras control se prolongó durante las primeras 12 h del proceso. Tras superar dicha fase, *S. cerevisiae* Ethanol Red mostró un incremento gradual de la viabilidad celular, obteniendo el mayor número de unidades formadoras de colonias a las 48 h de SFS. Sin embargo, la mayor parte de la producción de etanol tuvo lugar entre las 12 y las 24 h, alcanzando una concentración máxima de etanol de 11,3 g/L a las 48 h.



**Figura 4.18.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red durante los procesos de SFS al 6% ST (p/v) utilizando el MPC VIII (220 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

La fase de adaptación de una levadura depende en cierta medida de su capacidad para convertir determinados compuestos inhibidores como el furfural, el 5-HMF y diferentes aldehídos aromáticos como la vainillina y el siringaldehído a sus correspondientes formas alcohólicas con un menor poder de inhibición (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000b; Klinke y col., 2004). En este sentido, en comparación con los resultados observados con *S. cerevisiae* Ethanol Red, *K. marxianus* mostró una

inhibición completa del crecimiento bajo las mismas condiciones (Figura 4.10), a pesar de la habilidad de este microorganismo para asimilar la mayoría de los compuestos inhibitorios (Oliva y col., 2003).

Las diferentes temperaturas a las que se llevan a cabo los procesos de SFS (35 °C para *S. cerevisiae* Ethanol Red y 42 °C para *K. marxianus*) podría ser una de las razones que explicarían esta mayor sensibilidad de *K. marxianus* frente a los compuestos de degradación, ya que tras elevar la temperatura, las membranas biológicas se fluidifican y pierden su capacidad de actuar como una barrera física (Tomás-Pejó y col., 2009; Abdel-Banat y col., 2010).

Al igual que ocurría con los procesos de SFS donde se empleó *K. marxianus* como microorganismo fermentativo, el tratamiento con lacasa mejoró los procesos de SFS con *S. cerevisiae* Ethanol Red. En comparación a las muestras control, el proceso de destoxificación acortó la fase de adaptación de 12 a 6 h (Figura 4.18), incrementando significativamente el número de UFC/mL. Asimismo, el tratamiento con lacasa también mejoró las tasas de consumo de glucosa y de producción de etanol, incrementando los valores de productividad desde 0,39 a 0,44 g/L h (Tabla 4.17). No obstante, la concentración final de etanol no difirió mucho respecto a las muestras control, por lo que los cálculos relativos al rendimiento fueron similares.

**Tabla 4.17.-** Resumen relativo a los procesos de SFS (*S. cerevisiae* Ethanol Red) en los que se utilizó como sustrato el MPC VIII (220 °C; 2,5 min) al 6% ST (p/v)

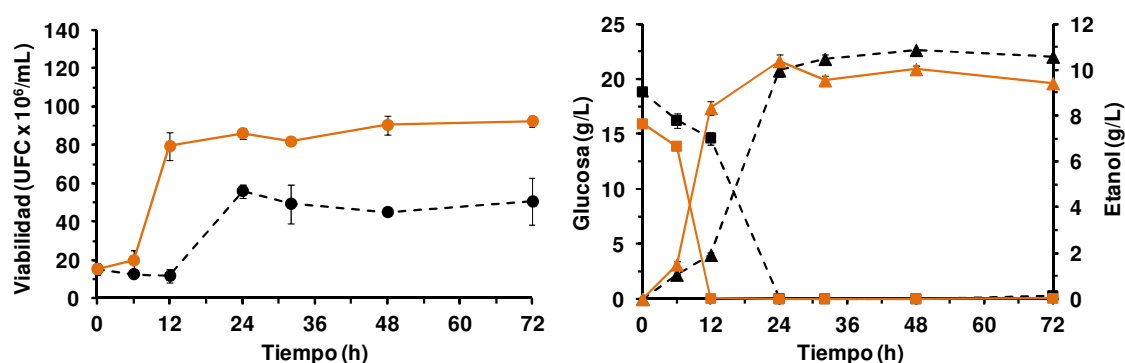
Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Y <sub>E/ET</sub> (%)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
C	11,3	0,37	71,9	0,39
PC	10,7	0,35	68,4	0,44

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente en el MPC; Y<sub>E/ET</sub>, porcentaje de etanol obtenido respecto al máximo teórico estequiométrico (0,51 g/g); Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada a las 24 h de proceso.

Tras equiparar estos resultados con los datos indicados en la Tabla 4.12 para el proceso de SFS con *K. marxianus*, se pudieron observar unas concentraciones de etanol (10,7 g/L) y rendimientos (0,35 g/g) similares. No obstante, sí se encontraron diferencias en relación al valor de productividad volumétrica calculada a las 24 h (0,36 g/L h frente a 0,44 g/L h con *K. marxianus* y *S. cerevisiae* Ethanol Red, respectivamente), por lo que el tratamiento con lacasa previo a los procesos de SFS puede representar una alternativa prometedora en combinación con cepas que presentan una menor tolerancia a inhibidores.

#### 4.4.3.3. Estudio comparativo durante los procesos de PSFS

Además de su evaluación en los procesos de SFS, *S. cerevisiae* Ethanol Red también se empleó para la fermentación del MPC que se había sometido a una etapa de prehidrólisis (PSFS). Bajo esta configuración, las muestras sometidas a una presacarificación mostraron un mayor incremento de la viabilidad celular entre las 12 y las 24 h, como se puede advertir en la Figura 4.19, en comparación a las muestras sometidas a los procesos de SFS sin presacarificación.



**Figura 4.19.-** Viabilidad celular (círculos), consumo de glucosa (cuadrados) y producción de etanol (triángulos) por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red durante los procesos de PSFS al 6% ST (p/v) utilizando el MPC VIII (220 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

Este resultado puede deberse a que la concentración de glucosa en el momento que se supera la fase de adaptación (12 h) fue mayor en el caso de las muestras de PSFS. Asimismo, a pesar de que la concentración final de etanol fue muy similar (10,8 g/L), sus tasas de producción también fueron relativamente superiores (0,41 frente a 0,39 g/L h) bajo esta configuración, tal y como se indica en la Tabla 4.18.

**Tabla 4.18.-** Resumen relativo a los procesos de PSFS (*S. cerevisiae* Ethanol Red) en los que se utilizó como sustrato el MPC VIII (220 °C; 2,5 min) al 6% ST (p/v)

Muestra	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Y <sub>E/ET</sub> (%)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
C	10,8	0,35	68,5	0,41
PC	10,4	0,34	66,1	0,43

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente en el MPC; Y<sub>E/ET</sub>, porcentaje de etanol obtenido respecto al máximo teórico estequiométrico (0,51 g/g); Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada a las 24 h de proceso.

Estos resultados corroboran una mayor resistencia de *S. cerevisiae* Ethanol Red frente a la presencia de los compuestos inhibidores en comparación a *K. marxianus*, ya que esta última cepa fue incapaz de fermentar los medios bajo las mismas condiciones de cultivo (Figura 4.14).

Al igual que ocurría en los procesos de SFS, la suplementación con lacasa durante la etapa de presacarificación mejoró los procesos de fermentación, incrementando significativamente la viabilidad celular y las tasas relativas al consumo de glucosa y a la producción de etanol. En este contexto, la fase de adaptación se redujo de 12 a 6 h, alcanzándose el mayor número de UCF/mL a las 12 h de proceso (Figura 4.19). Asimismo, los valores de productividad volumétrica incrementaron ligeramente desde 0,41 g/L h a 0,43 g/L h, mientras que la concentración de etanol y los rendimientos obtenidos se mantuvieron en valores similares a los observados para las muestras control (Tabla 4.18).

En comparación con los procesos donde se utilizó *K. marxianus* como microorganismo fermentativo, el tratamiento con lacasa también mejoró la productividad volumétrica por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red bajo una configuración de PSFS. Sin embargo, la concentración final de etanol así como los rendimientos globales del proceso no presentaron grandes diferencias, al igual que ocurría bajo la configuración de SFS. De esta manera, los procesos de destoxificación *in situ* con lacasas deberían tenerse en cuenta durante los procesos de producción de etanol dado su potencial de aplicación no sólo en relación a la utilización de cepas sensibles a los inhibidores, sino también en los procesos de fermentación donde se usen cepas más robustas como *S. cerevisiae* Ethanol Red.

#### 4.4.4. Mejora de la fermentabilidad del MPC en los procesos de SCFS a altas cargas de sustrato tras el tratamiento *in situ* con lacasa (Artículo V)

Una de las ventajas directas que derivan del uso del MPC para la producción de etanol es la presencia en los medios de los azúcares solubilizados durante el pretratamiento, los cuales pueden ayudar a incrementar la concentración final del producto. Dado que los azúcares en forma soluble provienen principalmente de la fracción hemicelulósica, siendo el arabinoxilano mayoritario en la paja de trigo, la xilosa constituye el segundo azúcar más importante del MPC en términos de

concentración. En datos numéricos, el contenido en xilosa de los residuos agrícolas como la paja de trigo puede constituir hasta el 30% de los azúcares totales, por lo que el empleo de microorganismos capaces de fermentar la glucosa y la xilosa de forma simultánea resultan de gran importancia para el eficiente aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos.

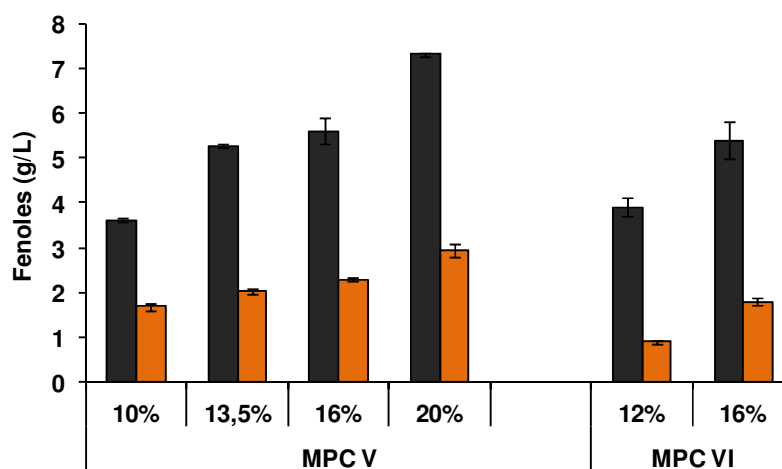
*S. cerevisiae* F12 es un ejemplo de microorganismo capaz de asimilar y fermentar tanto la glucosa como la xilosa presentes en un mismo medio de cultivo. Esta cepa se ha obtenido a partir de la cepa parental *S. cerevisiae* F, mediante la sobreexpresión del gen endógeno que codifica para la enzima xiluloquinasa (XK) y la incorporación en su genoma de los genes que codifican las enzimas xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH) procedentes de la levadura *Scheffersomyces stipitis* (Sonderegger et al, 2004). Además, esta estirpe ha sido adaptada mediante un proceso de ingeniería evolutiva a los tóxicos presentes en el prehidrolizado obtenido tras el pretratamiento por EV de la paja de trigo (Tomás-Pejó et al, 2010), por lo que puede tolerar concentraciones superiores de los diferentes compuestos inhibidores en comparación al microorganismo parental. En estudios previos, esta cepa se ha empleado con éxito para producir etanol a partir de paja de trigo pretratada por EV, mostrando su capacidad de conversión de la xilosa y alcanzando unos rendimientos de hasta 0,26 g/g (Panagiotou y Olsson, 2007; Tomás-Pejó et al, 2008). Considerando estos datos, y en colaboración con la Universidad Tecnológica de Chalmers en Suecia, se propuso utilizar *S. cerevisiae* F12 para intentar fermentar todos los azúcares presentes en el MPC de la paja de trigo y aumentar de esa forma la concentración final de etanol, haciendo el proceso más favorable desde el punto de vista económico.

Para la realización de este estudio se tuvieron en cuenta los resultados de optimización obtenidos con *K. marxianus* CECT 10875, por lo que los procesos de hidrólisis y fermentación se integraron bajo una configuración de sacarificación y co-fermentación simultánea (SCFS), utilizando como sustrato el MPC V (200 °C; 2,5 min) a consistencias de entre 10-20% ST (p/v). Además, con el fin de mejorar la etapa de sacarificación y gracias a la mayor tolerancia de *S. cerevisiae* F12 frente a los diferentes productos de degradación, también se utilizó como sustrato el MPC VI (210 °C; 2.5 min), obtenido a una mayor severidad. Bajo estas condiciones, el tratamiento con lacasa (12 h) previo a los procesos de SCFS se propuso como método de destoxificación para reducir la toxicidad de los medios e incrementar la concentración final de etanol, al

permitir trabajar a mayores consistencias de sustrato tal y como se ha mostrado en los apartados anteriores. Por último, cabe mencionar que en este punto los procesos de sacarificación se llevaron a cabo mediante el empleo de la mezcla hidrolítica Cellic en lugar de la mezcla estándar, debido a la posibilidad que ofrece esta mezcla respecto a la mejora de los rendimientos de sacarificación. Además, la mezcla Cellic presenta una mayor actividad xilanas y otras actividades secundarias como las polisacárido-monooxigenasas (PMO), que permiten mejorar los rendimientos de hidrólisis de la celulosa e incrementar la concentración de xilosa en los medios.

#### 4.4.4.1. Efecto del tratamiento con lacasa en los compuestos fenólicos

Antes de comenzar con los procesos de SCFS, el tratamiento con lacasa se evaluó en función del contenido fenólico total de las muestras. Como se puede observar en la Figura 4.20, tras el tratamiento con lacasa las muestras redujeron el contenido en fenoles totales entre un 50% y un 80%, en comparación a las muestras que no fueron tratadas.



**Figura 4.20.-** Contenido en fenoles totales de las muestras control (negro) y tratadas con lacasa (naranja) relativas a diferentes diluciones del MPC V (200 °C; 2,5 min) y VI (210 °C; 2,5 min), previo a los procesos de SCFS con *S. cerevisiae* F12

Si tenemos en cuenta la concentración de fenoles, el efecto de la destoxificación por lacasas fue más pronunciado a medida que se incrementó la consistencia del sustrato. De esta manera, con el MPC V se observó una reducción de aproximadamente 2 g/L al 10% ST (p/v), mientras que al incrementar la consistencia hasta el 20% ST

(p/v) el contenido fenólico total disminuyó unos 4,5 g/L. Asimismo, en el caso del MPC VI, las muestras al 12% ST (p/v) redujeron en 3 g/L su contenido fenólico tras el tratamiento con lacasa, mientras que en las muestras al 16% ST (p/v) el proceso de destoxificación disminuyó 3,6 g/L de los fenoles totales. Por otro lado, en términos de eficiencia catalítica, el tratamiento con lacasa en las muestras relativas al MPC V disminuyó alrededor de un 60% los fenoles totales en todos los casos, mientras que en las muestras procedentes del MPC VI se observó un descenso desde el 77% al 67% tras aumentar la concentración del 12% al 16% ST (p/v).

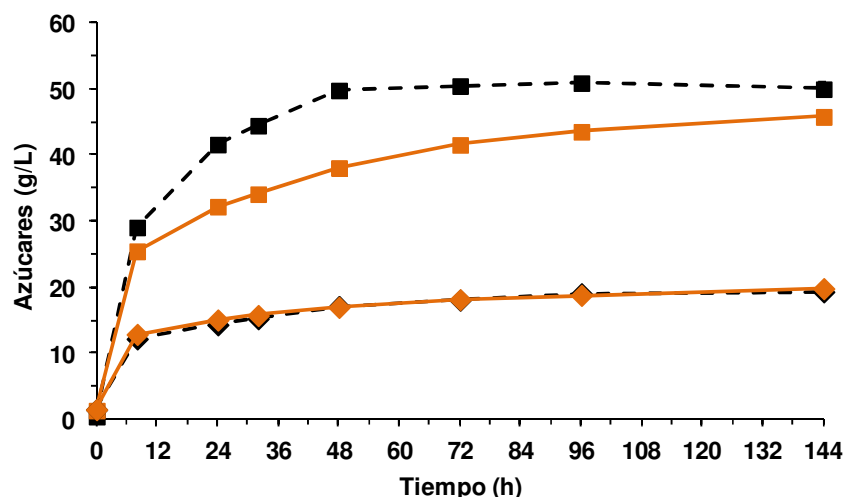
En este punto, debe tenerse en cuenta que los valores de eficiencia más altos se obtuvieron con el MPC VI. Este resultado puede explicarse debido a las posibles diferencias que podrían existir entre las viscosidades de ambos materiales pretratados. En el caso del MPC VI, la mayor severidad de pretratamiento conduce a una mayor descomposición de las fibras lignocelulósicas (Samaniuk y col., 2011), lo que contribuye a aumentar el mezclado de las muestras y facilitar la accesibilidad tanto de las enzimas hidrolíticas como de la lacasa a la celulosa y a los compuestos fenólicos, respectivamente. En este contexto, tras aumentar la consistencia del sustrato de las muestras pueden aparecer problemas de transferencia de masa que dificulten el mezclado de todos los componentes, limitando la homogeneidad de la suspensión e impidiendo el acceso de la lacasa a los fenoles presentes en estos medios. Por ello, el descenso de la eficiencia del tratamiento con lacasa del 77% al 67% pudo deberse a un aumento en la viscosidad tras el aumento de la consistencia del 12% al 16% ST (p/v). Por otro lado, los resultados similares en relación a los valores de eficiencia catalítica por parte de la lacasa en las muestras del MPC V podrían explicarse debido a que tras un punto determinado de estrés, éste deja de ser dependiente de la concentración de la muestra y se comporta de forma independiente (Viamajala y col., 2009).

#### 4.4.4.2. Efectos del tratamiento con lacasa durante la etapa de sacarificación

Dado que la concentración de azúcar se correlaciona directamente con la producción de etanol y que una disminución en los rendimientos de sacarificación puede afectar de forma negativa el proceso, al igual que en los apartados previos se valoró el efecto del tratamiento con la lacasa durante la etapa de HE del MPC VI. Como se



observa en la Figura 4.21, en consonancia con los ensayos anteriores, las muestras tratadas con lacasa mostraron una liberación de glucosa más lenta durante la etapa de sacarificación, alcanzando a su vez una menor concentración máxima de este azúcar en comparación a las muestras que no habían sido tratadas. De este modo, mientras que en las muestras control la concentración máxima de glucosa (50,9 g/L) se alcanzó transcurridas las primeras 48 h del proceso, las muestras tratadas con lacasa mostraron un incremento paulatino a lo largo de 144 h, obteniéndose asimismo una concentración máxima de glucosa (45,8 g/L) inferior. Por el contrario, en el caso de la xilosa el tratamiento con lacasa no mostró ningún efecto durante el proceso de sacarificación, obteniéndose una concentración final de este azúcar similar, tanto en el caso de las muestras control (19,3 g/L) como en aquellas que habían sido previamente tratadas con lacasa (19,8 g/L).



