



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

**Enzyme Technology for Plant Biomass
Saccharification in Neoteric Solvents**

**Tecnología Enzimática para la Sacarificación
de Biomasa Vegetales en Solventes Neotéricos**

**Dña. Berenice Bernal Juárez
2013**

Memoria presentada para acceder al Grado de Doctor por la
Universidad de Murcia por

BERENICE BERNAL JUÁREZ

Murcia, Julio 2013

Berenice Bernal Juárez ha sido becaria de FPI del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Ref: BES-2009-015448

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos MICIN CTQ2008-00877/PPQ, y MINECO CTQ2011-28903-C02-02 y Fundación SENECA Ref. 08616/PI/08.

Parte de los resultados de investigación contenidos en la presente Memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones:

Artículos

- P. Lozano, **B. Bernal**, J.M. Bernal, M. Pucheault, M. Vaultier, 2011. Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* **13**, 1406–1410.
- P. Lozano, **B. Bernal**, I. Recio and M.P. Belleville. 2012, A cyclic process for full enzymatic saccharification of pretreated cellulose with full recovery and reuse of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, *Green Chem.* **14**, 2631-2637.

Comunicaciones a Congresos

- B. Bernal**, J. M. Bernal, P. Lozano, M. Vaultier. Enzymatic hydrolysis of cellulose in ionic liquids. Congreso Biospain 2010, Septiembre 2010. Pamplona, España.
- P. Lozano, J. M. Bernal. **B. Bernal**, G. Sánchez-Gómez, E. García-Verdugo, S. V. Luis, M. I. Burguete, M. Pucheault, M. Vaultier. Frontiers in White biotechnology Congress. 2011. Delft, Holanda.
- B. Bernal**, I. Recio, P. Lozano. Cyclic process with recovery and recycling of [Bmim][Cl] in the full enzymatic saccharification of Cellulose. Green Solvents for Synthesis. A DECHEMA Congress. October 08-10, 2012, Boppard, Alemania.
- B. Bernal**, I. Recio, P. Lozano, M. P. Belleville, D. Paloucci, G. M. Rios A continuous enzymatic membrane reactor for hydrolysis of regenerated cellulose from [Bmim][Cl] solutions. 1st International Conference of Ionic Liquids in Sep. Purif. Technol.. Septiembre. Sitges, España. (Comunicación oral)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi Director de tesis Don Pedro Lozano Rodríguez por su apoyo absoluto en todo momento, por su paciencia y esfuerzo para enseñarme a buscar la excelencia, a ver las cosas desde otro punto de vista, a ser objetiva y cambiar de rumbo cuando es necesario, por preocuparse de despertar en mí un sentido más crítico de las cosas y sobre todo por ser un excelente ejemplo del amor a los retos y a la ciencia.

Je voudrais remercier également ma codirectrice de thèse Marie-Pierre Belleville pour son soutien inconditionnel en permanence, sa patience sa disponibilité et son sage conseil. Cela a permis de faire de mon séjour en France une fructueuse et belle expérience.

Je remercie le Dr Gilbert Rios de m'avoir donné l'opportunité de travailler à l'Institut Européen des Membranes, ainsi que le Dr José Sánchez pour m'avoir accueillie au sein du département Génie des Procédés Membranaires.

Merci également à Vorleak Chea pour ta générosité en pour m'avoir beaucoup appris, ainsi qu'à l'ensemble du département GPM (Melisa, Oualid, Amira, Jenn, Demian, Nakry), à Cristiana, Alina, Sawsen, Mikael, Sami pour tous les bons moments partagés. A Matthias De-Cazes por tu ayuda incondicional en todo momento tanto profesional como personal, por hacerme reír y olvidarme de cualquier mal momento. Por recordarme lo bonito que es México.

Así mismo deseo agradecer a mi compañera y amiga incondicional Juana María Bernal por todo tu apoyo tanto profesional como personal, por estar ahí en mis mejores y peores momentos, por ser pilar fundador de mi familia española. A David Martínez por tu apoyo en momentos clave de esta tesis y de mi vida, por ser un soporte confiable y leal a prueba de todo. A José María Pastor por ser uno de mis mejores consejeros y maestros en muchos sentidos, por creer siempre en mí. A Marcos Palazón por estar siempre pendiente de tenderme una mano y hacerme sentir como en casa. A Sara Castaño por ser mi ángel salvador en momentos de pánico y confusión, por todos tus consejos que han hecho mi trabajo más sencillo y eficaz. A Sergio Renilla por materializar mis ideas. A Sergio Fructuoso por tu sensibilidad en mis momentos difíciles. A Marleny Cáceres por tu buen humor y por siempre escucharme. A Alejandro Blázquez, Antonio Jara y Francisco Chacón por permitirme aprender junto a ustedes. A Vicente Bernal por ser mi maestro sin necesidad de pedírtelo. A Vanesa Fernández por estar siempre dispuesta a ayudar. A Dani, Javi, Carol, Ali, Kishore, Almudena, Ana, Julia, Theng por aportar alegría y jovialidad a mi vida.

Así mismo deseo agradecer a mi madre Lupita y hermano David por apoyarme en luchar por mis sueños y por ser los facilitadores para hacerlos realidad. Quiero agradecer a mi hermana Saraí por toda tu ayuda e incondicional empatía y a Lisette por tus llamadas clandestinas y tu aliento en mis malos momentos. Agradezco a mi padre por enseñarme que no hay edad para soñar que sólo hay que comenzar a hacer lo necesario para verlos hacerse realidad. Agradezco a mis cuñados Severino y María del Rosario por su apoyo en la distancia y tantas palabras de ánimo así como a mi preciosa ahijada Julieta Danae, por ser mi fuente de inspiración.

Finalmente, quiero agradecer a mi leal compañero en esta batalla, Angel Joel Méndez por tu ayuda incondicional en todo momento así como por darme la fuerza y coraje para seguir adelante, por creer siempre en mí y darme el calor de hogar que tantas veces me acogió y revitalizó.

A mi mamá Lupita y a mi hermano David

Índice	
Resumen	17
Capítulo 1. Introducción y objetivos	25
Introducción	27
1.1 Panorama energético actual	27
1.2. Biomasa y biocombustibles.....	29
1.3. Bioetanol celulósico	33
1.4. Pretratamiento de celulosa	42
1.5. Líquidos iónicos	44
1.6. Hidrólisis enzimática de celulosa	57
1.7. Inmovilización de enzimas	63
1.8. Reactores de enzimáticos de membrana (REM)	68
1.9. Hidrólisis de celulosa en REM	83
1.10. Referencias	87
Objetivos	97
Capítulo 2. Estabilización de celulasa en líquidos iónicos	99
2.1. Resumen.....	101
2.2. Introducción	102
2.3. Materiales y métodos.....	104
2.4. Resultados y discusión	107
2.5. Referencias	114

Capítulo 3. Sacarificación enzimática de celulosa pretratada con[Bmim][Cl].....	117
3.1. Resumen.....	119
3.2. Introducción	120
3.3. Materiales y métodos.....	125
3.4 Resultados y discusión	128
3.5. Referencias	140
Capítulo 4. Reactor enzimático de membrana para la sacarificación de celulosa	145
4.1. Resumen.....	147
4.2. Introducción	148
4.3. Materiales y métodos.....	150
4.4. Resultados y discusión	156
4.5. Referencias	166
Conclusiones	169
Anexo I.....	175
Anexo II.....	183

Resumen

Biomass is recognized as the major world renewable energy source to replace petroleum fuels. The use of bio-fuels (e.g. bioethanol, biodiesel, etc) for energy generation purposes is of particular interest nowadays because they allow mitigation of greenhouse gas emissions, provide means of energy independence and may even offer social and agricultural regional developments. However, the use of edible feedstock to produce bio-fuels is controversial because of the increase in prices of basic food materials (e.g. corn, olive oil, etc), resulting in a clear detrimental impact on the economy of countries.

The utilization of lignocellulosic materials as renewable resources for the production of bioethanol is of great interest, because of the additional benefit of disposal of agricultural solid wastes that usually do not have any economic alternative. The full potential of these agro-resources of low-cost has not yet exploited for several reasons, such as, the lack of an environmental-friendly method to extract cellulose from its primitive materials and the difficulties to readily dissolve cellulose with common solvents. Classical methods for delignification of biomass and cellulose hydrolysis involves thermomechanical processes, treatments with acid or alkali treatments, etc., which results in the production of large amounts of wastewater residues. The greenest approach to carry out the saccharification of biomass involves the use of enzymes (e.g. cellulases and hemicellulases). However, the insolubility of biomass and the presence of lignin greatly reduce the rate and extent of enzyme-catalyzed polysaccharide degradation, being necessary the pre-treatment of these lignocellulosic residues by thermomechanical/chemical steps to facilitate the accessibility of enzymes to glycosidic bonds in cellulose and hemicellulose.

Ionic liquids have emerged as exceptionally interesting non-aqueous reaction media for enzymatic transformations, and research interest in this area has increased widely in recent years. What are ionic liquids? They are simply salts and therefore entirely composed of ions that are liquid below 100°C or usually close to room temperature. Typical room temperature ionic liquids are based on organic cations, e.g. 1,3-dialkylimidazolium, N-, tetraalkylammonium, paired with a variety of anions that

have a strongly delocalized negative charge (e.g. BF_4^- , PF_6^- , triflate, bistriflimide, etc), resulting in colourless, low viscosity and easily handled materials with very interesting properties as solvents. Their interest as green solvents resides in their negligible vapour pressure, excellent thermal stability (up to 300 °C in many cases), high ability to dissolve a wide range of organic and inorganic compounds, including gases (e.g. H_2 , CO_2 , etc) and non-flammable nature, which can be used to mitigate the problem of volatile organic solvents emission to the atmosphere. Moreover, their polarity, hydrophilicity/hydrophobicity and solvent miscibility can be tuned by selecting the appropriate cation and anion. Thus, ionic liquids can be designed to be miscible or immiscible with water or some organic solvents (e.g. hexane, ether, i-PrOH, etc.), increasing their usefulness for recovering products from the reaction mixture [23]. By using anhydrous conditions or low water content (< 2% v/v), all the assayed water-immiscible ionic liquids (i.e. $[\text{Bmim}]^+ [\text{PF}_6]^-$, etc.) were shown to be suitable reaction media for biocatalytic reactions, while no enzymatic activity was observed when anhydrous water-miscible ionic liquids were used, with a few exceptions (i.e. $[\text{Bmim}]^+ [\text{BF}_4]^-$, etc). In these green solvents, enzymes display a high level of activity and stereoselectivity for synthesizing many different compounds, e.g. aspartame, aliphatic and aromatic esters, amino acid esters, biodiesel, polymers, terpene esters, etc.

Recently, ionic liquids show promise as efficient novel solvents for dissolution and pre-treatment of cellulose. The ability of ionic liquids to dissolve large amounts of cellulose at considerably mild conditions, and the feasibility of recovering 100 % of the used ionic liquid to its initial purity, make them attractive for further bioprocessing of cellulose. However, for the only one reference that regards the enzymatic hydrolysis of cellulose dissolved into an ionic liquids medium (e.g. $[\text{Bmim}] [\text{Cl}]$), the assayed ionic liquids were not able to maintain the catalytic activity of cellulase to perform a saccharification process. In the same context, several efforts were made to apply cellulose solution in ionic liquids. Thus, it was demonstrated how dissolved cellulose in ionic liquids may be regenerated by rapid precipitation with an anti-solvent (e.g. water, ethanol, etc), which provokes a loss in their crystalline structure that enhances the saccharification process catalyzed by cellulases. The excellent solvent properties of ionic liquids have also been demonstrated in the dissolution of wood, opening an interesting way to fractionate the lignocellulosic material previously to further applications (e.g. to produce biofuels). The pre-treatment of biomass and/or lignocellulosic material appears as a necessary step previous to any enzymatic process, because of the limited accessibility of glycohydrolases to polysaccharide backbones.

On the other hand, the excellent performance of enzymatic membrane reactors to carry out depolymerization/saccharification of many different polysaccharides have been reported, e.g. pectin hydrolysis during juice clarification. The attachment of enzymes onto the filtration surface of any ceramic or polymeric membranes, and their coupling into cross-flow systems to be operated in recirculation mode, have been shown as the most efficient way to perform all types of biotransformation with industrial application.

The overall aim of this PhD thesis consists in the application of the enzyme technology in the design and optimization of integrated processes of saccharification of cellulose by using both the ionic liquids and membrane reactor technologies.

The first chapter of this PhD thesis is devoted to a deep review under the most important topic concerned in aims. Thus, as a first part, the importance of lignocellulosic materials, the characteristic of ILs and their use to dissolve cellulose is widely described. At this point, it is necessary to underline how more than twenty ILs are known to dissolve cellulose. In general, the inter- and intra-molecular hydrogen bonds of cellulose are thought to be disrupted, replaced by hydrogen bonding between the IL anion and the carbohydrate hydroxyls. Consequently, the basicity of the IL anions can alter cellulose solubility. To date, chloride, acetate, formate, or alkylphosphonate anions have shown the most promise, because they can effectively hydrogen bond with cellulose. Chloride-containing ionic liquids dissolve pulp cellulose up to 25 wt%, although these solvents require relatively high temperatures and exhibit high viscosities. Chloride-containing ILs tend to be more viscous than those containing acetate and are more thermally stable than those containing formate. Dissolution of cellulose in [Bmim][Cl] is sensitive to water content; less than 1% water content is necessary because water competes with the [Cl] anion for hydrogen bonding with the cellulose hydroxyls. Water may also coordinate with the chloride ions. For commercial cellulose processing, ILs with low toxicity, low melting points and low viscosities are desirable, and imidazolium-based ILs with carboxylic acid or phosphonate anions have received the most attention.

At this point, the potential for performing cellulase-catalyzed reactions on cellulose dissolved in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]) has been investigated by several authors. However, it was observed the irreversible solvent and ionic strength-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. Experiments, varying both cellulase and IL solvent concentrations, have indicated that

[Bmim][Cl], and several other ILs, as well as dimethylacetamide–LiCl (a well-known solvent system for cellulose), inactivate cellulase under these conditions. Despite cellulase inactivity, results obtained from these studies led to valuable insights into the requirements necessary for enzyme activity in IL systems.

In this context, researchers proposed alternative approaches to overcome the negative effect of ILs-dissolving cellulose on cellulase activity and stability for cellulose saccharification, e.g. by using buffered media containing “benign” dissolved ILs at low concentrations, like dialkylphosphate or acetate ILs, or by coating immobilized cellulase with a protective shell of hydrophobic ILs, like 1-butyl-3-methylimidazolium bistriflimide, the identification and application of cellulases from microbial sources others than fungus (e.g. the halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*) with improved ILs tolerance, or the use of concentrated sea water as free-IL alternative reaction medium. However, the most popular approach involves the re-precipitation of cellulose from IL solutions into polar molecular solvents (e.g. water, ethanol, etc.) in order to disrupt the crystalline structure of this polysaccharide, thus improving its subsequent enzymatic hydrolysis in buffered media. The digestibility of pretreated biomass by cellulase is limited by cellulose accessibility. However, the full degradation of cellulose to its glucose monomer units has not been reported. Some authors have applied ultrasonic intensification during the pretreatment of cellulose with ILs to improve the disruption of the cellulose structure, which enhances enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous/IL media, providing up to 95% yield after 24 h reaction.¹³ Other authors carried out the enzymatic hydrolysis step of [Bmim][Cl]-pretreated cellulose (5 mg/mL) in pH 4.8 citrate buffer system containing up to 20% of another IL, such as the tris-(2-hydroxyethyl)methylammonium methylsulfate, which yields up to 4 mg/mL glucose after 15 h at 60 °C.

However, to the different advantages that ionic liquid technology may provide as regards cellulose processing in the bioethanol industry should be added the economical and environmental sustainability of the process based on the full recovery and recycling of ionic liquids. Some ionic liquids have been described as being not fully green solvents because of their low biodegradability and high (eco)toxicological properties. Several approaches to recover ionic liquids from biomass-ionic liquids solutions have recently been proposed, e.g. the use of aqueous kosmotropic salt solutions after a cellulose re-precipitation step with polar solvent to form a three-phase system forming an IL-rich phase, or the chromatographic separation of the IL and glucose from the enzymatic reaction mixture using alumina as stationary phase, which

provided up to 93% IL recovery. However, since the final destination of the hydrolyzed cellulose solutions is fermentation by yeast to produce bioethanol, the effect of ILs on the viability of yeast cells should also be taken into account.

The second chapter of this PhD thesis is devoted to a new approach for improving the cellulase stability against 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]), based on coating of immobilized enzyme particles with hydrophobic ILs, is proposed. The stability of commercial cellulase (Celluclast[®]), immobilized onto a polymeric support (Amberlite XAD4), was firstly studied in ten different ionic liquids (ILs) at 50 and 80°C, respectively. Hydrophobic ILs clearly enhanced the enzyme thermal stability, i.e. butyltrimethyl-ammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([N₁₁₁₄][NTf₂]) enhances up to 4-times half-life time of the immobilized enzyme at 50°C, while [Bmim][Cl] behaved as a powerful enzyme deactivating agent. Thus, the stability of cellulase in hydrophobic IL/[Bmim][Cl] mixtures was greatly improved with respect to [Bmim][Cl] alone. A stabilized cellulase derivative obtained by coating immobilized enzyme particles with [N₁₁₁₄][NTf₂], has been then successfully used for the saccharification of dissolved cellulose in [Bmim][Cl] (i.e. up to 50 % hydrolysis in 24 h) at 50°C and 1.5 w/v water content.

In the third chapter, a sustainable cyclic process for the enzymatic saccharification of ionic liquid-pretreated cellulose, in which the ionic liquid is recovered and recycled, has been developed. Homogeneous cellulose solutions in the IL 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]) were used to prepare amorphous cellulose by antisolvent precipitation with water, ethanol or equimolar water/ethanol mixtures as green molecular solvents. Several operation parameters (e.g. solvent, temperature, ultrasounds, etc.) for both cellulose precipitation and the washing steps were tested to achieve full desorption of the IL from the cellulose backbone. In the best conditions, up to 99.7 % IL was recovered, which was then successfully reused in further cellulose dissolution/precipitation cyclic processes. Furthermore, the cellulose regenerated in each cycle was an excellent substrate for enzymatic hydrolysis, permitting full hydrolysis (i.e. up to 97.7% hydrolysis after 4 h at 50 °C) by the combined action of both cellulase and cellobiase enzymes, that provides a clear glucose solution. The excellent suitability of this glucose solution for growing aerobic *Saccharomyces cerevisiae* was demonstrated. In conclusion, this chapter shows how the suitability of ionic liquid technology biomass processing to provide useful substrates for enzymatic hydrolysis is clearly enhanced by the IL recovery. By combining green molecular antisolvents, like water or ethanol, and ultrasounds, efficient protocols to fully recover

the IL from cellulose solutions can be designed. Moreover, the ionic liquid can be purified by simple distillation, before being applied in further biomass processing. In addition to the economic and environmental benefits provided by the full recovery of IL, the excellent suitability of the resulting amorphous cellulosic substrate for full transformation into directly fermentable glucose should be emphasized.

In the four chapter of this PhD thesis, both continuous and semi-continuous enzymatic membrane reactors for enzymatic saccharification of cellulose have been developed. Enzymatic hydrolysis of cellulose pretreated by 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]) demonstrated excellent batch hydrolysis yields (93%) after 4h of reaction. The operational behavior of the reactor based on polyethersulfonic membrane operating under semi-continuous mode showed an excellent suitability for cellulose hydrolysis, which it was maintained unchanged for 9 cycles operation reuse of the enzyme and with no fouling problems of membrane. Continuous enzymatic saccharification of cellulose was carried out in a ceramic membrane reactor, being studied the influence of enzyme concentration (cellulase, cellobiose), inlet feeding substrate concentration and residence time on the operational behavior. The excellent suitability of the proposed reactor was demonstrated in all cases, because of the constant hydrolytic degree which was observed at the steady state of the system. Additionally, outlet flow profiles were always unchanged with time, as results of the appropriate enzymatic degradation of the substrate that avoid any membrane fouling problem.

As conclusion, the combination of the ionic liquid technology for the pretreatment of cellulose with the enzymatic saccharification in membrane reactors provide as an easy and sustainable approach for carrying out the valorization of plant biomass towards the production of bioethanol. The full recovery and reuse of ionic liquids is essential for the overall for both the economical and sustainable success of any implementation of this technology at industrial levels. Further studies concerning the suitability of more complex substrates, mainly having different lignin contents, should be carried out. In this PhD thesis is clearly demonstrated how the ionic liquid technology is an enhancer of enzyme technology for developing the green chemical bioprocesses for the sustainable society of the near future

1. *Introducción y objetivos*

1. Introducción

1.1. Panorama energético actual

La creciente demanda de energía y la continua depleción de las fuentes fósiles de combustible, ha generado un enorme interés por la búsqueda de recursos energéticos alternativos obtenidos a partir de fuentes naturales, renovables, de bajo coste económico y respetuosas con el medio ambiente. Ello constituye un objetivo de máximo interés en la sociedad contemporánea, donde el desarrollo sostenible se ha convertido en una prioridad inaplazable.

Según la Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (Comisión Brundtland), el desarrollo sostenible se define como “ aquel desarrollo capaz de satisfacer las necesidades del presente, pero sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades”

En el ámbito de la energía, el petróleo, conjuntamente con el carbón y el gas natural, han sido las fuentes fósiles de energía más importantes durante el siglo XX (Olah, 2005), siendo responsables del abastecimiento del 98% de la energía consumida actualmente por el sector transporte (Gomez *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso de combustibles fósiles se enfrenta actualmente a tres principales problemas:

1. La disminución inevitable de las reservas de combustible fósil, estimándose su extinción hacia el 2050 (Saxena *et al.*, 2009).
2. El deterioro ambiental causado por el uso de este tipo de combustibles: la lluvia ácida generada por la emisión de SO₂ y el calentamiento global generado por la emisión de CO₂ (Saxena *et al.*, 2009).

3. La creciente demanda energética debido al rápido crecimiento de países emergentes. Se proyecta un aumento en la demanda de más del 50% hacia el 2025 (Ragauskas *et al.*, 2006)

En este contexto, el uso de fuentes de energía renovables, de bajo costo, y respetuosas con el medio ambiente, se ha convertido en una exigencia para el desarrollo sostenible de la sociedad.

A pesar de su aplicación inicial como combustible de alumbrado, el petróleo comenzó a explotarse intensamente durante la segunda mitad del siglo XIX, cuando la revolución industrial exigió la producción de energía a gran escala. La invención del motor de combustión interna, que funciona con combustibles líquidos derivados del petróleo (*i.e.* gasolina), y su integración al automóvil, dispararían la demanda del petróleo como fuente de combustible para el transporte durante todo el siglo XX hasta nuestros días.

En la actualidad, los combustibles líquidos para el transporte son responsables de aproximadamente el 30% de las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera (Gomez *et al.*, 2008) y su sustitución por fuentes alternativas de combustibles ha sido considerada primordial para lograr un suministro energético sostenible.

De entre las distintas fuentes alternativas de energía (*i.e.* solar, eólica, térmica o hidroeléctrica), la biomasa es considerada la única fuente sostenible de carbono orgánico, capaz de aportar suficiente combustible líquido para el transporte (Huber *et al.*, 2006). Siendo el recurso renovable más abundante sobre la tierra (Lin *et al.*, 2012), el uso de la biomasa en la producción de biocombustible, garantiza el suministro energético, a partir de una fuente local, barata, amigable con el medio ambiente y no susceptible a monopolios.

El creciente interés por el uso de la biomasa como fuente alternativa de energía, ha promovido una política global estratégica que busca la sustitución gradual de los combustibles fósiles. El Departamento de Energía de los Estados Unidos de América se ha fijado como objetivo la producción del 30% de combustibles de transporte, a partir de biomasa hacia el 2030. Por su parte, la Comisión Europea se ha comprometido a sustituir el 20 y 25% de los combustibles fósiles por combustibles alternativos hacia el 2020 y 2030, de los cuales el 10% involucra al sector transporte (Zhang, 2008).

Para lograr estos ambiciosos objetivos, Estados Unidos de América ha incorporado en su agenda política importantes programas de apoyo al uso de biocombustibles, financiando la producción de bioetanol, mientras que en diversos países de la Comunidad Europea como Austria, Italia, Polonia, España, Alemania, Suecia y Francia, han establecido la exención de impuestos a los biocombustibles para transporte (Huber *et al.*, 2006).

La sustitución de los combustibles fósiles exige el desarrollo de tecnologías de bajo costo, que permitan el suministro de biocombustibles sostenibles y de valor competitivo en el mercado. Así, la investigación sobre la producción de biocombustibles ha de centrarse en el desarrollo de procesos sencillos en los cuales el reciclaje, la prevención de formación de subproductos y el uso de disolventes verdes, sean parámetros decisivos en su diseño e implementación a gran escala. Cumpliendo con estas demandas, el procesamiento de biomasa, mediante procesos químicos sostenibles basados en el uso de disolventes de nueva generación y/o disolventes verdes (i.e. líquidos iónicos) ha surgido como una de las opciones para la producción de biocombustibles a partir de una materia prima renovable mediante el uso de disolventes verdes capaces de actuar a condiciones suaves de presión y temperatura, y la posibilidad de recuperarlos para su reutilización.

1.2. Biomasa y biocombustibles

1.2.1. Biomasa

Las plantas son colectores de energía solar y sistemas de almacenamiento de energía termoquímica. El almacenamiento de la energía solar de tal forma que pueda estar posteriormente accesible mediante acción enzimática o termoquímica, es lo que distingue a la biomasa de otras fuentes renovables de energía (Rubin, 2008)

La biomasa comprende a toda la materia orgánica originada de las plantas, incluidas algas, árboles y cultivos. La biomasa se produce a partir de la fotosíntesis, proceso físico-químico mediante el cual las plantas almacenan la energía solar en forma de enlaces químicos. Los enlaces químicos formados entre moléculas de carbono, hidrógeno y oxígeno, constituyen bloques de carbohidratos capaces de almacenar la energía solar de manera estable por millones de años. La ruptura de estos enlaces mediante digestión, combustión o descomposición, libera la energía química almacenada (McKendry, 2002).

La biomasa representa la fuente de combustible más grande después del carbón, el petróleo y el gas natural y hasta antes de la revolución industrial, constituía la principal fuente de energía de la sociedad. En la actualidad, el uso de la biomasa como fuente de combustibles puede contribuir a la sustentabilidad de la producción de calor, electricidad o combustibles para el transporte, siendo en el transporte donde ha generado un mayor impacto.

Comparado con los combustibles de origen fósil (carbón, petróleo, gas natural) el uso de combustibles provenientes de la biomasa (biocombustibles) presenta las siguientes ventajas:

1. La biomasa es un recurso abundante, renovable, barato y puesto que se encuentra distribuida más uniformemente que los combustibles fósiles, puede considerarse un recurso doméstico que asegura el abastecimiento de energía (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).
2. El uso de biocombustible favorece la extensión del tiempo de vida de las fuentes de recursos fósiles.
3. Respeto por el medio ambiente, pues los biocombustibles tienen un bajo impacto ambiental, ya que:
 - a) Contienen cantidades despreciables de SO_2 , por lo que no contribuyen a la emisión de SO_2 causante de la lluvia ácida
 - b) El uso de combustibles no contribuye al incremento de la concentración de CO_2 en la atmósfera, evitando el aumento del calentamiento global.

1.2.2. Biocombustibles

Los biocombustibles son materiales derivados directa o indirectamente de la biomasa, que pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos, y que son capaces de liberar gran cantidad de energía durante los procesos de combustión siendo usualmente utilizados en los motores de combustión interna de los vehículos de transporte, así como en la producción de calor y electricidad.

Los biocombustibles, han sido clasificados, de acuerdo a su disponibilidad actual o futura, en biocombustibles de primera, segunda o tercera generación (Bringezu *et al.*, 2009). Los biocombustibles de primera generación son producidos a partir de plantas o semillas usadas también como alimento, por ejemplo maíz, caña de azúcar, semillas de

girasol o aceite de palma. El más común de este tipo de biocombustibles es el bioetanol (más del 80% de la producción de biocombustibles líquidos) seguido por el biodiesel, acetite vegetal y el biogás (Bringezu *et al.*, 2009). Sin embargo, las consecuencias a largo plazo por el uso de los recursos agrícolas para la sustitución de los combustibles fósiles, han generado opiniones divididas sobre su uso. El aumento en la producción de bioetanol, acompañado por el encarecimiento de los alimentos en Estados Unidos (Gomez *et al.*, 2008) ha puesto ya de manifiesto la necesidad de utilizar fuentes alternativas de energía que no compitan con el sector agroalimentario.

Los biocombustibles de segunda generación son producidos a partir de la biomasa no comestible, resultante de los desechos agrícolas y/o forestales (i.e. lignocelulosa de las plantas, proveniente de tallos, rastrojo de maíz, madera o cultivos), así como de desechos alimenticios (i.e. desechos de aceites y/o grasas comestibles) (Bringezu *et al.*, 2009). Comparados con los biocombustibles de primera generación, ofrecen la ventaja de no ser recursos comestibles, evitando la competencia con el sector agroalimentario, si bien su obtención a escala industrial no está muy desarrollada.

Se considera como biocombustibles de tercera generación, a aquellos obtenidos a partir de fuentes marinas, como son las algas. La utilización de biomasa de origen marino para la producción de biocombustibles tiene la ventaja adicional de que su producción no ocupa terrenos de cultivo agrícola, los cuales quedan únicamente destinados a la obtención de alimentos. Así, las algas son materias primas provenientes de cultivo acuático utilizadas para la producción de triglicéridos y biodiesel. La tecnología para procesar este tipo de biocombustible, es básicamente la misma que para los combustibles de segunda generación.

El bioetanol es hoy por hoy el biocombustible renovable más importante en términos de volumen y valor en el mercado, siendo producido a partir de azúcares, provenientes de la caña, y el almidón, proveniente del maíz. Sin embargo la producción de bioetanol de segunda generación, a partir de material lignocelulósico está ahora atrayendo gran interés a nivel científico e industrial (Tahezadeh y Karimi, 2008)

El 98% de los combustibles para el transporte son producidos a partir del petróleo. Sin embargo, el efecto negativo ambiental causado por la emisión de gases efecto invernadero, así como la crisis energética mundial, ha producido un creciente

interés en el uso de biocombustibles líquidos como el biodiesel (producido a partir de aceites vegetales), o el bioetanol (producido mediante la fermentación de azúcares).

Actualmente, el biodiesel y el bioetanol consumidos en los vehículos a motor son considerados como de primera generación, ya que se obtienen a partir de recursos con potencial alimenticio. Así, el biodiesel se obtiene a partir de aceites vegetales procedentes de plantas oleaginosas (i.e. semillas de girasol, soja, aceite de palma) y se aplica a motores diesel, sustituyendo al gasóleo o mezclándolo con él. El bioetanol se obtiene mediante la fermentación microbiana de los azúcares extraídos de caña de azúcar, remolacha, maíz, trigo, cebada. Tras la fermentación se obtiene un mosto con una concentración de alcohol entre 10%-15%. El alcohol es concentrado por destilación produciendo "alcohol hidratado" (4-5% de agua) el cual es posteriormente deshidratado para obtener alcohol absoluto (99.4% mínimo). El alcohol absoluto se mezcla con la gasolina utilizada en los automóviles (Ballesteros, 2006).