**Figura 4.21.-** Concentraciones de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) durante el proceso de HE con la mezcla Cellic utilizando el MPC VI (210 °C; 2,5 min) al 16% ST (p/v) de consistencia. Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

Como se ha explicado a lo largo de la presente Tesis, el efecto negativo observado durante los procesos de sacarificación en las muestras tratadas con lacasa puede ser atribuido a varias causas entre las que se incluyen la inhibición o desactivación de las celulasas por los productos generados por la acción de la lacasa, el aumento en las uniones improductivas de las enzimas hidrolíticas y/o el fortalecimiento

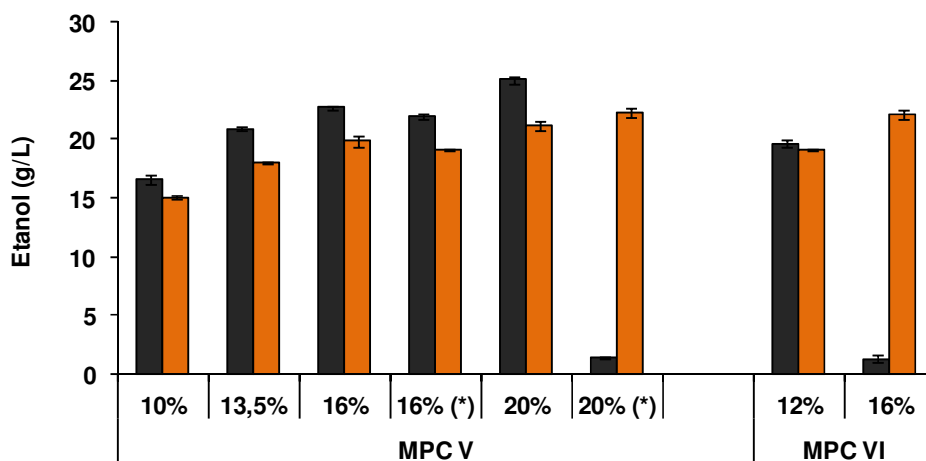
de las uniones relativas a los complejos lignina-carbohidratos (Moilanen y col., 2011; Tejirian y Xu, 2011).

#### 4.4.4.3. Viabilidad celular y producción de etanol en los procesos de SCFS

Teniendo en cuenta la evaluación previa donde se estableció la configuración SFS como óptima para el empleo del MPC de la paja de trigo pretratada por EV, las muestras control y tratadas con lacasa diluidas a una consistencia entre el 10% y el 20% ST (p/v), se sometieron a un proceso de SCFS utilizando la cepa evolucionada y fermentadora de xilosa *S. cerevisiae* F12. Como ya se ha mencionado, el uso de levaduras capaces de fermentar la xilosa y que además toleren mayores concentraciones de inhibidores ofrecen un gran potencial para incrementar las concentraciones finales de etanol, gracias tanto a la posibilidad de conversión de todos los azúcares presentes en los materiales lignocelulósicos, como a la oportunidad de trabajar a altas cargas de sustrato (Tomás-Pejó y col., 2010).

Otro aspecto importante que se evaluó en este estudio fue la privación de una fuente de nitrógeno externa (en este caso el DAP [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]), ya que el nitrógeno es considerado como uno de los elementos fundamentales para el crecimiento de un microorganismo y repercute de forma directa en los costes del proceso. Bajo condiciones anaerobias se ha determinado que el nitrógeno es esencial para la proliferación celular, permitiendo aumentar la tasa de producción de etanol de una levadura que se encuentre en una fase de crecimiento activo (Devantier y col., 2005; Jørgensen, 2009). De forma intuitiva, resulta obvio afirmar que el crecimiento de un determinado microorganismo y su robustez están muy influenciados por la composición del medio, por lo que la falta de una buena fuente de nitrógeno junto a una alta concentración de compuestos inhibidores puede resultar en una disminución de los rendimientos de fermentación. En este sentido, una etapa de destoxificación enzimática previa a la inoculación del microorganismo podría reducir el efecto sinérgico de los inhibidores, permitiendo llevar a cabo los procesos de fermentación sin la adición de nitrógeno adicional y, consecuentemente, aliviando los costes de producción de etanol.

La Figura 4.22 muestra la producción de etanol obtenido en este estudio después de diferentes procesos de SCFS de 144 h en los que se utilizó como sustrato el MPC V y el MPC VI.

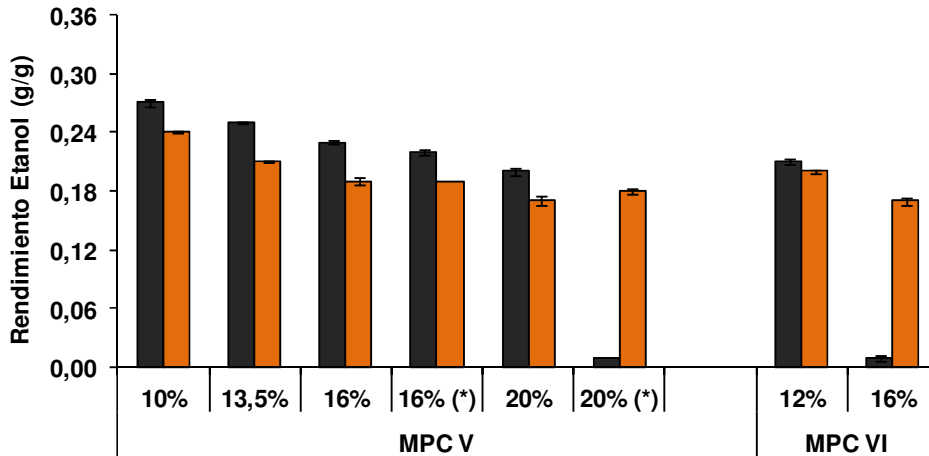


**Figura 4.22.-** Concentración de etanol máxima alcanzada durante los procesos de SCFS (144 h) utilizando la levadura *S. cerevisiae* F12 como microorganismo fermentativo y los MPC V (200 °C; 2,5 min) y VI (210 °C; 2,5 min) como sustratos a diferentes consistencias de % ST (p/v). Aquellas muestras que no fueron suplementadas con DAP se identifican con (\*). Asimismo, las muestras control se identifican en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan en naranja.

Como se puede observar, tanto en las muestras control como en las tratadas con lacasa, la concentración final de etanol se incrementó de manera proporcional al aumento de la consistencia, alcanzando la concentración más alta (25,0 g/L) con las muestras sin tratar del MPC V al 20% ST (p/v).

Por otro lado, cuando se tuvo en cuenta toda la glucosa y xilosa potencialmente fermentables presentes en las muestras (para ello se consideró a su vez la glucosa presente en la mezcla Cellic de forma intrínseca), los cálculos de rendimiento mostraron un efecto contrario, de manera que a medida que se incrementaba la consistencia del sustrato, los rendimientos disminuyeron (Figura 4.23). En el caso de las muestras control del MPC V, los rendimientos de etanol disminuyeron del 0,27 al 0,20 g/g tras aumentar la concentración del sustrato del 10% al 20% ST (p/v). Esta disminución en los rendimientos finales tras incrementar la consistencia del sustrato también ha sido descrita por otros autores (Kristensen y col., 2009; Wang y col., 2011). En estos trabajos, dichos autores pudieron establecer una correlación entre el incremento en la consistencia del sustrato y la disminución de los rendimientos de HE, explicando de esta forma la disminución en los rendimientos de producción de etanol. Aunque hay muchos factores que pueden afectar a las enzimas hidrolíticas, tales como la inhibición por

producto final, las uniones improductivas o la desactivación y la desnaturalización (Jørgensen y col., 2007a), parece ser que al trabajar bajo consistencias de sustrato altas se produce una disminución en la capacidad de unión de las enzimas a la celulosa y una dificultad en el mezclado de las muestras, que provoca la reducción en los rendimientos de HE (Kristensen y col., 2009; Wang y col., 2011).

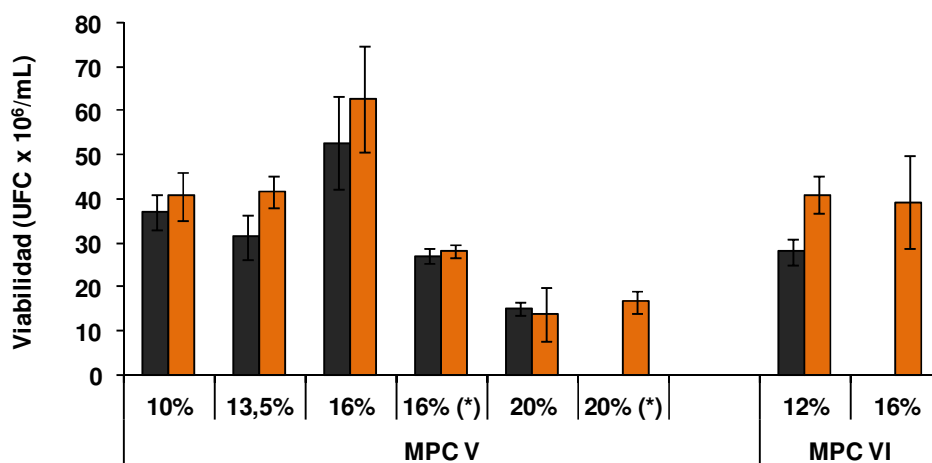


**Figura 4.23.-** Rendimientos de etanol obtenidos durante los procesos de SCFS (144 h) con la levadura *S. cerevisiae* F12 calculados a partir de la cantidad total de glucosa y xilosa presente en las muestras del MPC V (200 °C; 2,5 min) y VI (210 °C; 2,5 min) a diferentes consistencias de sustrato (% ST (p/v)). Aquellas muestras que no fueron suplementadas con DAP se identifican con (\*). Asimismo, las muestras control se identifican en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan en naranja.

Como se ha mencionado con anterioridad, las muestras que habían sido tratadas con lacasa mostraron efectos similares en relación a la producción y a los rendimientos de etanol. Sin embargo, en comparación con los procesos donde no se realizó el tratamiento con lacasa, los valores relativos a estos parámetros fueron inferiores en todos los casos. Este fenómeno se puede explicar en base a la menor concentración de glucosa liberada durante la sacarificación de las muestras, debido al menor poder de actuación de las enzimas hidrolíticas en presencia de la lacasa (Figura 4.21).

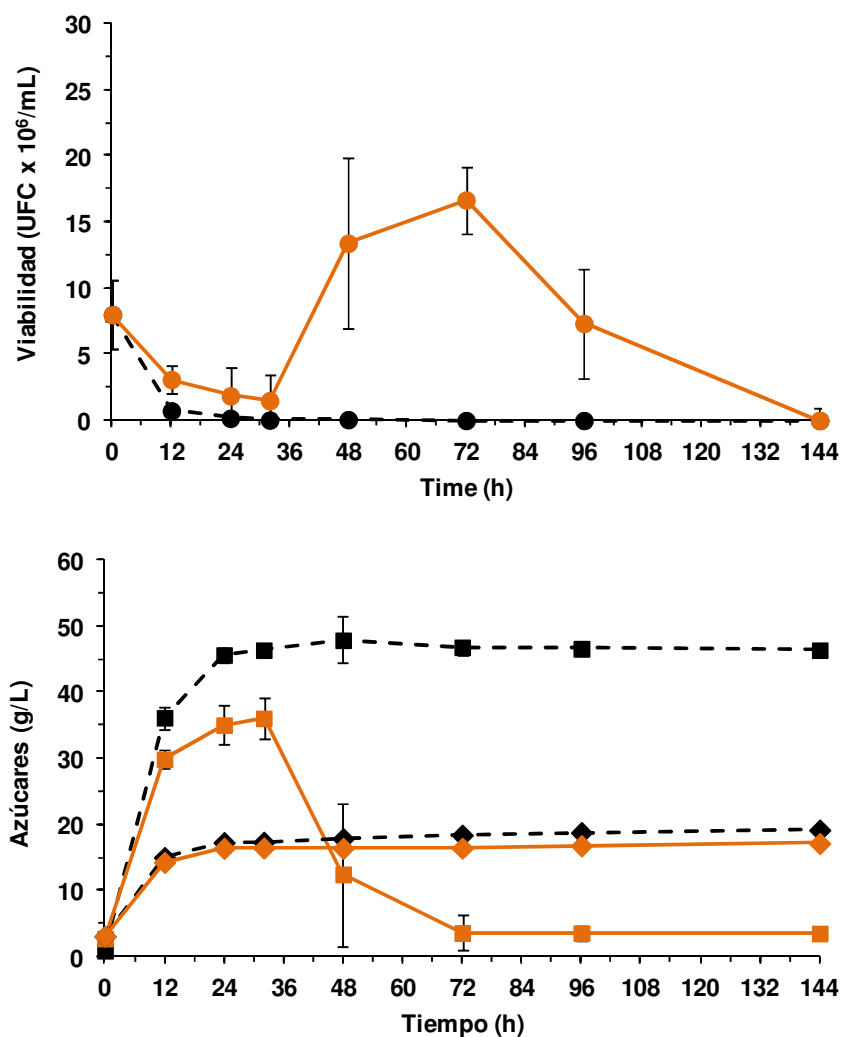
Al igual que en los ensayos de SFS y PSFS con *K. marxianus* CECT 10875 y *S. cerevisiae* Ethanol Red, además de la producción de etanol también se llevó a cabo un seguimiento de la viabilidad celular en base al número de UFC/mL. En este sentido, la

Figura 4.24 muestra los valores máximos de UFC/mL obtenidos durante los procesos de SCFS con el MPC V y VI, bajo diferentes cargas de sustrato.



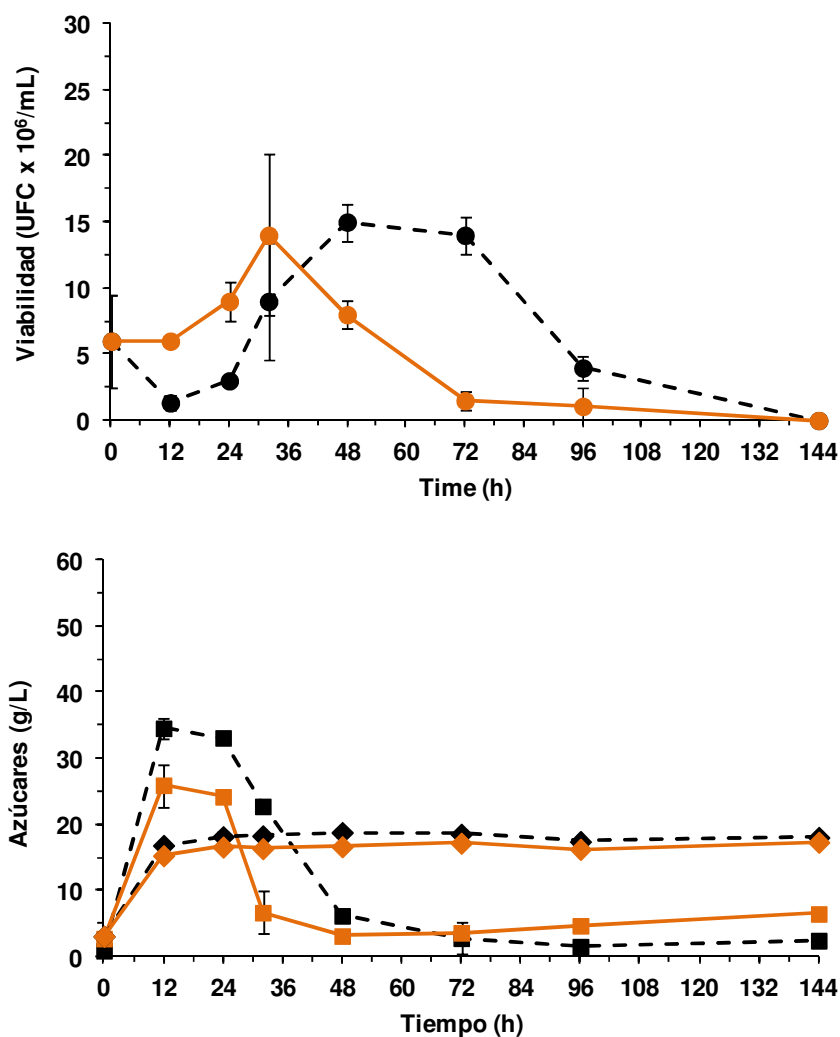
**Figura 4.24.-** Valores máximos de UFC/mL correspondientes a las muestras del MPC V (200 °C; 2,5 min) y VI (210 °C; 2,5 min) a diferentes consistencias de sustrato (% ST (p/v)) durante los procesos de SCFS (144 h) con la levadura *S. cerevisiae* F12. Aquellas muestras que no fueron suplementadas con DAP se identifican con (\*). Asimismo, las muestras control se identifican en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan en naranja.

Como se observa en la Figura 4.24, en el caso de las muestras correspondientes al MPC V a bajas consistencias de sustrato (10-16% ST (p/v)), la viabilidad mejoró al aumentar la consistencia. Sin embargo, en el caso de las muestras al 20% ST (p/v) con y sin DAP y las muestras al 16% ST (p/v) sin DAP, la viabilidad celular sufrió una clara disminución. Este descenso de la viabilidad podría deberse a una mayor concentración de inhibidores a altas cargas de sustrato, lo que puede ejercer un mayor efecto en las células. Asimismo, como se observa en la Figura 4.25, en el caso de las muestras diluidas a una consistencia del 20% ST (p/v), tras suprimir el aporte extra de nitrógeno los controles no sólo experimentaron una disminución de la viabilidad, sino que no se observó crecimiento alguno. Por el contrario, las células inoculadas en los medios que habían sido previamente tratados con lacasa fueron capaces de crecer, alcanzando un valor de  $1,7 \times 10^7$  UFC/mL.



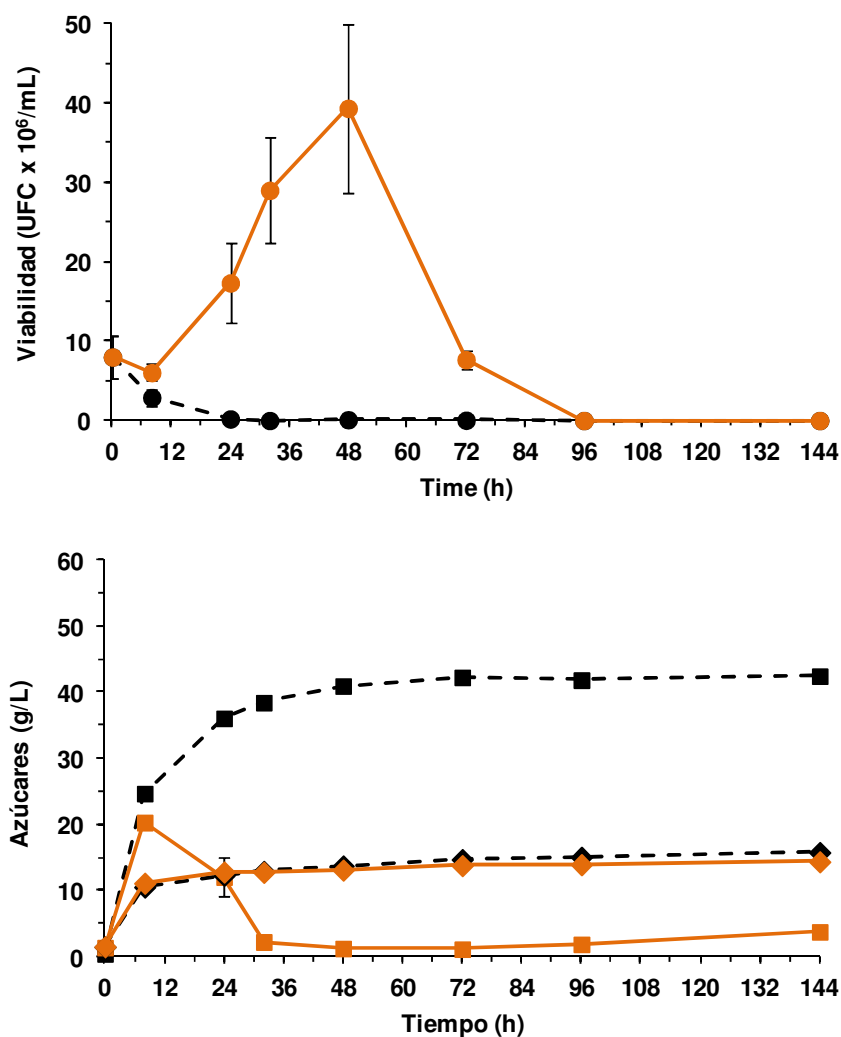
**Figura 4.25.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* F12 durante los procesos de SCFS al 20% ST (p/v) sin DAP utilizando el MPC V (200 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

En comparación con los resultados obtenidos con las muestras suplementadas con DAP, mostrados en la Figura 4.26, la supresión de nitrógeno incrementó la fase de adaptación de *S. cerevisiae* F12 de 12 a 32 h, permitiendo una acumulación en el medio de la glucosa y la xilosa liberadas por la acción de las enzimas celulolíticas. No obstante, en comparación con las muestras sin tratar, la disminución del contenido fenólico total tras el tratamiento con lacasa pudo prevenir la inhibición del crecimiento y producir una concentración de etanol de 22,3 g/L, una cantidad similar a la obtenida en las muestras tratadas con lacasa y suplementadas con DAP (Figura 4.22).



**Figura 4.26.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* F12 durante los procesos de SCFS al 20% ST (p/v) con DAP utilizando el MPC V (200 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

Por otro lado, en la Figura 4.27 se puede visualizar que cuando se utilizó el MPC VI, sustrato obtenido bajo unas condiciones de pretratamiento más severas, las muestras al 16% ST (p/v) que no habían sido tratadas con lacasa inhibieron totalmente el crecimiento de *S. cerevisiae* F12 incluso con DAP como fuente de nitrógeno.

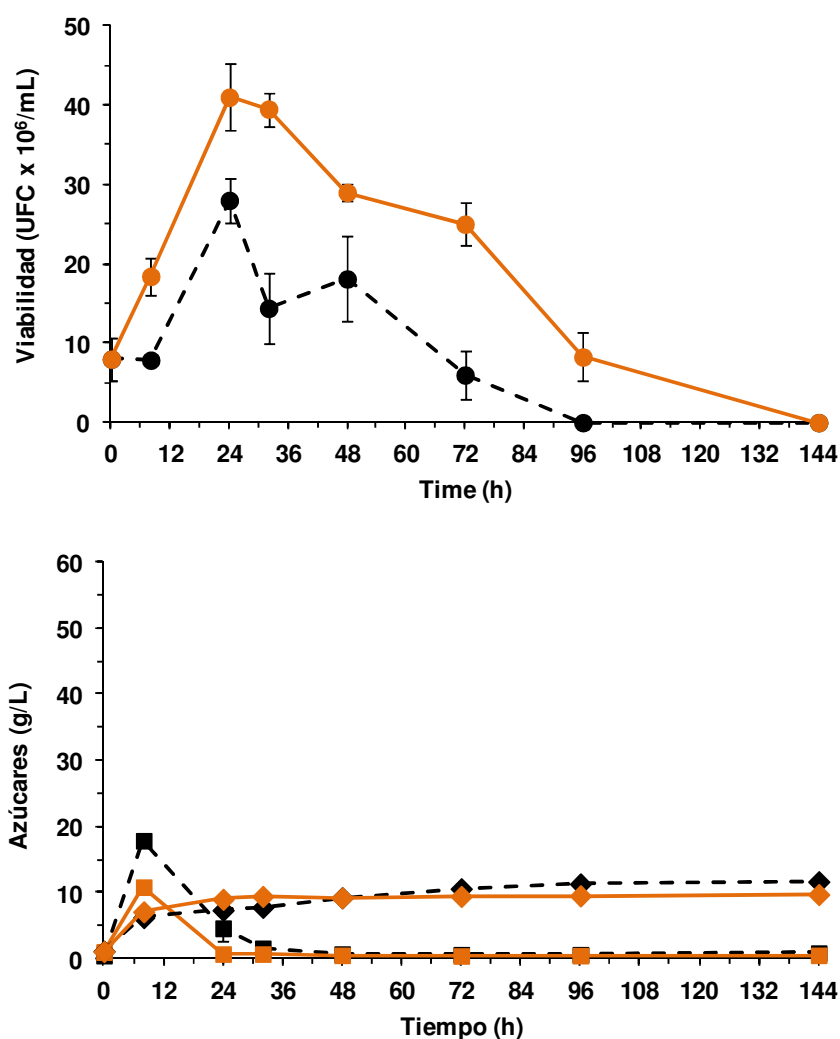


**Figura 4.27.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* F12 durante los procesos de SCFS al 16% ST (p/v) utilizando el MPC VI (210 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

En este caso, al igual que se ha descrito para las muestras del MPC V al 20% ST (p/v) sin DAP, durante todo el proceso no se pudo observar ni consumo de azúcar ni producción de etanol. Sin embargo, en el caso de las muestras que habían sido tratadas con lacasa de forma previa a la inoculación del microorganismo, *S. cerevisiae* F12 pudo crecer y producir 22,1 g/L de etanol, concentración superior a las obtenidas con las muestras sin tratar (19,6 g/L) y tratadas (19,1 g/L) al 12% ST (p/v). Asimismo, la reducción del contenido fenólico por parte de la lacasa en las muestras al 12% ST (p/v)



permitió reducir la fase de adaptación de *S. cerevisiae* F12, tal y como se observa en la Figura 4.28.



**Figura 4.28.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* F12 durante los procesos de SCFS al 12% ST (p/v) utilizando el MPC VI (210 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

Un aspecto importante derivado de este estudio que hay que destacar es, que además de la reducción en la fase de adaptación del microorganismo al medio de fermentación, el tratamiento con lacasa permitió incrementar el número máximo de UFC/mL durante todos los procesos de SCFS (Figura 4.24), a excepción de las muestras del MPC V al 20% ST (p/v) con DAP. Al igual que se ha observado con *K. marxianus*

CECT 10875 y *S. cerevisiae* Ethanol Red, el menor contenido fenólico de las muestras tratadas con lacasa disminuye la toxicidad de los medios, lo que permite a las células sobrevivir y crecer con mayor facilidad. Respecto a las muestras del MPC V al 20% ST (p/v), a pesar de la desviación observada se podría decir que el menor valor de UFC/mL medido (Figura 4.24) puede deberse a que tras el tratamiento con lacasa la eficiencia de HE es menor (Figura 4.21). Como consecuencia, la concentración de glucosa disponible para la levadura es también menor (Figura 4.26), lo que limita el crecimiento del microorganismo.

Como se muestra en las Figuras 4.25-4.28, durante los procesos de SCFS la glucosa y xilosa se acumularon durante la fase de adaptación del microorganismo. Posteriormente, *S. cerevisiae* F12 comenzó a consumir la glucosa mientras que la concentración de xilosa no mostró una disminución clara. De forma general se puede observar un retraso en el consumo de la xilosa en presencia de glucosa, ya que estos dos azúcares comparten el transportador por el cual son incorporados en las células (Meinander y col., 1999). Además, el estrés sufrido por la levadura, debido a la elevada toxicidad de los medios de fermentación, produjo una reducción de la viabilidad celular después de consumir la glucosa, limitando la fermentación de xilosa y explicando las altas concentraciones de este azúcar al final de los procesos (Figuras 4.25-4.28). Sin embargo, a pesar de que pueda parecer que *S. cerevisiae* F12 no consume xilosa, las leves diferencias en las concentraciones finales de este azúcar entre las muestras tratadas y sin tratar, muestran evidencias de un co-consumo de xilosa (Figuras 4.25 y 4.27). No obstante, la liberación continua de glucosa y xilosa a partir de la fracción sólida durante el proceso de SCFS hace difícil la determinación de los rendimientos de conversión de estos azúcares.

#### 4.4.5. Efecto de la suplementación con lacasas durante la sacarificación y co-fermentación simultánea en fed-batch (Artículo VI)

Con el fin de poder incrementar el consumo de xilosa y, por consiguiente, los rendimientos finales de conversión del MPC obtenido mediante EV de la paja de trigo, se decidió evaluar otra cepa recombinante fermentadora de pentosas, *S. cerevisiae* KE6-12. Esta estirpe se obtuvo mediante la combinación de diferentes estrategias de ingeniería evolutiva y mutagénesis al azar, a partir de la cepa parental *S. cerevisiae*

TBM 3400 (Albers y col., resultados no publicados; Koppram y col., 2013), la cual presenta las mismas características genéticas que *S. cerevisiae* F12 (sobreexpresión del gen endógeno XK e incorporación en su genoma de los genes XR y XDH de *S. stipitits*). Al igual que el apartado anterior, este trabajo se realizó en colaboración con el Grupo de Biotecnología Industrial de la Universidad Tecnológica de Chalmers (Suecia). La elección de la levadura se produjo en base a los excelentes resultados, tanto a nivel de laboratorio como a escala piloto y de demostración, obtenidos previamente por Koppram y col. (2013). En dicho trabajo, los autores mostraron que a escala de demostración (reactores de 10 m<sup>3</sup>) *S. cerevisiae* KE6-12 es capaz de asimilar toda la xilosa presente en un hidrolizado obtenido tras el pretratamiento mediante EV en condiciones ácidas del residuo de las mazorcas de maíz, con unos rendimientos de conversión a etanol del 90% respecto al máximo teórico.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el punto anterior con *S. cerevisiae* F12 mostraron unos rendimientos finales bajos, motivados principalmente por una sacarificación ineficiente, por lo que durante el presente estudio también nos propusimos mejorar la etapa de HE. Sin embargo, como se ha evaluado y descrito previamente al emplear *K. marxianus* CECT 10875 como microorganismo fermentativo, la estrategia de presacarificación como mejora de la HE no supuso ninguna ventaja en los procesos de producción de etanol al utilizar el MPC como sustrato. Por ello, nos propusimos evaluar otra estrategia que nos permitiese obtener unos mayores niveles de azúcares fermentables durante la etapa de sacarificación. Entre las opciones disponibles nos decantamos por la adición gradual de sustrato, es decir, la realización de los procesos en semicontinuo o *fed-batch*. Con esta estrategia, el sustrato puede incorporarse al sistema de producción de etanol (en este caso SCFS) a diferentes tiempos previamente establecidos, de manera que al inicio del proceso las cargas del sustrato son bajas y se van incrementando gradualmente a medida que transcurre el tiempo de reacción.

Para llevar a cabo este estudio decidimos utilizar la mezcla Cellic como preparación enzimática para la sacarificación y el MPC VI (210 °C; 2,5 min) como sustrato. La principal razón por la cual se decidió utilizar dicho sustrato fue porque la levadura *S. cerevisiae* KE6-12 fue evolucionada para incrementar su tolerancia frente a los tóxicos, por lo que nos podría permitir trabajar a cargas de sustrato similares a las que habíamos trabajado con *S. cerevisiae* F12. Además, el MPC VI presenta una mayor

fracción de celulosa respecto al MPC V (200 °C; 2,5 min) (Tabla 4.3), por lo que las concentraciones de glucosa que se pueden alcanzar en los medios de fermentación pueden ser mayores.

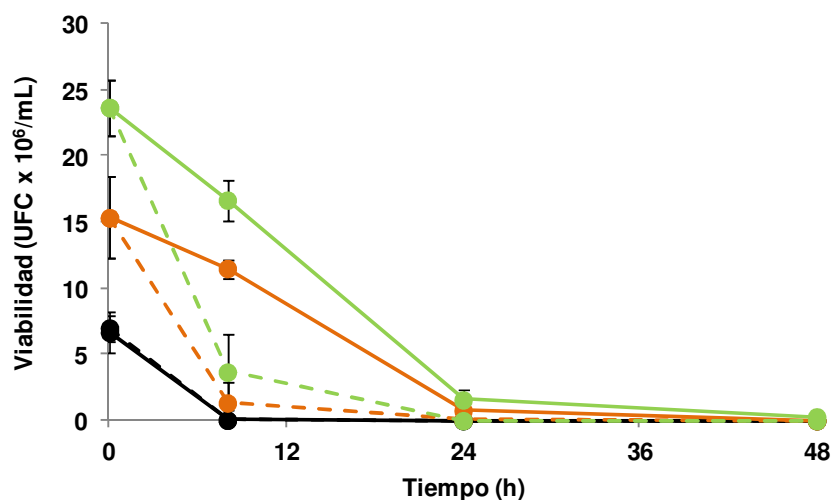
#### 4.4.5.1. Estudio de fermentabilidad de la fracción líquida o prehidrolizado

A pesar de que los datos obtenidos por [Koppram y col. \(2013\)](#) hacen de *S. cerevisiae* KE6-12 una levadura muy adecuada para la realización de los procesos de SCFS, la composición de los medios de fermentación influye de forma significativa en el crecimiento y viabilidad de un determinado microorganismo. De esta forma, dado que en nuestro caso empleamos la paja de trigo como sustrato en lugar de utilizar el residuo obtenido de las mazorcas de maíz, en primer lugar se realizó una evaluación de la fermentabilidad de los prehidrolizados obtenidos tras la separación de las fracciones sólidas y líquidas del MPC VI. Además, con este procedimiento también se pretendía observar la capacidad de asimilación de xilosa por parte de *S. cerevisiae* KE6-12.

En primer lugar, la fracción líquida se diluyó a una concentración equivalente del MPC del 14% ST (p/v) y se sometió a una etapa de prehidrólisis de 24 h con la mezcla Cellic para convertir los azúcares oligoméricos en monómeros fermentables. Asimismo, las muestras se sometieron a un tratamiento con lacasa durante las últimas 3 h de presacarificación, utilizando para este tratamiento la lacasa de *P. cinnabarinus*. Una vez realizada la presacarificación, las muestras se inocularon con 1, 3 ó 5 g/L (peso seco) de *S. cerevisiae* KE6-12 para evaluar al mismo tiempo el efecto del tamaño de inóculo.

Como se observa en la Figura 4.29, en el caso de las muestras control el número de UFC/mL se redujo rápidamente, independientemente del tamaño de inóculo. Por otro lado, tras el tratamiento con lacasa se pudo observar un efecto positivo en el número de UFC/mL dependiente del tamaño de inóculo, de manera que la supervivencia celular fue más significativa a medida que el tamaño de inóculo era mayor. Este resultado puede explicarse gracias a una disminución del 73% (de 4,8 g/L a 1,3 g/L) del contenido fenólico total en las muestras que habían sido tratadas respecto a las que no. A pesar de esta mejora de la viabilidad celular, la concentración de los inhibidores que aún quedaron en los medios (ácidos alifáticos, derivados del furano y aquellos fenoles que no se vieron afectados tras el tratamiento con la lacasa) provocaron un gran nivel de estrés en las células. Como consecuencia, éstas murieron poco después de agotar la

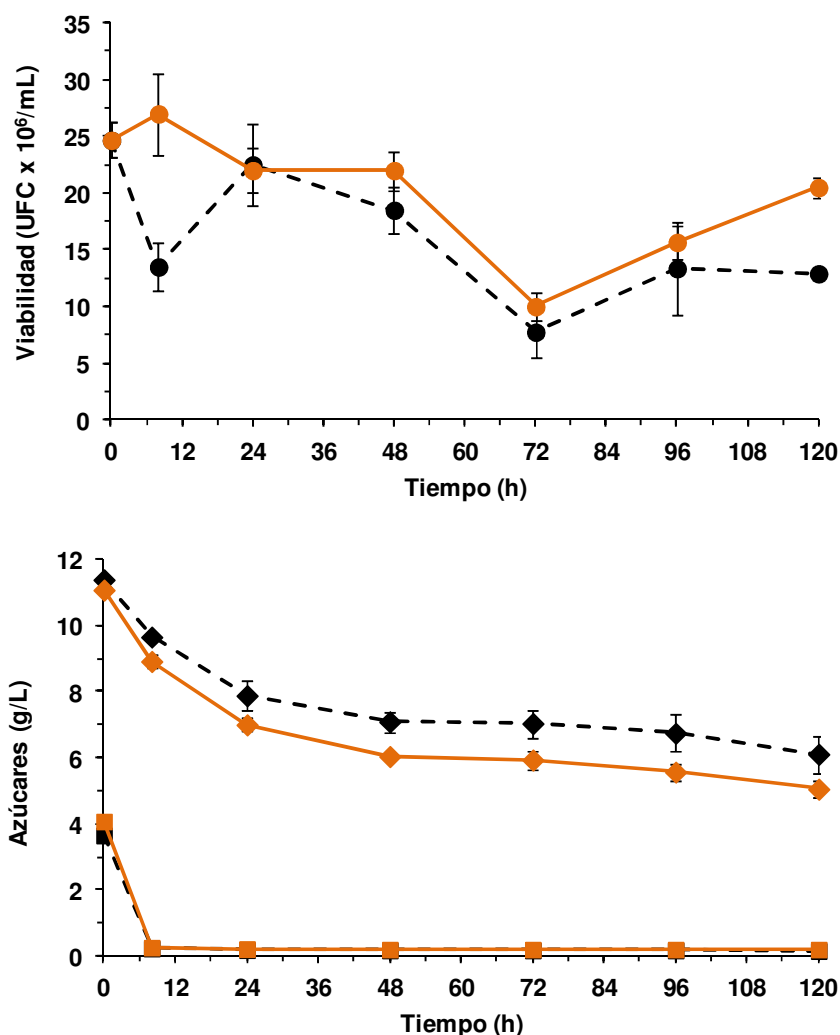
glucosa (4,1 g/L) con un ligero consumo de xilosa (de 13,2 a 12,2 g/L tras las 24 h de fermentación).