El uso de biodiesel y bioetanol ha mostrado capacidad para hacer frente, en parte, a las necesidades de combustible (Hill *et al.*, 2006), representando el bioetanol el 80% de los biocombustibles líquidos en la actualidad. El comienzo del uso de etanol como combustible de transporte se remonta a los inicios de la era del automóvil. Sin embargo, el bajo costo de la gasolina proveniente del petróleo lo desplazó rápidamente como combustible de transporte, volviendo al mercado a finales de 1970 con el lanzamiento en Brasil del programa "Proalcool" (Saxena *et al.*, 2009).

En la actualidad el bioetanol es un producto sustitutivo de la gasolina. Puede utilizarse solo (E100) o mezclado con gasolina (gasohol) en distintas proporciones (E5, E10, E15). El etanol aumenta el contenido de oxígeno en la gasolina y con ello su octanaje. Los actuales motores de automóviles no requieren modificaciones para mezclas de gasolina con proporciones de etanol de 5, 10, 15% (E5, E10, E15). Sin embargo, el uso directo de etanol (E100) o mezclas de gasolina con un 85% de éste (E-85) requiere modificaciones en los motores de explosión. (Ballesteros, 2006, Tomás-Pejó, 2010).

1.3. Bioetanol celulósico

Si bien los azúcares, como la sacarosa o el almidón, constituyen el 90% de las materias primas utilizadas actualmente para producir bioetanol, las fuentes de azúcares más abundantes en la naturaleza son la celulosa y la hemicelulosa presentes en las biomásas agroforestales. Esta celulosa puede ser convertida en etanol mediante hidrólisis y posterior fermentación (Kumar *et al.*, 2008).

En la actualidad, el bioetanol producido a partir de materiales que contienen almidón (por ejemplo maíz, cebada, trigo) consta de 3 etapas: una etapa de licuefacción (para solubilizar el almidón), una etapa de hidrólisis (para producir glucosa) y una etapa de fermentación (para producir etanol). Aunque existen semejanzas entre la procesamiento de la celulosa y el almidón, los requerimientos técnico-económicos difieren en gran medida.

Existen diferentes opciones para convertir la celulosa en bioetanol, sin embargo, cualquiera de las opciones elegidas debe cumplir con los siguientes requerimientos, en comparación con la producción del etanol a partir de almidón (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006):

1. Despolimerización eficiente de la celulosa (y hemicelulosa en el caso de la lignocelulosa) en azúcares solubles.
2. Fermentación eficiente de los azúcares
3. Integración avanzada del proceso para minimizar la demanda de energía.
4. En el caso de la lignocelulosa, el uso rentable de la lignina.

Entre las ventajas del uso de biocombustibles lignocelulósicos se encuentran (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006):

1. Reducción de la competencia entre el uso del suelo para producción de alimento (humana y animal) y la producción de materia prima energética.
2. El costo de la lignocelulosa es mucho menor que la materia prima agrícola.
3. Comparados con los biocombustibles de primera generación, los biocombustibles ligno-celulósicos generan menores emisiones netas de gases de efecto invernadero.

1.3.1. Composición de la lignocelulosa

La lignocelulosa es el recurso renovable más abundante sobre la tierra, con una producción anual de 200×10^9 toneladas (ReddyYang, 2005) de las cuales sólo el 3% es utilizada en áreas no alimentarias, como la industria del papel (Zhang, 2008).

La lignocelulosa es el componente que provee estructura a las plantas. Se encuentra en raíces, hojas y tallos, estando constituida por tres componentes principales: celulosa (35-50%), hemicelulosa (20-35%) y lignina (5-30%) (Lynd *et al.*, 2002; Rubin, 2008) (Figura 1.1).

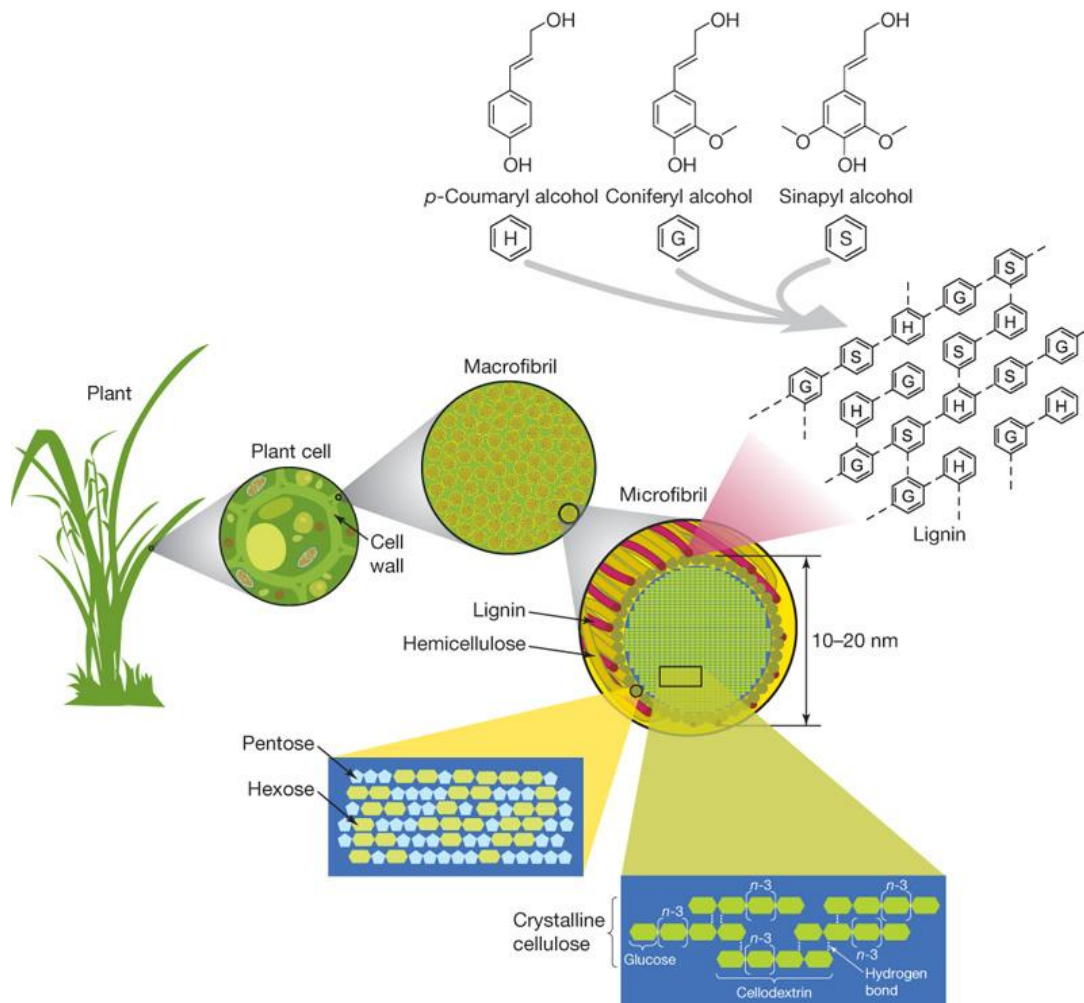


Figura 1.1. Estructura de la lignocelulosa (Rubin, 2008)

- **Celulosa**

La celulosa, el principal componente estructural de la pared celular vegetal, es un polímero lineal de glucosa unido por enlaces glucosídicos β -(1-4) (Figura 1.3). El tamaño de sus cadenas es variable, ya que presentan grados de polimerización (DP, número de

unidades de repetición de la glucosa) muy variables. En su organización estructural, cada residuo de glucosa está invertido con relación al residuo contiguo en 180° , lo que resulta en una cadena lineal de residuos de azúcar con unidades alternadas en cuanto a la disposición del oxígeno piranósico, siendo la celobiosa (disacárido) la unidad de repetición (Figura 1.3). Con esta disposición, la unión hemiacetálica entre residuos de glucosa se ve fortalecida por las interacciones por puente de hidrógeno entre residuos adyacentes de glucosa. Además, como resultado de dicha organización estructural, cada cadena de celulosa dispondrá de un extremo reductor, con un grupo reductor hemiacetal libre en la posición C1, y de un extremo no reductor, con el carbono anomérico implicado en la formación del enlace glicosídico β -(1-4) (Pinkert *et al.*, 2009). Adicionalmente, la linealidad de las cadenas de celulosa permite una aproximación muy estrecha con las cadenas vecinas, lo que permite la formación de múltiples puentes de hidrógeno intercatenarios, que incrementan en enorme magnitud su fortaleza, proporcionándole un carácter semi-cristalina a su estructura.

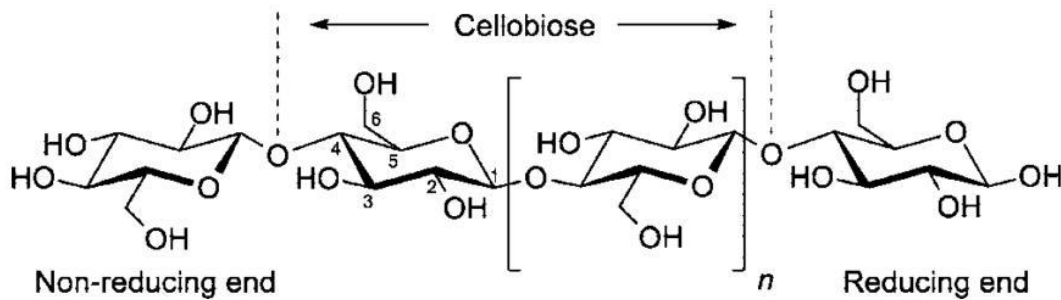


Figura 1.2. Estructura de las cadenas poliméricas de celulosa (Pinkert *et al.*, 2009)

Desde un punto de vista más concreto, la alta estabilidad del enlace β -(1-4) se ve reforzada por la formación de puentes hidrógeno intracatenarios entre el grupo hidroxilo del carbono C3 de una unidad d glucosa y el oxígeno en el anillo adyacente, así como entre el grupo hidroxilo del carbono C2 y el oxígeno del hidroximetilo del carbono C6 (Figura 1.4). Además, las cadenas de celulosa están interconectadas por puente de hidrógeno entre el hidroxilo del carbono C6 y los grupos hidroxilo de los carbonos C3 de las cadenas adyacentes, formando microfibrillas que a su vez se agrupan formando macrofibrillas de celulosa (Figura 1.1) (Pinkert *et al.*, 2009). Los enlaces por puente de hidrógeno formados dentro de las cadenas de celulosa son responsables de su rigidez,

mientras que los enlaces por puente de hidrógeno intercatenarios, son responsables del orden o desorden de su estructura (Agbor *et al.*, 2011)

Las microfibrillas de celulosa son en su mayoría independientes, pero la ultraestructura de la celulosa se debe en gran medida a la presencia de los enlaces por puente de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las regiones donde las microfibrillas se encuentran bien ordenadas se denominan regiones cristalinas, mientras las regiones menos ordenadas se conocen como regiones amorfas. Cuanto más cristalina es la celulosa, más difícil es de degradar, volviéndose altamente recalcitrante (Zhang y Lynd, 2004).

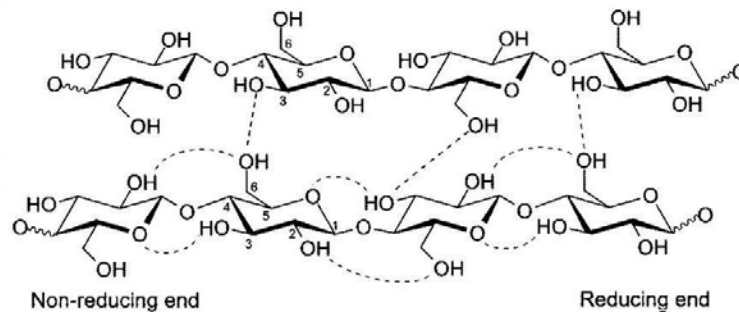


Figura 1.3. Cadenas de celulosa unidas mediante enlaces por puente de hidrógeno inter e intramoleculares (Pinkert *et al.*, 2009)

Las zonas amorfas presentes en la celulosa han sido descritas como zonas de anclaje para la hemicelulosa. El desorden de estas zonas facilita el acceso a las enzimas hidrolíticas, por lo que el aumento de las regiones amorfas de la celulosa mediante diferentes pretratamientos, proporciona un medio para aumentar su digestibilidad (Dadi *et al.*, 2006)

La alta estabilidad química y mecánica de la celulosa así como su naturaleza hidrofóbica es consecuencia tanto de la fortaleza enlaces glucosídicos, como del gran número de puentes hidrógeno. Los puentes hidrógeno no sólo actúan como interconectores de las unidades de celobiosa, sino que también parecen participar en las propiedades hidrofobas del polímero.

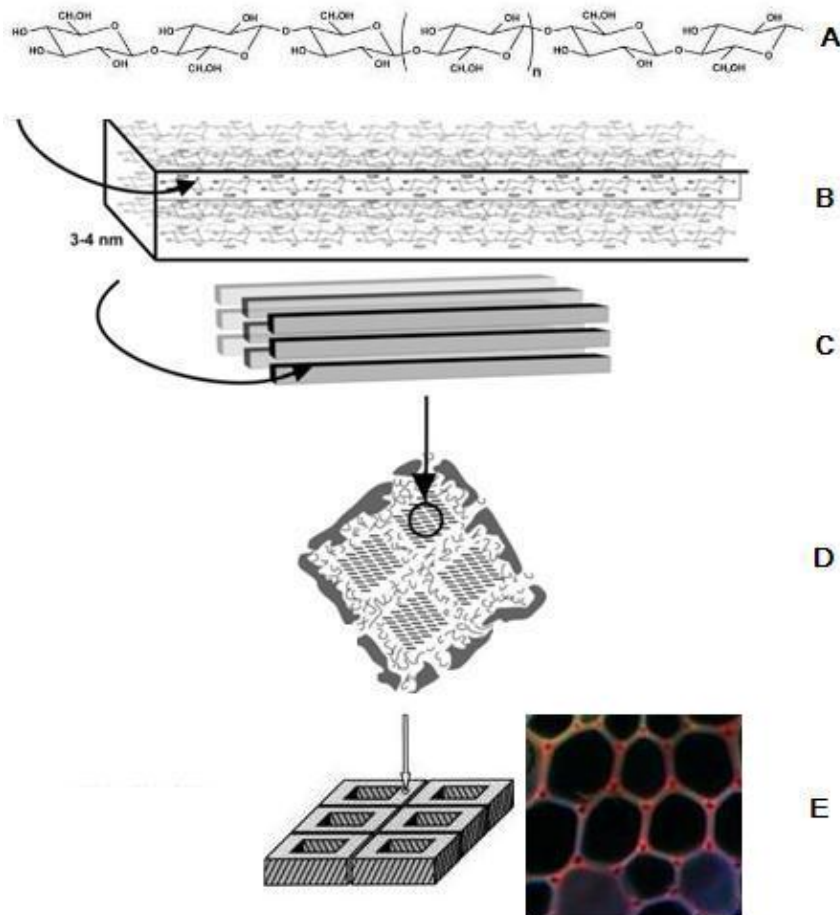


Figura 1.4. Estructura interna de una macrofibrilla y una microfibrilla de celulosa: (A) cadena de celulosa; (B) fibrilla elemental de celulosa formada a partir del agrupamiento de cadenas de celulosa; (C) fibrillas elementales paralelas; (D) Cuatro microfibrillas unidas por hemicelulosa y lignina (macrofibrilla de celulosa); (E) Pared celular vegetal. Adaptado de (Azeredo, 2009; GuoyCatchmark, 2012) y Lawrence Berkley National Laboratory: <http://newscenter.lbl.gov/feature-stories/2009/07/08/fuels-from-biomass-ionic-liquids/>).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo componente estructural más abundante de la lignocelulosa y a diferencia de la celulosa, no es un compuesto homogéneo químicamente (Rubin, 2008). Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos ramificados, formados por pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos como el ácido glucurónico y galacturónico. La hemicelulosa se une a la parte exterior de las microfibrillas, formando una cubierta capilar que previene el contacto directo entre las microfibrillas (Figura 1.5). Así, la hemicelulosa actúa como sustancia cementante entre las diferentes microfibrillas, formando una red cohesiva y además sirve de unión a la lignina (Agbor *et al.*, 2011).

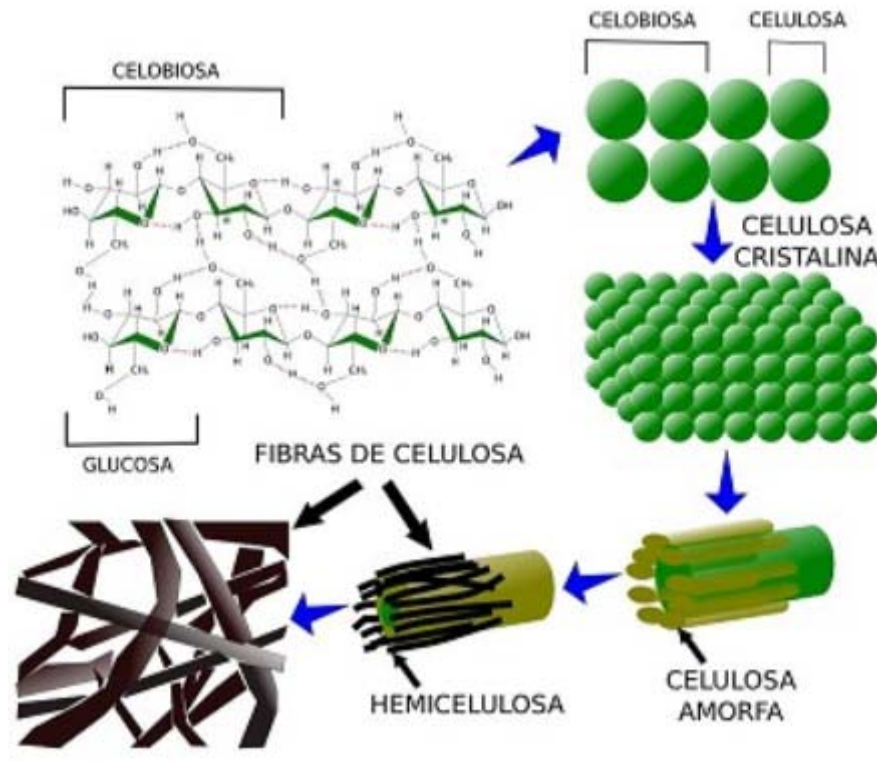


Figura 1.5. Esquema de la estructura jerarquizada de la celulosa y la hemicelulosa.

La cadena principal de la hemicelulosa puede ser un homopolímero, constituido por una sola unidad (*i.e.* xilano) o un heteropolímero, constituido por dos o más unidades (glucomanano). En función del azúcar dominante en la cadena principal, las hemicelulosas pueden clasificarse en xilanos, mananos, glucanos y galactanos. Así, la composición de la hemicelulosa puede diferir en función del tipo de biomasa. La hemicelulosa de maderas duras y residuos agrícolas (*i.e.* roble, nogal, paja, pasto), es principalmente el xilano mientras en las maderas blandas (*i.e.* pino, abeto, castaño) es el glucomanano, en (Kumar *et al.*, 2008; Taherzadeh y Karimi, 2008). Las hemicelulosas como los xilanos y arabinoxilanos suelen encontrarse acetilados, lo cual sirve para disminuir la solubilidad de los polisacáridos, afectando el potencial de sacarificación de este material.

Dado que las hemicelulosas cubren las microfibrillas de celulosa, se ha propuesto que al menos el 50% de las hemicelulosas han de ser eliminadas para aumentar significativamente la digestibilidad de la celulosa. Sin embargo, la severidad del pretratamiento con ácidos o bases usualmente empleados su separación, suelen producir la formación de subproductos por degradación de la hemicelulosa indeseados, tales como

(Tahezadeh y Karimi, 2008). La lignina está considerada como un “pegamento” hidrofóbico que mantiene unidos los distintos componentes lignocelulósicos. La impermeabilidad de la lignina así como su estrecha unión a las microfibrillas de celulosa, la convierten en un importante obstáculo para la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Existe una correlación directa entre el contenido de lignina de un residuo agroforestal y su potencial utilidad para la producción de azúcares fermentables. En este sentido, diversas razones han sido descritas, a saber:

1. La lignina provee una barrera física que limita el acceso de las enzimas hidrolíticas a las cadenas de celulosa.
2. Las enzimas se adsorben inespecíficamente a la lignina, lo cual reduce la hidrólisis productiva de la celulosa. Por esta razón, no es sólo la presencia de lignina, sino su distribución, lo que afecta a la hidrólisis enzimática (Zhang y Lynd, 2004, Qi *et al.*, 2011).
3. Los productos de degradación de la lignina tales como derivados de la lignina (vainillina, siringaldehído, 4-hidroxibenzaldehído), derivados de furano (furfural 5-hidroximetilfurfural), ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido leuvinico) y etanol, pueden inhibir la actividad enzimática y resultar tóxicos para los microorganismos que degradan lignocelulosa (Agbor *et al.*, 2011; Van Dyk y Pletschke, 2012).

En este sentido, y al igual que en el caso de la hemicelulosa, la eliminación de la lignina es un elemento potenciador de la digestibilidad enzimática de la celulosa, ya que su eliminación induce el hinchamiento de la biomasa, la disrupción de la estructura cristalina y el aumento del área superficial de acceso de las enzimas a las fibrillas de celulosa.

Existen pretratamientos para deslignificar la lignocelulosacelulosa y, aunque no todos ellos logran una eliminación significativa de dicho polímero. Además, dichos pretratamientos físicos y/o químicos suelen alterar la estructura de la lignina, generando importantes cambios en las propiedades químicas de la misma. Así, la biomasa pretratada resulta ser más digestible que la biomasa bruta, aun cuando tenga el mismo contenido de lignina (Agbor *et al.*, 2011).

1.3.2. Producción de azúcares fermentables a partir de celulosa.

Para poder utilizar la celulosa como fuente de azúcares fermentables, debe someterse a una etapa de hidrólisis del enlace glicosídico β -(1-4) que une covalentemente a las unidades de glucosa. La hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o mediante biocatalizadores (hidrólisis enzimática). El proceso de hidrólisis ácida puede realizarse mediante ácidos minerales en fase homogénea, o mediante catalizadores ácidos soportados (i.e. resinas conteniendo grupos bencenosulfónicos) (Saxena *et al.*, 2009). Sin embargo, la baja especificidad de dicho proceso catalítico, que conlleva la aparición de muchos subproductos indeseables, así como los elevados costes generados por el uso de materiales resistentes a la corrosión, recuperación del ácido y depuración de aguas residuales, hacen que el proceso sea poco rentable y sostenible.

En la actualidad, la hidrólisis enzimática de la celulosa mediante *celulasas* es preferida sobre la hidrólisis ácida. La altísima especificidad de las *celulasas* en su acción catalítica sobre los enlaces β -(1-4) de la celulosa, permite la obtención de glucosa pura con el máximo rendimiento, evitándose la formación de subproductos indeseables por degradación de la glucosa. Las *celulasas* (de origen fúngico o bacteriano) son en realidad un sistema de enzimas que exhiben mayor actividad colectiva que la suma de sus actividades individuales, mostrando una acción sinérgica en la degradación de la celulosa (Lynd *et al.*, 2002). La hidrólisis enzimática de celulosa no requiere equipos de materiales especiales. Sin embargo, siendo la celulosa un sustrato insoluble en los medios acuosos de reacción hidrolítica, su hidrólisis enzimática resulta muy lenta y de bajo rendimiento. Además, el carácter cristalino de una porción importante de su estructura impide su degradación total por vía enzimática, haciendo necesario la realización de pre-tratamientos físicos y/o químicos que generen un sustrato más susceptible al ataque enzimático.

Para conseguir la hidrólisis total de la celulosa por vía enzimática, las *celulasas* deben adsorberse al sustrato, acceder totalmente a las diferentes cadenas individuales de celulosa y entonces, cortar los enlaces glicosídicos de la cadena (Zhang y Lynd, 2004; Dadi *et al.*, 2006). Los sitios de adsorción de las *celulasas* en la celulosa cristalina son muy limitados debido al estrecho empaquetamiento de las microfibrillas de celulosa, lo cual además de excluir el acceso de las enzimas, excluye en gran parte el acceso de agua.

Diferentes tipos de pretratamientos físicos (i.e. tratamiento con agua sobrecalentada, ultrasonidos, altas presiones, molindas mecánicas, etc) han sido ensayados para mejorar la digestibilidad económica de la celulosa, en base al incremento de su área superficial y del acceso del agua y las *celulasas*. Estos pretratamientos han demostrado mejorar la cinética de degradación de la celulosa cristalina así como los rendimientos de conversión a glucosa (Zhang y Lynd, 2004; Dadi *et al.*, 2006; Hendriks y Zeeman, 2009). No obstante, el coste energético y tecnológico que conllevan dichos pretratamientos, supone una importante restricción frente a su posible implementación industrial.

1.4. Pretratamiento de celulosa

La accesibilidad del sustrato para las enzimas celololíticas es un factor importante para la hidrólisis enzimática de celulosa (Alvira *et al.*, 2010). Por lo tanto, el uso de estos catalizadores requiere de una etapa de pretratamiento que reduzcan el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa e incremente el área superficial disponible para el ataque enzimático (Dadi *et al* 2006). El pretratamiento óptimo de celulosa debe cumplir con los siguientes requisitos: i) incrementar la producción de azúcares o mejorar la posterior producción de azúcares mediante hidrólisis, ii) evitar la degradación o pérdida de azúcares, iii) evitar la formación de subproductos que inhiban el posterior proceso de fermentación y iv) ser rentable (Sun y Cheng, 2002).

Existen diferentes pretratamientos físicos y químicos para aumentar la accesibilidad a los polisacáridos de la biomasa (i.e. molienda, explosión por vapor, explosión por vapor con amoniaco, tratamientos con ácidos diluidos, agua sobrecalentada, etc) (Agbor *et al.*, 2011). De entre ellos, los pretratamientos químicos a partir de disolventes de celulosa han demostrado un mayor impacto en la disrupción de la cristalinidad de la celulosa, aumentando el área superficial y mejorando las velocidades de hidrólisis (Hamilton *et al.*, 1984; Dadi *et al.*, 2006).

Entre los disolventes de celulosa se encuentran: ácidos minerales concentrados (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico), disolventes en base amonio (amoníaco, hidrazina), disolventes apróticos (DMSO, óxidos de azufre) y complejos metálicos (cadoxen, cuoxam). Varios autores han demostrado la mejora de la hidrólisis enzimática mediante pretratamientos químicos con este tipo de disolventes.

En 1978 Landisch *et al.* observaron una mejora en la cinética de hidrólisis enzimática de celulosa, cuando ésta había sido pretratada con cadoxen (una mezcla de óxido de cadmio en solución acuosa de etilendiamina). Los materiales celulósicos fueron reblandecidos mediante sumersión en cadoxen durante 12h a temperatura ambiente. Una vez enjuagados, los materiales se sacarificaron mediante el uso de celulasas, observándose una mejora en el porcentaje de degradación en comparación con sustratos no pretratados. La mejora en la cinética de la hidrólisis fue atribuida a la pérdida de cristalinidad en la estructura de la celulosa (Landisch *et al.*, 1978). Sin embargo, el largo tiempo de incubación, la toxicidad del cadoxen así como la difícil recuperación de la diamina, han descartado el uso de este tipo de pretratamiento como herramienta sostenible de implementación en los procesos industriales de sacarificación de celulosa. Otros trabajos han demostrado que el uso de ácido fosfórico concentrado a temperaturas próximas a 0°C para disolver celulosa, precipitándola (regeneración) posteriormente mediante la adición de agua helada (Zhang *et al.*, 2006). En este caso, la velocidad de sacarificación de la celulosa amorfa obtenida, aumentó de uno a dos órdenes su magnitud, debido a la modificación de su estructura supramolecular. La disolución de celulosa mediante cloruro de litio/N,N-dimetilacetamida (LiCl/DMAc) y su posterior regeneración mediante la adición de agua y etanol también ha sido utilizada como método para producir celulosa amorfa, más susceptible a la hidrólisis (Grano *et al.*, 2004). No obstante, un elemento clave para la aplicación industrial del proceso de pretratamiento químico mediante los disolventes de celulosa es la recuperación y reutilización del disolvente, tanto por cuestiones económicas como medioambientales. Sin embargo los disolventes mencionados con anterioridad son difíciles de recuperar para su posterior reutilización. (Chang y Chou, 1981)

Recientemente han sido descritos un nuevo tipo de disolventes no volátiles denominados líquidos iónicos para producir celulosa regenerada. Su capacidad para disolver grandes cantidades de celulosa en condiciones suaves, los hace especialmente atractivos para el procesamiento de celulosa (Zhao *et al.*, 2009). La celulosa regenerada a partir de líquidos iónicos como el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim][Cl]) ha demostrado ser amorfa, porosa y más susceptible a la hidrólisis enzimática (Dadi *et al.*, 2006; Liu y Chen, 2006; Zhao *et al.*, 2009, Lozano *et al.*, 2012). El pretratamiento de celulosa con líquidos iónicos resulta más fácil de operar, aunque es necesario establecer protocolos operacionales que permitan su recuperación y reutilización total.

1.5. Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (ILs) son sales que funden a temperaturas inferiores a 100°C (Wasserscheid y Welton, 2008). A diferencia de los disolventes moleculares tradicionales, los líquidos iónicos se encuentran constituidos exclusivamente por pares de iones, a saber un catión de naturaleza orgánica y un anión orgánico o inorgánico. El catión y anión de los líquidos iónicos pueden ser diseñados de tal forma que las sales resultantes no se pueden empaquetar de forma compacta y como consecuencia, dichas sustancias no pueden cristalizar fácilmente y permanecen en estado líquido dentro de un amplio rango de temperaturas, incluso a temperatura ambiente (RTILs, *room temperature ionic liquids*) (Bonhote *et al.*, 1996; Murugesan y Linhardt, 2005).

Las propiedades físicas y químicas (polaridad, hidrofobicidad, miscibilidad con otros disolventes) de un líquido iónico pueden ser modulables dependiendo del catión y anión que lo conforman, existiendo numerosas combinaciones posibles (hasta 10^{18} combinaciones) (Joshi y Anderson, 2012). Entre los cationes más comunes se encuentran los de imidazolio, piridinio, amonio, pirrolidinio y fosfonio, mientras que los aniones más comunes son [(trifluorometil)sulfonil]imida (NTf_2^-), hexafluorofosfato, (PF_6^-), trifluorometilsulfonato y haluros Figura 1.7.

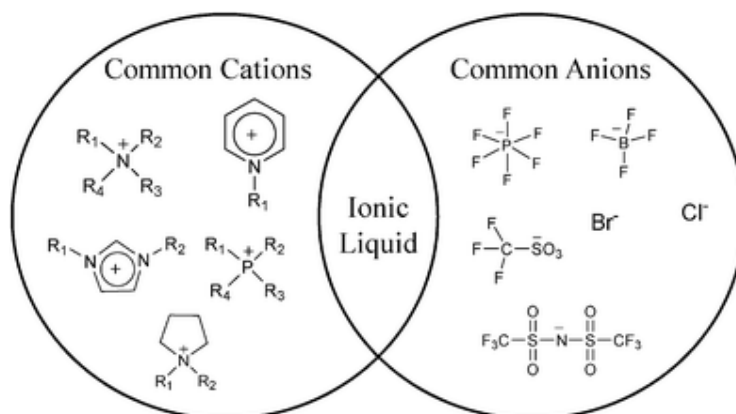


Figura 1.7. Cationes y aniones más comunes empleados en los líquidos iónicos (Wasserscheid y Welton, 2008)

Las genuinas propiedades de los líquidos iónicos tales como presión de vapor prácticamente nula, nula inflamabilidad, alta estabilidad térmica, etc, permitiendo su reutilización total, así como la posibilidad de modular sus propiedades en base a la

naturaleza de los iones, los han convertido en una alternativa sostenible a los disolventes orgánicos tradicionales.