**Figura 4.29.-** Viabilidad celular (círculos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 durante los procesos de fermentación del prehidrolizado diluido a una concentración equivalente del MPC VI (210 °C; 2,5 min) del 14% ST (p/v). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas. Asimismo, en negro se identifican las muestras con un volumen de inóculo de 1g/L, en naranja 3g/L, mientras que en verde se representan las muestras inoculadas con 5 g/L.

Teniendo en cuenta estos resultados, el prehidrolizado se diluyó con un porcentaje equivalente del 12% ST (p/v) para reducir la toxicidad de los medios, inoculándolo con 5 g/L de levadura debido al mejor crecimiento observado durante los procesos al 14% ST (p/v). En este caso, como muestra la Figura 4.30, la menor concentración de inhibidores dio lugar a un mantenimiento de la viabilidad celular a lo largo de la fermentación, incluso en aquellas muestras que no habían sido tratadas con lacasa. Durante este proceso, *S. cerevisiae* KE6-12 fue capaz de consumir toda la glucosa presente tras las primeras 8 h de proceso, mientras que la xilosa se consumió con unas menores tasas a lo largo del proceso. En el caso del consumo de glucosa no se pudieron establecer diferencias entre las muestras tratadas con lacasa y las muestras control. Por el contrario, en el caso de la xilosa, las muestras tratadas mostraron un mayor consumo durante la fermentación, posiblemente debido a una menor fase de adaptación del microorganismo fermentativo por la disminución de un 81% de los

fenoles totales por parte de la lacasa. Este resultado se ve reflejado asimismo en un aumento del rendimiento final de etanol desde 0,25 a 0,28 g/g (teniendo en cuenta la concentración de glucosa y xilosa medida antes de la inoculación), tal y como se indica en la Tabla 4.19.



**Figura 4.30.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 (inóculo: 5 g/L) durante los procesos de fermentación del prehidrolizado diluido a una concentración equivalente del MPC VI (210 °C; 2,5 min) del 12% ST (p/v). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

**Tabla 4.19.-** Concentración inicial de fenoles totales, glucosa y xilosa, producción de etanol máxima y rendimientos en la fermentación de la fracción líquida del MPC VI con *S. cerevisiae* KE6-12 con 5 g/L de tamaño de inóculo

Muestra	Contenido Fenólico Total (g/L)	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Glucose (g/L)	Xylose(g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)
C	4,2	3,7	3,7	11,4	0,25
PC	0,8	4,3	4,1	11,1	0,28

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la concentración de glucosa y xilosa medida al inicio de la fermentación.

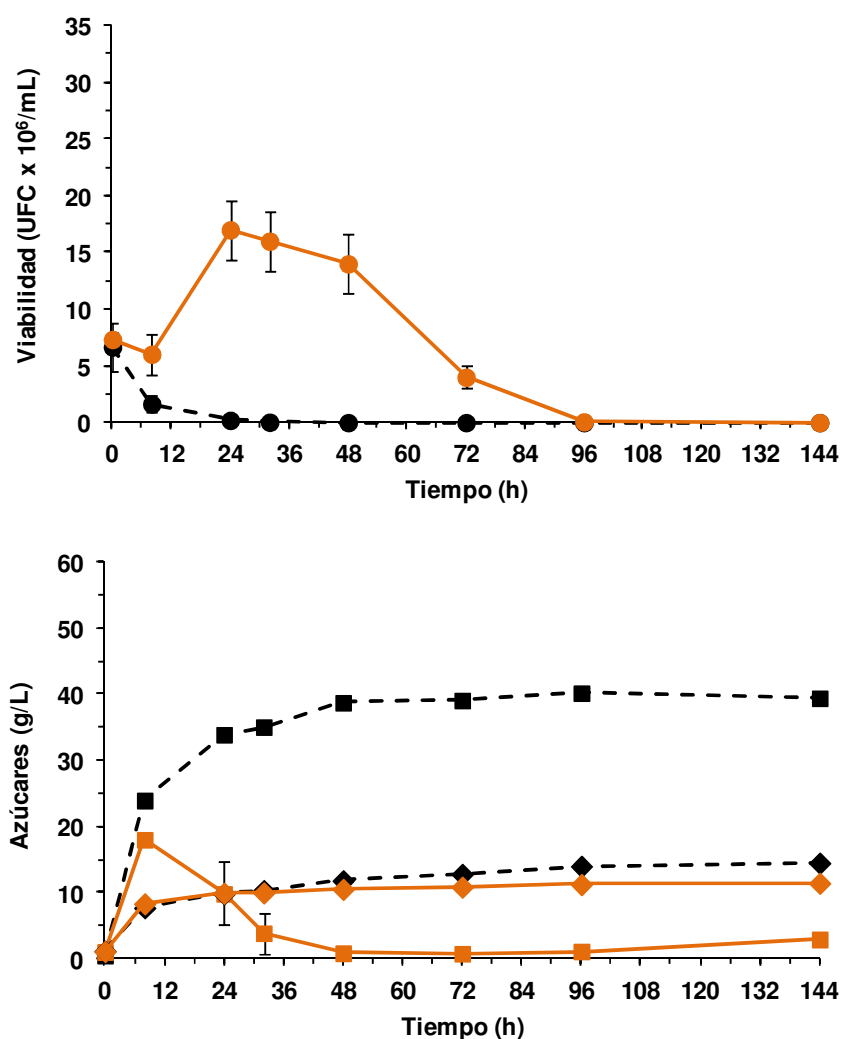
#### 4.4.5.2. Procesos de SCFS en discontinuo

Basándonos en los resultados descritos con el prehidrolizado y teniendo en cuenta también los obtenidos con *S. cerevisiae* F12, el MPC VI se sometió a diferentes procesos de SCFS al 12% y al 16% ST (p/v) de consistencia, inoculando las muestras con 1 g/L (peso seco) de *S. cerevisiae* KE6-12. Asimismo, al igual que ocurría con los procesos donde se empleó *S. cerevisiae* F12, las muestras se trataron con lacasa durante 12 h antes de la incorporación de las enzimas hidrolíticas y del microorganismo fermentativo.

Como se puede visualizar en la Figura 4.31, en el caso de las muestras control al 12% ST (p/v) de consistencia, la viabilidad se redujo por completo entre las primeras 24 h, observándose una acumulación de azúcares durante el proceso. Por otro parte, el tratamiento con lacasa favoreció el crecimiento de *S. cerevisiae* KE6-12 tras reducir el contenido fenólico total en un 77% (de 3,9 g/L en los controles a 0,9 g/L en las muestras tratadas), alcanzando el máximo número de UFC/mL a las 24 h. En comparación con la reducción observada en el prehidrolizado diluido a la misma concentración equivalente, el tratamiento con lacasa del MPC fue ligeramente menos eficiente, posiblemente debido a problemas de mezclado (Rosgaard y col., 2007), incluso cuando el tratamiento se prolongó durante 9 h más.

Como se ha descrito durante todos los estudios previos donde se ha utilizado una configuración de SFS/SCFS, durante la fase de adaptación del microorganismo se produjo una acumulación de los azúcares liberados por la acción de las enzimas hidrolíticas. En este contexto, al igual que la levadura *S. cerevisiae* F12, la presencia de ambos azúcares generalmente promueve un retraso en el consumo de la xilosa durante el proceso de co-fermentación (Meinander et al., 1999). Este efecto, junto con una

disminución brusca de la viabilidad celular de *S. cerevisiae* KE6-12 tras consumir la glucosa, explicaría la alta concentración de xilosa tras el proceso de fermentación.

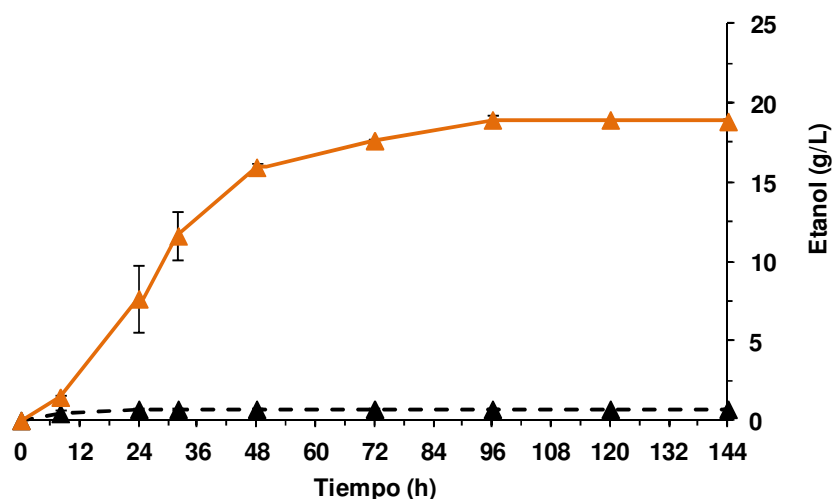


**Figura 4.31.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 (inóculo: 1 g/L) durante los procesos de SCFS al 12% ST (p/v) del MPC VI (210 °C; 2,5 min). Las muestras control se identifican con líneas discontinuas y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con líneas continuas y en naranja.

Como se muestra en la Figura 4.32, la concentración final de etanol alcanzada durante el proceso de SCFS de las muestras tratadas con lacasa fue de 19 g/L. Este valor es muy similar al obtenido bajo las mismas condiciones con *S. cerevisiae* F12 y se corresponde con un rendimiento final de etanol de 0,20 g/g en base a la cantidad potencial de glucosa y xilosa en el MPC (también se tuvo en cuenta la glucosa presente en la mezcla Cellic de forma intrínseca). Suponiendo un rendimiento teórico de 0,51 g/g



para ambos azúcares, el rendimiento obtenido supone un 39% del etanol que podría obtenerse bajo estas condiciones. Sin embargo, si se tienen en cuenta sólo los azúcares liberados durante la sacarificación (valores procedentes de las muestras sin tratar), el rendimiento teórico final se incrementa hasta el 70%, mostrando que una vez superada la inhibición del crecimiento del microorganismo la hidrólisis enzimática representa un factor limitante muy importante.



**Figura 4.32.-** Producción de etanol (triángulos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 (inóculo: 1 g/L) durante los procesos de SCFS al 12% ST (p/v) del MPC VI. Las muestras control se identifican con una línea discontinua y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con una línea continua y en naranja.

Por otro lado, cuando se intentó incrementar la consistencia de sustrato del 12% al 16% ST (p/v) en un proceso de SCFS en discontinuo, las células se inhibieron por completo durante las primeras 8 h de proceso, incluso en el caso de las muestras que habían sido tratadas con lacasa.

#### 4.4.5.3. Procesos de SCFS en semicontinuo o *fed-batch*

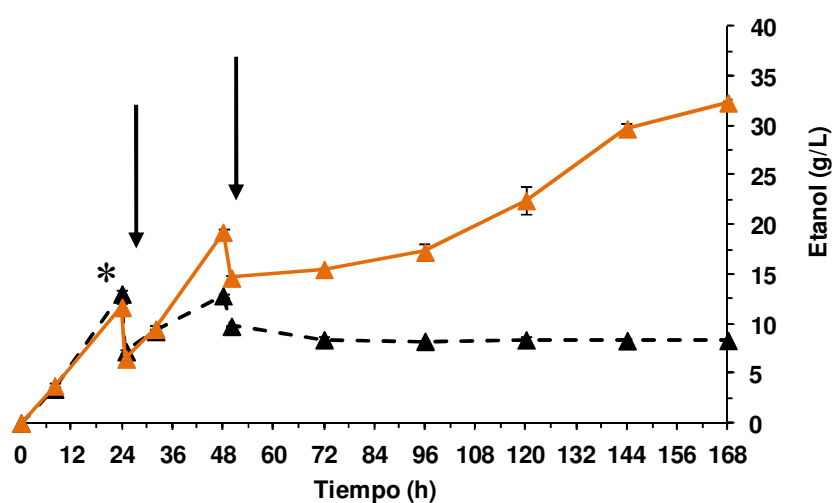
Teniendo en cuenta los datos obtenidos con los procesos en discontinuo, los retos que nos propusimos superar incluían la mejora de la etapa de sacarificación, el incremento de la consistencia de los medios hasta el 16% y, en definitiva, incrementar tanto la concentración final de etanol como los rendimientos globales del proceso. Para una producción de bioetanol rentable se necesitan concentraciones superiores al 4%

(p/v), lo que supone una producción de etanol de alrededor de 40 g/L en solución (Zacchi y Axelsson, 1989). En este contexto, decidimos evaluar los procesos de SCFS trabajando bajo un modo de operación en semicontinuo o *fed-batch*. Con esta estrategia, el sustrato se añade poco a poco, por lo que se reducen los problemas de mezclado y acumulación de glucosa y, por consiguiente, se produce un co-consumo de glucosa y xilosa más eficiente (Olofsson y col., 2008; Tomás-Pejó y col., 2010). Por otra parte, dado que en un proceso en discontinuo las consistencias iniciales suelen ser bajas y las concentraciones de los inhibidores se mantienen a niveles fermentables, el microorganismo fermentativo podría llevar a cabo un mecanismo de adaptación *in situ* a estos productos de degradación, pudiendo incrementar su tolerancia frente a ellos y ser más resistentes frente a una nueva adición de sustrato.

Para la realización del proceso de SCFS en semicontinuo, se decidió comenzar con una consistencia inicial del MPC VI del 6% ST (p/v) y con una carga de inóculo de 3 g/L (peso seco). En este caso, la carga de inóculo se elevó a 3 g/L iniciales ya que tras tener en cuenta todas las adiciones de sustrato, dicho inóculo representaría 1,2 g/L (peso seco), similar a la carga empleada en los procesos en discontinuo. A continuación, transcurridas 25 y 50 h desde la inoculación de *S. cerevisiae* KE6-12, la consistencia de sustrato se incrementó al 12% y al 16% ST (p/v), respectivamente, mediante la adición de la cantidad correspondiente del MPC VI.

En la Figura 4.33 se puede observar que tras realizar los procesos de SCFS bajo una estrategia en semicontinuo, las muestras control al 16% ST (p/v) alcanzaron una concentración de etanol de 8,3 g/L, por lo que en comparación con los procesos en discontinuo supuso un gran avance. Teniendo en cuenta que en las muestras control al 12% ST con un modo de operación en discontinuo se había producido una completa inhibición de la viabilidad tras 24 h de proceso, se puede considerar una posible adaptación *in situ* del microorganismo en el modo *fed-batch*, ya que a esta misma consistencia de sustrato (tras la primera adición de sustrato) se observó una producción continua de etanol (Figura 4.32). Asimismo, en la Figura 4.34 también se muestra un ligero crecimiento del microorganismo entre las 25 y las 32 h de proceso. Sin embargo, después de la segunda adición del sustrato, tanto el crecimiento celular como la producción de etanol y el consumo de azúcares se detuvieron por completo.

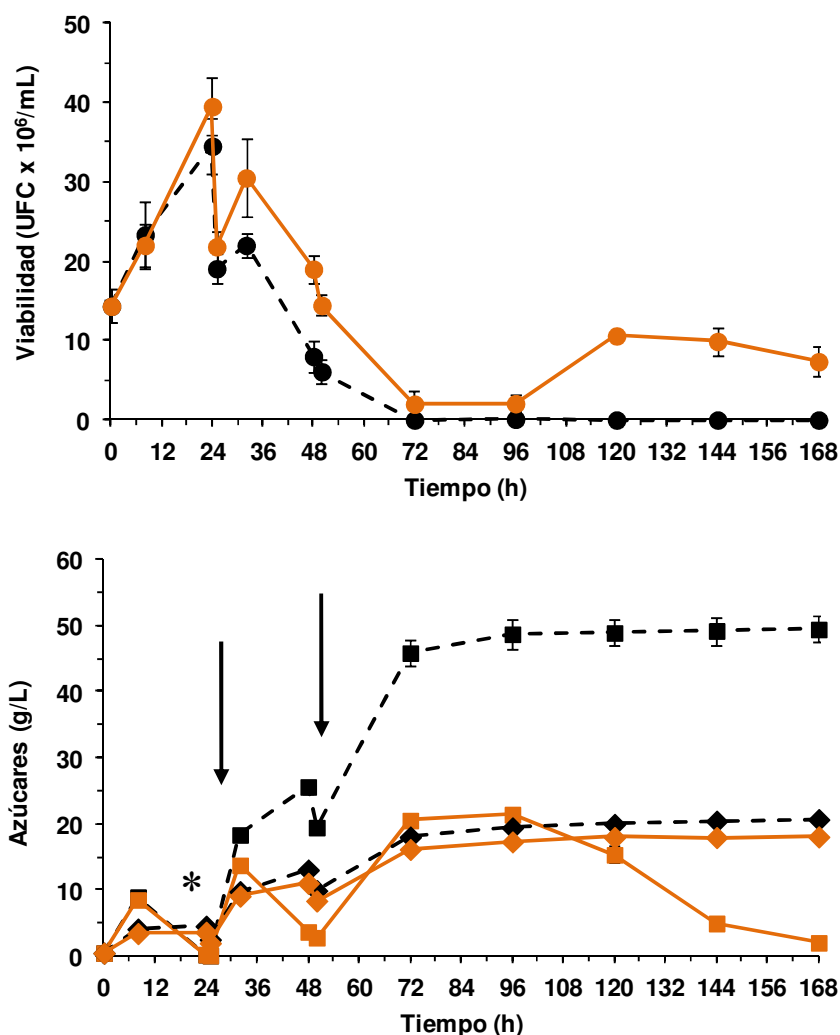
Para el tratamiento con lacasa en los ensayos de SCFS en semicontinuo, la enzima se añadió 4 h antes o 8 h después de la primera adición de sustrato, es decir, tras 21 ó 33 h desde la inoculación del microorganismo fermentativo, respectivamente. En este caso no se llevó a cabo una etapa de destoxificación previa debido a que al inicio de los procesos de SCFS la concentración de los inhibidores es más baja, por lo que esta etapa no resulta necesaria. Además, como se ha podido establecer en diversos puntos de la presente Tesis, el tratamiento con lacasa afecta de forma significativa la liberación de glucosa al medio de fermentación por parte de las enzimas hidrolíticas, por lo que su adición se retrasó lo máximo posible.



**Figura 4.33.-** Producción de etanol (triángulos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 (inóculo: 3 g/L iniciales; 1,2 g/L finales) durante los procesos de SCFS en semicontinuo con el MPC VI (210 °C; 2,5 min) al 16% ST (p/v). Las muestras control se identifican con una línea discontinua y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con una línea continua y en naranja. Las flechas indican los puntos a los cuales se realizaron las adiciones de sustrato y el asterisco indica el punto al cual se añadió la lacasa de *P. cinnabarinus*.

En el caso de las muestras que habían sido suplementadas con la lacasa de *P. cinnabarinus* tras 21 h desde el inicio del proceso de SCFS, el contenido fenólico se mantuvo por debajo de los 0,6 g/L tras las 32, 48 y 72 h desde la inoculación de la levadura. En este proceso, en términos de concentración de producto se obtuvo un aumento de casi el 400% de etanol respecto a las muestras control, alcanzando una concentración final de 32,3 g/L (Figura 4.33). Esta producción de etanol corresponde

con un rendimiento global del 0,26 g/g en base a la glucosa y la xilosa total presentes en el MPC, correspondiendo con un 51% del etanol teórico. Se trata de un rendimiento mucho mayor al obtenido con los procesos de SCFS en discontinuo, incluso con una consistencia final de sustrato mucho mayor.



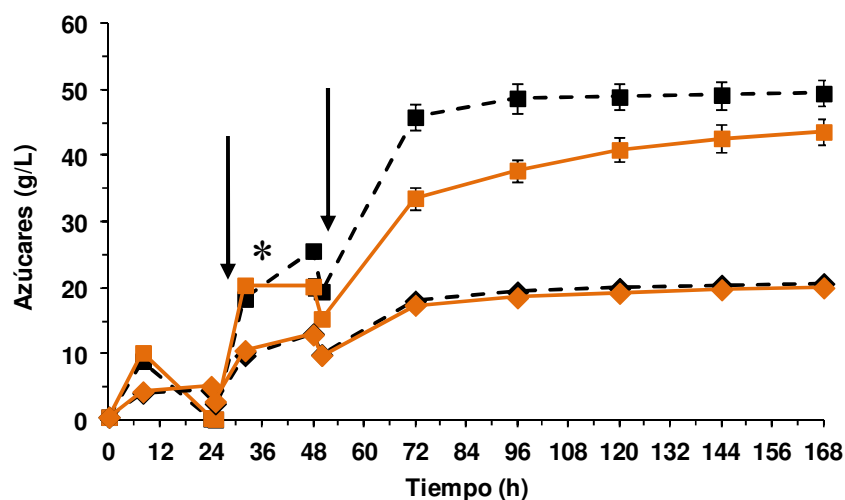
**Figura 4.34.-** Viabilidad celular (círculos) y consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 (inóculo: 3 g/L iniciales; 1,2 g/L finales) durante los procesos de SCFS en semicontinuo con el MPC VI (210 °C; 2,5 min) al 16% ST (p/v). Las muestras control se identifican con una línea discontinua y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con una línea continua y en naranja. Las flechas indican los puntos a los cuales se realizaron las adiciones de sustrato y el asterisco indica el punto al cual se añadió la lacasa de *P. cinnabarinus*.

Este resultado se puede explicar gracias a que las concentraciones de sustrato iniciales se mantienen bajas, por lo que se pueden evitar los mecanismos de inhibición de las enzimas hidrolíticas descritos con anterioridad (Jørgensen y col., 2007a; Kristensen y col., 2009; Wang y col., 2011).

En estos procesos, tras cada adición de sustrato, *S. cerevisiae* KE6-12 tuvo que adaptarse al medio, tanto en el caso de las muestras tratadas como en las no tratadas. Dicha fase fue más notable en las etapas críticas, es decir, al 12% ST (p/v) para las muestras control y al 16% en el caso de las muestras tratadas con lacasa. Durante esta etapa de adaptación, las tasas de producción de etanol por parte del microorganismo fueron más bajas y la glucosa comenzó a acumularse en los medios (Figura 4.34).

Respecto al segundo conjunto de experimentos, la lacasa se añadió 8 h después de la primera adición del sustrato, es decir, 33 h desde de la inoculación de *S. cerevisiae* KE6-12. En este caso, la suplementación con lacasa no produjo ningún efecto claro, dando lugar a unos perfiles de fermentación similares a los observados en las muestra control de las Figuras 4.33 y 4.34. En este sentido, tras la inhibición del crecimiento celular, la glucosa y la xilosa comenzaron a acumularse en el medio (Figura 4.35). Al igual que se ha comentado reiteradas veces durante los estudios anteriores, las muestras que se habían suplementado con lacasa presentaron unas tasas menores de liberación de glucosa, alcanzándose, respecto a las muestras que no habían sido tratadas, una menor concentración final de glucosa.

Otra conclusión interesante que puede extraerse de este ensayo es que no se encontraron variaciones significativas al comparar la viabilidad celular entre las muestras tratadas y no tratadas (perfil de viabilidad celular similar al mostrado en la Figura 4.34), lo que sugiere que el daño promovido por la exposición de las células a concentraciones subletales de inhibidores no puede ser reparado de forma inmediata, ni incluso tras reducir la concentración de los compuestos de degradación. Asimismo, en estas muestras la concentración de fenoles totales a las 48 y 72 h fue de 1,2 y 1,7 g/L, respectivamente. Estos valores son superiores a los obtenidos con las muestras donde la lacasa se añadió tras 21 h, por lo que el efecto sinérgico entre los diferentes inhibidores pudo ser superior, dificultando la adaptación de *S. cerevisiae* KE6-12 a los medios de fermentación.



**Figura 4.35.-** Consumo de glucosa (cuadrados) y xilosa (rombos) por parte de *S. cerevisiae* KE6-12 (inóculo: 3 g/L iniciales; 1,2 g/L finales) durante los procesos de SCFS en semicontinuo con el MPC VI (210 °C; 2,5 min) al 16% ST (p/v). Las muestras control se identifican con una línea discontinua y en color negro, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan con una línea continua y en naranja. Las flechas indican los puntos a los cuales se realizaron las adiciones de sustrato y el asterisco indica el punto al cual se añadió la lacasa de *P. cinnabarinus*.

#### 4.5. Evaluación del tratamiento con lacasas en la producción de etanol a partir del RSI de paja de trigo a altas cargas (Artículo VII)

A pesar de los buenos resultados obtenidos al combinar las lacasas con el MPC como sustrato, sobre todo en relación a los procesos de SCFS en *fed-batch* donde se obtuvo una concentración superior a los 30 g/L y unos rendimientos superiores al 50% respecto al teórico, los valores de producto aún no alcanzan el mínimo requerido del 4% (p/v). En este contexto, el uso del RSI podría facilitar el trabajar con cargas de sustrato aún mayores, ya que el contenido en tóxicos es muy inferior. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, al trabajar bajo cargas de sustrato más altas existen ciertos inconvenientes como la inhibición de las enzimas hidrolíticas por producto final, las limitaciones en cuestión de mezclado y transferencia de masa o una mayor concentración de los inhibidores que se mantienen embebidos en el material (Mohagheghi y col., 1992; Rosgaard y col., 2007; Taherzadeh y Karimi, 2011). Para superar estos obstáculos, los procesos se tienen que realizar bajo una configuración adecuada. En este contexto, los procesos de presacarificación y sacarificación y

fermentación simultáneas (PSFS) podrían ser una alternativa eficaz en cuanto a la utilización del RSI como sustrato para la producción de etanol (Öhgren y col., 2007; Olofsson y col., 2008; Manzanares y col., 2011). Asimismo, la utilización de lacasas para reducir el contenido fenólico total y, en definitiva, la toxicidad de los medios antes de la inoculación del microorganismo, podrían suponer una estrategia importante para el correcto aprovechamiento del RSI procedente de los materiales lignocelulósicos a altas cargas de sustrato.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, se propuso realizar un estudio utilizando el RSI obtenido tras el pretratamiento mediante EV de la paja de trigo, trabajando a cargas de sustrato altas. En este caso, la configuración de proceso elegida fue la de PSFS, evaluándose asimismo la suplementación con lacasas de estos medios y la acción hidrolítica de dos preparaciones enzimáticas (mezcla estándar y mezcla Cellic). Por otro lado, como microorganismo fermentativo se decidió emplear *S. cerevisiae* Ethanol Red y las muestras no se suplementaron con ningún nutriente que facilitara su crecimiento celular. En este sentido, otros autores han mostrado ser capaces de fermentar paja de trigo pretratada a altas cargas de sustrato sin la adición de nutrientes (Jørgensen y col., 2007b).

#### 4.5.1. Suplementación con lacasa de la presacarificación enzimática

Para la realización de este estudio se empleó el RSI III, obtenido a unas condiciones de pretratamiento de 210 °C; 2,5 min y cargas de sustrato del 17%, 20% y 25% SI (p/p). Como etapa inicial de los procesos de PSFS se llevó a cabo una presacarificación de las diferentes muestras. En aquellos casos en los que se empleó la mezcla estándar, la etapa de presacarificación incrementó el contenido en glucosa libre de los medios a medida que la carga de sustrato fue mayor, alcanzando el valor más alto (100,5 g/L) a un 25% SI (p/p). Asimismo, como se puede observar en la Tabla 4.20, el mayor grado de conversión de las muestras se produjo entre las primeras 24 h de proceso de forma independiente a la carga del sustrato, en consonancia con otros procesos descritos (Kristensen y col., 2009; Manzanares y col., 2011). Sin embargo, en las muestras diluidas al 25% (p/p) sí se observó un incremento en la concentración de glucosa tras aumentar el tiempo de hidrólisis de 24 a 48 h.

En relación a los rendimientos de sacarificación, tras incrementar la consistencia de sustrato del 17% al 25% SI (p/p) se observó una disminución de este indicador desde el 69% al 54%, respectivamente (Tabla 4.20). Este descenso de los rendimientos también ha sido observado por otros autores al trabajar con otros sustratos lignocelulósicos pretratados (Lu y col., 2010; García-Aparicio y col., 2011; Manzanares y col., 2011). Tal y como se comentó durante los procesos de SCFS con la levadura *S. cerevisiae* F12, diferentes factores como la inhibición de las enzimas por producto final o por los productos de degradación, cambios en la reactividad del sustrato, las uniones improductivas de las enzimas sobre el sustrato y limitaciones en cuanto a transferencia de masa podrían verse implicados en la disminución de los rendimientos de sacarificación (Jørgensen y col., 2007a; Rosgaard y col., 2007; Kristensen y col., 2009).

**Tabla 4.20.-** Producción de glucosa (g/L) con la mezcla estándar y la mezcla Cellic durante la etapa de presacarificación enzimática a las 24 y 48 h de proceso y a diferentes cargas de sustrato del RSI III (210 °C; 2,5 min)

% RSI (p/p)	Muestra	Mezcla estándar		Mezcla Cellic*
		24 h	48 h	24 h
17	C	76,2 (67,8)	77,2 (68,7)	78,4 (69,7)
	PC	77,2 (68,7)	76,7 (68,2)	78,6 (69,9)
20	C	84,1(59,8)	84,3 (60,0)	93,4 (66,4)
	PC	85,5 (60,9)	84,7 (60,3)	94,6 (67,3)
25	C	93,5 (49,9)	100,5 (53,7)	103,4 (55,2)
	PC	95,4 (50,9)	100,1 (53,4)	101,9 (54,4)

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*.

Entre paréntesis se muestra el porcentaje relativo al rendimiento de hidrólisis calculado en base a la glucosa liberada respecto a la glucosa potencial contenida en las muestras.

\*Tanto en la concentración de glucosa como en el cálculo de los rendimientos se tuvo en cuenta la glucosa presente en la mezcla Cellic de forma intrínseca y se restó para los cálculos oportunos.

Por otro lado, la etapa de presacarificación también se llevó a cabo utilizando la mezcla Cellic. En este caso, considerando los resultados obtenidos con la mezcla estándar, el proceso de sacarificación no se prolongó más allá de las 24 h. Sin embargo, a pesar del menor tiempo de sacarificación, el uso de la mezcla Cellic dio lugar a un aumento en la concentración de glucosa, particularmente al 20% y al 25% SI (p/p) (Tabla 4.20). Al 20% SI (p/p) el rendimiento de la presacarificación aumentó del 59,8% con la mezcla estándar al 66,5% con la mezcla Cellic, mientras que al 25% SI (p/p) el rendimiento aumentó del 49,9% al 55,2%, respectivamente. Estas mejoras podrían explicarse por las nuevas características incorporadas en la mezcla Cellic, como las actividades hemicelulasas o la presencia de enzimas pertenecientes a la familia de las



PMO. Se ha demostrado que la adición de hemicelulasas, como las xilanasas, puede aumentar los rendimientos de hidrólisis al mejorar la accesibilidad de la celulosa por parte de las celulasas y al reducir el poder inhibitorio de los xilooligómeros presentes en el medio (Berlín y col., 2007; Qing y col., 2010; Alvira y col., 2011; García-Aparicio y col., 2011). En este contexto, el empleo de la mezcla Cellic aumentó la producción de xilosa hasta los 11,2 g/L en comparación a los 8,7 g/L obtenidos con la mezcla estándar. Sin embargo, a pesar de las mejoras, los rendimientos de hidrólisis disminuyeron tras aumentar la consistencia de la muestra, al igual que se observó con la mezcla estándar (Tabla 4.20).

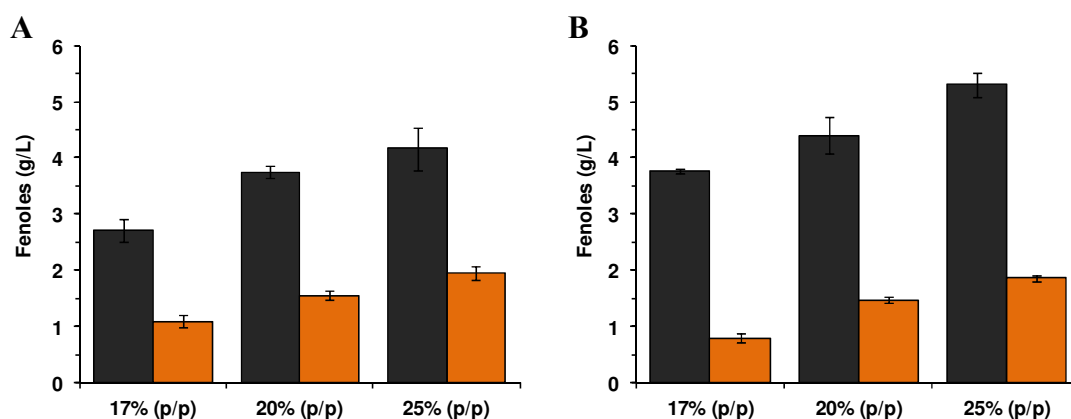
Tras la etapa de presacarificación (48 h en los casos donde se empleó la mezcla estándar y 24 h en los casos donde se utilizó la mezcla Cellic), antes de la inoculación de los medios con el microorganismo fermentativo, los diferentes tipos de inhibidores fueron identificados y cuantificados. Los datos obtenidos en relación al contenido en ácidos alifáticos (ácido acético y ácido fórmico) y derivados del furano (5-HMF y furfural) se indican en la Tabla 4.21, mientras que el contenido fenólico total se muestra en la Figura 4.36. En este punto, cabe destacar que incluso al emplear el RSI (fracción obtenida tras la filtración y el lavado abundante del MPC) como sustrato, tras la etapa de presacarificación se pudieron identificar diferentes inhibidores. Como ya se ha comentado previamente, este resultado puede explicarse debido a que los diferentes productos de degradación formados durante el pretratamiento quedan embebidos en el material incluso después del lavado, por lo que pueden liberarse tras la dilución de la muestra con el tampón correspondiente y mediante la acción de las enzimas hidrolíticas (Thomsen y col., 2009; Gurrám y col., 2011). A este respecto, algunas actividades enzimáticas tales como las xilanasas, acetil esterases u otras esterases de ácidos fenólicos, pueden estar involucradas en la liberación del ácido acético y de los ácidos fenólicos. Comparando las dos mezclas enzimáticas utilizadas, la liberación de tóxicos fue mayor en los casos donde se empleó la mezcla Cellic (Tabla 4.21 y Figura 4.36), en consonancia con los mejores rendimientos de sacarificación obtenidos. Asimismo, la concentración de los inhibidores aumentó de forma directamente proporcional al incremento en la consistencia.

**Tabla 4.21.-** Concentración (g/L) correspondiente a los derivados del furano y ácidos alifáticos presentes en los hidrolizados enzimáticos obtenidos con la mezcla estándar o la mezcla Cellic a diferentes cargas de sustrato del RSI III (210 °C; 2,5 min)

% RSI (p/p)	Muestra	Furfural	5-HMF	Ácido Acético	Ácido Fórmico
<b>Mezcla estándar:</b>					
17	C	0,209	0,069	1,731	0,371
	PC	0,218	0,067	1,740	n.d.
20	C	0,275	0,092	2,098	0,515
	PC	0,261	0,083	1,945	n.d.
25	C	0,29	0,1	2,330	0,575
	PC	0,279	0,089	2,309	n.d.
<b>Mezcla Cellic:</b>					
17	C	0,229	0,076	1,913	0,841
	PC	0,238	0,074	1,850	n.d.
20	C	0,286	0,104	2,225	1,005
	PC	0,274	0,097	2,140	n.d.
25	C	0,295	0,106	2,494	1,078
	PC	0,274	0,097	2,407	n.d.

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*.

La concentración de los compuestos inhibidores se determinó a las 48 h en los ensayos donde se empleó la mezcla estándar y a las 24 h en las muestras hidrolizadas con la mezcla Cellic.



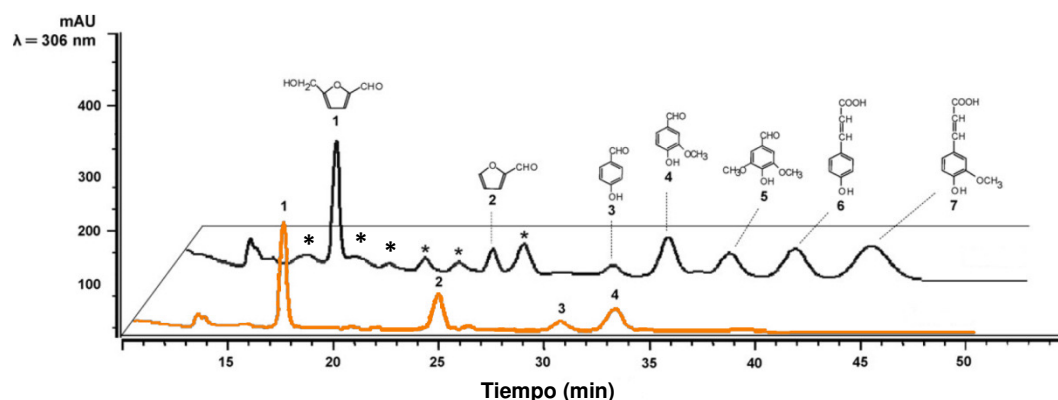
**Figura 4.36.-** Contenido fenólico total tras la etapa de presacarificación de las muestras del RSI III (210 °C; 2,5 min) diluidas bajo diferentes consistencias con la mezcla estándar (A) (48 h) o con la mezcla Cellic (B) (24 h). En negro se identifican las muestras control, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan en naranja.