1.5.1. Propiedades de los líquidos iónicos

Entre las propiedades de los líquidos iónicos que los hacen especialmente atractivos se encuentran:

- *Habilidad para diseñar propiedades físicas y químicas específicas.* La propiedad más útil de los líquidos iónicos es la posibilidad de “diseñar” o “modular” sus propiedades físicas y químicas mediante la modificación de las cadenas laterales del catión, y la selección apropiada del anión. Así, los líquidos iónicos pueden ser diseñados en base a las características físicas y químicas deseadas (Wasserscheid y Welton, 2008, Murugesan y Linhardt, 2005; Joshi y Anderson, 2012)

- *Baja o nula presión de vapor.* Los líquidos iónicos son sales en estado líquido, por lo que tienen poca o casi nula presión de vapor. Gracias a esta propiedad, los líquidos iónicos no se evaporan aún a elevadas temperaturas (menores a 300°C) lo cual permite su completa recuperación y reciclaje (Wasserscheid y Welton, 2008, Murugesan y Linhardt, 2005; Yang y Pan, 2005). Esta propiedad los vuelve atractivos como sustituyentes de los actuales disolventes orgánicos volátiles.

- *Bajo punto de fusión.* Los líquidos iónicos tienen un bajo punto de fusión, lo que les permite ser líquidos a temperatura ambiente. Esta propiedad puede ser adjudicada a la asimetría de los iones que constituyen el líquido iónico ya que impide el empaquetamiento compacto de los iones. El punto de fusión depende en gran medida del tamaño de los iones implicados en dicho líquido iónico, así como de su carga y distribución. A mayor tamaño del catión y del anión, menor punto de fusión. De igual manera, un aumento en la asimetría de los iones disminuye el punto de fusión.

- *Polaridad.* Su elevada polaridad (capacidad para estabilizar una carga) es una de las propiedades más genuinas de los líquidos iónicos (Rantwijk y Sheldon, 2007).. La polaridad de un disolvente suele determinarse mediante los desplazamientos de los máximos de emisión de fluorescencia de un colorante solvatocrómico (i.e. rojo Nilo) Las medidas solvatocrómicas indican que los líquidos iónicos poseen una polaridad

similar a la observada en disolventes moleculares polares, tales como etanol, formamida, etc (Poole, 2004). Hasta ahora, el concepto de polaridad se ha aplicado a disolventes moleculares, para predecir sus propiedades físicas y químicas, así como su capacidad solvente. Sin embargo, con los líquidos iónicos es difícil de utilizar este concepto para predecir su influencia en la solubilidad o en la velocidad de reacción. En este sentido, ha sido descrito que las interacciones entre soluto-disolvente obedecen a un modelo de interacción dual. Así, los líquidos iónicos pueden comportarse como disolventes apolares con solutos apolares, o pueden manifestar un comportamiento polar con solutos polares (Rantwijk y Sheldon, 2007), incluso, en el caso de los líquidos iónicos con catión imidazolio, pueden considerarse materiales nanoestructurados con regiones polares y apolares (Dupont, 2004).

El carácter polar de los líquidos iónicos los hace un medio ideal para reacciones químicas y bioquímicas gracias a su habilidad para disolver diferentes sustancias, incluyendo compuestos orgánicos, inorgánicos, polares, apolares y poliméricos (Poole, 2004)

- *Miscibilidad en agua.* Los líquidos iónicos pueden ser o no miscibles en agua. La miscibilidad de los líquidos iónicos depende en gran medida de la hidrofobicidad del anión, debido a la interacción por puentes de hidrógeno entre éste y el agua. Sin embargo, el aumento en la longitud de la cadena alquílica del cation puede disminuir la miscibilidad debido al aumento de su hidrofobicidad. Además, la miscibilidad en agua de los líquidos iónicos puede ser modulable en función del tipo de anión y de catión (Brennecke y Maginn, 2001; Murugesan y Linhardt, 2005). Por ejemplo, Sheldon *et al.* (2000) observaron el efecto del cambio de anión en la miscibilidad de sales imidazolio en agua. Ellos indicaron que sales imidazolio con aniones haluro ($[Br^-]$, $[Cl^-]$, $[I^-]$), acetato $[CH_3CO_2^-]$, nitrato $[NO_3^-]$ y trifluoroacetato $[CF_3CO_2^-]$ son totalmente miscibles en agua, mientras que sales con aniones como el hexafluorofosfato $[PF_6^-]$, bis(trifluorometilsulfonil)imida $[CF_3SO_2)_2N_2^-]$ ó $[NTf_2^-]$ son inmiscibles. Por otro lado las sales imidazolio con aniones tetrafluoroborato $[BF_4^-]$ y triflato $[CF_3SO_3^-]$ pueden ser completamente miscibles o inmiscibles en agua dependiendo de los sustituyentes del catión. Los líquidos iónicos no miscibles en agua son higrocópicos y que son capaces de disolver hasta 1% de agua (Bonhote *et al.*, 1996; van Rantwijk *et al.*, 2003; Yang y Pan, 2005). Cabe destacar que las soluciones acuosas de líquido iónico no son homogéneas a nivel molecular ya que, al igual que en metanol, el agua no se mezcla a nivel molecular, pero se encuentra en forma de grupos o cadenas.

• *Miscibilidad en compuestos orgánicos.* Los líquidos iónicos son generalmente inmiscibles en muchos disolventes orgánicos especialmente si éstos últimos son apolares como el hexano; mientras que otros pueden ser miscibles en disolventes polares como el diclorometano y el tetrahidrofurano. La inmiscibilidad de los líquidos iónicos ya sea en agua o disolventes orgánicos los vuelve ideales para formar sistemas bifásicos (Bonhote *et al.*, 1996; Wasserscheid y Welton, 2008).

• *Pureza.* Las impurezas, como el agua, los haluros, las sales tanto orgánicas como inorgánicas son fácilmente acumulables en los líquidos iónicos. Por lo que el uso de líquidos iónicos requiere el previo conocimiento de las impurezas que puedan contener. La presencia de impurezas en los líquidos iónicos pueden no sólo afectar las propiedades del disolvente, sino que también pueden provocar la desactivación de las enzimas. El agua es otro contaminante común, incluso los líquidos iónicos inmiscibles en agua son higroscópicos. Los líquidos iónicos con anión $[\text{BF}_4^-]$ o $[\text{PF}_6^-]$ en presencia de agua pueden hidrolizarse parcialmente originando HF, provocando la desactivación de varias enzimas. La obtención de resultados reproducibles en biocatálisis con líquidos iónicos requiere un especial cuidado con respecto a la pureza de estos solventes (Rantwijk y Sheldon, 2007).

• *Capacidad de recuperación y reutilización.* Puesto que la miscibilidad de los líquidos iónicos depende de su estructura, los productos de las reacciones pueden ser recuperados mediante extracción, utilizando agua, CO_2 supercrítico o algún disolvente orgánico. Ello permite la recuperación del líquido iónico para su reutilización (Murugesan y Linhardt, 2005).

• *Estabilidad térmica.* Los líquidos iónicos son estables a altas temperaturas, teniendo una temperatura de descomposición térmica mayor a los $350\text{ }^\circ\text{C}$ (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). Esta propiedad hace útiles a los líquidos iónicos en reacciones que requieren alta o baja temperatura.

• *Viscosidad.* La viscosidad de los líquidos iónicos es más alta que la de los disolventes convencionales (35-500 cP frente al 0,6 cP para el tolueno y 0,9 cP para agua a $25\text{ }^\circ\text{C}$). La viscosidad de un líquido iónico representa su tendencia a formar enlaces por puente de hidrógeno y la fuerza de sus interacciones de van der Waals, pudiendo reducirse mediante el aumento de la temperatura o por la adición de algunos co-disolventes orgánicos. La viscosidad de los líquidos iónico aumenta con la longitud

de la cadena alquílica y el tamaño del anión (Yang y Pan, 2005). La alta viscosidad de los líquidos iónicos afecta las propiedades de transporte como la difusión, factor importante en la biocatálisis (Poole, 2004, Rantwijk y Sheldon, 2007).

- *Densidad.* Los líquidos iónicos son más densos que los disolventes orgánicos y el agua con valores densidad entre 1 y 1.6 gcm⁻³ (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010).

- *No inflamabilidad.* Los líquidos iónicos son considerados compuestos no volátiles y, por lo tanto no inflamables. Cabe mencionar que no es porque no sean inflamables lo que permite su uso cerca de fuentes de calor ya que los líquidos iónicos son combustibles Pueden ser diseñados para contener energía y reemplazar a la hidracina. (Smiglak *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2008).

- *Alto poder de disolución.* Muchos componentes son suficientemente solubles en los líquidos iónicos para realizar reacciones. Con respecto a sus propiedades generales como disolvente, los líquidos iónicos son considerados semejantes a los disolventes polares como el acetonitrilo el metanol. Una propiedad muy útil de los líquidos iónicos es la de servir como medio para transformar componentes, como proteínas o carbohidratos, que pueden ser moderadamente solubles en los disolventes orgánicos convencionales (Rantwijk y Sheldon, 2007).

1.5.2. Biocatálisis en líquidos iónicos

Los líquidos iónicos se han convertido en un sustituto ideal de los disolventes orgánicos para el desarrollo de procesos biocatalíticos sostenibles. Su despreciable presión de vapor evita la emisión de compuestos volátiles, lo que posibilita la completa recuperación del líquido iónico para su posterior reutilización, lo que abunda en su carácter verde y/o sostenible, así como en una reducción de costos operacionales (Tavares *et al.*, 2013). Además de estas ventajas, los líquidos iónicos han demostrado ser excelentes medios no acuosos para la biocatálisis, observando altos niveles de actividad y estereoselectividad enzimáticas para sintetizar diferentes compuestos como aspartamo, ésteres o polímeros, etc. (Lozano, 2010)

Los criterios más importantes para la selección de un sistema enzima- IL son la actividad y la estabilidad de la enzima en el medio de reacción, así como las posibles estrategias experimentales que se pueden establecer para la recuperación de los

productos, y la reutilización de dicho sistema enzima-IL. (van Rantwijk y Sheldon, 2007).

Los líquidos iónicos hidrofóbicos han demostrado ser excelentes medios no acuosos para reacciones con enzimas (principalmente lipasas) ya que incrementan su actividad. Tienen un efecto de estabilización en las enzimas, incluso en condiciones extremas (por ejemplo, en presencia de dióxido de carbono supercrítico a 100 bar y 150 ° C) (Lozano *et al.*, 2003). La razón por la que los líquidos iónicos hidrofóbicos permiten preservar mejor la actividad y estabilidad de las enzimas en condiciones extremas ha sido atribuida a un efecto protector de la capa de agua esencial que rodea a dichas proteínas catalíticas (Lozano, 2001; Zhao, 2005). Esta agua esencial provee a la enzima la flexibilidad conformacional necesaria para llevar a cabo la catálisis.

Mecánicamente, el papel del agua como lubricante se debe a su capacidad para formar enlaces por puentes de hidrógeno con los grupos funcionales de la de proteína, originalmente unidos entre sí, con lo que la proteína adquiere su conformación estructural catalíticamente activa. (Zaks y Klibanov, 1988). Así, los líquidos iónicos hidrofóbicos son capaces de formar una fuerte matriz iónica que retiene a la enzima en un microambiente de agua adecuado, resultando en una red supramolecular capaz de mantener la conformación activa de la enzima (Lozano 2001; De Diego *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2005). Esta conclusión concuerda con los estudios de actividad y estabilidad realizados con alfa-quimotripsina en [Emim][NTf₂] y [Bmin][NTf₂] (Lozano *et al.*, 2001) donde ambos líquidos iónicos estabilizaron la enzima mediante la formación de una estructura tridimensional más compacta pero flexible y activa, gracias a la preservación de una capa de agua esencial para la enzima .

Por el contrario, el uso de líquidos iónicos hidrofílicos como medio de reacción puede disminuir la estabilidad y actividad enzimáticas (Turner *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2012). La desactivación enzimática consiste en una pérdida de la conformación catalíticamente activa de la enzima. La estabilidad de esta conformación depende de las interacciones entre la enzima y su microentorno, y de diferentes fuerzas no-covalentes como interacciones por puente de hidrógeno, hidrofóbicas, iónicas y de Van der Waals que son las que mantienen la estructura enzimática.

Así, el efecto negativo de los líquidos iónicos hidrofílicos es consecuencia de su interacción con el agua esencial del microentorno de la enzima, haciendo que disminuya o la desplace completamente del microentorno de la enzima. Otro factor importante es la interacción directa del líquido iónico con los residuos cargados positiva o negativamente de la enzima, lo cual puede producir cambios conformacionales o bloquear el sitio activo de ésta (Lozano, 2010; Park y Kazlauskas, 2003; Ventura, 2012).

Algunos líquidos iónicos hidrofílicos, como el [Bmim][Cl], que son utilizados en la disolución de biomásas vegetales, tienen un potente efecto desnaturalizante sobre las enzimas responsables de la hidrólisis de la celulosa. Por esta razón, tanto es importante encontrar un sistema compatible celulosa- líquido iónico que permita solubilizar la celulosa, y que a la vez mantenga la actividad catalítica de la enzima para realizar la hidrólisis.

Varias oxidorreductasas, como lacasa, peroxidasa, cloroperoxidasa, D-aminoácido oxidasa, han sido reportadas como enzimas activas en solución acuosa con ILs (Tavares *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos con estas enzimas en líquidos iónicos han demostrado mejorar la solubilidad del sustrato pero el tipo de líquido iónico y su concentración deben ser cuidadosamente optimizados, minimizando el efecto negativo que pueden tener en la actividad enzimática.

Además de su bajo impacto ambiental, las ventajas principales sobre el uso de líquidos iónicos en biocatálisis son:

1. *Ciertos líquidos iónicos no inactivan las enzimas como lo hacen los disolventes orgánicos polares.* Aunque los disolventes orgánicos polares inactivan enzimas (Chin *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2003), ciertos líquidos iónicos no lo hacen; esto permite realizar reacciones en un rango de polaridad del disolvente que antes era imposible. La capacidad de utilizar disolventes con mayor polaridad aumenta la solubilidad de los sustratos polares, tales como glucosa, maltosa o ácido ascórbico, que conduce a reacciones más rápidas. La acetilación de glucosa mediante *Candida antarctica B* (CALB) en líquido iónico ([Moemim][BF₄]) reveló una conversión mayor (99%) en comparación a los resultados en acetona (72.3%) (Park *et al.*, 2003). Esta mejora resultó de la mayor solubilidad de la glucosa en el líquido iónico.

2. *Los líquidos iónicos pueden estabilizar enzimas.* Tanto hidrolasas como oxidoreductasas mantienen su actividad en presencia de líquidos iónicos. Sin embargo no todos los líquidos iónicos son apropiados para la biocatálisis. Así, las enzimas suelen mantenerse activas en líquidos iónicos con aniones $[\text{BF}_4^-]$, $[\text{PF}_6^-]$ y $[\text{NTf}_2^-]$, pero no en líquidos iónicos con aniones $[\text{Cl}^-]$, $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{CF}_3\text{SO}_3^-]$, trifluoroacetato o acetato. Una explicación a esto es la baja basicidad de los aniones compatibles con enzimas. El anión $[\text{BF}_4^-]$ distribuye su carga en 4 átomos flúor, el anión $[\text{PF}_6^-]$ sobre 6 átomos flúor y el anión $[\text{NTf}_2^-]$ sobre 5 átomos. Su baja basicidad disminuye su afinidad por los puentes hidrógeno de la enzima. En concordancia con esta observación, las enzimas son inactivas en líquidos iónicos como el $[\text{Bmim}][\text{Cl}]$ con una alta basicidad del anión. (Park y Kazlauskas, 2003)

La incapacidad de usar aniones con una alta basicidad puede limitar algunas aplicaciones, por ejemplo, la celulosa puede disolverse bien en $[\text{Bmim}][\text{Cl}]$, hasta un 25% en peso, pero no en $[\text{Bmim}][\text{BF}_4]$ o $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$ (Remsing *et al.*, 2006)(Swatloski *et al.*, 2002). La clave de la solubilidad en el $[\text{Bmim}][\text{Cl}]$ es la formación de puentes hidrógeno entre la celulosa y el cloruro rompiendo los enlaces por puente de hidrógeno entre las cadenas de celulosa insoluble. Otros disolventes que disuelven celulosa (soluciones de cloruro de litio / N, N-dimetilacetamida) también forman fuertes enlaces por puente de hidrógeno con la celulosa. Puede ser imposible encontrar un disolvente de celulosa que mantenga la actividad de la enzima (Park y Kazlauskas, 2003).

1.5.3. Disolución de celulosa en líquidos iónicos

La celulosa es un polímero de glucosa insoluble en la mayoría de los disolventes moleculares, como consecuencia de la extensa red de puentes hidrógeno inter e intramoleculares (Figura 1.3) y a fuerzas de Van der Waals (Kuo y Lee, 2009). Los disolventes típicos para disolver celulosa durante la década pasada estaban basados en disolventes polares orgánicos. Sin embargo estos disolventes son altamente tóxicos, costosos, inestables térmicamente y difíciles de reciclar. En este contexto, los líquidos iónicos han surgido como una opción alternativa en el pretratamiento de celulosa gracias a sus ventajas como baja volatilidad y la posibilidad de recuperarlos completamente para su reciclaje.

Los cationes más efectivos para la disolución de celulosa son los basados en grupos alquilimidazolio y alquilpiridinio, con cadenas laterales alilo, etilo o butilo. Los líquidos iónicos de cadenas laterales con número par de carbonos han mostrado mayor capacidad de solución en el rango de C2 a C10 (Erdmenger *et al.*, 2007). El máximo poder de disolución se ha alcanzado con la cadena lateral C4, y la incorporación de átomos OH parece incrementar la solubilidad de celulosa (Feng y Chen, 2008). Esto podría ser debido a la polaridad adicional en los sustituyentes heteroatómicos del anillo de imidazolio. Otra observación que se ha hecho es que la presencia de dobles enlaces en la cadenas alquílica puede disminuir la viscosidad (Pinkert *et al.*, 2009).

Entre los aniones más efectivos para disolver la celulosa se encuentran el cloruro, el acetato y el formato. Análisis de NMR de ^{13}C y $^{35/37}\text{Cl}$ indicaron que existe una fuerte interacción entre los aniones y los grupos hidroxilo de la celulosa (Rensing *et al.*, 2006). En este sentido, dichos autores demostraron que la disolución de celulosa mediante el líquido iónico [Bmim][Cl] era debida a la alta basicidad del anión cloruro, proponiendo un mecanismo de disolución de la celulosa en [Bmim][Cl], que implica la formación de puentes hidrógeno entre dicho anión cloruro del líquido iónico y los grupos OH de la celulosa (Figura 1.8). Según este mecanismo, los átomos de hidrógeno y oxígeno de la celulosa forman complejos donador-aceptor de electrones (EDA) con los iones polares del líquido iónico, ocurriendo principalmente entre los carbonos C6 y C3 de las cadenas (Kosan *et al.*, 2007). Esta interacción provoca la separación de los grupos hidroxilo de las cadenas de celulosa produciendo la disolución de celulosa. Sin embargo, otros autores también atribuyen un papel importante al catión, en tanto que es un aceptor de electrones, para la solubilización de la celulosa (Ye *et al.*, 2007, Feng y Chen, 2008).

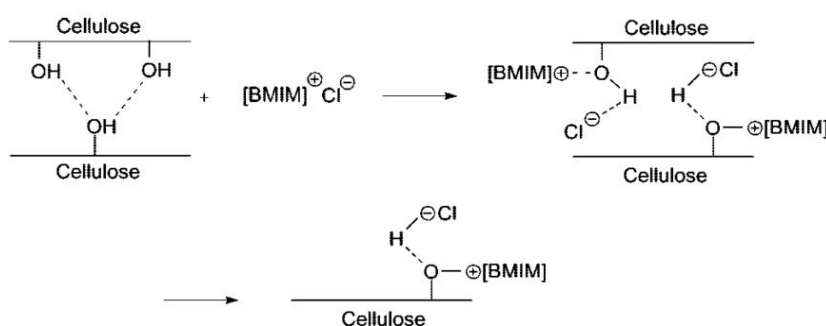


Figura 1.8. Mecanismo de disolución de celulosa mediante [Bmim][Cl] (Feng y Chen, 2008; Pinkert *et al.*, 2009)

En este sentido, los mejores resultados para la disolución de celulosa en líquidos iónicos se han observado para el caso de líquidos iónicos de base haluro, especialmente con el anión cloruro, el pequeño tamaño del ión así como su fuerte electronegatividad le aportan considerables ventajas. El efecto del catión en este tipo de líquidos iónicos ha demostrado su importancia en la disolución. Así, para el mismo anión cloruro, el aumento en la longitud de la cadena alquílica en un catión imidazolio dialquílico resulta en la disminución de capacidad de la disolución de celulosa, mientras que la introducción de un grupo alilo en el catión imidazolio mejoró la disolución. Además, la temperatura también es un factor importante en la disolución de celulosa, ya que para temperaturas superiores a 100 °C, la solubilización de la celulosa se ve muy favorecida, probablemente por la concomitante reducción del contenido en agua (Swatloski *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2007; Suarez *et al.* 2013).

Los contaminantes en el líquido iónico pueden afectar su capacidad de disolución de celulosa. Estudios realizados con [Bmim][Cl] han demostrado que la presencia de una fracción de 0.01 % de agua es suficiente para imposibilitar la disolución de celulosa (Swatloski *et al.*, 2003). En contraste, el uso de presiones elevadas (0.2 a 0.9) MPa pueden facilitar la disolución de celulosa mientras que la adición de algunos cosolventes pueden reducir la velocidad (disulfuro de carbono) o no tener efecto alguno en la solubilidad, pero sí en la disminución de la viscosidad de la mezcla (DMSO, DFM) (Fort *et al.*, 2007; Pinkert *et al.*, 2009).

1.5.4. Precipitación-Regeneración de celulosa

Independientemente del tipo de disolvente utilizado, la regeneración de celulosa se basa en la introducción de un disolvente molecular capaz de desplazar a los iones del líquido iónico en su interacción con la celulosa, el cual actúa a modo de antisolvente. En todos los casos, la regeneración de la celulosa se realiza mediante la adición en exceso de un disolvente polar como agua, acetona, etanol o mediante la mezcla de ellos (Swatloski *et al.*, 2002, 2003; Zhu *et al.*, 2006). La celulosa recuperada del líquido iónico muestra entre un 50 y un 75% menos grado de polimerización que el polímero inicial, así como una estructura amorfa. (Zhao *et al.*, 2009).

Análisis de NMR de protón de baja resolución, con celulosa regenerada en estado hidratado, han demostrado un rápido intercambio de protón entre la superficie de los grupos hidroxilos del biopolímero y el agua o antisolvente utilizado en la regeneración. Sin embargo, esta interacción no es suficiente para reestablecer completamente la red de puentes hidrógeno de la celulosa cristalina (Ibbett *et al.*, 2008) . Así, se ha observado que la celulosa regenerada es mayoritariamente amorfa con una mayor accesibilidad a las cadenas de polisacáridos, lo cual facilita el ataque enzimático de las celulasa, mejorando la cinética de hidrólisis (Dadi *et al.*, 2006).

La celulosa regenerada es separada mediante filtración o centrifugación, y dado que los líquidos iónicos son disolventes no volátiles, se pueden plantear diversas estrategias de eliminación del antisolvente (i.e. destilación, tecnología de membranas, etc) para la recuperación total del líquido iónico. La recuperación de los líquidos iónicos es esencial e ineludible, si se desea realizar un proceso sostenible de tratamiento de biomasa vegetal económica y medioambientalmente sostenible.

1.5.5. Evaluación del procesamiento verde de celulosa con líquidos iónicos.

La Química Verde se define como “el diseño de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas” (Anastas y Warner, 1998). En 1998 Anastas y Warner enunciaron los 12 principios de la química verde para poner en práctica la Química Verde. En relación directa a la utilización de líquidos iónicos en el procesamiento de la celulosa, dichos principios contemplarían los siguientes aspectos:

1. **Prevención.** Es mejor prevenir la formación de residuos que eliminarlos después de producirlos. A pesar de que los líquidos iónicos han sido considerados disolventes de celulosa no derivatizantes, se ha demostrado que en presencia de bases catiónicas imidazolio o 1-metilimidazolio, los cationes 1-alkil-3-metilimidazolio pueden reaccionar en la posición C2 con la celulosa y su extremo reductor, formando un enlace carbono-carbono (Ebner *et al.*, 2008). Esta reacción secundaria puede evitarse en ausencia de estas bases o con tiempos de contacto menores a 2 horas. A pesar de estas observaciones, la cantidad de subproductos que pueden producirse mediante el procesamiento de celulosa o lignocelulosa con líquidos iónicos, son mucho menores que los

producidos por otros métodos de procesamiento como el proceso Kraft (para producir pulpa de celulosa) o el proceso “viscoso” (para producir rayón).

2. **Economía atómica.** Los productos sintéticos deben ser diseñados para maximizar la incorporación de todas las materias primas utilizadas en el producto final, de tal manera que éste contenga el máximo número de átomos de los reactantes. La reacción ideal incorporaría todos los reactantes al producto. En el procesamiento de celulosa mediante líquidos iónicos, el empleo de líquidos iónicos que sean inertes frente a la celulosa es esencial, lo que permitirá su recuperación total, y los máximos niveles de rendimiento en los posteriores procesos de sacarificación de la celulosa.(Wang *et al.*, 2012).
3. **Uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida.** Los procesos verdes utilizarán y producirán sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad para la salud humana y el medio ambiente. El procesamiento de celulosa mediante líquidos iónicos utiliza y produce productos considerados no tóxicos para el humano o el medio ambiente. Esto lleva a enfocarse en la mejora de ciertas cualidades de los líquidos iónicos y los anti-solventes como disminuir su toxicidad y mejorar su biodegradabilidad (Wang *et al.*, 2012).
4. **Generación de productos eficaces pero no tóxicos.** Los productos químicos deben ser diseñados de manera que mantengan su eficacia pero minimizando su toxicidad. El procesamiento de celulosa mediante líquidos iónicos produce numerosos productos usados como recubrimientos, membranas, bioetanol, medios de separación, los cuales son considerados no tóxicos o dañinos para el medio ambiente.
5. **Disolventes más seguros.** El uso de sustancias auxiliares (por ejemplo disolventes, agentes de separación, etc) deberá evitarse o ser inocuos cuando sea necesario su uso. Las propiedades inherentes de líquidos iónicos, en cuanto a su nula presión de vapor y su estabilidad térmica, cumplen a la perfección este principio de la Química Verde. No obstante, la toxicidad de algunos líquidos iónicos como el [Bmim][Cl] (Bernot *et al.*, 2005), exige la recuperación completa del disolvente para mantener el concepto de procesamiento verde de la celulosa. Con respecto al anti-solvente utilizado para regenerar la celulosa, el agua es el anti-solvente más inocuo. Con respecto a los disolventes orgánicos deberán elegirse aquellos de menor toxicidad.
6. **Eficiencia energética.** La energía requerida para cualquier proceso deberá ser minimizada. Se preferirán los métodos sintéticos realizados a temperatura y presión ambiente. El procesamiento de celulosa usando líquidos iónicos suele

- realizarse a condiciones suaves de temperatura pero el tiempo y temperatura necesarios para un proceso óptimo aún deben determinarse.
7. **Uso de materias primas renovables.** La celulosa y el agua, utilizada como anti-solvente, son recursos renovables.
 8. **Evitar la derivatización innecesaria.** Se evitará la posible formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de propiedades físico/químicas). Los posibles derivados en la disolución de la celulosa con líquidos iónicos pueden ser el producto de la reacción entre los cationes 1-alkil-3-metilimidazolio en su posición C2 con el extremo reductor de celulosa. Sin embargo, la cantidad de este subproducto es menor que con otros métodos de procesamiento de celulosa (proceso Kraft o viscoso) y esta reacción secundaria puede evitarse por la ausencia de bases y tiempos de reacción más cortos. Este principio se refiere más a las metodologías sintéticas, por ejemplo, el uso de grupos protectores en la síntesis orgánica (Wang *et al.*, 2012).
 9. **Potenciación de la catálisis.** Se preferirán catalizadores (lo más selectivos posibles) en lugar de reactivos estequiométricos. El procesamiento de materiales lignocelulósicos mediante líquidos iónicos requiere la escisión de ciertos enlaces covalentes. En este sentido, el empleo de biocatalizadores para el procesamiento de biomásas vegetales es del máximo interés para el desarrollo de una tecnología sostenible de aplicación en la producción de biocombustibles (Lozano *et al.*, 2012).
 10. **Generar productos biodegradables.** El empleo de líquidos iónicos inertes, y de biocatalizadores permite garantizar la nula obtención de subproductos indeseados. No obstante, muchos de los actuales líquidos iónicos que disuelven la celulosa no son biodegradables pero deben ser reciclados como un indicador positivo en la sostenibilidad de los procesos.
 11. **Análisis en tiempo real para evitar contaminación.** Es necesario controlar una reacción en tiempo real y tomar las medidas necesarias para evitar la formación de subproductos. Con respecto a la disolución de celulosa mediante líquidos iónicos, el seguimiento de la reacción *in situ* mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (IR-TF) podría ser una técnica adecuada, alimentando muestras de análisis al equipo a tiempos de reacción establecidos. El análisis de la absorbancia del medio de reacción permitiría detectar cualquier reacción secundaria entre el líquido iónico y la celulosa. Puesto que el análisis de IR-FT requiere pocos minutos, el seguimiento de la

reacción podría realizarse en tiempo real. Sin embargo, no se ha prestado mucho interés en este tema (Wang *et al.*, 2012).

- 12. Minimizar los accidentes químicos potenciales.** Un proceso químico verde deberá disminuir el riesgo potencial de accidentes. Los líquidos iónicos capaces de disolver celulosa pueden prevenir accidentes químicos como explosiones o incendios gracias a su baja presión de vapor, baja inflamabilidad y alta estabilidad térmica. Sin embargo, el hecho de que algunos líquidos iónicos, (hasta ahora no disolventes de celulosa), han demostrado que pueden ser destilables a bajas presiones (Earle *et al.*, 2006), combustibles (Smiglak *et al.*, 2006) o e incluso hidrolíticamente inestables (Swatloski *et al.*, 2003). Este hecho determina la necesidad de tener en cuenta las características de cada ión químico utilizado para cada tipo de cada aplicación y/o proceso (Wang *et al.*, 2012).

En conclusión, los líquidos iónicos han sido reconocidos como disolventes verdes debido a nula volatilidad, y alta estabilidad, lo que les hace muy seguros. Sin embargo, la toxicidad de algunos de ellos exige su recuperación y reutilización. Los líquidos iónicos pueden ser diseñados a partir de cualquier ión donde la elección de los iones que lo conforman es determinada por las propiedades químicas, físicas y biológicas que se desean obtener. Por este motivo, la elección del líquido iónico adecuado para el procesamiento de celulosa es de gran importancia, sin embargo no es el único factor decisivo en el desarrollo de un proceso verde y sostenible. Para ello ha de considerarse la totalidad del proceso y el equilibrio de todos los principios de la química verde (Wang *et al.*, 2012).

1.6. Hidrólisis enzimática de celulosa

La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo mediante enzimas hidrolíticas (*i.e.* celulasas, glucohidrolasas, etc) produciendo azúcares reductores como la celobiosa y la glucosa (Béguin y Aubert, 1994). El costo de la hidrólisis enzimática es bajo comparado con la hidrólisis ácida debido a las condiciones suaves de reacción (pH entre 4.8 y 5 y temperatura entre 40 y 50°C), lo que evita problemas de corrosión y toxicidad de los productos (Sun y Cheng, 2002; Zhang y Lynd, 2004).

Las celulasas son relativamente caras y la reducción de su costo es un factor importante para su uso comercial en las biorefinerías. Alguna de las estrategias

utilizadas para economizar el uso de celulasas incluyen el aumento de la productividad volumétrica de la enzima, producción de la enzima con sustratos más baratos, producción de preparados enzimáticos con mayor estabilidad para procesos específicos, y producción de celulasas con mayor actividad específica en sustratos sólidos. Compañías de biotecnología como Genecor o Novozymes Biotech están sumamente comprometidas en el desarrollo de tecnología que reduzcan el costo de la celulasa para su uso en procesos de etanol celulósico. Se espera que el mercado de las celulasas se expanda dramáticamente cuando comience la producción a gran escala del bioetanol celulósico (Zhang y Lynd, 2004).

Entre las celulasas producidas por distintos microorganismos, la celulasa fúngica de *Trichoderma reesei* ha sido una de las más estudiadas, y está comercializada a nivel industrial. Celulasa es el nombre que se da al sistema de enzimas que actúan de forma sinérgica para degradar la celulosa en sus unidades de glucosa. Los componentes de los sistemas celulasa han sido clasificados según su acción catalítica (Lynd *et al.*, 2002) en:

- I. *Endoglucanasa* (1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.4). Estas enzimas cortan al azar los enlaces β -1,4 intramoleculares accesibles en las zonas amorfas de las cadenas de celulosa, generando oligosacáridos de varias longitudes y generando nuevos extremos de cadena.
- II. *Exoglucanasas*. A diferencia de las endoglucanasas, estas enzimas actúan de manera *procesiva* (progresivamente sin dissociarse del sustrato) en los extremos reductores o no reductores de las cadenas de celulosa liberando celobiosa o glucosa y se denominan:
 - i) 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa (celobiohidrolasa, EC 3.2.1.91) Enzimas que liberan celobiosa a partir de los extremos reductores (CBH I) o no reductores (CBH II) de las cadenas de celulosa (Teeri, 1997).
 - ii) 1,4- β -D-glucan glucohidrolasa (celodextrinasa, EC 3.2.3.74). Enzimas que actúan sobre los extremos de las cadenas de celulosa liberando glucosa.
- III. *β -Glucosidasa* (β -glucosidasa glucohidrolasa o celobiasa, EC 3.2.1.21). Estas enzimas actúan hidrolizando la celobiosa y otras celodextrinas con un grado de polimerización (DP) de hasta 6 para producir glucosa. La afinidad de la enzima por el sustrato aumenta conforme disminuye el

grado de polimerización. Una de las desventajas del complejo celulasa obtenido a partir de *Trichoderma reesei* es el bajo nivel de actividad β -glucosidasa mientras otro hongo, *Aspergillus niger*, es muy eficiente en la producción de dicha enzima.

El sistema de celulasa de *Trichoderma reesei* ha sido objeto de estudio en los últimos 50 años. *Trichoderma reesei* produce al menos dos exoglucanasas (CBHI y CBHII), cinco endoglucanasas (EGI, EGII, EGIII, EGIV y EGV), y dos β -glucosidasas (BGLI y BGLII). La necesidad de dos exoglucanasas (celobiohidrolasas) se atribuye a su preferencia por los extremos reductores (CBHI) y no reductores (CBHII) de las cadenas de celulo microcristalina. La necesidad de 5 endoglucanasas no está clara aún (siendo la EGI y la EGII las mayoritarias), sobre todo sabiendo que representan menos del 20% de la proteína total de la celulasa (Lynd *et al.*, 2002).

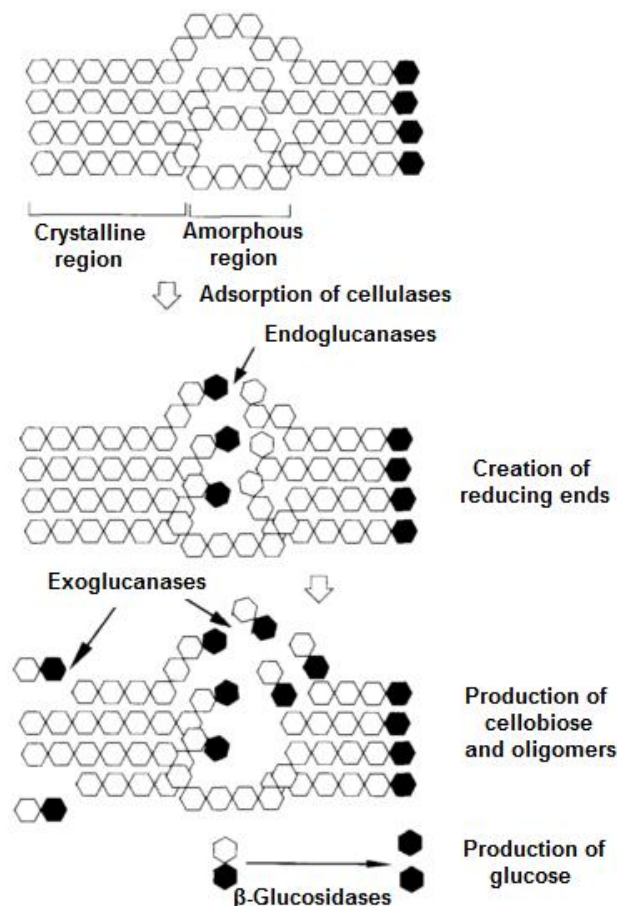


Figura 1.9. Representación esquemática de la hidrólisis de celulosa mediante la acción sinérgica de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Los residuos de glucosa están indicados en hexágonos, los extremos reductores están representados en negro. Adaptado de (Béguin P. y Aubert JP., 1994; Taherzadeh y Karimi, 2007)

La CBHI y la CBHII son los principales componentes del sistema *T. reesei*, representando el 60% y 20% respectivamente, de la proteína total de celulasa producida por el hongo (Teeri, 1997). Sin embargo ambas celobiohidrolasas son muy lentas para disminuir el grado de polimerización. Las endoglucanasas son las responsables de disminuir el grado de polimerización mediante el corte interno de las cadenas de celulosa en las zonas amorfas, generando nuevos extremos de cadena susceptible al ataque de las celobiohidrolasas (Figura 1.9). La celobiosa es el producto principal de las CBHI y CBHII e inhibe la actividad de las celobiohidrolasas y endoglucanasas, la hidrólisis de celobiosa a glucosa por acción de las β -glucosidasas evita la inhibición.

Como se ha mencionado anteriormente *Trichoderma reesei* produce bajos niveles de β -glucosidasa comparada con hongos de la especie *Aspergillus*. Además, la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei* suele inhibirse por el producto glucosa, mientras aquellas producidas por *Aspergillus* son más tolerantes a los altos niveles glucosa. Los niveles de β -glucosidasa en *Trichoderma reesei* son presumiblemente suficientes para el crecimiento en medio de celulosa, pero no lo suficientemente altos para la sacarificación in vitro de celulosa. Así, la suplementación de β -glucosidasa de *Aspergillus niger* a las preparaciones de *Trichoderma reesei* es una de las estrategia mayormente utilizadas para reducir la inhibición de la celulasa (Sun y Cheng, 2002), reflejándose en la mejora de los rendimientos y cinéticas de hidrólisis de celulosa. (Lynd *et al.*, 2002; Taherzadeh y Karimi, 2007) .

1.6.1. Mecanismo de hidrólisis de celulosa

El mecanismo aceptado de hidrólisis de celulosa implica la acción sinérgica de las endocelulasas, exocelulasas y β -glucosidasas del sistema celulasa. Así, las endoglucanasas hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1, 4 de las zonas amorfas de las cadenas de celulosa, las exoglucanasas hidrolizan los extremos de las cadenas de celulosa liberando celobiosa o glucosa y las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa, eliminando la inhibición por celobiosa. Estos tres procesos de hidrólisis se producen simultáneamente como se muestra en la Figura 1.9. Durante la hidrólisis enzimática la celulosa es degradada a a azúcares reductores que pueden ser fermentados por bacterias o levaduras a etanol (Sun y Cheng, 2002).

La hidrólisis primaria realizada en la superficie del sustrato libera azúcares solubles a la fase líquida con un grado de polimerización de hasta 6 mediante la hidrólisis de las endoglucanasas y exoglucanasas. La despolimerización enzimática por las endo y exoglucanasas es el paso limitante de la hidrólisis completa del sustrato. La hidrólisis secundaria ocurre en la fase líquida e implica la hidrólisis de celobiosa a glucosa por las β -glucosidasas (Zhang y Lynd, 2004).

Para que la hidrólisis de celulosa pueda realizarse la enzima debe primero adsorberse al sustrato insoluble, lo cual depende del área de superficie accesible para el ataque enzimático. Las partículas de celulosa tienen una superficie interna y externa, siendo la superficie interna mayor en 1 o 2 órdenes que la superficie externa, excepto en casos como en celulosa bacteriana. La superficie externa incluye la superficie bruta de la celulosa, las aberturas y los poros que son visibles bajo al microscopio. La superficie interna de la celulosa incluye los espacios entre las microfibrillas y probablemente también entre los extremos de los cristales. La mayor parte de estas superficies internas se cierran cuando las paredes celulares están libres de agua, abriéndose de nuevo al absorber agua. El área de la superficie interna total está en función del pretratamiento dado a la celulosa (Chang y Chou, 1981).

La adsorción de la celulasa al sustrato es rápida comparada con el tiempo requerido para la hidrólisis, observándose que la adsorción alcanza un valor constante entre 30 min y 90 min después de iniciada la hidrólisis (Lynd *et al.*, 2002). El área ocupada por una molécula de celulasa es más grande que el área de la unidad de repetición del polímero, la celobiosa. Como resultado, el número de moléculas de celulosa que pueden unirse a la superficie de celulosa es considerablemente menor que el número de unidades de celobiosa disponibles en la superficie.

Durante la hidrólisis de la celulosa, las características del sustrato sólido varía, incluyendo (1) cambios en el número de extremos de las cadenas de celulosa debidos a la acción de endoglucanasas y exoglucanasas (Zhang y Lynd, 2004), y (2) los cambios en la accesibilidad de celulosa resultantes de consumo de sustrato y la fragmentación de celulosa. La acción combinada de las endo y exoglucanasas modifica la superficie del sustrato con el tiempo, resultando en cambios rápidos en la velocidad de hidrólisis.

1.6.2. Factores importantes en la hidrólisis enzimática

La concentración y calidad del sustrato, el tipo de pretratamiento, la actividad de la celulasa, y las condiciones de hidrólisis tales como temperatura, el pH, y agitación son los factores más importantes en la hidrólisis enzimática de celulosa. Las temperaturas y pH óptimos de diferentes celulasas suelen estar en el rango de 40 a 50 °C y pH de 4 a 5 (Tahezadeh y Karimi, 2007). Para mejorar el rendimiento y la velocidad de la hidrólisis enzimática, la investigación se ha centrado en la optimización del proceso de hidrólisis y la mejora de la actividad celulasa (Sun y Cheng, 2002).

1.6.3. Mejorando la hidrólisis enzimática

▪ Sustrato

Uno de los principales factores que afectan a la tasa de rendimiento y cinética de hidrólisis enzimática es la concentración de sustrato en el medio de reacción. La alta concentración de sustrato puede causar inhibición de la celulasa, lo que reduce sustancialmente la velocidad de hidrólisis. Las altas concentraciones de sustrato pueden ser contraproducentes debido a problemas de transferencia de masa. La inhibición de la celulasa por sustrato depende de la relación entre la concentración de enzima y la de al sustrato (Tahezadeh y Karimi, 2007).

La susceptibilidad de la celulosa al ataque de las celulasas depende en gran medida de su estructura conformacional incluyendo cristalinidad, grado de polimerización o contenido de lignina. La lignina bloquea el acceso de las celulasas a la celulosa y uniéndose irreversiblemente a las enzimas. Por lo que la eliminación de la lignina y el pretratamiento de la celulosa pueden aumentar considerablemente la velocidad de hidrólisis (Sun y Cheng, 2002).

▪

▪ Celulasa

En la sacarificación de biomásas vegetales, el aumento en la concentración de celulasa, aumenta la velocidad y el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa. Sin embargo, este aumento incrementaría significativamente el costo del proceso. Una dosis de celulasa de 10 FPU / g de celulosa suelen utilizarse en los laboratorios ya que proporcionan altos rendimientos de hidrólisis en un tiempo razonable (48-72 h) a un costo razonable enzima (Gregg y Saddler, 1996).

La hidrólisis enzimática de celulasa se realiza en tres principales pasos: la adsorción de la celulasa a la superficie de la celulosa, la degradación del polímero a azúcares fermentables y la desorción de la celulosa, observándose una disminución en la actividad enzimática durante la hidrólisis. La pérdida de actividad de la celulasa se ha adjudicado en parte a la adsorción irreversible de la celulasa en la celulosa. A este respecto, la adición de surfactantes (*i.e.* Tween 20, Emulgen, polioxietilen glicol, Anhitole, Q86W, etc.) durante la hidrólisis, es capaz de modificar la superficie de la celulosa y reducir al mínimo la unión irreversible de celulasa en la celulosa, observando mejores resultados a partir de tensoactivos no iónicos.

La adición de β -glucosidasas en el sistema de celulasas de *T. reesei* logra mejor sacarificación que sin β -glucosidasa. La β -glucosidasas hidroliza la celobiosa que inhibe a la celulasa.

▪ Inhibición por producto de la celulasa

La actividad de la celulasa es inhibida por la celobiosa y en menor medida por la glucosa. Varias estrategias se han desarrollado para reducir la inhibición incluyendo el uso de altas concentraciones de enzima, la adición de β -glucosidasa y la eliminación de los azúcares producidos durante la hidrólisis mediante ultrafiltración o sacarificación simultánea y fermentación (SSF) (Sun y Cheng, 2002).

La recuperación y reutilización de las enzimas celulasa y β -glucosidasa es una estrategia potencial para reducir el costo de la hidrólisis enzimática de celulosa, por lo que las enzimas han de ser separadas del producto para su posterior reutilización. La inmovilización y el uso de reactores de membrana es una alternativa para conservar las enzimas en el reactor a la vez que son separadas del producto.

1.7. Inmovilización de enzimas

El término inmovilización se refiere a “enzimas físicamente confinadas o localizadas en un espacio definido con preservación de sus capacidades catalíticas, las cuales pueden ser utilizadas de manera continua y repetida” (Sheldon, 2007; Brena y Batista-Viera 2006). Entre las ventajas que aporta este método se pueden mencionar (Hartmeier, 1985):

- La inmovilización permite la reutilización de la enzima y su aplicación en procesos en continuo.
- La inmovilización puede aumentar la estabilidad térmica de la enzima.
- Comparado con el uso de enzima libre, la inmovilización permite disminuir el volumen del reactor, mejorando la productividad volumétrica (la cantidad de producto formado por unidad de tiempo y volumen de reactor).

1.7.1. Métodos de inmovilización

Los métodos de inmovilización se clasifican, de acuerdo al tipo de unión entre soporte de inmovilización y la enzima, en métodos de unión física y métodos unión química (Figura 1.10).

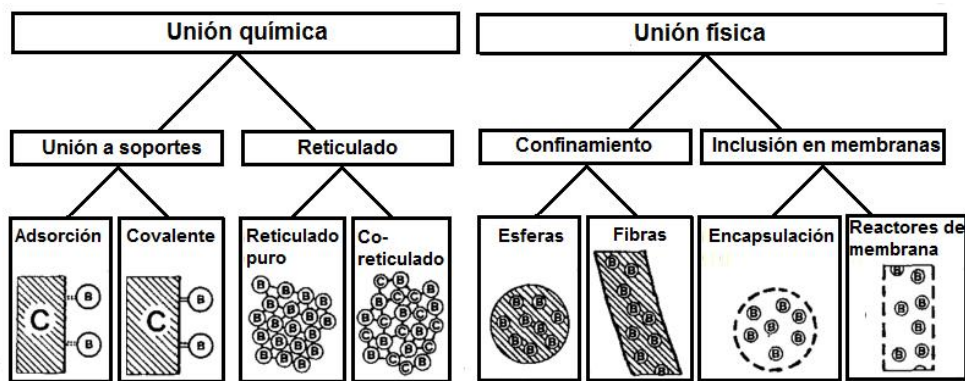


Figura 1.10. Principales clases de inmovilización de enzimas. C=carrier o soporte, B=biocatalizador (enzima). Adaptado de (Hartmeier, 1985)

a) Métodos de unión física

▪ Confinamiento

El método de confinamiento se basa en la retención de una enzima dentro de una red polimérica (polímero orgánico, sílica sol-gel), que permite que el sustrato y los productos pasen a través, reteniendo la enzima. En este método la enzima no se encuentra unida a la matriz o membrana y requiere la síntesis de la red de polímero en presencia del biocatalizador. El confinamiento de la enzima puede realizarse mediante geles o fibras. Una de las desventajas de este método son los problemas de transferencia de masa a través membranas o geles (Brena y Batista-Viera, 2006).

▪ **Inclusión en membranas**

- **Microencapsulación.** Consiste en rodear las enzimas de membranas semipermeables que permiten el paso de las moléculas de sustrato y producto, reteniendo las enzimas. El método permite la encapsulación simultánea de más de un tipo de enzimas permitiendo llevar a cabo reacciones que suceden en múltiples pasos (Sheldon, 2007)
- **Reactores de membrana.** El uso de membranas para la retención de enzimas ha despertado gran interés industrial. En estos reactores se utilizan membranas permeables al producto, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a las enzimas. El flujo de sustrato es alimentado mediante una bomba. En esta metodología la enzima puede ser previamente inmovilizarse sobre la membrana que formará el reactor (Giorno y Drioli, 2000; Lozano *et al* 2002, 2004, Mori *et al* 2005).

b) *Métodos de unión química*

▪ **Unión a soportes**

Son los métodos de inmovilización más utilizados. La naturaleza del soporte así como el tipo de enlace entre éste y la enzima son determinantes en el comportamiento enzimático. El soporte elegido debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y debe ser fácilmente separado para su posterior reutilización. Existen soportes de una gran variedad de materiales que pueden encontrarse en forma de cilindro, hojas, fibras o esferas. La unión al soporte puede realizarse mediante adsorción o unión covalente (Sheldon, 2007).

- **Adsorción** El método más simple de inmovilización es el de adsorción y se basa en unión de la enzima al soporte mediante enlaces por puente de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones iónicas (Brena y Batista-Viera, 2006). Los principales factores que afectan la adsorción se encuentran (Sheldon, 2007):

- i) El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.

- ii) La fuerza iónica: el aumento de la fuerza iónica induce la desorción de la enzima ya que los iones se unen con más fuerza al soporte que a la enzima
- iii) El diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje central de la enzima.
- iv) La presencia de iones que actúan como cofactores: ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

La inmovilización mediante adsorción se realiza en condiciones suaves, fácil de realizar y usualmente preserva la actividad catalítica de la enzima, por lo que resulta económicamente atractiva. Sin embargo, pueden existir problemas de pérdida de enzima si la unión al soporte es muy débil (Brena y Batista-Viera, 2006; Verardi *et al.*, 2012). Otra técnica de inmovilización por adsorción se basa en el uso de resinas de intercambio iónico. Estas resinas contienen grupos funcionales y contraiones que se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin producir cambios en la matriz insoluble.

➤ **Unión covalente.** La inmovilización de proteínas mediante unión covalente es uno de los métodos más utilizados. La unión covalente consiste en la activación de los grupos del soporte para que reaccione con los grupos nucleófilos de las proteínas, principalmente lisina, cisteína, tiroina, metionina, triptófano, arginina, ácido aspártico y glutámico. El carácter hidrófobo de los demás aminoácidos no se encuentran expuestos y no intervienen en la unión covalente.

Una de las ventajas de este método es que debido a la estabilidad de los enlaces, la enzima no es liberada en la disolución. Sin embargo, para lograr niveles altos de actividad es importante que los aminoácidos esenciales para la actividad catalítica, no participen en la unión covalente, lo cual puede ser un obstáculo en ciertos casos. Los métodos mediante unión covalente suelen utilizarse cuando se requiere estrictamente la ausencia de la enzima en el producto (Brena y Batista-Viera, 2006).

▪ **Reticulado**

El método del reticulado consiste en el uso de reactivos bifuncionales (dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos o diaminas activadas con carbodiimida) que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. El resultado son enzimas insolubles con enlaces intermoleculares irreversibles y resistentes a condiciones extremas de pH y temperatura (Verardi *et al.*, 2012).

1.7.2. Efectos de la inmovilización en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede perderse o disminuir debido a razones como:

- La unión al soporte se realiza de tal manera que impide el paso del sustrato al centro actividad de la enzima.
- Los grupos activos del soporte reaccionan con aminoácidos del centro activo de la enzima.
- Cambio conformacional de la enzima resultando en una forma inactiva.

Si después de la inmovilización no se ha perdido la actividad, los cambios en ella podrían deberse a efectos estéricos y/o del microentorno.

1.7.3. Inmovilización de celulasa y β -glucosidasa

Pocos estudios se han realizado sobre la inmovilización de celulasa debido a que la celulosa es insoluble y algunas técnicas de inmovilización como el confinamiento, impiden las interacciones enzima-sustrato. Entre las técnicas de inmovilización conocidas, la inmovilización por unión covalente al soporte parece la más efectiva ya que ha demostrado estabilizar la enzima en ciclos consecutivos de reutilización (Yuan *et al.*, 1999; Dourado *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007).

En su trabajo, Yuan *et al.* (1999) inmovilizaron celulasa en membranas de acrilonitrilo (PAN) injertado con acrilamida usando glutaraldehído. La estabilidad de la enzima se incrementó después de la inmovilización mientras la actividad resultó más alta que en enzimas libres a pH 3-5 comparación y temperaturas arriba de 45°C (Yuan *et al.*, 1999).

Otra mejora de la estabilidad de la celulasa después de ser inmovilizada se observó en el trabajo realizado por Dourado *et al.* (2002). En este trabajo los autores inmovilizaron la celulasa comercial de *T. reesei* llamada Celluclast 1.5L sobre Eudragit

L-100 (copolímero aniónico). El método permitió mejorar la estabilidad de las enzimas sin pérdida significativa de su actividad (Dourado *et al.*, 2002)

La inmovilización de β -glucosidasa también ha sido efectiva para mejorar su estabilidad. Tu *et al.* (2006) inmovilizaron β -glucosidasa en el soporte de metacrilamida Eupergit C. La enzima mejoró su estabilidad a 65°C con respecto a la enzima libre, mientras el perfil de actividad vs pH permaneció igual. La estabilidad operacional de la enzima se demostró durante 6 ciclos de hidrólisis de lignocelulosa (Tu *et al.*, 2006).

1.8. Reactores enzimáticos de membrana (REM)

Los reactores enzimáticos de membrana consisten en el acoplamiento de una reacción enzimática con un proceso de separación de membrana. La principal finalidad de estos reactores es retener a la enzima dentro del reactor a la vez que es separada del producto. Dependiendo del caso, la enzima utilizada puede encontrarse circulando de manera libre en el reactor o inmovilizada sobre la superficie de la membrana (Lozano *et al* 2002, 2004; Mori *et al* 2005, Rios *et al*, 2005, 2007).

1.8.1. Tecnología de Membranas

Una membrana es una fina interfase que regula la permeación de sustancias químicas en contacto con ella. Las membranas pueden ser homogéneas, es decir completamente uniformes en su composición y estructura, o heterogénea, por ejemplo si contiene poros de distintos diámetros o si está constituida por capas. La diferencia entre una membrana y un filtro está en que éste último separa suspensión de partículas más grandes que 1-10 μm (Baker, 2004). Los principales tipos de membranas se muestran en la Figura 1.11.

▪ Membranas Isotrópicas

- **Membranas microporosas.** Estructuras rígidas plenas de poros distribuidos al azar e interconectados entre sí. A diferencia de los filtros, sus poros son extremadamente pequeños, variando entre 0.01 a 10 μm de diámetro. La separación de solutos está en función del tamaño molecular del soluto y del de los poros de la membrana. Sólo aquellas moléculas que difieran considerablemente en el tamaño con respecto a

los poros de la membrana pueden separarse efectivamente mediante ultrafiltración o microfiltración (Baker, 2004).

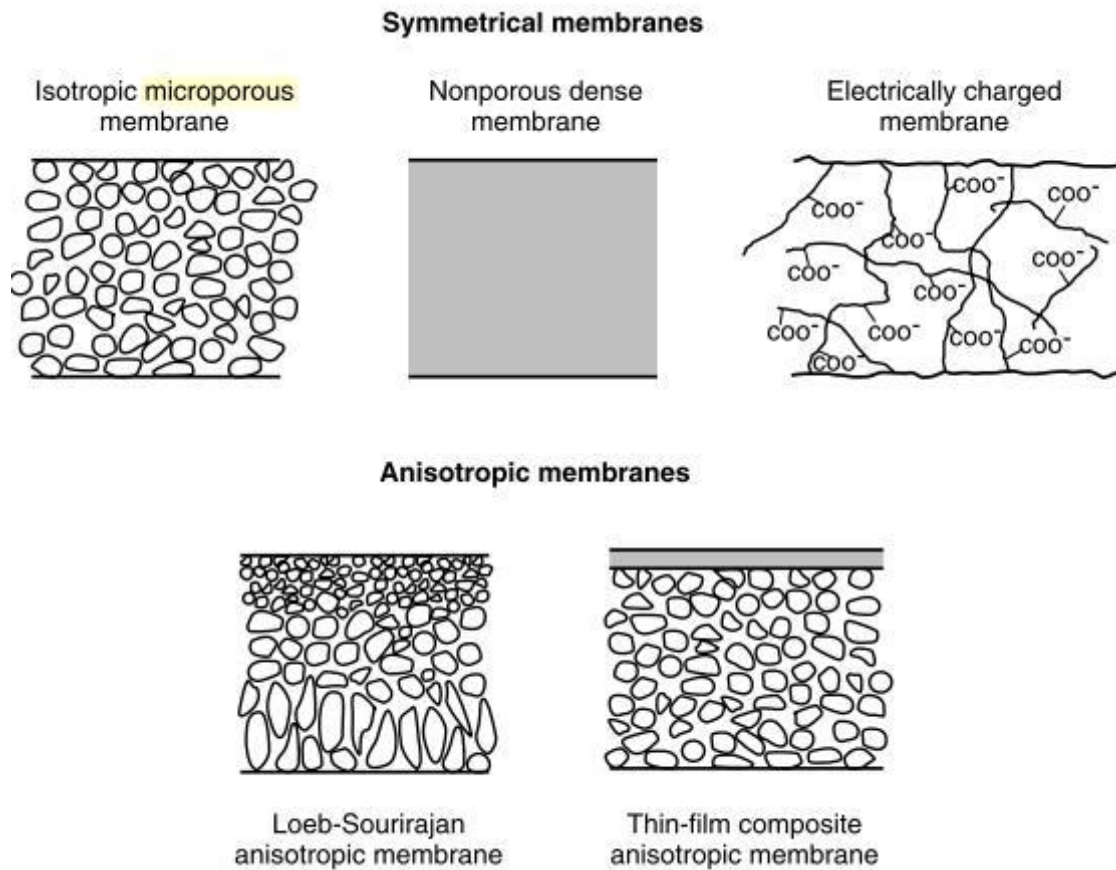


Figura 1.11. Representación esquemática de los diferentes tipos de membranas. Baker, 2004)

- **Membranas no porosas o densas.** Estructura densa, sin poros en donde la separación se da mediante la disolución de los componentes en la membrana y su posterior difusión a través de ella (modelo solución-difusión). La separación de una mezcla de componentes depende de su velocidad de transporte en la membrana, la cual está determinada por su difusividad y solubilidad en el material de la membrana, siendo capaces de separar sustancias del tamaño de moléculas e iones. Debido a las altas presiones a las que se dan estos procesos, las membranas suelen ser anisotrópicas. La ósmosis inversa, la nanofiltración, la pervaporación son procesos donde se utilizan estas membranas (Baker, 2004)

- **Membranas cargadas eléctricamente.** Pueden ser porosas o densas, con iones de carga negativa o positiva fijos en las paredes del poro. La separación se da por exclusión de los iones con misma carga que los de la membrana. La separación se ve afectada por la carga y concentración de los iones en solución. Estas membranas se utilizan en los procesos de electrodiálisis.

- **Membranas anisotrópicas.**

Las membranas anisotrópicas son estructuras laminares o tubulares donde el tamaño de poro, la porosidad o la composición cambia a lo largo de su espesor. Constan de una lámina extremadamente delgada en la superficie, soportada por una subestructura mucho más gruesa y porosa. La lámina delgada es la responsable de la separación mientras la subestructura aporta resistencia mecánica. La estructura de separación y la subestructura pueden estar hechas del mismo material (membranas de Loeb-Sourirajan) o con materiales diferentes (composite). Los altos flujos provistos por las membranas anisotrópicas son tan altos que la mayoría de procesos comerciales utilizan este tipo de membranas (Baker, 2004)

1.8.2. Configuración de módulos de membranas

- **Módulos de placa.** Módulo hecho de membranas planas y placas de soporte. Tienen una configuración semejante a los filtros prensa. La alimentación circula entre las membranas de dos placas adyacentes. Las placas garantizan el soporte mecánico de la membrana y el drenaje del permeado (Figura 1.12)

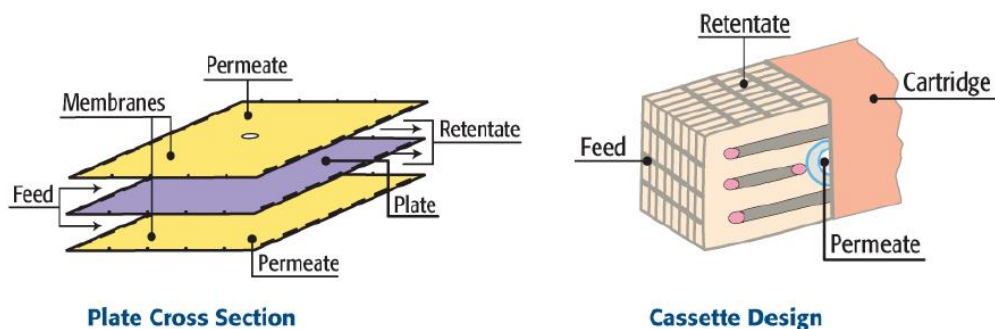


Figura 1.12. Representación esquemática de un sistema de membranas en módulos de placa.

▪ **Módulos de enrollamiento espiral.** Estructura que consiste en una envolvente de dos membranas planas encerrando una hoja flexible porosa (colector de permeado) que está sellado por tres de sus bordes. El borde abierto está conectado enrollado sobre un tubo perforado que transporta el permeado. La alimentación fluye paralela al eje del permeado (Figura 1.13).