Teniendo en cuenta que el RSI ha sido previamente lavado y filtrado, a priori no resulta lógico llevar a cabo un tratamiento con lacasa. Sin embargo, dado el incremento observado en la concentración de los productos inhibidores tras la etapa de presacarificación, nos propusimos hacer una evaluación del tratamiento con lacasa para

disminuir el contenido fenólico total de las muestras. En este contexto, la etapa de presacarificación se suplementó con la lacasa de *P. cinnabarinus* tras las 36 h desde el inicio del proceso, en los casos donde se utilizó la mezcla estándar, y tras 21 h en los casos donde se empleó la mezcla Cellic. Tras finalizar el proceso de presacarificación, las muestras tratadas con lacasa mostraron un descenso en el contenido de fenoles totales (Figura 4.36), mientras que la concentración de los ácidos alifáticos y los derivados del furano no se alteró (Tabla 4.21), al igual que se ha observado en todos los estudios anteriores. Además, los mejores rangos de sacarificación por parte de la mezcla Cellic dieron lugar a una mejor acción de la lacasa, incluso en un menor tiempo de reacción (3 h), debido posiblemente a un mejor mezclado de las muestras. Asimismo, el incremento en la viscosidad de las muestras tras incrementar las cargas de sustrato del 17% al 25% SI (p/p), también provocó una disminución de la eficiencia de conversión por parte de la lacasa desde el 60% al 53%, respectivamente con la mezcla estándar y desde el 79% al 65%, respectivamente con la mezcla Cellic.

Como se ha observado y discutido previamente, el perfil cromatográfico representado en la Figura 4.37 muestra una actividad selectiva por parte de la lacasa frente a los distintos compuestos que engloban el grupo de los fenoles. Por una parte, el siringaldehído, el ácido  $\rho$ -cumárico y el ácido ferúlico mostraron una completa reducción de la concentración, mientras que la concentración de la vainillina no se redujo de forma tan significativa y el 4-hidroxibenzaldehído mantuvo una concentración constante. Estos resultados también se han descrito para la lacasa de *Trametes versicolor* por Kolb y col. (2012) al tratar la fracción líquida obtenida tras un pretratamiento de la paja de trigo con agua caliente en fase líquida. En este trabajo, los autores observaron que la lacasa puede eliminar el siringaldehído, el ácido  $\rho$ -cumárico y el ácido ferúlico durante la primera hora de tratamiento, mientras que la vainillina se elimina con unas tasas menores tras 24 h y el 4-hidroxibenzaldehído no se ve afectado, incluso tras una semana de tratamiento. A lo largo de esta tesis se ha mencionado que las diferencias en la reactividad de los diferentes fenoles en relación al tratamiento con lacasa dependen de sus características estructurales. De este modo, la actividad de la lacasa frente a los fenoles está mejorada por la presencia de sustituyentes donadores de electrones en el anillo de benceno que disminuyen su potencial electroquímico. En este sentido, un grupo metoxilo adicional (la diferencia estructural entre la vainillina y el siringaldehído) incrementa la afinidad de la lacasa por los compuestos fenólicos.

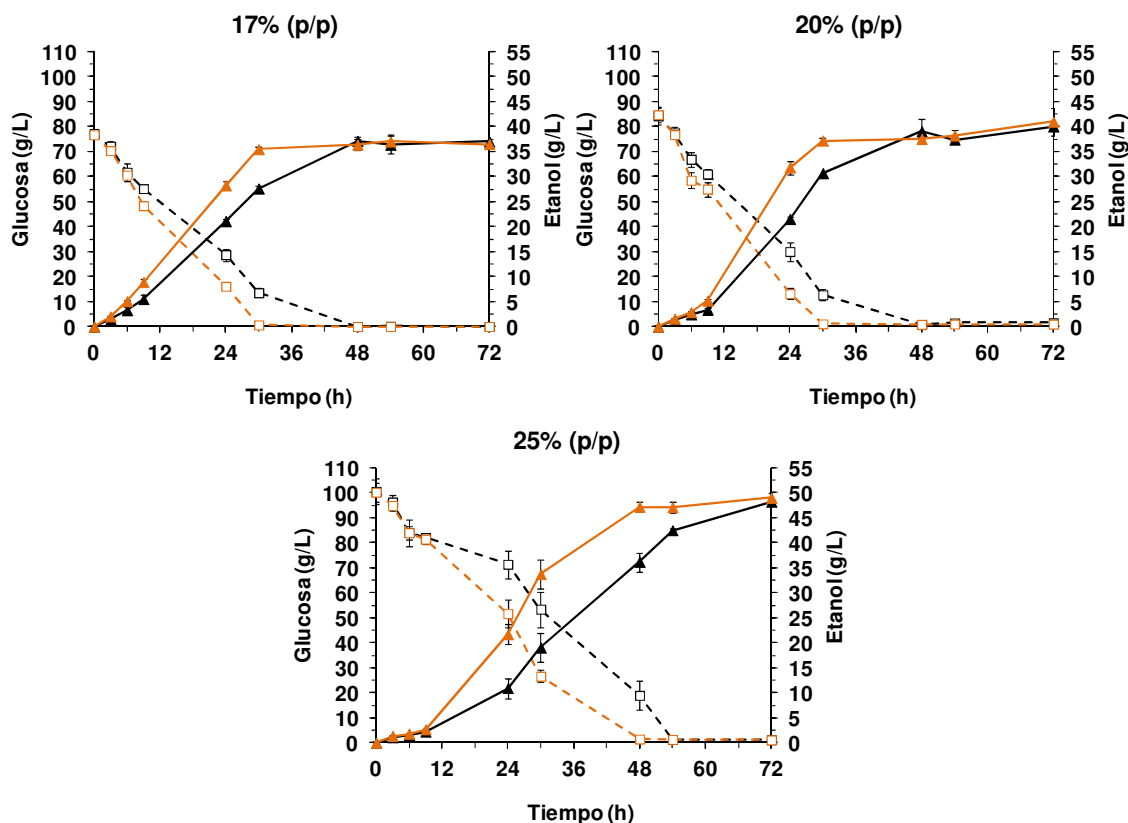
Además, la presencia de grupos etileno en fenoles para-sustituídos, tales como el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico, también incrementan la actividad de la lacasa.



**Figura 4.37.-** Comparación de los perfiles obtenidos mediante HPLC de los compuestos inhibidores presentes en las muestras tras 48 h de presacarificación del RSI III (210 °C; 2,5 min) al 20% SI (p/p) con la mezcla estándar. En negro se indentifican la muestras control, mientras que las muestras tratadas con lacasa se representan en naranja. Los picos identificados corresponden con: 1, 5-HMF; 2, furfural; 3, 4-hidroxibenzaldehído, 4, vainillina; 5, siringaldehído; 6, ácido *p*-cumárico; 7, ácido ferúlico; \*, fenoles no identificados.

#### 4.5.2. Sacarificación y fermentación simultáneas a altas cargas de sólidos

Tras el proceso de presacarificación, las muestras control y tratadas con lacasa se inocularon con 1 g/L (peso seco) de la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red, resultando en un proceso de PSFS. Como se ilustra en la Figura 4.38, a pesar de que los medios no se suplementaron con nutrientes, el microorganismo fue capaz de crecer en todos los casos y de consumir toda la glucosa que se había liberado durante el proceso de presacarificación con la mezcla estándar. Con esta mezcla hidrolítica, se alcanzaron concentraciones máximas de etanol de 48,2 y 49,0 g/L con las muestras sin tratar y tratadas al 25% SI (p/p) de consistencia, respectivamente (Tabla 4.22). Estas concentraciones superan los requerimientos industriales y representan además un valor 1.5 veces superior al obtenido en las mejores condiciones con el MPC (16% ST (p/v) en una configuración de SCFS en *fed-batch*).



**Figura 4.38.-** Consumo de glucosa (líneas discontinuas y cuadrados abiertos) y producción de etanol (líneas continuas y triángulos cerrados) por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red durante los procesos de PSFS con la mezcla estándar y utilizando el RSI III (210 °C; 2,5 min) a diferentes cargas de sustrato. En negro se identifican las muestras control, mientras que en naranja se representan las muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*.

**Tabla 4.22.-** Resumen de los diferentes parámetros durante los procesos de PSFS a diferentes cargas de sustrato del RSI III (210 °C; 2,5 min)

% RSI (p/p)	Muestra	Mezcla estándar			Mezcla Cellic		
		EtOH <sub>M</sub> (g/L) <sup>a</sup>	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Q <sub>E</sub> (g/L h)	EtOH <sub>M</sub> (g/L)	Y <sub>E/TS</sub> (g/g)	Q <sub>E</sub> (g/L h)
17	C	37,1 (64,7)	0,32	0,87	42,5 (68,2)	0,34	0,72
	PC	37,5 (65,5)	0,33	1,17	44,4 (71,3)	0,36	1,44
20	C	40,0 (55,8)	0,28	0,89	51,1 (66,0)	0,33	0,55
	PC	41,0 (57,2)	0,29	1,32	51,7 (66,8)	0,34	1,39
25	C	48,2 (50,4)	0,25	0,45	30,0 (29,1)	0,14	0,09
	PC	49,0 (51,3)	0,26	0,9	58,6 (56,9)	0,29	0,73

C, control; PC, muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*; EtOH<sub>M</sub>, concentración máxima de etanol; Y<sub>E/TS</sub>, rendimiento de etanol calculado en base a la glucosa potencial presente tanto en el RSI como en las mezclas enzimáticas; Q<sub>E</sub>, productividad volumétrica de etanol calculada a las 24 h de proceso.

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica el porcentaje de etanol obtenido respecto al máximo teórico estequiométrico (0,51 g/g).

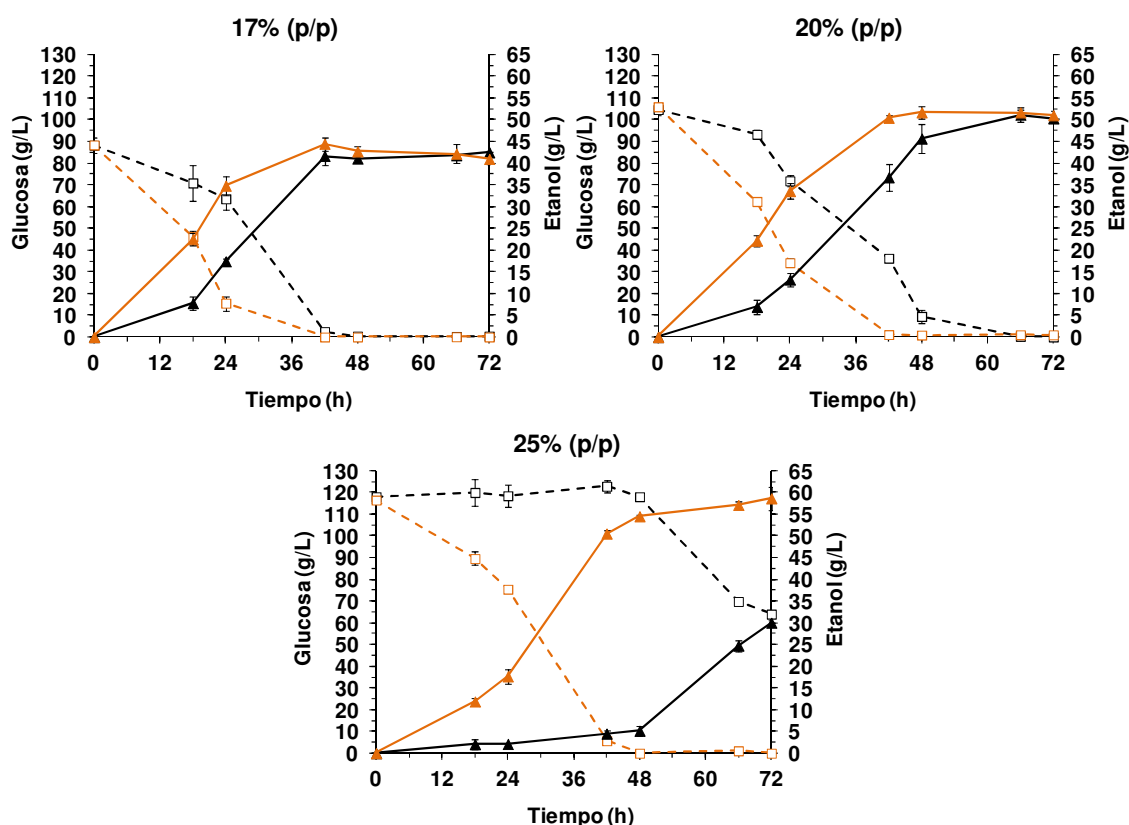
Otros autores también han reportado altas concentraciones de etanol (hasta los 69,2 g/L) al emplear el RSI de residuos agrícolas pretratados como la paja de cebada o el rastrojo de maíz bajo consistencias de sustrato altas (hasta el 30% (p/p)) (Lu y col., 2010; Zhang y col., 2010; Zhang y col., 2010b; García-Aparicio y col., 2011).

En relación al consumo de glucosa y a la productividad volumétrica de etanol por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red, el aumento en la consistencia de sustrato provocó un descenso de estos parámetros en las muestras control hidrolizadas con la mezcla estándar, especialmente al 25% (p/p) (Tabla 4.22). Asimismo, también se observó un descenso en los rendimientos finales desde 0,32 a 0,25 g/g al comparar las muestras al 17% y al 25% SI (p/p). Estos resultados adversos podrían explicarse por las limitaciones de transferencia de masa a altas consistencias de sustrato o a la presencia de una mayor concentración tanto de glucosa como de compuestos inhibidores al inicio de la etapa de fermentación, lo que prolonga la fase de adaptación del microorganismo (Palmqvist y col., 2000b; Jørgensen y col., 2007b; Taherzadeh and Karimi, 2011).

En contraste con los resultados anteriores, la suplementación con lacasa durante la presacarificación mejoró los rendimientos de *S. cerevisiae* Ethanol Red en todos los casos, disminuyendo la fase de adaptación del microorganismo. Sin embargo, al igual que ocurre en las muestras control, el incremento de la consistencia produjo una disminución de los rendimientos finales y de la productividad volumétrica (Tabla 4.22). En este sentido, la presencia de los ácidos alifáticos y los derivados del furano, cuya concentración no se ve afectada tras el tratamiento con lacasa (Tabla 4.21), podrían ejercer de forma sinérgica un efecto negativo sobre la levadura, disminuyendo sus rendimientos.

En relación a las muestras donde se empleó la mezcla Cellic para la sacarificación del RSI, la Figura 4.39 pone de manifiesto una fermentación completa (sin acumulación de glucosa) de las muestras tratadas y sin tratar al 17% y al 20% (p/p) tras 72 h de proceso. En comparación a las mismas muestras en las que se utilizó la mezcla estándar, los mejores rendimientos de hidrólisis obtenidos con la mezcla Cellic dieron lugar a una mayor producción de etanol, aumentando este parámetro desde los 37-38 g/L a los 42-44 g/L al 17% SI (p/p) y desde los 40-41 g/L a los 51-52 g/L al 20% SI (p/p) (Tabla 4.22). Sin embargo, al 25% SI (p/p) de consistencia, las muestras control hidrolizadas con la mezcla Cellic no pudieron consumir la glucosa liberada tras 72 h de

proceso, por lo que fueron necesarias 24 h más de fermentación donde se alcanzó una concentración final de etanol de 58,2 g/L (resultados no mostrados). Este retraso en el proceso de fermentación por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red pudo superarse mediante el tratamiento con lacasa, dando lugar a un consumo completo de la glucosa liberada dentro de las 72 h de proceso y alcanzando una concentración final de etanol de 58,6 g/L.



**Figura 4.39.-** Consumo de glucosa (líneas discontinuas y cuadrados abiertos) y producción de etanol (líneas continuas y triángulos cerrados) por parte de *S. cerevisiae* Ethanol Red durante los procesos de PSFS con la mezcla Cellic y utilizando el RSI III (210 °C; 2,5 min) a diferentes cargas de sustrato. En negro se identifican las muestras control, mientras que en naranja se representan las muestras tratadas con la lacasa de *P. cinnabarinus*.

De forma general, al igual que ocurría con las muestras hidrolizadas con la mezcla estándar, a medida que se incrementó la consistencia del sustrato, la fase de adaptación del microorganismo así como los valores de productividad volumétrica fueron inferiores (Figura 4.39 y Tabla 4.22). Estos efectos fueron especialmente pronunciados al 25% SI (p/p), donde las muestras que no habían sido tratadas

presentaron una fase de adaptación de 48 h y un rendimiento final de etanol de 0,14 g/g tras 72 h de fermentación.

Al comparar ambos complejos enzimáticos, los procesos de PSFS con la mezcla Cellic presentaron en todos los casos una fase de adaptación más prolongada, posiblemente debido a la mayor liberación de compuestos inhibidores como se ha descrito con anterioridad. Por otra parte, el tratamiento con lacasa produjo en ambos conjuntos de ensayos un incremento de la productividad volumétrica en comparación a las muestras sin tratar.

Estos resultados relativos al empleo de las lacasas para el tratamiento del RSI a altas cargas de sustrato, en consonancia con los datos obtenidos mediante el uso del MPC, ofrecen una visión global del potencial que presentan estas enzimas como método de destoxificación durante los procesos de producción de etanol a partir de los residuos lignocelulósicos, como, en este caso, la paja de trigo.





*CONCLUSIONES/CONCLUSIONS*



## 5. CONCLUSIONES

1. La explosión por vapor (EV) es un método efectivo para alterar la estructura de paja de trigo favoreciendo la accesibilidad de las enzimas en la etapa de hidrólisis enzimática (HE). A medida que la severidad del pretratamiento aumenta, la solubilización de la hemicelulosa es mayor y permite la concentración de la celulosa y la lignina en el residuo sólido insoluble (RSI). Asimismo, la severidad del pretratamiento influye de forma directa en la formación de diversos productos de degradación considerados inhibidores de las etapas de HE y fermentación.
2. El tratamiento del RSI de paja de trigo con la lacasa de *P. cinnabarinus* y diversos sistemas lacasa-mediador (SLM) produce una menor recuperación de glucosa, además de no observarse una disminución en el contenido en lignina. En combinación con una etapa de extracción alcalina, el tratamiento con lacasa/SLM no produce ningún efecto sinérgico en la mejora de la HE o la deslignificación del RSI.
3. El tratamiento con lacasa reduce de forma selectiva los compuestos fenólicos presentes en el material pretratado completo (MPC) sin afectar la concentración de los ácidos alifáticos o los derivados del furano. La estructura química de los diferentes compuestos fenólicos determina en gran medida el potencial de acción de la lacasa de manera que las tasas de eliminación del siringaldehído, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico son altas, mientras que para la vainillina son bajas y nulas para el 4-hidroxibenzaldehído.
4. En comparación a la estrategia de destoxificación del MPC con lacasa posterior a la HE, el tratamiento con lacasa del MPC previo a la HE permite una mayor reducción del contenido fenólico. Sin embargo, la recuperación de azúcares durante la sacarificación es menor.
5. La eficiencia del tratamiento con lacasa disminuye a medida que aumenta la consistencia del medio. En estos casos, los procesos de destoxificación y presacarificación simultáneas incrementan los porcentajes de eliminación de los compuestos fenólicos con respecto a los tratamientos con lacasa sin presacarificación simultánea.