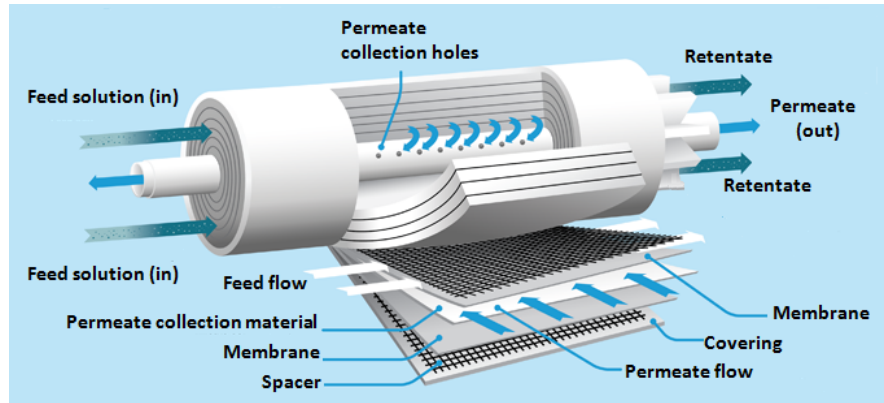


Figura 1.13. Representación esquemática de un sistema de membranas en módulos de enrollamiento espiral.

▪ **Modulos tubulares.** En este diseño la membrana de forma cilíndrica y el sistema soporte se colocan en el interior de un tubo. La alimentación se bombea hasta el centro del tubo bajo presión, el permeado pasa a través de la membrana en forma radial y se recoge por medio de la carcasa, para luego recolectarse fuera del tubo. El retenido pasa tangencialmente en la parte interna de la membrana y sale por el lado opuesto a la entrada de la alimentación (Zapata, 2006) (Figura 1.14).

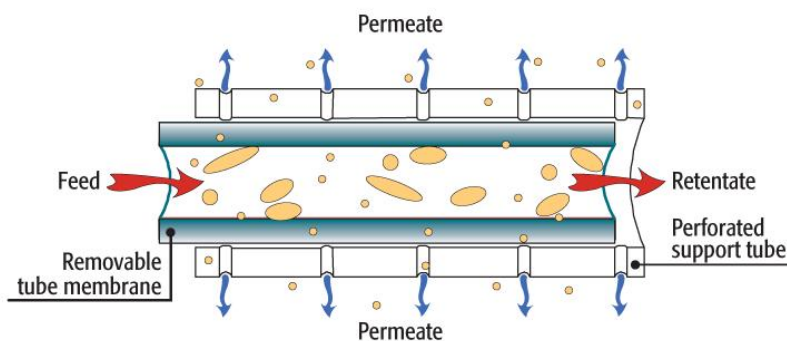


Figura 1.14. Representación esquemática de un sistema de membrana en módulo tubular.

▪ **Módulos de fibra hueca.** Estos módulos son cartuchos que contienen haces de 45 a 3000 fibras poliméricas y completamente huecas. Las fibras se agrupan longitudinalmente dentro de un tubo colector del permeado y los extremos están empotrados en una resina. Cada fibra tiene un diámetro interior que oscila entre 0.5 y 2.7 mm, siendo el lado interior de la fibra hueca, la superficie activa de membrana. La cara exterior de la fibra tiene una estructura rugosa y actúa como soporte. El flujo de alimentación recorre la cara interior de estas fibras, y el permeado se recupera en el exterior y se elimina en la parte superior del tubo (Zapata, 2006) (Figura 1.15).

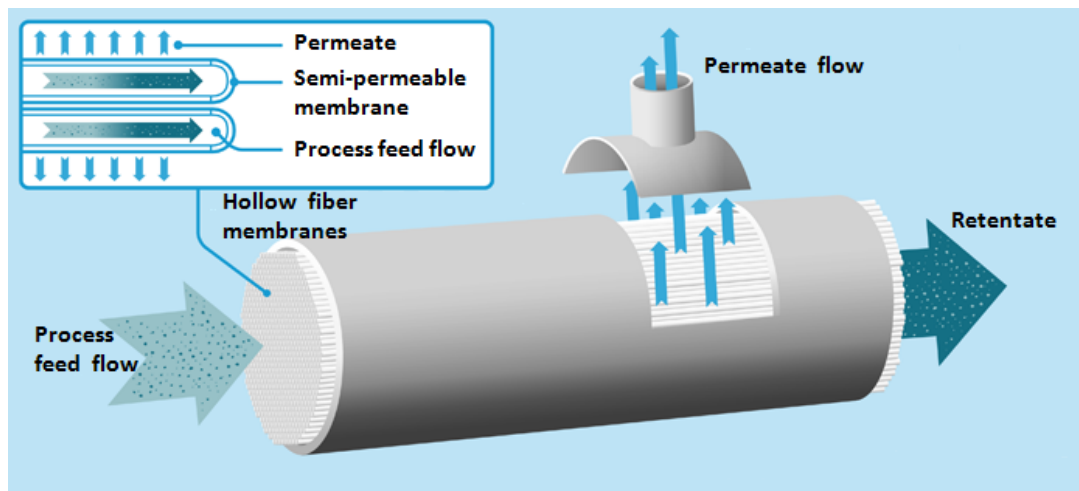


Figura 1.15. Representación esquemática de un sistema de membranas en módulos de fibra hueca.

1.8.3. Tipos de operación de membranas

▪ **Filtración frontal.** El flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana (Figura 1.16a). Como fuerza impulsora de la filtración suele utilizarse el vacío, la presión, la fuerza centrífuga o la fuerza de gravedad (Zapata, 2006). La formación de una capa de partículas sobre la membrana dificulta el flujo y velocidad de filtración (Echavarría *et al.*, 2011).

▪ **Filtración tangencial.** El flujo de alimentación es tangencial a la superficie de membrana. Mientras el flujo de permeado es perpendicular a ésta (Figura 1.16b). Este tipo de filtración genera dos flujos a partir de la alimentación: *retenido*, con una concentración de componentes mayor, y *permeado* con una concentración menor (Zapata, 2006).

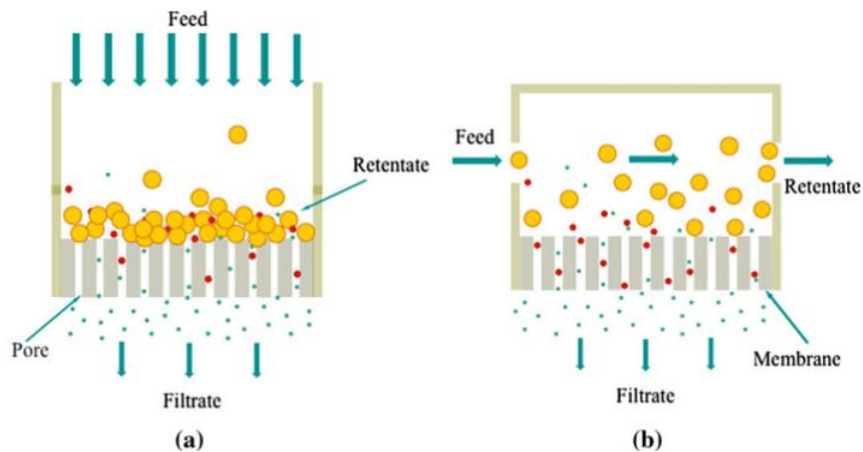


Figura 1.16. Representación esquemática de un sistema de membranas filtración frontal (a) y filtración tangencial (b).

1.8.4. Materiales de fabricación

- **Membranas orgánicas.** Las membranas orgánicas son derivadas de sulfonas, poliamidas y materiales celulósicos. Tienen una resistencia aceptable al pH pero no son adecuadas para temperaturas mayores a 100°C. Tienen poca resistencia a altas presiones y una vida corta de duración comparadas con las membranas inorgánicas.

- **Membranas inorgánicas.** Soporte poroso hecho de materiales como carbono o alúmina, recubierto de una capa selectiva hecha de ZrO_2 o TiO_2 . Tienen buena resistencia física, química y térmica, son resistentes al ataque microbiano, buena resistencia mecánica por lo que resisten altas presiones. Su tiempo de vida media es largo y pueden esterilizarse mediante vapor. Su coste es elevado. Incluyen a las membranas de vidrio y metálicas.

1.8.5. Clasificación de los procesos de membrana.

Los procesos de separación de membranas suelen clasificarse por el tamaño de partículas que separan en: ósmosis inversa, nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración (Figura 1.17).

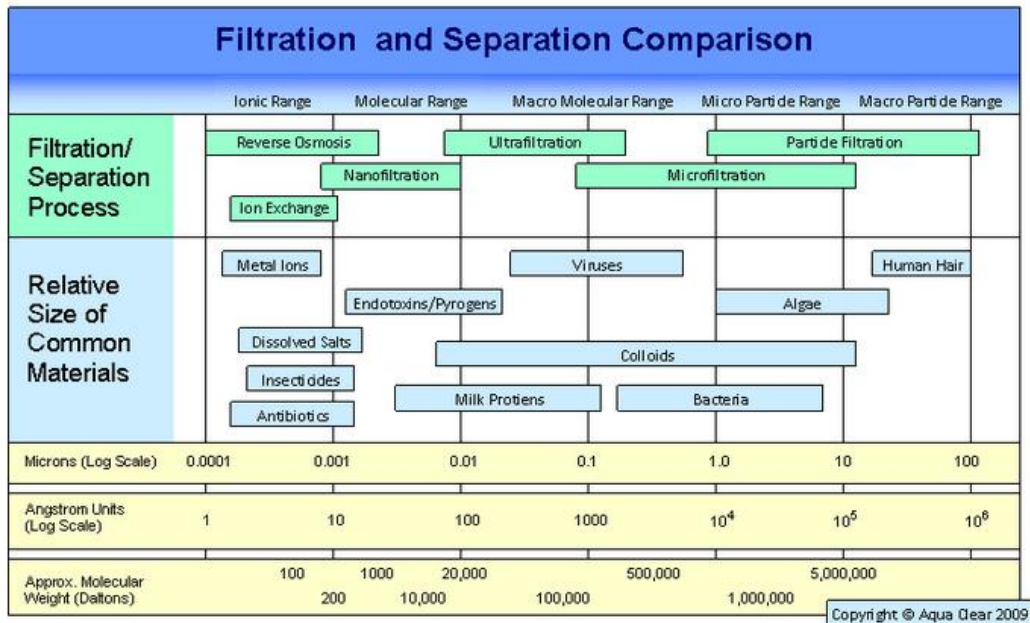


Figura 1.17. Representación esquemática los tamaños de partícula y tipos de filtración. Tomado (<http://www.aquaclearllc.com/osmosis-vs-nanofiltration.php>)

▪ **Osmosis inversa.** Si una membrana selectiva (es decir permeable al agua pero menos permeable a sales) separa una solución salina del agua pura, el agua atravesará la membrana del lado del agua pura al lado menos concentrado en agua concentrado en sal) como se muestra en la Figura 1.18 . Este proceso es llamado ósmosis normal. Si una presión hidrostática es aplicada al lado salino de la membrana, el flujo de agua puede ser retardado y si la presión es suficiente, el flujo cesa. La presión necesaria para detener el flujo de agua se llama presión hidrostática ($\Delta\pi$). Si la presión hidrostática aplicada al lado salino es mayor a la presión osmótica, el agua comienza a fluir del lado salido al lado de agua pura. A este método se le llama ósmosis inversa (Baker, 2004).

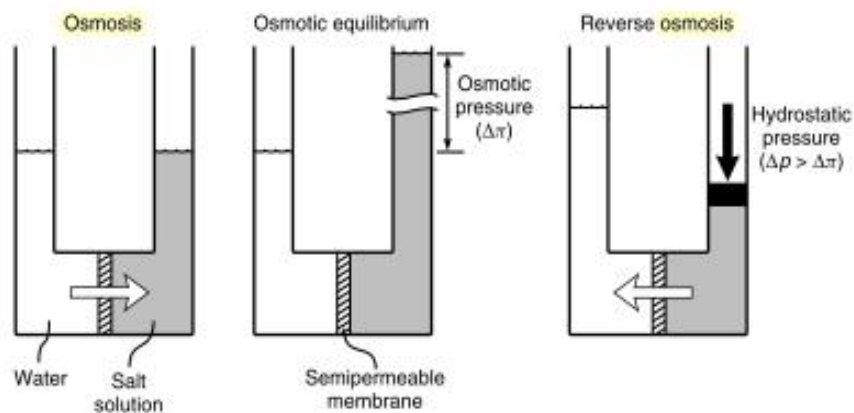


Figura 1.18. Representación esquemática de la ósmosis inversa (Baker, 2004)

▪ **Nanofiltración.** La nanofiltración suele utilizarse para eliminar contaminantes orgánicos disueltos con pesos moleculares mayores a 200kDa y aproximadamente el 70% de los iones monovalentes por repulsión electrostática (efecto de la carga), por tamaño y una serie de mecanismos de rehazo. (Kim *et al.*, 2007) La presión de trabajo en nanofiltración es mucho menor que en ósmosis inversa, normalmente entre 0.5 y 1.3 MPa, de ahí que también se denomine ósmosis inversa de baja presión. Esta técnica suele utilizarse para el ablandamiento y tratamiento de agua potable.

▪ **Ultrafiltración (UF).** Al igual que en la microfiltración, la ultrafiltración actúa como tamiz molecular. La relación tamaño de sustancia a separar/ distribución del tamaño de poro de la membrana permite la exclusión de dichas sustancias en el permeado. Así, las sustancias de mayor tamaño que los poros de la membrana serán completamente rechazadas, mientras las sustancias cuyo tamaño esté comprendido entre el mayor y menor tamaño de poro serán parcialmente rechazadas (Baker, 2004). Debido a su idoneidad para la separación de azúcares del medio de reacción enzimático, la ultrafiltración fue el proceso de separación elegido para la separación del producto y el reciclaje de enzimas en el presente trabajo.

▪ **Microfiltración.** La diferencia básica con la UF es el tamaño de poro de la membrana, de 0.1 μm o mayores pudiendo separar sólidos suspendidos, partículas finas y algunos coloides (Baker, 2004).

1.8.6. Ultrafiltración (UF)

La ultrafiltración utiliza membranas de poros finos para separar agua y microsolutos de macrosolutos y coloides. El diámetro de poro promedio de las membranas utilizadas en UF está en el rango de 10-1000 Å. Las membranas de ultrafiltración suelen ser anisotrópicas fabricadas mediante el proceso Loeb-Sourirajan. Tienen una capa porosa en la superficie soportado sobre una subestructura microporosa más abierta. La superficie porosa fina es la capa selectiva mientras la subestructura microporosa provee fuerza mecánica. La forma habitual de clasificar estas membranas es mediante el peso molecular de corte (*cut-off MW*), definido como el peso molecular de las proteínas, de tipo globular, que la membrana puede separar en un 90 %. El intervalo de pesos moleculares de corte de las membranas de ultrafiltración es de 10 kD – 900 kD.

Los experimentos de laboratorio suelen realizarse con células de agitación en reactores tanque agitado o mediante células de flujo en un sistema de recirculación Fig 1.19.

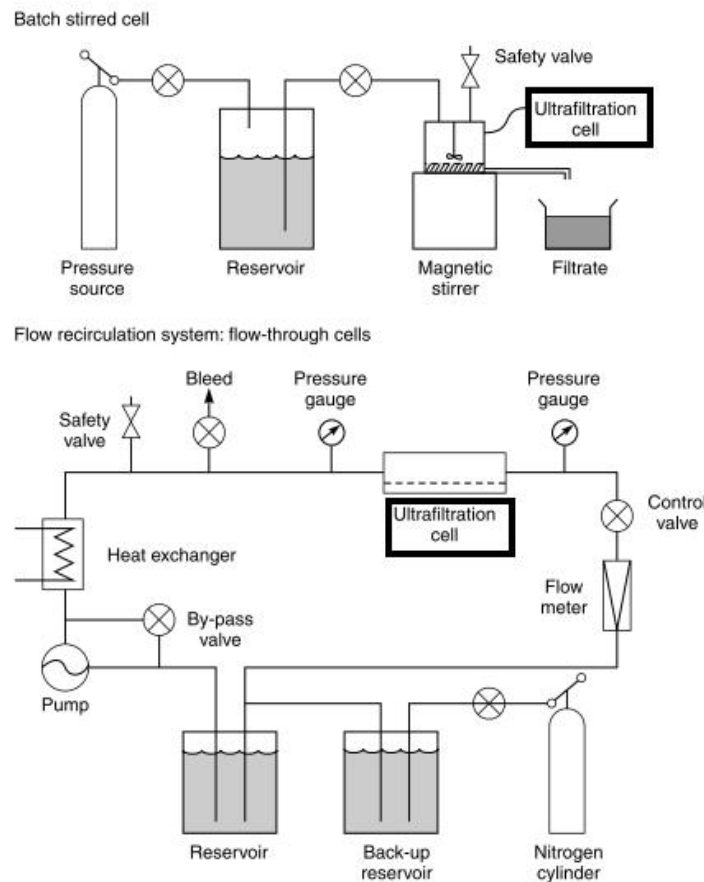


Figura 1.19. Representación esquemática de sistemas de ultrafiltración en laboratorio (Baker, 2004).

1.8.7. Membranas de ultrafiltración

Los materiales normalmente utilizados en la fabricación de membranas de ultrafiltración incluyen poliacrilonitrilo, polímeros de polivinilcloruro/poliacrilonitrilo, polisulfonas, poliamidas aromáticas, acetato de celulosa y membranas cerámicas. Las membranas cerámicas y polietersulfónicas fueron las utilizadas en el presente estudio, por lo que sus características serán descritas con mayor detalle. La duración media de las membranas de ultrafiltración es del orden de 2 – 3 años. Las membranas se suelen disponer en módulos de tipo placa-bastidor, tubulares, de membrana enrollada en espiral o de tipo fibra hueca (Baker, 2004).

▪ **Membranas polisulfónicas**

Las membranas polisulfónicas son membranas poliméricas orgánicas que se caracterizan por la presencia sulfona como unidad de repetición. Las polisulfonas como la polisulfona bisfenol-A (PSf), polisulfona tetrametil bisfenol-A (TM-PSf) y la polietersulfona (PES) tienen gran resistencia térmica además de una excelente estabilidad hidrolítica y la habilidad de retener sus propiedades en ambientes húmedos calientes. Debido a estas ventajas, las polisulfonas son excelentes materiales para la fabricación de membranas que requieren una limpieza constante con agua caliente o esterilización. Sin embargo las membranas polisulfónicas están limitadas por sus propiedades hidrofóbicas. Debido a su naturaleza hidrofóbica, se requiere un gradiente de presión para pasar agua a través de la membrana. Además de esto, las interacciones hidrofóbicas entre el soluto de la alimentación y la membrana, pueden provocar problemas de colmatación y deteriorar el desempeño de la membrana (Kim y Kim, 2005).

▪ **Membranas cerámicas**

Varias compañías han desarrollado membranas cerámicas para ultrafiltración. Las membranas cerámicas suelen ser asimétricas consistiendo de una capa soporte (generalmente α -alúmina) con poros de gran diámetro y una capa de separación hecha de distintos materiales (*i.e.* γ -alúmina, zirconia, sílica, etc) que controla el flujo de permeación. Estas membranas son químicamente inertes y estables a altas temperaturas y condiciones a las cuales las membranas poliméricas no lo son. Estas ventajas hacen ideal el uso de estas membranas en aplicaciones alimentarias, biotecnológicas y farmacéuticas en las cuales se requiere su esterilización y lavado con soluciones agresivas (Baker, 2004).

1.8.8. Selección de la membrana

A la hora de elegir la membrana más adecuada, además del peso molecular de corte, hay que tener en cuenta ciertas características físicas de las macromoléculas como linealidad y rigidez (Figura 1.20). Macromoléculas lineales y flexibles pueden atravesar membranas de peso molecular de corte muy inferior a su peso molecular. Así, cadenas lineales de dextrano de 100 kD de peso molecular, pueden atravesar membranas de peso molecular de corte inferior a 35 kD. El pH del medio es otro factor que también puede modificar el proceso de ultrafiltración, especialmente con los

polielectrolitos. Los ácidos (poli)acrílicos, a valores de pH 5 y superiores, se encuentran ionizados, formando estructuras rígidas que se repelen entre si y que son fácilmente rechazados por membranas de ultrafiltración. Sin embargo, a valores de pH 3 o inferiores dejan de estar ionizados, adoptando una conformación más flexible que pueden atravesar la membrana y dificulta su proceso de separación (Baker, 2004).

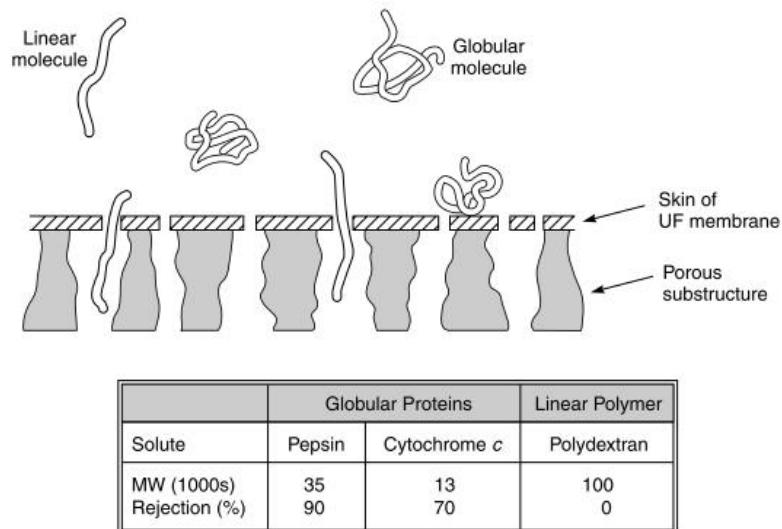


Figura 1.20. Representación esquemática de un proceso de filtración a través de membranas de ultrafiltración. La tabla muestra los resultados típicos obtenidos con diferentes proteínas globulares y un polidextrano lineal con la misma membrana polisulfónicas (Baker, 2004).

1.8.9. Polarización de la concentración

Un factor determinante en el desempeño de una membrana de UF es la polarización de la concentración la cual causa un fenómeno denominado colmatación (Baker, 2004). La colmatación consiste en la deposición de los coloides retenidos y materiales macromoleculares en la superficie de la membrana. El flujo de agua a través de una membrana suele ser muy alto-más de $1 \text{ cm}^3\text{cm}^{-2}\text{min}^{-1}$. Sin embargo cuando se usan soluciones coloidales o se requieren separar macromoléculas, el flujo cae en segundos a $0.1 \text{ cm}^3\text{cm}^{-2}\text{min}^{-1}$. Esta caída inmediata es debida a la formación de un gel en la superficie de la membrana (*fouling*) (Figura 1.21) debido a la polarización de la concentración.

La colmatación (*fouling*) superficial es la deposición de material sobre la membrana que se forma con el tiempo. Esta colmatación puede ser controlada generando alta turbulencia, limpiando regularmente la membrana y usando

membranas hidrofílicas o cargadas para minimizar la adhesión a la membrana. La operación de la membrana a presiones bajas también retarda la formación del gel. La colmatación superficial suele ser reversible.

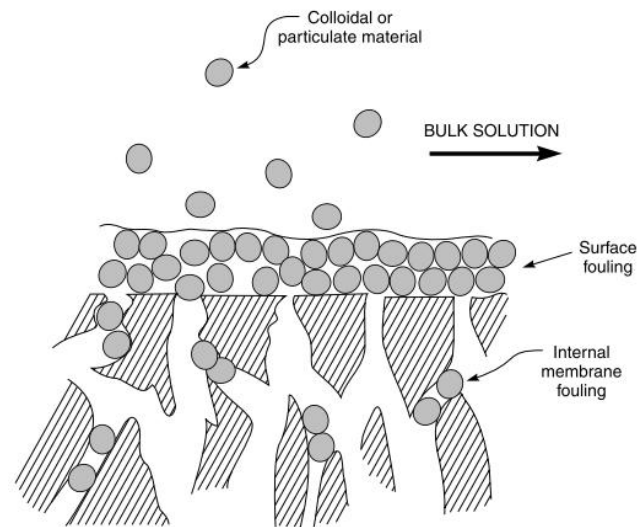


Figura 1.21. Representación gráfica de la colmatación (*fouling*) en una membrana de ultrafiltración (Baker, 2004)

La colmatación interna es causada por la penetración de material sólido en la membrana lo que resulta en la obstrucción de los poros. La colmatación interno es generalmente irreversible.

Cuando la limpieza de la membrana se repite de forma cíclica, el flujo de la membrana puede no regresar al valor original (Figura 1.22). Parte de esta pérdida lenta de flujo es debida a precipitados formados en la superficie de la membrana y que no son removidos por el proceso de lavado. Otra causa puede ser la colmatación interna. Las membranas de ultrafiltración suelen usarse para separar coloides del agua y microsolutos. En estos casos suele utilizarse cortes de peso molecular altos, pero los altos flujos transitorios de estas membranas pueden generar colmatación interna en las membranas. Una membrana con cortes de pesos moleculares más bajos pueden tener flujos de agua más bajos pero proveen de un flujo más estable debido a menos colmatación interna.

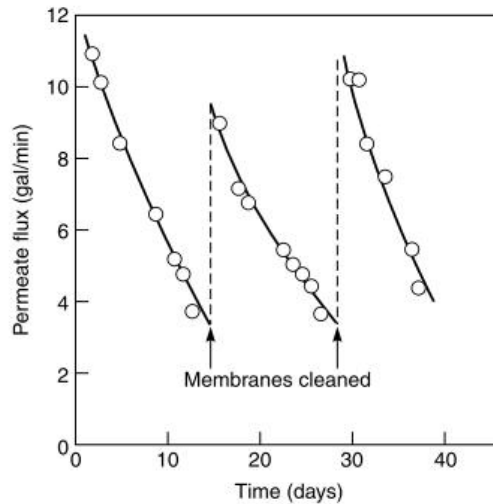


Figura 1.22. Flujo de ultrafiltración en función del tiempo en repetidos ciclos de limpieza

1.8.10. Limpieza de membranas

Las membranas deben lavarse regularmente para mantener el desempeño de la ultrafiltración. El método típico de limpieza de membranas de ultrafiltración comprende las siguientes etapas (Baker, 2004):

1. Lavar el sistema con agua caliente al máximo flujo posible.
2. Tratar el sistema con algún agente químico (ácidos, álcalis entre otros) dependiendo de la naturaleza de la membrana.
3. Lavar la membrana con algún detergente caliente.
4. Enjuagar el sistema hasta eliminar las trazas de detergente.

Los sistemas de ultrafiltración nunca deben detenerse sin ser enjuagados y lavados. Puesto que las membranas deben ser almacenadas en húmedo, la solución final de enjuague deberá contener algún bactericida como formaldehído al 0.5% para inhibir el crecimiento bacteriano.

Los agentes químicos más comúnmente usados en el lavado de membranas son (D'Souza y Mawson, 2005):

▪ **Agentes caústicos.** Estos agentes se usan normalmente para eliminar materia orgánica, ya que son capaces de hidrolizarla y solubilizarla. Dentro de las sustancias

utilizadas para el lavado de membranas de ultrafiltración se encuentran el hidróxido de sodio (NaOH) y el hidróxido de potasio (KOH), su alta alcalinidad les permite hidrolizar proteínas y polisacáridos. Las grasas y aceites son saponificados generando micelas de jabón solubles en agua. Esta reacción se favorece a altas temperaturas (>50°C).

▪ **Ácidos.** Los ácidos son utilizados para disolver precipitados de sales inorgánicas o películas de óxido. Entre los ácidos utilizados se encuentran el ácido nítrico, el ácido fosfórico y el ácido cítrico. El ácido fosfórico tiene limitaciones porque puede dañar el material de la membrana. El ácido cítrico es más suave que el ácido nítrico, se enjuaga fácilmente y no corroe las superficies. Los ácidos también pueden hidrolizar algunas proteínas y polisacáridos.

▪ **Desinfectantes/oxidantes.** Los oxidantes más comúnmente utilizados son el peróxido de hidrógeno y sustancias cloradas. La oxidación de polímeros orgánicos genera grupos funcionales que contienen más oxígeno como cetonas aldehídos y ácidos carboxílicos. Estos grupos incrementan la hidrofiliidad de los compuestos y reducen la adhesión de los contaminantes a la superficie de la membrana. El hipoclorito de sodio actúa como agente de desprendimiento del material depositado en la membrana y en el interior de los poros (Zapata, 2006).

▪ **Agentes quelantes.** Estos agentes eliminan depósitos minerales y previenen su re-deposición al formar complejos en suspensión. Cuando la superficie de la membrana contiene óxidos de hierro, el ácido cítrico es efectivo ya que disuelve el óxido de hierro y también forma complejos de hierro (Zapata, 2006).

▪ **Surfactantes.** Los surfactantes juegan distintos papeles en la limpieza de membranas: ayudan a humedecer las superficies, facilitan la eliminación de suciedad, suspenden materiales (ayudan a la solubilización y emulsificación, se adsorben a la superficie modificando las propiedades de la superficie y actúan como biocidas. Los surfactantes aniónicos y no-iónicos son los recomendados para la limpieza de membranas. Los aniónicos tienen carga negativa cuando se disocian en agua y son normalmente sólidos como sales de sodio, potasio o amonio. Los no-iónicos no ionizan en solución, tienden a formar poca espuma, son independientes de pH y son fáciles de enjuagar, pero son menos efectivos que los aniónicos. Los surfactantes disueltos en agua pueden formar micelas con grasas aceites y proteínas. De esta forma previenen el ensuciamiento de la membrana por este tipo de sustancias ya que facilita su solubilización y emulsificación.

▪ **Enzimas.** Las enzimas suelen utilizarse cuando la membrana impone limitaciones de pH (menor o igual a 10) o se tiene una alta concentración de sólidos. Por lo general una proteasa suele ser el componente principal de limpieza de los detergentes enzimáticos o puede ser utilizada como complemento de algún detergente alcalino. Las enzimas son superiores a los agentes caústicos o ácidos en que son biodegradables y generan menos problemas de contaminación ambiental, son menos agresivas y altamente específicas, lo que alarga la vida de la membrana. Sin embargo son costosas y su velocidad de acción es lenta.

1.8 11. Reactores enzimáticos de membranas (REM)

El reactor enzimático de membrana consiste en el acoplamiento de procesos de separación de membranas con una reacción enzimática. La membrana selectiva permite separar la enzima de los productos de reacción. La finalidad principal del REM es garantizar la retención completa manteniendo completamente la actividad enzimática dentro del reactor. Dependiendo del caso, la enzima puede estar libre en el medio de reacción o puede encontrarse inmovilizada en la superficie de la membrana o dentro de su estructura porosa (Lozano *et al* 2002, 2004).

Las ventajas y desventajas más importantes de los REM se listan en la Tabla 1.1

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de los reactores de membrana

Ventajas

- Modo continuo (alimentación de sustrato fresco)
- Enzima libre
- Retención y reutilización del catalizador
- Reducción de la inhibición (sustrato/producto)
- Producto libre de enzima
- Control de las propiedades del producto mediante la selección de la enzima (especificidad) y/o la membrana (selectividad)
- Proceso integrado (reacción/separación en un solo paso)

Desventajas

- Pérdida de la actividad enzimática con el tiempo (pérdida del catalizador, efecto del esfuerzo cortante)
- Heterogeneidad de las condiciones de reacción entre el medio de reacción y la superficie de la membrana.
- Capa de polarización
- Colmatación de la membrana

La selectividad con respecto a los diferentes constituyentes del medio de reacción está relacionada al tamaño relativo de las moléculas y los poros de la membrana. Puesto que la mayoría de enzimas tienen peso molecular entre 10 y 80 kDa, las membranas de ultrafiltración entre 1 y 100 kDa son las más frecuentemente utilizadas.

1.9. Hidrólisis de celulosa en REM.

Recientemente el desarrollo de la tecnología de membranas ha facilitado el estudio de la hidrólisis enzimática de celulosa en distintos reactores de membrana (Bélafi-Bakó *et al.*, 2006). En estos reactores las enzimas celulolíticas pueden actuar directamente sobre la celulosa sin limitaciones de difusión o impedimento estérico como sucede en la inmovilización de las enzimas a un soporte sólido. El uso de una membranas de ultrafiltración con un corte de peso molecular apropiado (MWCO) garantiza la retención de las enzimas y la celulosa no hidrolizada en el reactor, permitiendo el paso de los azúcares a través de la membrana en forma de permeado. De este modo se logra la recuperación de las enzimas para su reutilización y la eliminación de productos inhibidores para las enzimas (Liu *et al.*, 2011). La enzima más utilizada es la celulasa de *Trichoderma reesei*, siendo en ocasiones suplementada con la adición de β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Ohlson *et al.*, 1984; Zhang *et al.*, 2010).

Las principales ventajas de utilizar reactores de membrana que permitan la hidrólisis enzimática de materiales celulósicos comprende:

- El uso de enzimas celulolíticas por largos periodos de tiempo, mediante la retención de las enzimas.
- La obtención de mayores rendimientos de conversión debido a la reducción de la inhibición por producto (principalmente celobiosa).
- La obtención de productos de hidrólisis puros, eliminando sustancias de alto peso molecular que pudieran interferir en procesos posteriores, por ejemplo, fermentación.
- Posibilidad de mantener una corriente de concentración constante de producto, sin necesidad de adicionar enzima adicional durante la hidrólisis.

Entre las desventajas del uso de los reactores de membrana se encuentra (Andrić *et al.*, 2010):

- La baja concentración de glucosa presente en el permeado y la posibilidad de arrastrar celobiosa, aunque esto sólo sucede cuando la presencia de β -glucosidasa en la reacción no es suficiente.
-
- En periodos prolongados de hidrólisis, puede observarse una pérdida de actividad por inactivación térmica de la enzima, lo que reduce la concentración de azúcares en el permeado.
-
- La polarización de la concentración de enzima, la formación de una capa de enzima unida a la membrana. Si este fenómeno ocurre puede reducir el flujo de la membrana y la concentración de enzima en el medio de reacción.
-
- Para el caso de material lignocelulósico, la alta viscosidad de la mezcla de biomasa, especialmente a altas concentraciones de sustrato. La alta viscosidad obstaculiza la agitación y las condiciones de transferencia de masa para promover la hidrólisis y remover los productos.

1.9.1. Factores que afectan el desempeño de un reactor de membrana en la hidrólisis enzimática de celulosa

El desempeño de un reactor de membrana para la hidrólisis de celulosa depende de los siguiente factores (Andrić *et al.*, 2010):

- La velocidad de la formación del producto
- La velocidad de la inhibición de la celulasa.
- La velocidad de la separación del producto
- La velocidad de alimentación del sustrato, celulasa y tampón.
- La polarización de la concentración y el *colmatación*.

Además de estos factores cabe considerar que, a diferencia de otros sistemas de reactores de membrana donde los sustratos suelen tener muy diferente tamaño al

de los productos, el producto intermedio de la hidrólisis de celulosa, la celobiosa tiene dimensiones parecidas a las de la glucosa y puede ser arrastrada en el permeado sin ser hidrolizada a glucosa.

1.9.2. Estudios sobre hidrólisis enzimática mediante reactores de membrana.

Los estudios realizados sobre hidrólisis enzimática de celulosa en reactores de membrana suelen centrarse principalmente en el pretratamiento del sustrato (Yang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010), el diseño del reactor (Gan *et al.*, 2002; Bélafi-Bakó *et al.*, 2006), la cinética de reacción (Akishima *et al.*, 1992) y el desarrollo de modelos matemáticos (Gusakov *et al.*, 1985). A pesar de que las condiciones de hidrólisis y de operación difieren entre los autores (Bélafi-Bakó *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011), se han logrado un gran número de mejoras para el desempeño óptimo de los reactores de membrana.

Para la producción de jarabes concentrados de glucosa a partir de lignocelulosa, Ghose y Kostick (1970) indicaron el uso de un reactor de volumen grande (tanque de agitación) y un sistema de separación relativamente pequeño (célula de separación de membrana) para mantener una alta velocidad de hidrólisis usando celulosa fina y enzima concentrada en suspensiones muy densas de sustrato (30%). Sin embargo este enfoque sólo es válido si se pueden remover los productos tan rápidamente como son formados (Ghose y Kostick, 1970). El funcionamiento exitoso del reactor proveía de alta velocidad inicial de reacción para producir rápidamente glucosa, siendo la velocidad inicial de reacción el factor controlador y no el flujo de separación del producto (Andrić *et al.*, 2010).

Yang *et al.* (2006) realizaron la separación de los azúcares reductores producidos durante la hidrólisis enzimática de celulosa a través de un reactor tubular en el que el sustrato (paja de arroz pretratada) se retuvo mediante un filtro poroso en el fondo y el buffer se alimentaba en la parte superior mediante un distribuidor. Acoplado al reactor se encontraba un módulo de filtración de fibra hueca con una membrana de polisulfona para la permeación de los azúcares. El volumen del reactor tubular se mantuvo constante mediante la recirculación del tampón remanente proveniente de la unidad de ultrafiltración y mediante la adición de tampón fresco, suministrado desde un depósito diseñado para ello. Los resultados mostraron un

aumento significativo en la velocidad inicial de hidrólisis así como en el rendimiento de azúcares reductores. La mejora se debió a la continua separación de los azúcares inhibidores (Yang *et al.*, 2006).

En su estudio con rastrojo de maíz pretratado, Knutsen y Davis (2004) sugirieron el uso de una unidad de filtración de poro amplio (20-25 μ l) para recuperar cantidades significativas de enzima activa unida al sustrato lignocelulósico sólido no hidrolizado, siendo posible la reutilización de estas enzimas mediante la simple adición de sustrato fresco y con el permeado recuperado. Los autores argumentaron que la recuperación de las enzimas mediante ultrafiltración no era necesaria ya que las enzimas se encontraban unidas fuertemente a los sólidos residuales del material lignocelulósico, incluso en casos en los que los sólidos habían sido lavados con agua y posteriormente mezclados con sustrato fresco, observando producción de glucosa. Así la filtración al vacío (microfiltración) podía ser utilizada para retener ambos, los sólidos y las enzimas del retenido. En este trabajo los autores también expresaron la economía de este modelo debido a la reutilización de la enzimas (Knutsen y Davis, 2004).

Por otro lado, Belafi-Bakó ha sugerido la inmovilización de β -glucosidasa del lado del permeado del módulo de membrana para mejorar la conversión del reactor, con respecto a la cantidad considerable de celobiosa en el permeado (Bélafi-Bakó *et al.*, 2006).

1.9.3. Desafíos de los reactores de membrana para la hidrólisis enzimática de celulosa

Existe un número importantes de desafíos para la hidrólisis enzimática de celulosa en reactores de membrana (Andrić *et al.*, 2010):

- La concentración de glucosa suele ser baja. Para reducir la inhibición por producto, la concentración de glucosa en el reactor debe ser menor a 10 mg/ml para apreciar el efecto.
- El alto grado de colmatación de las membranas a concentraciones altas de sustrato (materia seca), siendo posible procesar solamente bajas o medianas concentraciones de sustrato (materia seca)

- La difícil eliminación de la fracción no hidrolizable que se acumula durante periodos largos de reacción, especialmente con reactores en modo *fed-batch*.
- El escalamiento de las membranas así como de los reactores de membrana.

La selección final de un sistema apropiado, por ejemplo integrado/unidades separadas, reactores con o sin separación de producto, reactores en discontinuo, semi-continuo o continuo, etc., depende del costo operacional y de las unidades de filtración, el costo del transporte y manejo de la suspensión de sustrato, las enzimas, las materias primas y el precio del producto final en el mercado. Sin embargo el diseño del reactor es un tema serio en la aplicación industrial de esta tecnología para la producción de etanol celulósico (Andrić *et al.*, 2010).

1.10 Referencias

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–85.
- Akishima, Y., Isogai, A., Kuga, S., Onabe, F., Usada, M., 1992. Kinetic studies on enzymatic hydrolysis of celluloses for evaluation of amorphous structures. *Carbohydr. Polym.* 19, 11–15.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–61.
- Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. *Green Chem.: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York.
- Andrić, P., Meyer, A.S., Jensen, P. a, Dam-Johansen, K., 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnol. Adv.* 28, 407–25.
- Azeredo, H.M.C. De, 2009. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res. Int.* 42, 1240–1253.
- Baker, R.W., 2004. *Membrane Technology and Applications*, 2nd ed. Wiley and Sons, Ltd, Menlo Park.

- Béguin P., Aubert JP., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25–58.
- Bélafi-Bakó, K., Koutinas, a., Nemestóthy, N., Gubicza, L., Webb, C., 2006. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. *Enzyme Microbiol. Technol.* 38, 155–161.
- Bernot, R.J., Brueseke, M. a, Evans-White, M. a, Lamberti, G. a, 2005. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 24, 87–92.
- Bonhote, P, Dias, A.D.; Papageorgiou, N., Kalyanasundaram K., Gratzel, M. 1996, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.* 35, 1168-1178
- Brena, B.M., Batista-Viera, F., 2006. Immobilization of Enzymes A Literature Survey, in: Guisan, J.M. (Ed.), *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Human Press Inc., Totowa, pp. 15–30.
- Brennecke, J.F., Maginn, E.J., 2001. Ionic Liquids□: Innovative Fluids for Chemical Processing. *AIChE J* 47, 2384–2389.
- Bringezu, S., Brien, M.O., Howarth, R.W., 2009. Assessing biofuels, UNEP. United Nations Environment Programme, Paris.
- Chang, M., Chou, T.Y.C., 1981. Structure , Pretreatment and Hydrolysis of Cellulose. *Adv. Biochem. Eng.* 20, 15–42.
- Chin, J.T., Wheeler, S.L., Klibanov, A.M., 1994. Communication to the editor on protein solubility in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 140–145.
- D'Souza, N.M., Mawson, a J., 2005. Membrane cleaning in the dairy industry: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 125–34.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., 2006. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 904–910.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2005. Understanding structure-stability relationships of *Candida antartica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules* 6, 1457–64.
- Dourado, F., Bastos, M., Mota, M., Gama, F.M., 2002. Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate. *J. Biotechnol.* 99, 121–31.
- Dupont, J., 2004. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 341–350.
- Earle, M.J., Esperança, J.M.S.S., Gilea, M. a, Lopes, J.N.C., Rebelo, L.P.N., Magee, J.W., Seddon, K.R., Widegren, J. a, 2006. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature* 439, 831–4.

- Ebner, G., Schiehser, S., Potthast, A., Rosenau, T., 2008. Side reaction of cellulose with common 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids. *Tetrahedron Lett.* 49, 7322–7324.
- Echavarría, a. P., Torras, C., Pagán, J., Ibarz, a., 2011. Fruit Juice Processing and Membrane Technology Application. *Food Eng. Rev.* 3, 136–158.
- Erdmenger, T., Haensch, C., Hoogenboom, R., Schubert, U.S., 2007. Homogeneous tritylation of cellulose in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Macromol. Biosci.* 7, 440–5.
- Feng, L., Chen, Z., 2008. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. *J. Mol. Liq.* 142, 1–5.
- Fort, D. a., Remsing, R.C., Swatloski, R.P., Moyna, P., Moyna, G., Rogers, R.D., 2007. Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 9, 63.
- Gan, Q., Allen, S., Taylor, G., 2002. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 12, 223–229.
- Ghose, T.K., Kostick, J.A., 1970. A Model for Continuous Enzymatic Saccharification of Cellulose with Simultaneous Removal of Glucose Syrup. *Biotechnol. Bioeng.* 12, 921–946.
- Giorno, L., Drioli, E., 2000. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends Biotechnol.* 18, 339–49.
- Gomez, L.D., Steele-King, C.G., McQueen-Mason, S.J., 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytol.* 178, 473–85.
- Gregg, D.J., Saddler, J.N., 1996. Factors Affecting Cellulose Hydrolysis and the Potential of Enzyme Recycle to Enhance the Efficiency of an Integrated Wood to Ethanol Process. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 375–383.
- Gruno, M., Väljamäe, P., Pettersson, G., Johansson, G., 2004. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 503–11.
- Guo, J., Catchmark, J.M., 2012. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 87, 1026–1037.
- Gusakov, a. V., Sinitsyn, A.P., Klyosov, A. a., 1985. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7, 346–352.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24, 549–56.

- Hamilton, T.J., Dale, B.E., Ladisch, M.R., Tsao, G.T., 1984. Effect of ferric tartrate/sodium hydroxide solvent pretreatment on enzyme hydrolysis of cellulose in corn residue. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 781–7.
- Hartmeier, W., 1985. Immobilized biocatalysts- from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* 3, 149–153.
- Hendriks, a T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–8.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11206–10.
- Huber, G.W., Iborra, S., Corma, A., 2006. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chem. Rev.* 106, 4044–98.
- Ibbett, R.N., Schuster, K.C., Fasching, M., 2008. The study of water behaviour in regenerated cellulosic fibres by low-resolution proton NMR. *Polymer* 49, 5013–5022.
- Joshi, M.D., Anderson, J.L., 2012. Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry. *RSC Advances* 2, 5470.
- Kim, H., Choi, J., Takizawa, S., 2007. Comparison of initial filtration resistance by pretreatment processes in the nanofiltration for drinking water treatment. *Sep. Purif. Technol.* 56, 354–362.
- Kim, J.H., Kim, C.K., 2005. Ultrafiltration membranes prepared from blends of polyethersulfone and poly(1-vinylpyrrolidone-co-styrene) copolymers. *J. Memb. Sci.* 262, 60–68.
- Knutsen, J.S., Davis, R.H., 2004. Cellulase Retention and Sugar Removal by Membrane Ultrafiltration. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113, 585–599.
- Kosan, B., Michels, C., Meister, F., 2007. Dissolution and forming of cellulose with ionic liquids. *Cellulose* 15, 59–66.
- Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V, 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 35, 377–91.
- Kuo, C.-H., Lee, C.-K., 2009. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments. *Carbohydr. Polym.* 77, 41–46.
- Li, C., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., Nakao, K., 2007. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Bioresour. Technol.* 98, 1366–72.
- Lin, Z., Liu, L., Li, R., Shi, J., 2012. Screw extrusion pretreatments to enhance the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *J. Microbial Biochem. Technol.* 1–5.

- Liu, J., Lu, J., Cui, Z., 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulose in a membrane bioreactor: assessment of operating conditions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34, 525–32.
- Liu, L., Chen, H., 2006. Enzymatic hydrolysis of cellulose materials treated with ionic liquid [BMIM] Cl. *Chin. Sci. Bull.* 51, 2432–2436.
- Lozano, P. 2010. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, 12, 555–569.
- Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. Iborra. J.L. 2001. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1529-1533.
- Lozano, P., de Diego, T., Guegan, J.P., Vaultier, M. Iborra. J.L. 2001. “Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol. Bioeng.*, 75, 563-569.
- Lozano, P. Pérez-Marín, A.B., De Diego, T. Gómez, D., Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M.P., Rios, G.M., Iborra, J.L. 2002. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B. *J. Membr. Sci.*, 201, 55 – 64.
- Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. Iborra. 2003. Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 °C. *Biotechnol. Progr.*, 19, 380 - 382.
- Lozano, P. Villora, G., Gómez, D., Gayo, A.B., Sánchez-Conesa, J.A., Rubio, M. Iborra, J.L. 2004. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, 29, 121 - 128
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2005. Dynamic structure–function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids. *Biocatal. Biotransformation* 23, 169–176.
- Lozano, P., Bernal, B., Bernal, J.M. Pucheault, M., Vaultier, M., 2011. Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 13, 1406–1410.
- Lozano, P., Bernal, B., Recio, I., Belleville, M.-P., 2012. A cyclic process for full enzymatic saccharification of pretreated cellulose with full recovery and reuse of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 14, 2631.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. Van, Pretorius, I.S., 2002. *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology* 66, 506–577.
- McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresour. Technol.* 83, 37–46.
- Mori, M., Gómez-García, R. Belleville, M.P., Paolucci-Jeanjean, D., Sánchez, J., Lozano, P., Vaultier, M., Rios, G.M. 2005. A new way to conduct enzymatic synthesis in an active membrane using ionic liquids as catalyst support. *Catal. Today.* 104, 313-317.

- Murugesan, S., Linhardt, R.J., 2005. Ionic liquids in carbohydrate chemistry – current trends and future directions. *Curr .Org. Synth.* 2, 437–451.
- Ohlson, I., Trägårdh, G., Hahn-Hägerdal, B., 1984. Enzymatic hydrolysis of sodium-hydroxide-pretreated sawlog in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 647–653.
- Olah, G. a, 2005. Beyond oil and gas: the methanol economy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 2636–2639.
- Olivier-Bourbigou, H., Magna, L., Morvan, D., 2010. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Applied Catal. A Gen.* 373, 1–56.
- Park, S., Kazlauskas, R.J., 2003. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 432–437.
- Park, S., Viklund, F., Hult, K., Kazlauskas, R.J., 2003. Ionic Liquids Create New Opportunities for Nonaqueous Biocatalysis with Polar Substrates□: Acylation of Glucose and Ascorbic Acid, in: Ame (Ed.), *Ionic Liquids as Green Solvents*. American Chemical Society, Washington.
- Pinkert, A., Marsh, K.N., Pang, S., Staiger, M.P., 2009. Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chem. Rev.* 109, 6712–6728.
- Poole C. F. 2004. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A*, **1037**, 49–82.
- Qi, B., Chen, X., Su, Y., Wan, Y., 2011. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 102, 2881–9.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. a, Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T., 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484–489.
- Reddy, N., Yang, Y., 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 23, 22–27.
- Remsing, R.C., Swatloski, R.P., Rogers, R.D., Moyna, G., 2006. Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: a ¹³C and ^{35/37}Cl NMR relaxation study on model systems. *Chem. Commun.*, 1271–1273.
- Rios, G.M., Belleville, M.P., Paolucci, D., Sanchez, J., 2004. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. *J. Memb. Sci.* 242, 189–196.
- Rios, G. M.; Belleville, M.P.; Paolucci-Jeanjean, D. 2007. Membrane engineering in biotechnology: quo vamus?. *Trends Biotechnol.*, 25, 242-246.
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841–845.

- Saxena, R.C., Adhikari, D.K., Goyal, H.B., 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Ren. Sust. Energ. Rev.* 13, 167–178.
- Schneider, S., Hawkins, T., Rosander, M., Mills, J., Vaghjiani, G., Chambreau, S., 2008. Liquid azide salts and their reactions with common oxidizers IRFNA and N₂O₄. *Inorg. Chem.* 47, 6082–9.
- Sheldon, R. A. 2007. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289-1307.
- Singh, R., Sharma, M., Mangain, R., Rawat, D.S., 2008. Ionic liquids: a versatile medium for palladium-catalyzed reactions. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 357–379.
- Suarez, P. A. Z.; Ramalho, H. F. 2013. On the Use of Ionic Liquids in Biomass Transformations: Reaction Media and Catalysts. *Curr. Org. Chem.*, 17, 229-237.
- Sun, N., Jiang, X., Maxim, M.L., Metlen, A., Rogers, R.D., 2011. Use of polyoxometalate catalysts in ionic liquids to enhance the dissolution and delignification of woody biomass. *ChemSusChem* 4, 65–73.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2003. Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Green Chem.* 5, 361.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2002. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4974–4975.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresour. Technol.* 2 (4), 707–738.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–1651.
- Tavares, A.P.M., Rodríguez, O., Macedo, E.A., 2013. New Generations of Ionic Liquids Applied to Enzymatic Biocatalysis, in: Kadokawa, J. (Ed.), *Ionic Liquids: New Aspects for Future*. Intech, pp. 537–556.
- Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases G3. *Trends Biotechnol.* 15, 141–148.
- Tu, M., Zhang, X., Kurabi, A., Gilkes, N., Mabee, W., Saddler, J., 2006. Immobilization of beta-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 28, 151–6.
- Turner, M.B., Spear, S.K., Huddleston, J.G., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2003. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* 5, 443.

- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–80.
- van Rantwijk, F., Madeira Lau, R., Sheldon, R. A., 2003. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends Biotechnol.* 21, 131–138.
- van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., 2007. Biocatalysis in Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 107, 2757–2785.
- Ventura. S. P. M., Santos L. D. F., Saraiva J. A., C.J.A.P., 2012. Concentration effect of hydrophilic ionic liquids on the enzymatic activity of *Candida antarctica* lipase B. *World J. Microbol. Biotechnol.* 28, 2303–2310.
- Wasserscheid, P.; Welton, T. *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley-VCH Weinheim, **2008**.
- Wang, H., Gurau, G., Rogers, R.D., 2012. Ionic liquid processing of cellulose. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1519–37.
- Yang, S., Ding, W., Chen, H., 2006. Enzymatic hydrolysis of rice straw in a tubular reactor coupled with UF membrane. *Process Biochem.* 41, 721–725.
- Yang, S., Ding, W., Chen, H., 2009. Enzymatic hydrolysis of corn stalk in a hollow fiber ultrafiltration membrane reactor. *Biomass Bioenergy* 33, 332–336.
- Yang, Z., Pan, W., 2005. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microbiol. Technol.* 37, 19–28.
- Ye J.; Zhao X.F.; Xiong J. 2007. Application of ionic liquids in cellulose study. *Progress in Chemistry*, 19, 478-484.
- Yuan, X., Shen, N., Sheng, J., Wei, X., 1999. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. *J. Memb. Sci.* 155, 101–106.
- Zaks, A, Klibanov, A M., 1988. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 263, 8017–8021.
- Zhang, M., Su, R., Li, Q., Qi, W., He, Z., 2010. Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. *Bioenergy Res.* 4, 134–140.
- Zhang, P.Y.-H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452–81.
- Zhang, Y.-H.P., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 367–75.
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824.
- Zhao, H., 2005. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 37, 16–25.

Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G. a, Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N., 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139, 47–54.

Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chem.* 8, 325–327.

Objetivos

En base a los antecedentes descritos, el presente trabajo tiene como objetivo general el desarrollo de una tecnología sostenible para la obtención de glucosa a partir de fuentes celulósicas no alimentarias, basada en la combinación sinérgica de la tecnologías enzimática y de los líquidos iónicos, con la recuperación y reutilización de los sistemas empleados mediante la utilización de la tecnología de los reactores de membrana. Dicho objetivo general se puede dividir en los siguientes objetivos parciales, a saber,:

Entre los objetivos concretos del presente trabajo se encuentran:

- Conocer la actividad y estabilidad de la enzimas responsable de la hidrólisis de celulosa, y mejorar su estabilidad frente al líquido iónico [Bmim][Cl].
-
- Desarrollar una estrategia experimental capaz de permitir la hidrólisis enzimática de la celulosa disuelta en [Bmim][Cl], así como considerar la viabilidad operacional de dicha aproximación experimental.
- Desarrollar un proceso sostenible para la sacarificación enzimática de celulosa donde el líquido iónico sea recuperado en su pureza inicial para ser reciclado en ciclos consecutivos de disolución.
- Estudiar la capacidad de disolución del [Bmim][Cl] a lo largo de ciclos consecutivos de disolución y su efecto sobre la digestibilidad de la celulosa obtenida.
- Desarrollar un protocolo regeneración de celulosa que permita la obtención de una celulosa desestructurada y altamente susceptible a la hidrólisis enzimática, pero libre de líquido iónico.

- Estudiar el efecto del uso de distintas condiciones de regeneración de celulosa tales como tipo de antisolvente o temperatura de regeneración, en la digestibilidad del sustrato obtenido, y en las cualidades del líquido iónico frente a su reutilización.
- Estudiar la idoneidad de la glucosa obtenida mediante hidrólisis enzimática de celulosa para ser utilizada como fuente de carbono de microorganismos como la levadura.
- Desarrollar un proceso de hidrólisis de celulosa a mayor escala mediante el uso de reactores de membrana en modo continuo y discontinuo.
- Evaluar la capacidad de retención de las enzimas celulolíticas de distintos tipos de membranas y distintos límites de exclusión.
- Evaluar la eficacia de los reactores de membrana en continuo y discontinuo en función del rendimiento de hidrólisis y estabilidad a lo largo del tiempo.
- Evaluar el efecto de distintos parámetros operacionales tales como concentración de enzima, concentración de sustrato o tiempo de residencia en el desempeño de los reactores de membranas.

Capítulo 2: Estabilización de celulosa en líquidos iónicos

2.1. Resumen

En este capítulo se propone una nueva estrategia para mejorar la estabilidad de la celulasa en cloruro de 1 butil-3metil imidazolio ([Bmim][Cl]) con objeto de poder llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa disuelta en dicho líquido iónico. La estrategia consistió en el recubrimiento de partículas de enzima inmovilizada con líquidos iónicos (ILs) hidrófobos que han mostrado excelentes cualidades en la estabilización de enzimas. Para ello, en primer lugar se estudió la estabilidad de celulasa comercial (Celluclast[®]), inmovilizada sobre un soporte polimérico (XAD4), en 3 diferentes líquidos iónicos a 50°C y 80°C, observándose cómo los líquidos iónicos hidrófobos mejoraron claramente la estabilidad térmica de la enzima. El líquido iónico butiltrimetilamonio bis(trifluorometilsulfonyl)imida ([N₁₁₁₄][NTf₂]) incrementó 4 veces el tiempo de vida media de la enzima inmovilizada a 50°C, mientras que el [Bmim][Cl] se comportó como un potente desactivador. Sin embargo, la estabilidad de la celulasa en mezclas IL hidrófobo/[Bmim][Cl] se mejoró en gran medida con respecto a la observada en [Bmim][Cl]. En base a estos resultados, se obtuvo un derivado estabilizado de celulasa inmovilizada, obtenido mediante el recubrimiento de las partículas de enzima inmovilizada con [N₁₁₁₄][NTf₂], que posteriormente fue utilizado con éxito en la sacarificación a 50°C de celulosa disuelta en [Bmim][Cl] (hasta el 50% de hidrólisis en 24 h).

2.2. Introducción

Los líquidos iónicos (ILs) se han convertido en medios de reacción no acuosos de excepcional interés para las transformaciones enzimáticas debido a sus propiedades disolventes únicas, su presión de vapor despreciable, y su capacidad excepcional para mantener estable y activa la conformación de las enzimas (Roosen *et al.*, 2008; Sureshkumar y Lee, 2009; Lozano, 2010; Moniruzzaman *et al.*, 2010).

En 2002, el grupo de Rogers descubrió que algunos ILs como el 1-butil-3metilimidazolio cloruro ([Bmim][Cl]), el 1-hexil-3metilimidazolio cloruro ([Hmim][Cl]), etc. eran capaces de disolver celulosa: la fuente de carbono renovable más abundante del mundo (Swatloski *et al.*, 2002). Este descubrimiento abriría nuevas oportunidades para la valorización de muchos materiales de desecho y subproductos agroforestales que contienen celulosa (*i.e.* la biomasa agrícola). Es por ello que la despolimerización de la celulosa en sus unidades de glucosa, para su posterior transformación en bioetanol por fermentación microbiana es objeto de numerosos estudios en la actualidad (Alonso *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006) como estrategia sostenible de obtención de biocombustibles

En este contexto, también ha sido recientemente descrita la posibilidad de disolver celulosa mediante el uso de un nuevo tipo de disolventes conocidos como “Deep eutectic solvents” (DES). Un DES es una mezcla de compuestos cuyo punto de fusión resulta menor que cualquiera de sus componentes individuales, ello debido principalmente, a la generación de enlaces por puente de hidrógeno intermoleculares (Dai *et al.*, 2013). El uso de DES podría representar también una alternativa interesante en el procesamiento de celulosa debido a la simplicidad de su preparación y su bajo costo. Sin embargo existen pocos ejemplos con respecto a la biocatálisis en estos medios neotéricos (Gorke *et al.*, 2008, 2009; Domínguez de María y Maugeri, 2011).

La despolimerización de la celulosa catalizada por celulasas en soluciones de celulosa ha sido de gran interés, si bien los resultados obtenidos han sido poco esperanzadores. Las celulasas proporcionan la más alta selectividad para la hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos de las cadenas de celulosa, con respecto a cualquier otro catalizador químico (por ejemplo, ácidos, álcalis, etc.) (Li y Zhao, 2007; Li *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2008). Sin embargo, ha sido ampliamente descrito cómo los ILs

capaces de disolver celulosa, por ejemplo el [Bmim] [Cl], el cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio ([Amim] [Cl]), etc., producen una rápida desactivación enzimática por desnaturalización de la proteína (Turner *et al.*, 2003; Engel *et al.*, 2010). A este respecto, distintos estudios han probado diferentes alternativas para la sacarificación enzimática de celulosa en sistemas acuosos. La más importante contempla la reprecipitación de la celulosa mediante la adición de disolventes moleculares polares (por ejemplo agua, etanol, acetona, etc.) en soluciones de IL, elimina la cristalinidad del polisacárido, mejorando la posterior hidrólisis enzimática en medio tamponado (Dadi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009).

Alternativamente, con objeto de superar el efecto negativo de los IL capaces de disolver celulosa sobre la estabilidad de la celulasa, algunos autores han propuesto el uso de medios tamponados con bajas concentraciones de IL "benignos" [por ejemplo dietilfosfato de 1-etil-3-metilimidazolio (Kamiya *et al.*, 2008), dimetilfosfato de 1,3-dimetilimidazolio (Engel *et al.*, 2010), etc.] mejorando la actividad de la celulasa. Otra estrategia implementada para la sacarificación enzimática de soluciones de celulosa en líquidos iónicos (por ejemplo [Bmim][Cl]), ha sido el uso de celulasas estabilizadas genéticamente, obtenidas mediante el cribado ("screening") de librerías metagenómicas (Pottkämper *et al.*, 2009) o extraídas de microorganismos extremófilos (por ejemplo, *Termagota maritima*) (Datta *et al.*, 2010).

Fuera de este contexto, diferentes trabajos de investigación han descrito ampliamente el efecto estabilizante de los ILs inmiscibles en agua sobre las enzimas (Roosen *et al.*, 2008; Sureshkumar y Lee, 2009; Lozano, 2010; Moniruzzaman *et al.*, 2010). El carácter higroscópico de estos líquidos iónicos (por ejemplo, el 1-butil-3metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, [Bmim][NTf₂]), capaz de absorber hasta 1,4% w/w de agua (Bonhote *et al.*, 1996)) se consideró como una propiedad clave para mantener el grado de hidratación esencial en las proteínas, lo que resulta en un efecto protector contra la habitual desnaturalización que se produce en ambientes no acuosos (Baker *et al.*, 2004; De Diego *et al.*, 2004, 2005; Lozano *et al.*, 2004; Page *et al.*, 2009). La inmovilización de enzimas es otro método clásico para mejorar la estabilidad de las enzimas en condiciones no convencionales de reacción. Adicionalmente, el recubrimiento de partículas de enzima inmovilizada con ILs inmiscibles en agua ha demostrado ser otra herramienta útil para mejorar la estabilidad de las enzimas (Lozano *et al.*, 2007; Fernandez-Lafuente, 2009; Mutschler *et al.*, 2009; Zhao, 2010) incluso bajo condiciones operacionales extremas (por ejemplo scCO₂ a

100 bar y 150 °C) (Lozano *et al.*, 2004). En el caso de la celulasa, existen estudios que han descrito ampliamente cómo la adsorción física sobre soportes sólidos [por ejemplo copolímeros acrílicos (Dourado *et al.*, 2002), poliestireno (Tébéka *et al.*, 2009), etc.)] proporciona derivados estables y reutilizables, basándose en la formación de una capa catalíticamente activa de agregados de enzima dispuesta sobre la superficie del soporte, tal como se demostró mediante microscopía atómica (Hirsh *et al.*, 2010).