6. La reducción del contenido fenólico en el MPC por parte de la lacasa permite la reducción de la fase de adaptación de *Kluyveromyces marxianus* CECT108, *Sacharomyces cerevisiae* Ethanol Red, *S. cerevisiae* F12 y *S. cerevisiae* KE6-12, mejorando a su vez la viabilidad celular y las productividades volumétricas de etanol de estos microorganismos.
7. El tratamiento con lacasa permite que la levadura termotolerante *K. marxianus* CECT 10875, con menor tolerancia a los inhibidores presentes en el MPC, pueda fermentar estos medios con rendimientos y concentraciones de etanol comparables a los que se obtienen con cepas industriales como *S. cerevisiae* Ethanol Red.
8. Al disminuir la severidad del pretratamiento, el tratamiento con lacasa durante los procesos de fermentación del MPC con la levadura termotolerante *K. marxianus* CECT 10875, presenta un mejor comportamiento en una configuración de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) en comparación a la configuración de presacarificación y sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS).
9. En combinación con el uso de cepas tolerantes a los compuestos inhibidores y capaces de co-fermentar la glucosa y la xilosa presentes en el MPC como *S. cerevisiae* F12 y *S. cerevisiae* KE6-12, la destoxificación con lacasa permite trabajar a consistencias mayores de sustrato, incluso sin la adición de una fuente de nitrógeno externa. Asimismo, con un modo de proceso semicontinuo o *fed-batch*, el tratamiento con lacasa permite alcanzar una concentración de etanol superior a los 30 g/L con unos rendimientos del 50%, acercándose al mínimo requerido en un proceso industrial.
10. Durante la presacarificación del RSI de paja de trigo a altas cargas de sustrato se liberan cantidades significativas de ácido acético, ácido fórmico, furfural, 5-hidroximetilfurfural y diferentes compuestos fenólicos que son inhibidores de la fermentación. La suplementación con lacasa durante la HE de estos medios facilita su fermentación, acortando los tiempos globales del proceso y permitiendo incrementar las concentraciones de etanol hasta valores cercanos al 6% (p/v).





## 6. CONCLUSIONS

1. Steam explosion (SE) is a cost-effective pretreatment technology to alter wheat straw structure and to enhance the accessibility of enzymes during the enzymatic hydrolysis (EH). As pretreatment severity increases hemicellulose solubilization is greater, allowing the concentration of cellulose and lignin in the water insoluble solids (WIS) fraction. In addition, pretreatment conditions is directly correlated with the formation of different degradation products considered as inhibitors of the EH and fermentation stages.
2. The treatment of WIS fraction with *P. cinnabarinus* laccase and different laccase-mediator systems (LMS) results in lower glucose recoveries and does not decrease the lignin content. In combination with a subsequent alkaline extraction step, the treatment with laccase/LMS produced no synergistic effect on enhancing the saccharification or delignification of WIS.
3. Laccase treatment selectively removes the phenolic compounds present in the whole slurry without affecting the concentration of weak acids or furan derivatives. The chemical structure of different phenolic compounds largely determines the activity of laccase towards them, observing high detoxification rates for syringaldehyde, ferulic acid and  $\rho$ -coumaric, while vanillin is oxidized with low rates and 4-hydroxybenzaldehyde is not affected.
4. Compared to the detoxification strategy after EH, laccase treatment before hydrolysis is advantageous due to a greater phenols reduction. By contrast, saccharification shows lower glucose recoveries.
5. The efficiency of laccase treatment decreases when increasing substrate consistency. Thus, a simultaneous detoxification and presaccharification process increases the percentage of removed phenols compared to laccase treatment without presaccharification.
6. Decreasing phenolic content from slurries by laccase treatment allows reducing the adaptation time of *Kluyveromyces marxianus* CECT108, *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red, *S. cerevisiae* F12 and *S. cerevisiae* KE6-12, improving cell viability and ethanol volumetric productivities.



7. Laccase treatment allows *K. marxianus* CECT 10875 to grow on steam-exploded wheat straw, reaching yields and ethanol concentrations comparable to those obtained with the industrial *S. cerevisiae* Ethanol Red strain.
8. Laccase treatment of less inhibitory slurries for the fermentation with the thermotolerant *K. marxianus* CECT 10875 has a better performance in a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process compared to the configuration of presaccharification and simultaneous saccharification and fermentation (PSSF).
9. In combination with robust strains capable of co-fermenting glucose and xylose such as *S. cerevisiae* F12 or *S. cerevisiae* KE6-12, laccase detoxification allows fermenting high toxic broths, even in the absence of an external nitrogen source. Furthermore, changing the operational mode from batch to fed-batch, laccase treatment leads to reach ethanol concentrations above 30 g/L with 50% yields, close to the minimum required in an industrial process.
10. During WIS presaccharification at high substrate loadings, significant quantities of acetic acid, formic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural and phenols compounds, are released. Laccase supplementation of the hydrolysis step facilitates the fermentation of the broths, reducing the overall process time and allowing to increase ethanol concentrations up to values close to 6% (w/v).





## *BIBLIOGRAFÍA*



- Abdel-Banat BMA, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R: **High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, **85**(4):861-867.
- Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF: **Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007, **82**:340-349.
- Almeida JRM, Röder A, Modig T, Laadan B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF: **NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and its applications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, **78**:939-945.
- Álvarez-Maciel C: **Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional.** En: *Transición energética: reorganización de las industrias, nuevas tecnologías y nuevos mercados*. Economía Informa – UNAM 2009, 359.
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ: **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:4851-4861.
- Alvira P, Negro MJ, Ballesteros M: **Effect of endoxylanase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:4552–4558.
- Alvira P, Ballesteros M, Negro MJ: **Progress on enzymatic saccharification technologies for biofuels production.** En: *Biofuel Technologies*. Gupta VK, Tuohy MG (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K: **Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity.** *Journal of Biotechnology* 1991, **23**:257-270.
- Ballesteros I, Ballesteros M, Cabañas A, Carrasco J, Martín C, Negro MJ, Sáez F, Sáez R: **Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1991, **28**:307–315.
- Ballesteros I, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros M: **Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste *Brassica carinata* at different particle sizes.** *Process Biochemistry* 2002, **38**:187-192.
- Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M: **Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, **129**:496-508.

- 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 Biochemistry* 2004, **39**:1843–1848.
- Ballesteros M, Sáez F, Ballesteros I, Manzanares P, Negro MJ, Martínez JM, Castañeda R, Oliva JM: **Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, **161**:423-431.
- Banerjee S, Mudliar S, Sen R, Giri B, Satpute D, Chakrabarti T, Pandey RA: **Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2009, **4**:77–93.
- Banerjee G, Scott-Craig JS, Walton JD: **Improving enzymes for biomass conversion: A basic research perspective.** *Bioenergy research* 2010, **3**:82-92.
- Barta Z, Oliva JM, Ballesteros I, Dienes D, Ballesteros M, Réczey K: **Refining hemp hurds into fermentable sugars or ethanol.** *Chemical and Biochemical Engineering* 2010, **24**(3):331–339.
- Barta Z, Duque A, Oliva JM, Manzanares P, González A, Ballesteros M, Réczey K: **Improving enzymatic hydrolysis of alkali-extruded barley straw by varying the dosage and ration of hemicellulases and cellulases.** *Italic 6-Science and Technology of Biomass: Advances and Challenges*. Viterbo, Italy: Tuscia University, 2011.
- Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J: **Optimization of enzymes complexes for lignocellulose hydrolysis.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007; **97**:287–296.
- Bhattacharya D, Germinario LT, Winter WT: **Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse.** *Carbohydrate Polymers* 2008, **73**:371–377.
- Bidlack J, Malone M, Benson R: **Molecular structure and components integration of secondary cell walls in plants.** *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences* 1992, **75**:51-56.
- Brett CT, Waldron KW. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**, 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1996.
- Bourbonnais R, Paice MG: **Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation.** *FEBS Letters* 1990, **267**:99-102.
- Brandberg T, Sanandaji N, Gustafsson L, Franzén CJ: **Continuous fermentation of undetoxified dilute acid lignocellulose hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 96581 using cell recirculation.** *Biotechnology Progress* 2005, **21**:1093-1101.

- Buranov AU, Mazza G: **Lignin in straw of herbaceous crops.** *Industrial Crops and Products* 2008, **28**:237–259.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT: **Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes.** *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**(4):1775-1784.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez AT, Romero J, Gutiérrez A, del Río JC: **Paper pulp delignification using laccase and natural mediators.** *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:1264-1271.
- Camarero S, Cañas AI, Nousiainen P, Record E, Lomascolo A, Martínez MJ, Martínez A: ***p*-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase detoxification of recalcitrant compounds.** *Environmental Science and Technology* 2008, **42**:6703–6709.
- Canam T, Town JR, Tsang A, McAllister TA, Dumonceaux TJ: **Biological pretreatment with a cellobiose dehydrogenase-deficient strain of *Trametes versicolor* enhances the biofuel potential of canola straw.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:10020-10027.
- Cara C, Ruiz E, Ballesteros I, Negro MJ, Castro E: **Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification.** *Process Biochemistry* 2006, **41**:423–429.
- Cardona CA, Sánchez OJ: **Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities.** *Bioresource Technology* 2007, **98**:2415-2457.
- Carpita NC, Gibeaut DM: **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* 1993, **3**:1-30.
- Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC: **Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501.** *Bioresource Technology* 2007, **98**:1947-1950.
- Chen Q, Marshall MN, Geib SM, Tien M, Richard TL: **Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover.** *Bioresource Technology* 2012, **117**:186-192.
- Cheng JJ, Timilsina GR: **Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review.** *Renewable Energy* 2011, **36**:3541-3549.
- Chu BCH, Lee H: **Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation.** *Biotechnology Advances* 2007, **25**:425-441.
- Cosgrove DJ: **Loosening of plant cell walls by expansins.** *Nature* 2000, **407**:321-326.



- Cullen D, Kersten PJ: **Enzymology and molecular biology of lignin degradation**. En: *The mycota III: Biochemistry and Molecular Biology, 2nd edition*. Brambl R, Marzluf GA (Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2004, 249-273.
- da Cunha-Pereira F, Hickert LR, Sehnem NT, de Souza-Cruz PB, Rosa CA, Ayub, MAZ: **Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations**. *Bioresource Technology* 2011, **102**:4218–4225.
- Dai D, Fan M: **Investigation of the dislocation of natural fibres by Fourier-transform infrared spectroscopy**. *Vibrational Spectroscopy* 2011, **55**:300–306.
- Dahlman O, Jacobs A, Sjöberg J: **Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps**. *Cellulose* 2003, **10**:325-334.
- Devantier R, Pedersen S, Olsson L: **Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005, **68**:622-629.
- Dias AA, Freitas GS, Marques GS, Sampaio A, Fraga IS, Rodrigues MA, Evtuguin DV, Bezerra RM: **Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi**. *Bioresource Technology* 2010, **101**:6045-6050.
- Dien BS, Ximenes EA, O'Bryan PJ, Moniruzzaman M, Li X-L, Balan V, Dale B, Cotta MA: **Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol**. *Bioresource Technology* 2008, **99**:5216–5225.
- Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P: **Cellulose degradation by oxidative enzymes**. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2012, **2**(3): e201209015.
- Directiva 2009/28/CE del parlamento europeo y del consejo. 2009.
- dos Santos-Bernardes MA. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. InTech, Rijeka, Croatia, 2011.
- Dwivedi P, Alavalapati JRR, Lal P: **Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments**. *Energy for Sustainable Development* 2009, **13**:174–182
- Fengel D, Wegener G. **Wood: chemistry, ultrastructure and reactions**. Ed: Walter de Gruyter. Berlin-Nueva York, 1989, 613.

- Ferreira S, Gil N, Queiroz JA, Duarte AP, Domingues FC: **An evaluation of the potential of *Acacia dealbata* as raw material for bioethanol production.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:4766-4773.
- FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham MF, Whitney RA: **A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:8915-8922.
- Folin O, Ciocalteu V: **On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.** *Journal of Biological Chemistry* 1927, **73**:627-650.
- Fonseca BG, Moutta RO, Ferraz FO, Vieira ER, Nogueira AS, Baratella BF, Rodrigues LC, Hou-Rui Z, da Silva SS: **Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2011, **38**:199-207.
- Galbe M, Zacchi G: **A review of the production of ethanol from softwood.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, **59**:618-628.
- García-Aparicio MP, Ballesteros I, González A, Oliva JM, Ballesteros M, Negro MJ. (2006). **Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, **129**:278-288.
- García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanares P, Ballesteros M, Ballesteros I, González A, Negro MJ: **Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.** *Fuel* 2011, **90**:1624-1630.
- Ghose TK: **Measurement of cellulase activities.** *Pure and Applied Chemistry* 1987, **59**:257-268.
- Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R: **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:4775-4800.
- Gold MH, Alic M: **Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** *Microbiological Reviews* 1993, **57**:605-622
- Gómez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. **Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls.** *New Phytologist* 2008, **178**:473-485.
- Goodey AR, Tubbs RS: **Genetic and biochemical analysis of the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to decarboxylate cinnamic acid.** *Journal of General Microbiology* 1982, **128**:2615-2620.

- Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, Slininger PJ, Liu ZL, Skory CD. **Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, **71**:339-349.
- Gupta R, Mehta G, Khasa YP, Kuhad RC: **Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses.** *Biodegradation* 2011, **22**:797-804.
- Gurram RN, Datta S, Lin YJ, Snyder SW, Menkhaus TJ: **Removal of enzymatic and fermentation inhibitory compounds from biomass slurries for enhanced biorefinery process efficiencies.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:7850–7859.
- Gutiérrez A, Rencoret J, Cadena EM, Rico A, Barth D, del Río JC, Martínez AT: **Demostration of laccase-based removal of lignin from wood and non-wood plant feedstocks.** *Bioresource Technology* 2012, **119**:114-122.
- Gyalai-Korpos M, Mangel R, Alvira P, Dienes D, Ballesteros M, Réczey K: **Cellulase production using different streams of wheat grain- and wheat straw-based ethanol processes.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2011, **38**(7):791-802.
- Hahn-Hägerdal B, Jeppsson H, Skoog K, Prior BA: **Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast.** *Enzyme and Microbial Technology* 1994, **16**:933-943.
- Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L: **Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family.** *Biochemistry* 2010, **49**:3305–3316.
- Hayn M, Steiner W, Klinger R, Steinmüller H, Sinner M, Esterbauer H: **Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics.** En: *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. Ed: Saddler JN. CAB International, Wallingford, Reino Unido, 1993, 33-72.
- Hendriks ATW, Zeeman G: **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology* 2009, **100**:10–18.
- Henriksson H, Stahlberg J, Isaksson R, Pettersson G: **The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: a comparison of cellobiohydrolase 1 and endoglucanase 1.** *FEBS letters* 1996, **390**:339-346.
- Hidayat BJ, Felby C, Johansen KS, Thygesen LG: **Cellulose is not just cellulose: a review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils.** *Cellulose* 2012, **19**:1481–1493.

- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH: **Novel enzymes for the degradation of cellulose.** *Biotechnology for Biofuels* 2012, **5**:45.
- Ibarra D, Camarero S, Romero J, Martínez MJ, Martínez AT: **Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006a, **66**:2052-2056.
- Ibarra D, Romero J, Martínez MJ, Martínez AT, Camarero S: **Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006b, **39**:1319–1327.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change): **Climate change 2007: synthesis report.** Core Writing Team, Pachauri RK, Reisinger A (Eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 2008.
- Itoh H, Wada M, Honda Y, Kuwahara M, Watanabe T: **Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi.** *Journal of Biotechnology* 2003, **103**:273-280.
- Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B: **Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998, **49**:691-697.
- Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C: **Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2007a, **1**:119-134.
- Jørgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J, Felby C: **Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007b, **96**:862–870.
- Jørgensen H: **Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, **153**:44-57.
- Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L: **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochemistry* 2005, **40**:3519–3525.
- Jun H, Kieselbach T, Jönsson LJ: **Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source.** *Microbial Cell Factories* 2011, **10**:68.
- Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá A, Martínez AT, Martínez MJ: **Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol.** *Bioresource Technology* 2009, **100**:6378-6384.

- Jurado M, Martínez, AT, Martínez MJ, Saparrat MCN: **Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes.** *Comprehensive Biotechnology* 2011, **6**:595-603.
- Käärrik, A: **The identification of the mycelia of wood decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds.** *Studia Forestalia Suecia* 1965, **31**:3-81.
- Kalyani D, Dhiman SS, Kim H, Jeya M, Kim IW, Lee JK: **Characterization of a novel laccase from the isolated *Coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass.** *Process Biochemistry* 2012, **47**:671-678.
- Karhumaa K, Sánchez RG, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF: **Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbial Cell Factories* 2007, **6**:5.
- Katahira S, Ito M, Takema H, Fujita Y, Tanino T, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A: **Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1.** *Enzyme and Microbial Technology* 2008, **43**:115-119.
- Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK: **Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, **66**:10-26.
- Kolb M, Sieber V, Amann M, Faulstich M, Schieder D: **Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*.** *Bioresource Technology* 2012, **104**:298-304.
- Koppram R, Albers E, Olsson L: **Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass.** *Biotechnology for Biofuels* 2012, **5**:32.
- Koppram R, Nielsen F, Albers E, Lambert A, Wännström S, Welin L, Zacchi G, Olsson L: **Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales.** *Biotechnology for Biofuels* 2013, **6**(1):2.
- Kristensen JB, Thygesen LG, Felby C, Jørgensen H, Elder T: **Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production.** *Biotechnology for Biofuels* 2008, **1**:5.
- Kristensen JB, Felby C, Jørgensen H: **Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose.** *Biotechnology for Biofuels* 2009, **2**:11.
- Kuhar S, Nair LM, Kuhad RC: **Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation**

- improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol.** *Canadian Journal of Microbiology* 2008, **54**:305-313.
- Kuila A, Mukhopadhyay M, Tuli DK, Banerjee R: **Accessibility of enzymatically delignified *Bambusa bambos* for efficient hydrolysis at minimum cellulase loading: an optimization study.** *Enzyme Research* 2011a, **2011**:805795.
- Kuila A, Mukhopadhyay M, Tuli DK, Banerjee R: **Production of ethanol from lignocellulosics: an enzymatic venture.** *EXCLI Journal* 2011b, **10**:85-96.
- Kwon YJ, Ma AZ, Li Q, Wang F, Zhuang GQ, Liu CZ: **Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:8099–8104.
- Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ: **Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1999, **77-79**:91-103.
- Larsson S, Nivelbrant NO, Jönsson LJ: **Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001a, **57**:167-174.
- Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ: **Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase.** *Applied and Environmental Microbiology* 2001b, **67**:1163-1170.
- Laureano-Pérez L, Teymouri F, Alizadeh H, Dale BE: **Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005, **121**:1081-1099.
- Lee H, Cho DH, Kim YH, Shin SJ, Kim SB, Han SO, Lee J, Kim SW, Park C: **Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2011, **16**:755-760.
- Lee JW, Gwak KS, Park JY, Park MJ, Choi DH, Kwon M, Choi IG: **Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi.** *Journal of Microbiology* 2007, **45**:485-491.
- Li J, Sun F, Li X, Yan Z, Yuan Y, Liu X: **Enhanced saccharification of corn straw pretreated by alkali combining crude ligninolytic enzymes.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2012, **87**(12):1687-1693.
- Li X, Beeson WTt, Phillips CM, Marletta MA, Cate JH: **Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases.** *Structure* 2012, **20**:1051-1061.



- Lichts FO: **World fuel ethanol production**. *Renewable Fuels Association* 2012 [Online] Available at: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>.
- Linde M, Galbe M, Zacchi G: **Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration**. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:1100–1107.
- Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW: **Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005, **121-124**:451-460.
- López MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J, Bothast RJ: **Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, **64**:125-131.
- Lu C, Wang H, Luo Y, Guo L: **An efficient system for pre-delignification of gramineous biofuel feedstock in vitro: Application of a laccase from *Pycnoporus sanguineus* H275**. *Process Biochemistry* 2010, **45**:1141–1147.
- Lu Y, Wang Y, Xu G, Chu J, Zhuang Y, Zhang S: **Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, **160**:360–369.
- Lynd LR: **Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy**. *Annual Review of Energy and the Environment* 1996, **21**:403-465.
- Lynd LR, Van Zyl WH, Mc Bride JE, Laser M: **Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update**. *Current Opinion in Biotechnology* 2005, **16**:577-583.
- Manzanares P, Negro MJ, Oliva JM, Saez F, Ballesteros I, Ballesteros M, Cara C, Castro E, Ruiz E: **Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2011, **86**(6):881-887.
- Marchessault RH, Malhotra SL, Jones AY, Perovic A: **The wood explosion process: characterization and uses of lignin/cellulose products**. En: *Wood and agricultural residues*, Academic press, Nueva York, EE.UU., 1983, 401-413.
- Martín C, Galbe M, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B, Jönsson LJ: **Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae***. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, **31**:274-282.
- Martín C, Marcet M, Almazán O, Jönsson LJ: **Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate**

- with high content of fermentation inhibitors.** *Bioresource Technology* 2007, **98**:1767-1773.
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC: **Biodegradation of lignocellulosics: microbiol, chemical, and enzymatic aspects of the fangal attack of lignin.** *International Microbiology* 2005, **8**:195-204.
- Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, del Río JC, Gutiérrez A: **Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill.** *Current Opinion in Biotechnology* 2009, **20**:348-357.
- Martín-Sampedro R, Eugenio ME, García JC, López F, Villar JC, Díaz MJ: **Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*.** *Biomass and Bioenergy* 2012, **42**:97-106.
- Mayer AM, Staples RC: **Laccase: new functions for an old enzyme.** *Phytochemistry* 2002, **60**:551-565.
- McKendry P: **Energy production from biomass (part 1): overview of biomass.** *Bioresource Technology* 2002, **83**:37-46.
- Meinander NQ, Boels I, Hahn-Hägerdal B: **Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpression of TAL1.** *Bioresource Technology* 1999, **68**:79-87.
- Merino ST, Cherry J: **Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2007, **108**:95-120.
- Miller, G.L: **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry* 1959, **31**:426-428.
- Mohagheghi A, Tucker M, Grohmann K, Wyman C: **High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1992, **33**:67-81.
- Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L: **The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **49**:492-498.
- Monavari S, Bennato A, Galbe M, Zacchi G: **Improved one-step steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated softwood with time-dependent temperature profile for ethanol production.** *Biotechnology Progress* 2010, **26**:1054-1060.



- Mukhopadhyay M, Kuila A, Tuli DK, Banerjee R: **Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification.** *Biomass and Bioenergy* 2011, **35**:3584-3591.
- Muñoz C, Mendonça R, Baeza J, Berlin A, Saddler J, Freer J: **Bioethanol production from bio-organosolv pulps of *Pinus radiata* and *Acacia dealbata*.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007, **82**:767-774.
- Mussatto SI, Roberto IC: **Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review.** *Bioresource Technology* 2004, **93**:1-10.
- Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Oliva JM, Cabañas A, Ballesteros M: **Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003, **105**:87-100.
- Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, van Walsum GP, Dien BS, Iten LB: **Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate.** *Enzyme and Microbial Technology* 2008, **42**:624-630.
- Nichols NN, Dien BS, Cotta MA: **Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:7545-7550.
- NREL. **Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures.** *National Renewable Energy Laboratory*, Golden, CO, 2011. Available from: [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)
- Öhgren K, Rudolf A, Galbe M, Zacchi G: **Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content.** *Biomass and Bioenergy* 2006, **30**:863-869.
- Öhgren K, Vehmaanperä J, Siika-Aho M, Galbe M, Viikari L, Zacchi G: **High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production.** *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **40**:607-613.
- Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S: **Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008, **106**:128-133.
- Olanders B, Steenari BM: **Characterization of ashes from wood and straw.** *Biomass and Bioenergy* 1995, **8**:105-115.
- Oliva JM, Sáez F, Ballesteros I, González A, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros M: **Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion**

- pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2003, **105**:141-153.
- Oliva JM, Ballesteros I, Negro MJ, Manzanares P, Cabañas A, Ballesteros M: **Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*.** *Biotechnology Progress* 2004, **20**:715–720.
- Oliva JM, Negro MJ, Sáez F, Ballesteros I, Manzanares P, González A, Ballesteros M: **Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*.** *Process Biochemistry* 2006, **41**:1223–1228.
- Olofsson K, Bertilsson M, Liden G: **A short review on SSF—an interesting option for ethanol production from lignocellulosic feedstock.** *Biotechnology for Biofuels* 2008, **1**:1–14.
- Olsson L, Jørgensen H, Krogh KBR, Roca C: **Bioethanol production from lignocellulosic material.** En: *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*. Ed: Dumitriu, S. Marcel Dekker, Nueva york, EE.UU., 2005, 957-993.
- Olsson L, Soerensen HR, Dam BP, Christensen H, Krogh KM, Meyer AS: **Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, **129-132**:117-129.
- Paice MG, Bourbonnais R, Reid ID, Archibald FS, Jurasek L: **Oxidative bleaching enzymes: A review.** *Journal of Pulp and Paper Science* 1995, **21**:280-284.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Szengyel Z, Zacchi G, Réczey K: **Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment.** *Enzyme and Microbial Technology* 1997, **20**:286-293.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B: **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification.** *Bioresource Technology* 2000a, **74**:17-24.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B: **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism of inhibition.** *Bioresource Technology* 2000b, **74**:25-33.
- Palonen H, Viikari L: **Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **86**:550-557.
- Panagiotou G, Olsson L: **Effect of compounds released during pre-treatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007, **96**:250-258.

- Parawira W, Tekere M: **Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review.** *Critical Reviews in Biotechnology* 2011, **31**:20-31.
- Pérez JA, González A, Oliva JM, Ballesteros I, Manzanares P: **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* 2007, **82**:929-938.
- Petersson A, Almeida JR, Modig T, Karhumaa K, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G: **A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Sacharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance.** *Yeast* 2006, **23**:455-464.
- Plan de Acción Nacional de Energías Renovables de España. PANER 2010-2020.
- Plan de Energías Renovables. PER 2011-2020.
- Poutanen K, Rättö M, Puls J, Viikari L: **Evaluation of different microbial xylanolytic systems.** *Journal of Biotechnology* 1987, **6**:49-60.
- Purwadi R, Brandberg T, Taherzadeh MJ: **A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolysate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast.** *International Journal of Molecular Sciences* 2007, **8**:920-932.
- Qing Q, Yang B, Wyman CE: **Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:9624-9630.
- Qiu W, Chen H. (2012). **Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment.** *Bioresource Technology* 2012, **118**, 8-12.
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R: **The path forward for biofuels and biomaterials.** *Science* 2006, **311**:484-489.
- Rahikainen JL, Martin-Sampedro R, Heikkinen H, Rovio S, Marjamaa K, Tamminen T, Rojas OJ, Kruus K: **Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption.** *Bioresource Technology* 2013, **133**:270-278.
- Reddy N, Yang Y: **Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications.** *Trends in Biotechnology* 2005, **23**:22-27.
- Rosgaard L, Andric P, Dam-Johansen K, Pedersen S, Meyer AS: **Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2007, **143**:27-40.

- Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, Liden G: **A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce.** *Enzyme and Microbial Technology* 2005, **37**:195-204.
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT: **Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*.** *Molecular Microbiology* 1999, **31**:223-235.
- Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Pérez-Boadam M, Martínez MJ, Martínez AT: **A new versátil peroxidase from *Pleurotus*.** *Biochemical Society Transactions* 2001, **29**:116-122.
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT: **Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this.** *Microbial Biotechnol* 2009, **2**:164-177.
- Runquist D, Fonseca C, Radstrom P, Spencer-Martins I, Hahn-Hägerdal B. **Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, **82**:123-130.
- Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyyssönen E, Bhatia A, Ward M, Penttilä M: **Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similiary to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials.** *European Journal of Biochemistry* 2002, **269**:4202-4211.
- Saloheimo A, Rauta J, Stasyk OV, Sibirny AA, Penttila M, Ruohonen L: **Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2007, **74**:1041-1052.
- Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez AT, Martínez MJ: **Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:7500-7506.
- Samaniuk JR, Wang J, Root TW, Scott CT, Klingenberg DJ: **Rheology of concentrated biomass.** *Korea-Australia Rheology Journal* 2011, **23**(4):237-245.
- Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Tuskan GA: **Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2010, **4**:209-226.
- Sassner P, Galbe M, Zacchi G: **Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**:756-762.
- Schneider H: **Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using a mutant yeast.** *Enzyme and Microbial Technology* 1996, **19**:94-98.

- Shi J, Sharma-Shivappa RR, Chinn M, Howell N: **Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production.** *Biomass and Bioenergy* 2009, **33**:88-96.
- Singh D, Zeng J, Laskar DD, Deobald L, Hiscox WC, Chen S: **Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*.** *Biomass and Bioenergy* 2011, **35**:1030–1040.
- Singh P, Suman A, Tiwari P, Arya N, Gaur A, Shrivastava AK: **Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008, **24**:667-673.
- Söderström J, Pilcher L, Galbe M, Zacchi G: **Combined use of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and SO<sub>2</sub> impregnation for steam pretreatment of spruce in ethanol production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2003, **105-108**:127-140.
- Somogyi M: **A new reagent for the determination of sugars.** *Journal of Biological Chemistry* 1945, **160**:61-73.
- Sonderegger M, Jeppsson H, Larsson C, Gorwa-Grauslund MF, Boles E, Olsson L, Spencer-Martins I, Hahn-Hägerdal B, Sauer U: **Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **87**:90-98.
- Stenberg K, Bollók M, Réczey K, Galbe M, Zacchi G: **Effect of substrate and cellulose concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production.** *Biotechnology and Bioengineering* 2000, **68**:205–210.
- Stoutenburg RM, Perrotta JA, Nakas JP: **Overcoming inhibitors in a hemicellulosic hydrolysate: improving fermentability by feedstock detoxification and adaptation of *Pichia stipitis*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2011, **38**:1939-1945.
- Sun RC, Tomkinson J: **Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw.** *Carbohydrate Polymers* 2002, **50**:263-271.
- Sun Y, Cheng JY: **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** *Bioresource Technology* 2002, **83**:1-11.
- Sun XF, Sun RC, Fowler P, Baird MS: **Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005a, **53**:860-870.
- Sun XF, Xu F, Sun RC, Geng ZC, Fowler P, Baird MS: **Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw.** *Carbohydrate Polymers* 2005b, **60**:15-26.

- Suurnäkki A, Tenkanen M, Siika-aho M, Niku-Paavola ML, Viikari L, Buchert J: **Trichoderma reesei cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp.** *Cellulose* 2000, **7**(2):189-209.
- Tabka MG, Herpoel-Gimbert I, Monod F, Asther M, Sigoillot JC: **Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase, xylanase and feruloyl esterase treatment.** *Enzyme and Microbial Technology* 2006, **39**:897–902.
- Talebnia F, Taherzadeh MJ: **In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolysate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*.** *Journal of Biotechnology* 2006, **125**:377-384.
- Taherzadeh MJ, Karimi K: **Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review.** *BioResources* 2007, **2**:707-738.
- Taherzadeh MJ, Karimi K: **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review.** *International Journal of Molecular Sciences* 2008, **9**:1621-1651.
- Taherzadeh MJ, Karimi K: **Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects.** En: *Biofuels. Alternative feedstocks and conversion processes.* Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E (eds.), Elsevier, 2011, 287–311.
- Tejirian A, Xu F: **Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**(3):239-47.
- Terziev N, Daniel G, Marklund A: **Dislocations in Norway spruce fibers and their effect on properties of pulp and paper.** *Holzforschung* 2005, **59**:163–169.
- Thomsen MH, Thygesen A, Thomsen AB: **Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, **83**:447-455.
- Thygesen LG, Hidayat BJ, Johansen KS, Felby C: **Role of supramolecular cellulose structures in enzymatic hydrolysis of plant cell walls.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2011, **38**:975-983.
- Tian S, Luo XL, Yang XS, Zhu JY: **Robust cellulosic ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine using an adapted strain *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:8678-8685.
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M: **Realistic approach for full-scale ethanol production from lignocellulose: a review.** *Journal of Scientific and Industrial Research* 2008a, **67**:874-884.



- Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M, 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.** *Biotechnology and Bioengineering* 2008b, **100**(6):1122-1131.
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, González A, Ballesteros I, Ballesteros M: **Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process.** *Fuel* 2009a, **88**:2142–2147.
- Tomás-Pejó E, García-Aparicio M, Negro MJ, Oliva JM, Ballesteros M: **Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes.** *Bioresource Technology* 2009b, **100**(2):890-895.
- Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Oliva JM, Olsson L: **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* 2010, **37**:1211-1220.
- Tomás-Pejó E, Alvira P, Ballesteros M, Negro MJ: **Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion.** En: *Biofuels. Alternative feedstocks and conversion processes*. Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E (eds.), Elsevier, 2011, 149-176.
- Viamajala S, McMillan JD, Schell DJ, Elander RT: **Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations – Effects of saccharification and particle size.** *Bioresource Technology* 2009, **100**:925-934.
- Vivekanand V, Dwivedi P, Sharma A, Sabharwal N, Singh RP: **Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008, **24**:2799-2804.
- Wahlbom CF, van Zyl WH, Jönsson LJ, Hahn-Hägerdal B, Otero RR: **Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054.** *FEMS Yeast Research* 2003, **3**(3):319-326.
- Wan C, Li Y: **Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispota* for enzymatic hydrolysis and ethanol production.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:6398-6403.
- Wang W, Kang L, Wei H, Arora R, Lee YY: **Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2011, **164**(7):1139-1149.

- Westman JO, Manikonda RB, Franzén CJ, Taherzadeh MJ: **Encapsulation-induced stress helps *Saccharomyces cerevisiae* resist convertible lignocellulose derived inhibitors.** *International Journal of Molecular Sciences* 2012, **13**:11881-11894.
- Wilson JJ, Deschatelets L, Nishikawa NK: **Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1989, **31**:592–596.
- Wingren A, Galbe M, Zacchi G: **Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks.** *Biotechnology Progress* 2003, **19**:1109-1117.
- Wyman CE: **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization.** Taylor and Francis, Washington, 1996.
- Xiao Z, Zhang X, Greff DJ, Saddler JN: **Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004, **113-116**:1115-1126.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M: **Inhibition of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology* 2010, **46**:170-176.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M: **Deactivation of cellulases by phenols.** *Enzyme and Microbial Technology* 2011, **48**:54-60.
- Yang B, Wyman CE: **Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2008, **2**:26-40.
- Yang P, Jiang S, Zheng Z, Luo S, Pan L: **Effect of alkali and laccase pretreatment of *Brassica campestris* straw: Architecture, crystallisation, and saccharification.** *Polymers from Renewable Resources* 2011, **2**:21-34.
- Yang X, Zhang S, Zuo Z, Men X, Tian S: **Ethanol production from the enzymatic hydrolysis of non-detoxified steam-exploded corn stalk.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:7840-7844.
- Yu H, Du W, Zhang J, Ma F, Zhang X, Zhong W: **Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:6728-6734.
- Yu Y, Feng Y, Xu C, Liu J, Li D: **Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:5123-5128.
- Yu Z, Jameel H, Chang HM, Park S: **The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis.** *Bioresource Technology* 2011, **102**:9083-9089.



- Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J: **Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation.** *Biotechnology for Biofuels* 2010a, **3**:26.
- Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G, Bao J: **Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor.** *Biotechnology and Bioengineering* 2010b, **105**:718–728.
- Zhang LH, Li D, Wang LJ, Wang TP, Zhang L, Chen XD, Mao ZH: **Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw.** *Bioresource Technology* 2008, **99**:8512-8515.
- Zhang M, Wang F, Sua R, Qia W, Hea Z: **Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment.** *Bioresource Technology* 2010, **101**:4959–4964.
- Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ: **A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds.** *Journal of Applied Phycology* 2006, **18**:445–450.
- Zhu L, O'Dwyer JP, Chang VS, Granda CB, Holtzapple MT: **Structural features affecting biomass enzymatic digestibility.** *Bioresource Technology* 2008, **99**:3817-3828.
- Zuroff TR, Curtis WR: **Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, **93**:1423-1435.





## *LISTADO DE PUBLICACIONES*



---

## LISTADO DE PUBLICACIONES

### Artículo I.

**A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production.** *Critical Reviews in Biotechnology* 2013 (bajo revisión).

*Moreno AD, Ibarra D, Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M*

### Artículo II.

**Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.** *Bioresource Technology* 2012, 106:101–109.

*Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M*

### Artículo III.

**Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* – Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings.** 2013. *Biochemical Engineering Journal* (bajo revisión).

*Moreno AD, Ibarra D, Ballesteros I, Fernández JL, Ballesteros M*

### Artículo IV.

**Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase.** *Bioresource Technology* 2013, 135:239–245.

*Moreno AD, Ibarra D, Ballesteros I, González A, Ballesteros M*

### Artículo V.

**In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies.** *Bioresource Technology* 2013 (aceptado).

*Moreno AD, Tomás-Pejó E, Ibarra D, Ballesteros M, Olsson L*

**Artículo VI.**

**Fed-batch SSCF from steam-exploded wheat straw at high dry matter using a xylose-fermenting *S. cerevisiae* strain: effect of laccase supplementation.**  
*Manuscrito.*

*Moreno AD, Tomás-Pejó E, Ibarra D, Ballesteros M, Olsson L*

**Artículo VII.**

**Improving the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by laccase during ethanol production from steam-exploded wheat straw at high-substrate loadings.** *Biotechnology Progress* 2013, 29(1):74-82.

*Alvira P, Moreno AD, Ibarra D, Sáez F, Ballesteros M*