El presente capítulo describe la estabilidad térmica de celulasa inmovilizada tanto en ILs puros como en mezclas binarias IL/[Bmim][Cl]. La estrategia consistió en la estabilización de la celulasa mediante la inmovilización de la enzima sobre un soporte, seguido por la hidratación de la enzima (1.5% w/v de agua) y un recubrimiento con ILs hidrofóbicos, para finalmente llevar a cabo la sacarificación de celulosa disuelta en [Bmim][Cl] a 50°C (Figura 2.1).

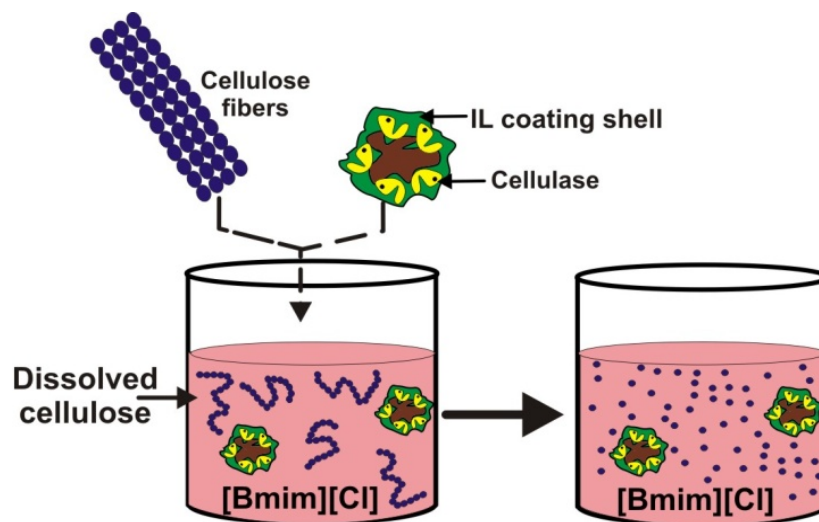


Figura 2.1. Representación esquemática de la sacarificación de celulosa disuelta en [Bmim][Cl] catalizada por celulasa inmovilizada recubierta con un líquido iónico hidrofóbico.

2.3 Materiales y métodos

La celulasa de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L, EC 3.2.1.4) fue un regalo de Novozymes S. A. (España). La celulosa microcristalina (20 μ m en polvo), la resina Amberlite® XAD4 y otros productos químicos fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Fluka (Madrid, España). Los ILs 1-butil-3-metilimidazolio

bis(trifluorometilsulfonil)imida ([Bmim][NTf₂]); butiltrimetilamonio
bis(trifluorometilsulfonil)imida ([N₁₁₁₄][NTf₂]) y 1-butil-3-metilimidazolio cloruro
([Bmim][Cl]) (99% de pureza) fueron suministrados por IoLiTec GmbH (Alemania).

▪ **Diafiltración de celulasa**

La preparación enzimática comercial se ultrafiltró para eliminar todos los aditivos de bajo peso molecular de la siguiente manera: 25 ml de Celluclast se diluyeron en 225 ml de tampón citrato 10 mM, pH 4,8. En primer lugar, la preparación enzimática se ultrafiltró para eliminar todos los aditivos de bajo peso molecular de la siguiente manera: 25 ml de Celluclast se diluyeron en 225 ml de tampón citrato 10 mM, pH 4,8, la solución resultante se concentró 10 veces mediante ultrafiltración a 8 ° C, utilizando un sistema de Vivaflow 50 (Sartorius) equipado con membranas de polietersulfona (10 kDa de corte). Este proceso se repitió tres veces, obteniendo una disolución de celulasa con una concentración de proteína de 150,8 mg / ml (según lo determinado por el método de Lowry) y una actividad específica de 0.11U por mg de proteína (ver ensayo de actividad de celulasa).

▪ **Inmovilización de celulasa en Amberlite XAD4**

El derivado de celulasa inmovilizada se preparó mezclando 1 ml de la solución acuosa de celulasa con 1 g de Amberlite XAD4. La mezcla se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente para permitir la adsorción de la enzima. Luego se recuperó el sobrenadante, y el soporte se lavó con agua para eliminar la enzima no adsorbida. El derivado inmovilizado se congeló a -60 ° C, posteriormente se liofilizó y, finalmente, se almacenó en un desecador a 8 ° C hasta su uso. El contenido de proteína del derivado de celulasa inmovilizada fue de 65.9 mg de proteína/g de soporte (según se determinó mediante el método Lowry).

▪ **Preparación de soluciones de celulosa en [Bmim][Cl]**

▪

En un vial de 4mL con tapón de rosca y septum de teflón, se adicionaron 1.98 g de [Bmim][Cl], y se incubaron a 110 °C en un bloque térmico durante 2 minutos, hasta

que el IL se fundió por completo. A continuación, se añadió celulosa microcristalina (20 mg), y la mezcla se incubó con agitación suave durante 30 min a 110 °C, dando una solución de celulosa (1% w/w) transparente, incolora y viscosa.

▪ **Estabilidad térmica de celulasa inmovilizada en IL**

Para cada uno de los IL ensayados, 200 mg de celulasa inmovilizada y 500 mg de IL se añadieron en viales con tapón de rosca (1.5 ml de capacidad total). Las suspensiones resultantes se mezclaron mecánicamente con una espátula durante 5 minutos para proporcionar un revestimiento completo de las partículas de biocatalizador con el IL, y luego se incubaron a 50 °C en un bloque térmico. A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras de 50 mg de la mezcla biocatalizador/IL, y posteriormente se cuantificó la actividad enzimática residual

Para el caso de las mezclas IL/[Bmim][Cl], las partículas del biocatalizador fueron primeramente revestidas con la cantidad seleccionada de IL hidrofóbico ([Bmim] [NTf₂] o [N₁₁₁₄] [NTf₂]) y mezcladas mecánicamente con espátula. Posteriormente se añadió el [Bmim][Cl] o la solución de celulosa al 1% (w/w) en [Bmim][Cl] hasta completar 1 g (cantidad total sumando ambos ILs). La mezcla resultante se mezcló mecánicamente durante 5 min, incubándose posteriormente a 50°C en un bloque térmico.

Para estudiar la estabilidad de la celulasa en medio acuoso, se suspendieron 15 mg de la enzima inmovilizada, añadida a distintos viales, con 500 µl de tampón citrato 50 mM y posteriormente se incubaron a 50°C. A tiempos seleccionados fueron retirándose de la incubación uno a uno los viales, la actividad residual de la celulasa se determinó mediante la adición de 500 µl de una suspensión de celulosa al 4% (w/v) en tampón citrato 50 mM, pH 4.8.

▪ **Ensayo de actividad de la celulasa**

La actividad de la celulasa se determinó a 50°C mediante cuantificación espectrofotométrica de los azúcares reductores producidos (considerados como equivalentes de glucosa) mediante el método del ácido bicinchónico (BCA) (Kongruang *et al.*, 2004) utilizando una recta de calibrado estándar de glucosa ($r^2=0.998$) para la cuantificación.

El método del ácido bicinchónico se utilizó para detectar y cuantificar la cantidad de azúcares reductores terminales producidos. El método se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por la reducción de los extremos reductores producidos. El ácido bicinchónico forma un complejo púrpura-azul con Cu^+ y la medida espectrofotométrica de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de extremos reductores en la muestra. Este método fue preferido sobre el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), empleado igualmente para determinar extremos reductores, debido a que las condiciones severas requeridas por este método (100°C durante un mínimo de 5 min), lo que podía haber generado degradación de la glucosa.

Las reacciones se llevaron a cabo en viales con tapón de rosca y septum de teflón (1.5 ml capacidad total), cada uno de los cuales contenía 1 ml de una suspensión de celulosa 2% (w / v) en tampón citrato 50 mM, pH 4.8. La reacción se inició mediante la adición de 15 mg de celulasa inmovilizada o 30 mg de mezcla celulasa inmovilizada / IL, dejándose con agitación magnética durante 24 h en un baño de glicerol a 50°C . A intervalos regulares de tiempo, se tomaron alícuotas de 25 μl y se suspendieron en 475 μl de tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9.8 para detener la reacción. A continuación, se añadieron 1.5 ml de reactivo BCA, y la mezcla se agitó fuertemente durante 2 min, incubándola posteriormente a 80°C durante 30 min. Las soluciones resultantes se centrifugaron a 100 rpm durante 10 min, y se midió la absorbancia a 560 nm utilizando un espectrofotómetro de diodos UV / Vis S1200 (Biochrom Ltd, UK). Una unidad de actividad de celulasa se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1 μmol de azúcares reductores por minuto. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

2.4. Resultados y discusión

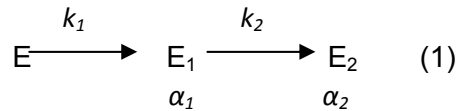
La posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de celulosa previamente disuelta en ILs como el [Bmim] [Cl], ha despertado el interés por las estrategias de la estabilización de la celulasa frente a la temperatura y/o este tipo de disolventes de celulosa. Sin embargo, la alta viscosidad de la disolución de la celulosa en [Bmim][Cl] a temperaturas moderadas (11 000 y 300 mPas a los 30°C y 70°C , respectivamente) es un factor limitante en la velocidad de cualquier proceso catalítico, ya que ralentiza los fenómenos de transporte de materia (Bose *et al.*, 2010). Es por ello que se propuso la

realización del proceso de sacarificación enzimática de celulosa disuelta en [Bmim][Cl] a 50 °C.

En primer lugar, se estudió la capacidad de la celulasa inmovilizada para catalizar la sacarificación de una suspensión de celulosa al 2% (w/v) en tampón citrato 50 mM, pH 4.8 a 50 ° C. Tal como muestra la Figura 2.2., a pesar de que la reacción se desarrolla lentamente, debido a la insolubilidad de la celulosa en los medios de reacción acuosos, el derivado de celulosa inmovilizada fue capaz de alcanzar hasta un 41% de hidrólisis después de 24 horas, en concordancia con otros trabajos realizados con celulasas solubles (Kamiya *et al.*, 2008). El derivado inmovilizado demostró una actividad específica de 0.1U por mg de proteína, con un 91% del rendimiento en la inmovilización.

En este contexto, considerando los largos tiempos de operación requeridos para los procesos de sacarificación enzimática de celulosa, se estudió la estabilidad de la enzima inmovilizada en medio tamponado a 50 °C y se comparó con la observada en [Bmim][Cl], [Bmim][NTf₂] y [N₁₁₁₄][NTf₂] (Figura 2.2, recuadro interior). Como puede observarse y, en consonancia con otros trabajos previos (Turner *et al.*, 2003), el mejor IL para disolver la celulosa es el peor para mantener la celulasa activa, produciendo una desactivación completa en pocas horas. Sin embargo, tanto el [Bmim][NTf₂] como el [N₁₁₁₄][NTf₂], ambos IL hidrofóbicos, se mostraron como claros agentes estabilizantes de la actividad de la celulasa en relación con el medio tamponado a 50 ° C. Similares resultados han sido obtenidos con otras proteínas como la lipasa (Lozano *et al.*, 2004; De Diego *et al.*, 2005), la quimotripsina (De Diego *et al.*, 2004) y albúmina de suero humano (Page *et al.*, 2009).

Como puede verse en el recuadro interior de la Figura 2.2, los perfiles de desactivación ajustaron a una ecuación cinética de dos etapas, siendo posible calcular los tiempos de vida media del derivado inmovilizado mediante un modelo de desactivación en serie (Sadana y Henley, 1987; Lozano *et al.*, 2004). Este modelo considera que la desactivación enzimática ocurre en dos etapas de primer orden, la primera con un precursor activo y la segunda, con un estado final con posible actividad distinta de cero, como se muestra a continuación:



Donde E, E₁ y E₂ son los diferentes estados de la enzima: nativo, intermedio y desarrollado, con diferentes actividades específicas; k₁ y k₂ son las constantes de primer orden (horas⁻¹ o días⁻¹) y α₁ y α₂ son los ratios entre las actividades específicas E₁/E y E₂/E.

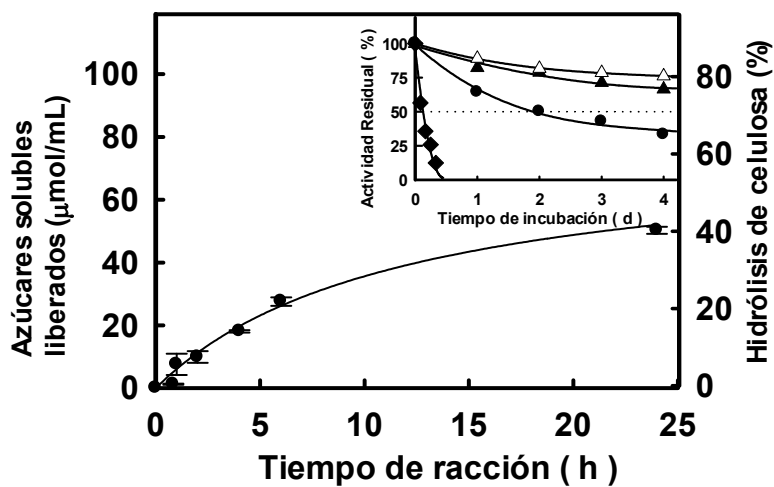


Figura 2.2. Perfil de sacarificación de una suspensión de celulosa al 2% (w/v) en tampón citrato 50 mM, pH 4.8, catalizada mediante celulasa inmovilizada (15 mg) a 50°C. El recuadro interior describe los perfiles de desactivación en (◆), [Bmim][NTF₂], (▲), [N1114][NTF₂] (△) y tampón citrato (●).

Con respecto a los resultados obtenidos, Tanto el [Bmim][NTf₂] como el [N₁₁₁₄][NTf₂] aumentaron 2.8 y 4 veces, respectivamente, el tiempo de vida media de la celulasa, en comparación con el medio tamponado. Un estudio en paralelo, realizado para evaluar el efecto de la naturaleza del IL hidrofóbico (longitud de la cadena alquílica lateral y tipo de anión) en su papel protector bajo condiciones severas de temperatura (80°C) (Lozano *et al.*, 2011), reveló que los LIs hidrofóbicos con anión [NTf₂] preveían de un mejor efecto estabilizante que los aniones [PF₆] o [BF₄] (Tabla 1), observándose una mejora con el incremento de la longitud de cadena alquílica del catión. Sin embargo, los mejores resultados se observaron con los IL de base catiónica amonio ([N₁₁₁₄], metiltrioetilamonio [N₁₈₈₈]), conservando alrededor del 40%

de la actividad de la celulosa después de 5 días bajo condiciones severas de temperatura (80°C) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Actividad residual de celulosa inmovilizada después de la incubación en ILs durante 5 días a 80 °C ((Lozano *et al.*, 2011)

Líquido iónico	Actividad residual (%)
[Emim][NTf ₂]	17.6
[Bmim][NTf ₂]	27.2
[Omim][NTf ₂]	34.3
[Ddmin][NTf ₂]	38.2
[Bmim][PF ₆]	23.4
[Omim][PF ₆]	30.9
[Ddmim][PF ₆]	27.6
[Emim][BF ₄]	16.1
[Bmim][BF ₄]	17.1
[Omim][BF ₄]	19.8
[Ddmim][BF ₄]	11.6
[N ₁₁₁₄][NTf ₂]	42.3
[N ₁₈₈₈][NTf ₂]	39.1
Tampón citrato	0

[Emim]: 1-etil-3-metil imidazolio; [Bmim]: 1-butil-3-metil imidazolio; [Omim]: 1-octil-3-metil imidazolio; [Ddmin]: 1-dodecil-3-metil imidazolio; [N₁₁₁₄]: butiltrimetilamonio; [N₁₈₈₈]: bis((trifluorometil)sulfonil)-imida.

Teniendo en cuenta que estos líquidos iónicos hidrofóbicos no disuelven la celulosa, así como el aumento de su viscosidad con el incremento de la longitud de cadena del catión, tanto el [Bmim][NTf₂], como el [N₁₁₁₄][NTf₂] fueron los ILs seleccionados para realizar una segunda etapa de estudio sobre la estabilización de celulosa inmovilizada en presencia de [Bmim][Cl], siendo previamente recubierta mediante dichos ILs. Así, el derivado inmovilizado se recubrió primero con diferentes cantidades de IL hidrofóbico ([Bmim][NTf₂] o [N₁₁₁₄][NTf₂]) y posteriormente se añadió [Bmim][Cl] a diferentes ratios molares. La pérdida de actividad de las mezclas heterogéneas IL/partículas de catalizador se determinó a 50°C en función del tiempo de incubación (Figura 2.3.).

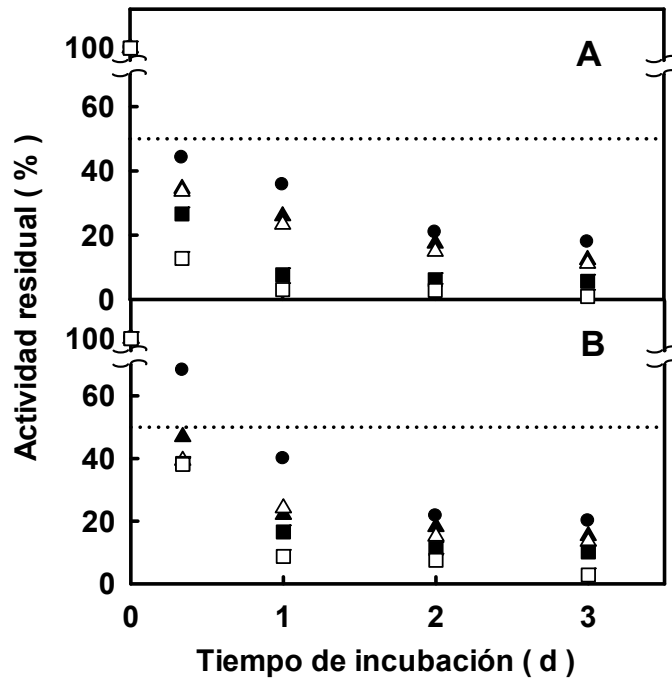


Figura 2.3. Perfiles de desactivación de celulasa inmovilizada en mezclas de (A) [Bmim][NTf₂]:[Bmim][Cl] y (B) [N₁₁₁₄][NTf₂]:[Bmim][Cl] a 50°C. Las mezclas probadas (mol:mol) fueron las siguientes: 3:1 (●), 2:1 (▲), 1:1 (△), 1:2 (■) y 1:3 (□), respectivamente

Como puede observarse en la Figura 2.3, en todos los casos la celulasa inmovilizada mostró un perfil de desactivación con importante pérdida de actividad. No obstante, el recubrimiento de las partículas de enzima inmovilizada con [Bmim][NTf₂] o [N₁₁₁₄][NTf₂] mejoró la actividad residual. Ambos ILs hidrofóbicos demostraron su capacidad para estabilizar la actividad de la celulasa contra el efecto negativo de [Bmim][Cl] (véase la Figura 1.2 para comparar). El incremento en la concentración del IL hidrofóbico disminuyó el efecto desactivador del [Bmim][Cl], lo cual podría atribuirse al papel activo del [Bmim][NTf₂] o el [N₁₁₁₄][NTf₂] en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la enzima mediante la preservación de las moléculas de agua esencial alrededor de la proteína que participan en la conformación nativa. La eliminación de dichas moléculas, fenómeno conocido como “wáter stripping” ha sido descrito ampliamente como factor clave de la desactivación enzimática en ambientes no acuosos (Baker *et al.*, 2004; De Diego *et al.*, 2004, 2005; Lozano *et al.*, 2004, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Sureshkumar y Lee, 2009; Fernandez-Lafuente, 2009; Mutschler *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2009; Zhao, 2010; Lozano, 2010; Moniruzzaman *et al.*, 2010). Además de esto, la inmovilización de la celulasa puede proporcionar un efecto protector adicional ya que podría actuar como reserva de las moléculas de agua,

ayudando a mantener el plegamiento de la proteína, y facilitando la reacción hidrolítica.

Una vez observado el papel protector de ambos ILs frente al [Bmim][Cl], el [N₁₁₁₄][NTf₂] fue seleccionado para recubrir la celulasa inmovilizada y llevar a cabo la sacarificación de una solución de celulosa a 50°C en [Bmim][Cl]. En la estrategia utilizada, la enzima inmovilizada (30 mg) se hidrató en primer lugar con tampón citrato 50 mM, pH 4.8 (15 µl), se recubrió posteriormente con [N₁₁₁₄][NTf₂] y, finalmente, se añadieron las cantidades correspondientes de solución de celulosa al 1% en [Bmim][Cl] (Figura 1.5). De esta forma fue posible estudiar el efecto estabilizador de la capa de IL hidrofóbico alrededor del derivado inmovilizado en su capacidad de la celulasa para hidrolizar las disoluciones de celulosa (Figura 2.4).

Como puede verse en la Figura 2.4, la celulasa inmovilizada permaneció activa en todas las mezclas de líquido iónico tras 24h de incubación. Sin embargo, puede observarse también la disminución en el grado de sacarificación de celulosa que coincide con el aumento en la cantidad de [N₁₁₁₄][NTf₂] que recubría al catalizador. Si bien la cantidad de disolución de celulosa presente en cada mezcla y, por tanto, la concentración de celulosa, se redujeron continuamente (5.69 a 1.28 mg ml⁻¹), dicha concentración de celulosa se mantuvo 10 veces más alta que el valor de K_M descrito para disoluciones acuosas (Halliwell y Griffin, 1973; Nidetzky *et al.*, 1994). Por lo tanto, la disminución en el grado de sacarificación de la celulosa de las diferentes mezclas ensayadas podría estar relacionada, no a una disminución en la concentración de sustrato disponible, sino a una mayor limitación de la celulosa para acceder al microambiente de la enzima, misma que se ve incrementada con el incremento en la cantidad de [N₁₁₁₄][NTf₂] que recubre la enzima inmovilizada, ello debido a la baja solubilidad que los azúcares han mostrado en ILs con base aniónica [NTf₂] (Rosatella *et al.*, 2009).

El incremento en la concentración de IL hidrofóbico que recubría el derivado inmovilizado, redujo la actividad de la celulasa al limitar la transferencia de masa del sustrato desde el seno del medio de reacción hasta la enzima. Esta observación se contrapone con el rol positivo desempeñado por el IL como agente protector contra la desactivación de la enzima por wáter stripping”, demostrando que existe una cantidad óptima de IL hidrofóbico para obtener un efecto protector adecuado.

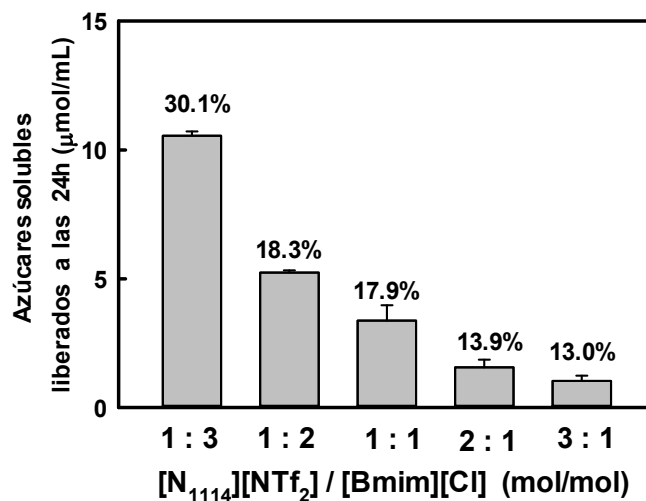


Figura 2.4 Sacarificación enzimática de celulosa *in situ* en [Bmim][Cl] durante 24h a 50°C. La enzima inmovilizada (30 mg) fue en primer lugar hidratada con tampón citrato 50 mM, pH 4.8 (15 µl) y recubierta con [N₁₁₁₄][NTf₂] (431, 532, 659, 819, ó 872 mg, respectivamente). Posteriormente se añadió una solución de celulosa al 1% en [Bmim][Cl] (569, 468, 306, 181 o 128 mg, respectivamente). Los ratios resultantes de estas mezclas [N₁₁₁₄][NTf₂]: [Bmim][Cl] fueron: 1:3, 1:2, 1:1, 2:1 y 3:1 (mol/mol) respectivamente. Los datos en el interior de la figura corresponden al porcentaje de hidrólisis.

Tal como se ha observado, el uso de líquidos iónicos hidrofóbicos (por ejemplo el [N₁₁₁₄][NTf₂]), como agentes estabilizantes en condiciones de reacción no convencionales, es una alternativa interesante para mantener las celulasas en su conformación activa durante los procesos de sacarificación en [Bmim][Cl]. Desde este punto de vista, tanto la estabilidad mecánica como el espesor de la capa de recubrimiento de IL de la enzima, deberán ser optimizados para lograr una mejor estabilización y el fácil transporte de la celulosa a la enzima. De este modo, el uso de líquidos iónicos soportados (SILLPs) (Lozano *et al.*, 2010) así como la selección adecuada del soporte (Kim *et al.*, 2006) (para actuar como microreservorio que supla las moléculas de agua durante la hidrólisis) y el uso de un sistema de reacción eficiente para medio viscoso (por ejemplo reactores de flujo tangencial (Rios *et al.*, 2004)), parecen ser parámetros clave a estudiar en la aplicación exitosa de los procesos de sacarificación.

Una vez más se confirma, la importancia de un microambiente adecuado en las reacciones enzimáticas realizadas en líquidos iónicos, ofreciendo una propuesta nueva y sostenible para la industria química verde en un futuro cercano.

2.5. Referencias

- Alonso, D.M., Bond, J.Q., Dumesic, J. a., 2010. Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chem.* 12, 1493.
- Baker, S.N., Mccleskey, T.M., Baker, G.A., 2004. Fluorescence studies of protein thermostability in ionic liquids †. *Chem. Comm.* 940–941.
- Bonhote, P., Dias, A., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K., Gra, M., 1996. Hydrophobic , Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts †. *Inorg. Chem.* 1168–1178.
- Bose, S., Armstrong, D.W., Petrich, J.W., 2010. Enzyme-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquids: a green approach toward the production of biofuels. *J. Phys. Chem. B* 114, 8221–8227.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., 2006. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 904–910.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., Choi, Y.H., 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica chimica acta* 766, 61–68.
- Datta, S., Holmes, B., Park, J.I., Chen, Z., Dibble, D.C., Hadi, M., Blanch, H.W., Simmons, B. A., Sapro, R., 2010. Ionic liquid tolerant hyperthermophilic cellulases for biomass pretreatment and hydrolysis. *Green Chem.* 12, 338-341.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2004. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the alpha-chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 916–924.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2005. Understanding structure-stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules* 6, 1457–1464.
- Domínguez de María, P., Maugeri, Z., 2011. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 220–225.
- Dourado, F., Bastos, M., Mota, M., Gama, F.M., 2002. Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate. *J. Biotechnol.* 99, 121–131.
- Engel, P., Mladenov, R., Wulfhorst, H., Jäger, G., Spiess, A.C., 2010. Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose. *Green Chem.* 12, 1959-1962
- Fernandez-Lafuente, R., 2009. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 405–418.

- Gorke, J.T., Sreenc, F., Kazlauskas, R.J., 2008. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Comm.* 1235–7.
- Hirsh, S.L., Bilek, M.M.M., Nosworthy, N.J., Kondyurin, A., Dos Remedios, C.G., McKenzie, D.R., 2010. A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir* 26, 14380–8.
- IKamiya, N., Matsushita, Y., Hanaki, M., Nakashima, K., Narita, M., Goto, M., Takahashi, H., 2008. Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media. *Biotechnol. Lett.* 30, 1037–40.
- Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 61, 1017–1026.
- Kongruang, S., Han, M.J., Breton, C.I.G., Penner, M.H., 2004. Quantitative analysis of cellulose reducing ends. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113, 213–231.
- Li, C., Wang, Q., Zhao, Z.K., 2008. Acid in ionic liquid: An efficient system for hydrolysis of lignocellulose. *Green Chem.* 10, 177.
- Li, C., Zhao, Z.K., 2007. Efficient Acid-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose in Ionic Liquid. *Advanced Synthesis & Catalysis* 349, 1847–1850.
- Lozano, P., 2010. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.* 12, 555–569.
- Lozano, P., Bernal, B., Bernal, J.M., Pucheault, M., Vaultier, M., 2011. Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 13, 1406–1410.
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2004. Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems. *Biotechnology progress* 20, 661–9.
- Lozano, P., García-Verdugo, E., Karbass, N., Montague, K., De Diego, T., Burguete, M.I., Luis, S. V., 2010. Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs) for enzymatic processes: Continuous KR and DKR in SILLP–scCO₂ systems. *Green Chem.* 12, 1803.
- Lozano, P., Piamtongkam, R., Kohns, K., Diego, T. De, Vaultier, M., Iborra, J.L., 2007. Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.* 9, 780.
- Moniruzzaman, M., Kamiya, N., Goto, M., 2010. Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids. *Org. Biomol. Chem.* 8, 2887–99.
- Mutschler, J., Rausis, T., Bourgeois, J.-M., Bastian, C., Zufferey, D., Mohrenz, I.V., Fischer, F., 2009. Ionic liquid-coated immobilized lipase for the synthesis of methylglucose fatty acid esters. *Green Chem.* 11, 1793.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M., Claeysens, M., 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *The Biochemical journal* 298 Pt 3, 705–10.

- Page, T.A., Kraut, N.D., Page, P.M., Baker, G.A., Bright, F. V, 2009. Dynamics of Loop 1 of Domain I in Human Serum Albumin When Dissolved in Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B* 12825–12830.
- Pottkämper, J., Barthen, P., Ilmberger, N., Schwaneberg, U., Schenk, A., Schulte, M., Ignatiev, N., Streit, W.R., 2009. Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. *Green Chem.* 11, 957.
- Rinaldi, R., Palkovits, R., Schüth, F., 2008. Depolymerization of cellulose using solid catalysts in ionic liquids. *Angewandte Chemie International E.* 47, 8047–50.
- Rios, G.M., Belleville, M.P., Paolucci, D., Sanchez, J., 2004. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. *J. Membr. Sci.* 242, 189–196.
- Roosen, C., Müller, P., Greiner, L., 2008. Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 607–14.
- Rosatella, A. A., Branco, L.C., Afonso, C. A. M., 2009. Studies on dissolution of carbohydrates in ionic liquids and extraction from aqueous phase. *Green Chem.* 11, 1406.
- Sadana, A., Henley, J.P., 1987. Single-Step Unimolecular Non-First-Order Enzyme Deactivation Kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 717–723.
- Sureshkumar, M., Lee, C.-K., 2009. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 60, 1–12.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2002. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4974–4975.
- Tébéka, I.R.M., Silva, A.G.L., Petri, D.F.S., 2009. Hydrolytic Activity of Free and Immobilized Cellulase. *Langmuir* 1582–1587.
- Turner, M.B., Spear, S.K., Huddleston, J.G., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2003. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* 5, 443.
- Zhao, H., 2010. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids-a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 891–907.
- Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G. a, Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N., 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139, 47–54.
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chem.* 8, 325–327.

**Capítulo 3. Sacarificación enzimática de celulosa
pretratada con [Bmim][Cl]**

3.1 Resumen

Este capítulo describe el desarrollo de un proceso cíclico sostenible para la sacarificación enzimática de celulosa pretratada mediante líquido iónico (IL), con recuperación completa del disolvente para su posterior reciclaje. Disoluciones de celulosa homogéneas en el IL 1-butil-3-metilimidazolio cloruro ([Bmim] [Cl]) se utilizaron para preparar celulosa amorfa por precipitación mediante diferentes antisolventes verdes como agua, etanol o una mezcla equimolar agua-etanol. Varios parámetros operacionales (tipo de antisolvente, temperatura, aplicación de ultrasonidos, etc), tanto para la precipitación de celulosa como para las etapas de lavado, fueron probados para lograr la plena desorción del IL de la estructura de la celulosa. En las mejores condiciones, hasta un 99,7% de IL fue recuperado, el cual fue utilizado posteriormente con éxito en procesos cíclicos de disolución/precipitación de celulosa. Por otra parte, la celulosa regenerada obtenida en cada ciclo resultó ser un excelente sustrato para la hidrólisis enzimática, lo que permitió su completa sacarificación (hasta 97.7%), tras 4 horas de reacción a 50 °C, mediante la acción combinada de las enzimas celulasa y celobiasa, proporcionando una solución de glucosa transparente. Así mismo, se demostró la viabilidad de dicha disolución de glucosa obtenida para ser metabolizada directamente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con idéntico resultado al observado para una disolución de glucosa pura comercial

3.2 Introducción

La producción de bioetanol de segunda generación a partir de biomasa no comestible (por ejemplo, biomasa lignocelulósica) mediante tecnologías limpias, basadas en los criterios de sostenibilidad que emanan de los principios de la Química Verde, es uno de los mayores retos de la investigación y de la industria, en la actualidad (Sims *et al.*, 2010; Agbor *et al.*, 2011; Rose y Palkovits, 2012; Sarkar *et al.*, 2012).

La producción de bioetanol a partir de fuentes celulósicas consiste en tres pasos principales: el pretratamiento de la celulosa para debilitar su estructura altamente ordenada y rígida, la hidrólisis de la celulosa en azúcares fermentables, y, finalmente, la transformación de los azúcares monosacarídicos resultantes en etanol mediante fermentación microbiana (Ver Figura 3.1).

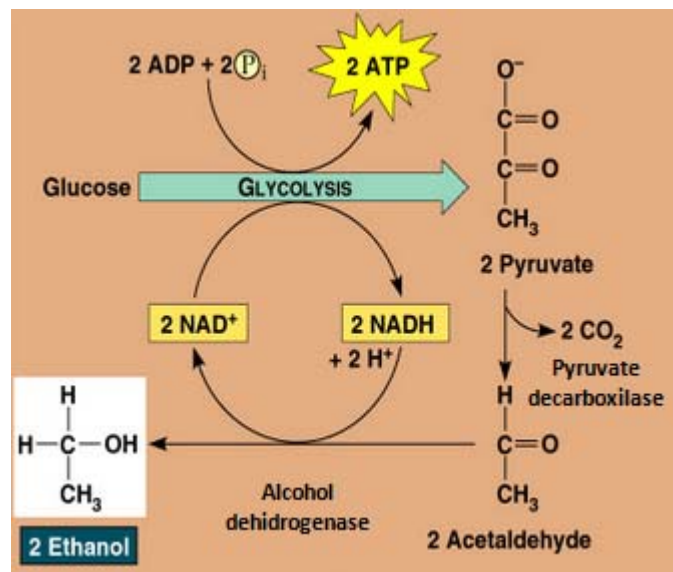


Figura 3.1. Esquema general de la fermentación alcohólica

La hidrólisis enzimática completa de la celulosa en sus unidades de glucosa se lleva a cabo mediante la acción sinérgica de diferentes glucohidrolasas, tales como celulasas (EC 3.2.1.4 endoglucanasas, EC 3.2.1.91 exoglucanasas) y celobiasas (EC 3.2.1.21). La alta especificidad de las enzimas las hace una de las alternativas más verdes para la sacarificación de celulosa (Sukharnikov *et al.*, 2011). Sin embargo, la estructura cristalina de la celulosa, conferida por puentes de hidrógeno inter e intramoleculares multivalentes, le aporta una naturaleza recalcitrante frente la degradación por los biocatalizadores. La presencia de regiones cristalinas y amorfas

en la celulosa implica una dificultad adicional para su hidrólisis enzimática, dado que se establece una diferente accesibilidad del sustrato al centro catalítico de la enzima. Es por ello que, teniendo en cuenta la insolubilidad de la celulosa en los medios acuosos de reacción, la eficacia de la acción biocatalítica es altamente dependiente de la adsorción de la enzima sobre la celulosa, hecho que ha sido descrito como un fenómeno de adsorción superficial (Mansfield *et al.*, 1999). En este sentido, cabe destacar que se conocen muchas celulasas, cuya arquitectura proteica comporta dos dominios, a saber, un dominio catalítico, y un dominio de unión a celulosa, mediante adsorción física (Lee *et al.*, 1996).

Varios métodos químicos y físicos se han empleado para mejorar la accesibilidad de los polisacáridos contenidos en la biomasa a la hidrólisis enzimática (molienda mediante bolas, uso de ácidos diluidos, tratamiento hidrotérmico, uso de álcalis, etc), sin embargo, ninguno de ellos es capaz de aumentar el área superficial de la celulosa y despolimerizarla en grado suficiente para permitir su hidrólisis enzimática total a tiempos cortos de residencia y bajas concentraciones de enzima (Zhu *et al.*, 2006; Alvira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

El trabajo pionero del grupo de R.D. Rogers (Univ. Alabama, USA) demostró la capacidad de algunos ILs, tales como el 1-butil-3-metilimidazolio cloruro ([Bmim][Cl]), el 1-hexil-3-metilimidazolio cloruro ([Hmim][Cl]), etc., para disolver celulosa (Swatloski *et al.*, 2002), así como madera (Fort *et al.*, 2007). Este importante descubrimiento abrió nuevas oportunidades para la valorización de grandes cantidades de materiales de desecho con alto contenido en este polímero (por ejemplo, la biomasa forestal residuos agrícolas, etc), como consecuencia de la pérdida de la rigidez estructural que caracteriza a la celulosa, resultante de su disolución en líquidos iónicos. Entre las acciones de investigación que son objeto del máximo interés estratégico, destaca la despolimerización biocatalítica de celulosa en sus unidades de glucosa, para su posterior transformación en bioetanol por fermentación (Fort *et al.*, 2007; Alonso *et al.*, 2010; Bose *et al.*, 2010).

Aunque la mayoría de los líquidos iónicos han demostrado actuar como excelentes medios de reacción para las reacciones catalizadas por enzimas (Lozano, 2010; Domínguez de María y Maugeri, 2011; Lozano, Garcia-Verdugo, *et al.*, 2011; Sheldon, 2012), también se ha demostrado que los líquidos iónicos capaces de disolver la celulosa (i.e., [Bmim][Cl], [Amim][Cl], etc.) producen una rápida

desactivación enzimática, como consecuencia de la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas. (Turner *et al.*, 2003; Engel *et al.*, 2010; Salvador *et al.*, 2010). Así, se ha podido observar cómo las interacciones por puente de hidrógeno intracatenarias, que participan activamente en el mantenimiento de la arquitectura nativa de la proteína, son desplazadas por interacciones proteína-líquido iónico, dando lugar a conformaciones catalíticamente inactivas como resultado de la desnaturalización proteica, (Baker y Heller, 2009).

En este contexto, diferentes estrategias han sido probadas para superar el efecto negativo de los ILs disolventes de celulosa sobre la actividad de la celulasa y su estabilidad. Entre las estrategias utilizadas se encuentran: el uso de medios tamponados con bajas concentraciones de ILs “benignos” de base aniónica acetato o dialquilfosfato (Kamiya *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Vitz *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), el recubrimiento de inmovilizados de celulasa con una capa protectora de ILs hidrofóbicos, como el bistriflimida 1-butil-3-metilimidazolio (Lozano, 2011), la identificación y aplicación de celulasas de fuentes microbianas no fúngicas (por ejemplo, la arquea halófila *Halorhabdus utahensis*) con mejor tolerancia a los ILs (Zhang *et al.*, 2011), o el uso de agua de mar concentrada como medio de reacción alternativo libre de IL (Grande y De María, 2012). No obstante, la viabilidad de un proceso de la despolimerización enzimática de celulosa disuelta en líquidos iónicos presenta una dificultad adicional desde el punto de vista de la sostenibilidad del proceso, como es la separación de la glucosa resultante y la recuperación total del líquido iónico para su posterior reutilización

Sin embargo, la estrategia más popular implica la re-precipitación (regeneración) de celulosa a partir de disoluciones celulosa-IL mediante la adición de disolventes polares (agua, etanol, etc.), con el fin de romper la estructura cristalina del polisacárido, mejorando así la accesibilidad del sustrato para su posterior hidrólisis enzimática en medio tamponado (Dadi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Samayam y Schall, 2010; Husson *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012). La digestibilidad de la biomasa pretratada por celulasa está limitada por la accesibilidad de la celulosa, y, hasta ahora no se ha descrito la degradación enzimática completa de la celulosa por vía sus unidades de monómeros de glucosa. Algunos autores han aplicado ultrasonidos durante el pretratamiento de la celulosa con ILs para interrumpir su estructura cristalina, mejorando la sacarificación enzimática *in situ* de celulosa en medios acuosos/IL, con un rendimiento máximo de 95% después de 24 h de

reacción. Otros autores han llevado a cabo la hidrólisis enzimática de celulosa, pretratada con [Bmim][Cl] (5mgml^{-1}), en tampón citrato pH 4.8 y hasta un 20% de otro IL, el metilsulfato de tris-(2-hidroxietil) metilamonio (HEMA)(v/v), produciendo hasta 4mgml^{-1} de glucosa después de 15 horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bose *et al.*, 2012).

Adicionalmente a las ventajas que la tecnología de los ILs puede ofrecer en el procesamiento de celulosa para la industria del bioetanol, también debe considerarse la sostenibilidad económica y ambiental del proceso con base en la plena recuperación y reciclaje de los ILs (Lozano, 2010; Salvador *et al.*, 2010; Agbor *et al.*, 2011; Domínguez de María y Maugeri, 2011; Lozano *et al.*, 2011; Sheldon, 2012). La necesidad de recuperar completamente el IL para su reciclaje se ha visto reforzada a partir de que algunos ILs fueran descritos como disolventes no completamente verdes debido a su baja biodegradabilidad y alta (eco) toxicidad (Cho *et al.*, 2007; Torrecilla *et al.*, 2009).

Varios métodos han sido propuestos recientemente para la recuperación de ILs empleados en la solubilización de biomasa, por ejemplo, el uso de disoluciones salinas kosmotrópicas (por ejemplo, disoluciones acuosas de K_3PO_4 y K_2HPO_4), después de una etapa de re-precipitación de celulosa con disolvente polar, para formar un sistema trifásico con una fase rica en IL (Shill *et al.*, 2011), o la separación cromatográfica de IL y glucosa del medio de reacción enzimático utilizando alúmina como fase estacionaria, proporcionando hasta un 93% de recuperación del IL (Feng *et al.*, 2011).

Además, dado que el destino final de las disoluciones de celulosa hidrolizada es la fermentación para producir bioetanol, el efecto de los ILs sobre la viabilidad de células como las de levadura es un factor importante a considerar. En este sentido, se ha descrito la inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de etanol, debido al contenido residual de acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim] [OAc]) en los hidrolizados de celulosa (Ouellet *et al.*, 2011). Otros autores han demostrado cómo una cepa de *Saccharomices cerevisiae*, modificada con celulasas en la superficie celular, era resistente a algunos ILs disolventes de celulosa ([Emim] [OAc], [Emim] [Cl], [Emim] [DEP]) en concentraciones de hasta 200 mM (Nakashima *et al.*, 2011).

En este contexto, el presente capítulo describe por primera vez un enfoque experimental cíclico (Figura 3.2) basado en la hidrólisis enzimática de celulosa regenerada a partir de disoluciones de celulosa en [Bmim][Cl], así como la recuperación total y reutilización de dicho IL en ciclos sucesivos de disolución-regeneración.

El protocolo experimental para producir celulosa regenerada (CR) fue seleccionado en función, tanto de la cantidad de IL recuperado, como de la idoneidad de la (CR) para la hidrólisis enzimática. Para ello, la precipitación de celulosa a partir de disoluciones celulosa-[Bmim][Cl], fue realizada mediante el uso de los disolventes moleculares (antisolventes) con mejor carácter sostenible, como son el agua y el etanol, así como una mezcla equimolar de etanol y agua. Varios parámetros operacionales, tales como temperatura, agitación, el uso de ultrasonidos, etc., fueron ensayados en el objetivo de recuperar totalmente el IL para su reutilización en ciclos consecutivos de disolución-precipitación.

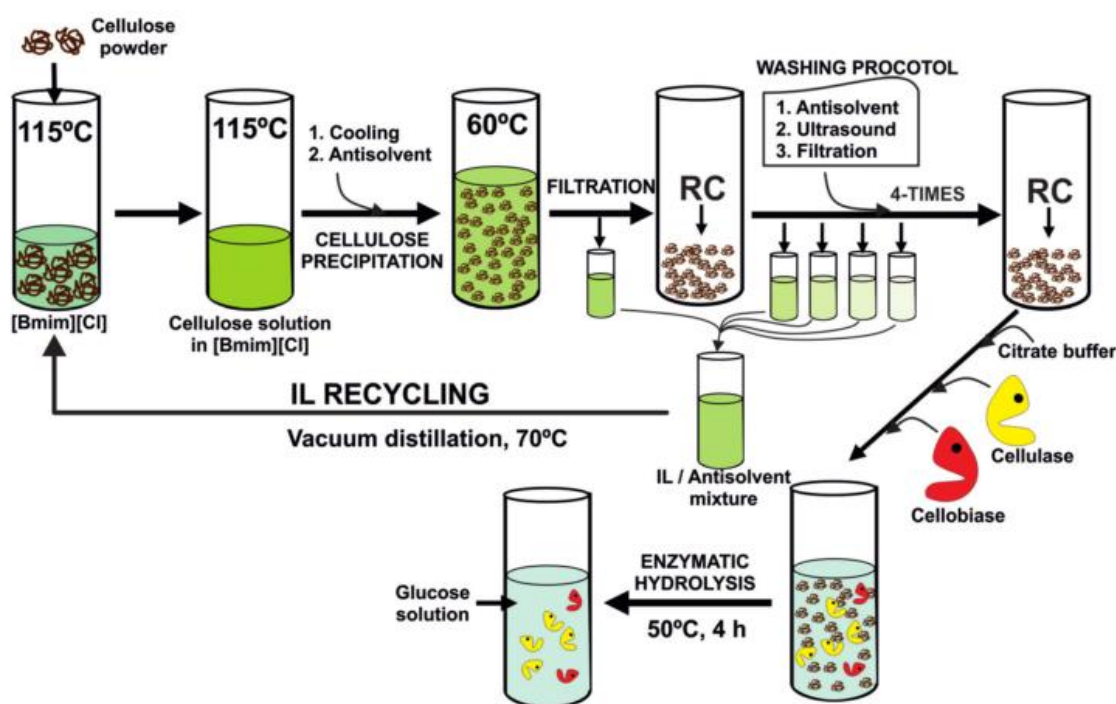


Figura 3.2 Esquema del protocolo cíclico para la sacarificación enzimática de celulosa pretratada mediante [Bmim][Cl] y reciclaje del líquido iónico. Para más detalles véase la sección de Materiales y métodos.

3.3 Materiales y métodos

La celulasa de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5 L, EC 3.2.1.4) y la celobiasa de *Aspergillus niger* (Novozyme 188, beta-1,4-glucosidasa, EC 3.2.1.21) fueron un regalo de Novozymes S. A. (España). La celulosa microcristalina (20 micras de tamaño de partícula) y otros productos químicos fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Fluka (Madrid, España). El IL 1-butil-3-metilimidazolio cloruro, [Bmim][Cl], (99% de pureza) fue suministrado por IoLiTec GmbH (Alemania).

Previamente a su uso, las preparaciones de enzimas fueron ultrafiltradas, para eliminar todos los aditivos de bajo peso molecular, de la siguiente manera: 25 ml de Celluclast o Novozyme 188 se diluyeron en 225 ml de tampón citrato 50 mM, pH 4,8, y las disoluciones resultantes se concentraron 10 veces por ultrafiltración a 8 °C, utilizando un sistema Vivaflow 50 (Sartorius) equipado con membranas de polisulfona (10 kDa de límite de exclusión). Para cada enzima, el proceso se repitió tres veces, resultando en una disolución de celulasa de 147.5 mg ml⁻¹ de concentración de proteína con actividad específica de 0.115 U mg proteína⁻¹, y una solución de celobiasa de 93.6 mg ml⁻¹ de concentración de proteína con actividad específica de 0.814 U mg de proteína⁻¹.

▪ Preparación de la celulosa regenerada

Para la disolución de la celulosa, el [Bmim][Cl] (10 g) se introdujo en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, y se incubó a 115 ° C en un bloque térmico durante 15 min, hasta que el IL se fundió por completo. Se añadió celulosa microcristalina (1 g), y la mezcla se incubó con agitación mecánica durante 1 hora a 115 ° C, obteniéndose una solución de celulosa transparente, incolora y viscosa. La solución se enfrió y mantuvo a 60, 70 u 80 °C en un baño termostático de glicerol.

Posteriormente, la celulosa se regeneró mediante la adición de 50 ml (5 veces el volumen de celulosa-IL, aproximadamente) de agua, etanol o una solución equimolar agua-etanol (23.5: 76.5 v/v) (antisolventes), calentados previamente a 60, 70 u 80 °C. La suspensión de celulosa resultante se agitó vigorosamente durante 15 min. El gel de CR se separó por filtración a través de una membrana de nylon (malla de 0,1 mm), mientras la fracción líquida se almacenó para su análisis mediante HPLC

y recuperación del IL. A continuación, la CR se sometió a 5 lavados a temperatura ambiente con 50 ml de diferentes disoluciones de antisolvente, de modo que el IL fuera desorbido totalmente de la celulosa.

La serie de lavados de la celulosa consistió en 5 etapas. En primer lugar se realizaron dos etapas de lavado consecutivas usando el mismo tipo de antisolvente que en la regeneración, aplicando ultrasonidos de 150 W (Ultrasons, Selecta, España) durante 15 min. Posteriormente, dos etapas de lavado con agua ultrapura (MilliQ de Millipore Sistema) y agitación mecánica durante 15 min; y una etapa de lavado final con citrato 50 mM, pH 4,8 y agitación mecánica. Las cinco etapas de lavado se recuperaron cuidadosamente cuantificando su volumen y posteriormente se almacenaron para su análisis por HPLC y recuperación del IL.

El contenido de humedad de la CR resultante fue de 84% (w/w). La humedad se determinó por pérdida de peso de la CR después de secarla en un horno a 105 °C durante 14 horas.

- **Recuperación del [Bmim][Cl]**

El [Bmim][Cl] contenido en el antisolvente de regeneración y en cada fracción de lavado fue separado por destilación al vacío a 70 °C y 74 hPa durante 4 horas. El IL recuperado de cada fracción se recolectó en un mismo matraz Erlenmeyer de 100 ml. El matraz fue entonces incubado en un horno a 80°C durante 16h hasta eliminar completamente la humedad del IL. Una vez seco, el [Bmim][Cl] recuperado se reutilizó para disolver celulosa en experimentos adicionales.

- **Análisis por HPLC de [Bmim][Cl]**

La concentración de IL de todas las fracciones de lavado se determinó en un equipo de HPLC Shimadzu equipado con una bomba multi-canal (LC-20AD) y un detector DAD (SPD-M20A), utilizando una columna Synergi Polar-RP de 150 × 4.6 mm (tamaño de partícula 4 µm, tamaño de poro 80 Å, Phenomenex) como fase estacionaria. Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas (flujo de 0.75 ml min⁻¹) utilizando una fase móvil 70:30 (v/v) de tampón fosfato (KH₂PO₄-H₃PO₄) 5 mM

pH 3.0/acetonitrilo (Stepnowski *et al.*, 2006). Los perfiles de elución se controlaron a 218 nm, y la identificación y cuantificación del pico de [Bmim][Cl] (tiempo de retención 2.8 min) se realizó mediante la recta de calibrado correspondiente utilizando acetofenona (tiempo de retención 11 min) como estándar interno .

▪ **Hidrólisis enzimática de celulosa regenerada (CR).**

Suspensiones de celulosa regenerada (CR) al 2% (w/v) se prepararon mediante la introducción de 500 mg de CR húmeda (80 mg de CR seca) en viales con tapón de rosca revestido de teflón (capacidad total de 5 ml), conteniendo 4 ml de tampón citrato 50 mM, pH 4.8. Las suspensiones se mantuvieron con agitación magnética en un baño de glicerol a 50 °C hasta que se observaron suspensiones homogéneas. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de celulasa (120 µL, 147.5 mg prot. mL⁻¹) y celobiasa (60 µL, 93.6 mg prot. mL⁻¹), manteniéndose con agitación magnética durante 4 h. A intervalos regulares de tiempo, se tomaron 65 µL y se suspendieron en tampón de bicarbonato 0.1 M, pH 9.8 (1,035 mL) para detener la reacción. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 min. La fase clara resultante se utilizó para cuantificar tanto la glucosa y celobiosa por HPLC, como el total de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de actividad de celulasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de azúcares reductores por minuto. Una unidad de actividad celobiasa se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de celobiosa por minuto. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

▪ **Ensayo de crecimiento microbiano**

Los ensayos de crecimiento microbiano se realizaron utilizando una cepa comercial liofilizada de *Saccharomyces cerevisiae* (Maurivin-PDM, AB Mauri, Australia) cultivada en medio YPD [2% (w/v) de glucosa, 2% (w/v) de peptona y 1% (w/v) extracto de levadura] (Nakashima *et al.*, 2011; Ouellet *et al.*, 2011). El pH del medio se ajustó a 6.5 antes de su esterilización. Un precultivo se preparó mediante la adición de 20 mg de polvo comercial de *S. cerevisiae* liofilizada a 40 mL de medio YPD, incubándose con agitación (300 rpm) durante 16 horas a 30 °C en condiciones aeróbicas. A continuación, se preparó un nuevo medio YPD (40 ml) mediante la

disolución de peptona y extracto de levadura en una solución de glucosa al 2% (w / v) en citrato 5 mM, pH 4.8, previamente obtenido por hidrólisis enzimática de CR, como se describió anteriormente. Antes de su uso, esta solución de glucosa se sometió a ultrafiltración usando un sistema de Vivaflow 50 (Sartorius) equipado con membranas de polisulfona (10 kDa, de corte) para eliminar las enzimas solubles. Como control, un medio YPD estándar se preparó mediante la disolución de extracto de levadura, peptona y glucosa comercial en citrato 5 mM, pH 4.8.

El pH de ambos medios de cultivo fue ajustado a 6.5 antes de su esterilización. Los ensayos de crecimiento se realizaron mediante la adición de 0,1 mL de precultivo, a los nuevos medios YPD, manteniéndose en agitación a 300 rpm e incubándose a 30 °C durante 30 h en condiciones aerobias. A intervalos regulares, las densidades ópticas (OD) de ambos cultivos fueron determinadas a 600 nm (OD_{600}) (utilizando la dilución apropiada) en un espectrofotómetro Novas-pec II, LKB-Pharmacia.

▪ **Análisis de azúcares por HPLC**

Las concentraciones de glucosa y celobiosa de las muestras de reacción enzimática se determinaron en un HPLC Shimadzu equipado con una bomba multi-canal (LC-20AD), y un detector de dispersión de luz (ELSD-LT II). Una columna Rezex RCM-monossacharide-Ca 2 (300 × 7.8 mm, Phenomenex) se utilizó como fase estacionaria a 60 °C. Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas (flujo de 0.6 ml min⁻¹) utilizando agua como fase móvil. Los picos de glucosa (tiempo de retención 11 min) y celobiasa (tiempo de retención 9 min) fueron identificados y cuantificados a partir de las rectas de calibrado correspondientes, utilizando xilitol (tiempo de retención 23 min) como patrón interno.

3.4. Resultados y discusión

La regeneración de celulosa a partir de disoluciones de IL es un paso clave en el debilitamiento de la cristalinidad y/o perturbación de la organización de la fibra, lo que resulta en un sustrato más accesible para la producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática (Smiglak *et al.*, 2006). Sin embargo, para

la industria de los biocombustibles, la recuperación y reutilización de los ILs en el procesamiento de celulosa podrían ser considerados requisitos esenciales para garantizar la sostenibilidad de cualquier proceso propuesto en este campo. Teniendo en cuenta que el [Bmim][Cl] ha sido descrito como uno de los mejores ILs para disolver materiales lignocelulósicos (Swatloski *et al.*, 2002; Abbott *et al.*, 2005; Fort *et al.*, 2007; Alonso *et al.*, 2010; Bose *et al.*, 2010; Zakrzewska *et al.*, 2010), una solución de celulosa al 10% en este IL fue elegida como material de partida para preparar CR. Como antisolventes de regeneración se utilizaron agua, etanol y una mezcla equimolar agua-etanol.

Mediante experimentos preliminares de regeneración se pudo observar cómo la regeneración a temperatura ambiente proporcionaba una CR de consistencia dura y en forma de flóculos, mientras que cuando la regeneración se realizaba a temperatura más elevada (por ejemplo 60, 70 y 80 °C) se obtenía un polvo fino de celulosa con textura suave.

Partiendo de esta observación, siete protocolos diferentes de regeneración basada en el uso de antisolvente a alta temperatura, fueron ensayados para producir CR. En cada uno de ellos, la CR obtenida fue sometida a 5 etapas de lavado con objeto de lograr la recuperación completa del IL (Figura 3.2). Para todos los casos, dos lavados se realizaron utilizando el mismo antisolvente que en la etapa de precipitación más la aplicación de ultrasonidos, dos lavados se realizaron con agua y, finalmente, el último lavado se realizó con tampón citrato 50 mM, pH 4.8. El porcentaje de IL recuperado en los siete métodos, tanto en la etapa de precipitación como en cada etapa de lavado, se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Efecto del protocolo de regeneración de celulosa en la recuperación de [Bmim][Cl] en función del antisolvente y las condiciones de lavado^a

Entrada	Precipitación de celulosa	Etapas de lavado					IL total (%)
		1. AS+US	2. AS+US	3. H ₂ O	3. H ₂ O	5. TC	
1	78.0 (H ₂ O, 60°C)	10.7	6.4	n. d.	n. d.	n. d.	95.1
2	80.0 (H ₂ O, 70°C)	8.4	6.8	n. d.	n. d.	n. d.	95.2
3	82.0 (H ₂ O, 80°C)	6.2	7.2	n. d.	n. d.	n. d.	95.4
4	67.1 (EtOH, 60°C)	21.6	8.9	n. d.	n. d.	n. d.	97.6
5	93.7 (EtOH-H ₂ O, 60 °C)	4.4	1.4	0.2	<0.1	n. d.	99.7
6	91.8 (EtOH-H ₂ O, 70°C)	5.3	1.4	0.3	0.1	n. d.	98.9
7	89.9 (EtOH-H ₂ O, 80°C)	5.0	1.2	0.4	0.2	n. d.	96.7

^a AS+ US, antisolvente mas ultasonidos durante 15 min a temperatura ambiente; TC, tampón citrato 50 mM, pH 4.8; n. d. no detectado. Ver sección de materiales y métodos para más detalle sobre las muestras

Como puede verse, el uso de agua a 60 °C como antisolvente para la precipitación de celulosa (entrada 1) permitió una recuperación directa de IL del 78%, aumentando ligeramente a 82% cuando la temperatura se elevó hasta 80 °C (entradas 2 y 3). En estos casos, la aplicación de dos pasos consecutivos de lavado, intensificado por la acción de ultrasonidos, permitió mejorar la recuperación total del IL a valores entre el 95.1 y el 95.4%. La aplicación de lavados adicionales con agua y tampón citrato no aportó mejoras en la recuperación de IL. El uso de etanol a 60 °C como antisolvente (entrada 4) proporcionó los peores resultados de recuperación de IL en la etapa de precipitación (67,1% IL), mejorándose a 97,6% después de dos etapas de lavado consecutivas con el mismo antisolvente y aplicación de ultrasonidos. La aplicación de dos lavados adicionales con agua y uno con citrato no mejoró la recuperación de IL. Temperaturas más altas no fueron ensayadas debido al punto de ebullición del etanol (78°C).

Los mejores resultados de recuperación de IL se obtuvieron mediante el uso como antisolvente de la mezcla equimolar agua-etanol a 60 °C (entrada 5), recuperándose de forma directa el 93.7% de IL en la etapa de precipitación. El aumento de la temperatura durante la etapa de precipitación produjo una disminución en el rendimiento de recuperación de IL (entradas 6 y 7). La aplicación del protocolo de lavado en las muestras de CR resultantes mejoraron el rendimiento de la recuperación total de IL hasta un 99,7% (entrada 5), lo que demostró la efectividad de la metodología propuesta para lograr la recuperación completa del IL en el procesamiento de celulosa.

La explicación de estos resultados no pudo hacerse considerando únicamente la capacidad de estos dos disolventes próticos, agua o etanol, para desplazar los iones [Bmim]⁺ y [Cl]⁻ de la CR, ya que ninguno fue capaz de lograr una recuperación total de IL al ser utilizados como antisolventes puros (entradas 1 a 4). A este respecto Lindman *et al.* sugirieron que la celulosa posee una naturaleza significativamente anfífila y que las interacciones hidrofóbicas son importantes para explicar su patrón de solubilidad (Lindman *et al.*, 2010). Por lo tanto, la completa recuperación de IL obtenida mediante la mezcla equimolar agua-etanol podría explicarse por el papel del agua y el etanol como disolventes capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno, así como por las propiedades hidrofóbicas de la fracción alifática de la molécula de etanol, actuando ambos disolventes en conjunto

como un antisolvente verde útil para la recuperación de IL. Por otra parte, la aplicación de ultrasonidos en dos de las etapas de lavado resultó de importancia relevante dada su capacidad para desplazar moléculas fuertemente adsorbidas sobre una matriz polimérica (Imai *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010; Ninomiya *et al.*, 2012).

Además de la ventaja de recuperar el IL, el interés industrial de cualquier propuesta experimental también debe basarse en la idoneidad la celulosa regenerada para la degradación enzimática y producción de disoluciones de glucosa. La Figura 3.3 muestra los perfiles en función del tiempo de la producción de azúcares por la acción combinada de la celulasa y celobiasa sobre las CRs obtenidas mediante los protocolos descritos en la Tabla 3.1. Una reacción control se llevó a cabo utilizando celulosa microcristalina como sustrato. Como puede verse, todas las CRs fueron sustratos adecuados para la hidrólisis enzimática, completándose prácticamente después de 4 h. En la misma figura puede observarse claramente el efecto positivo del pretratamiento mediante [Bmim][Cl] sobre la interrupción de la estructura de la celulosa, en comparación con el control de la reacción, donde la hidrólisis enzimática de la celulosa microcristalina se detuvo en 58%, sin observarse mejora en la hidrólisis a las 24h de reacción. Otra observación que puede realizarse es sobre los mejores rendimientos de hidrólisis obtenidos para una temperatura de regeneración de 60°C, utilizando agua o la mezcla equimolar agua-etanol como antisolventes. Este hecho puede atribuirse a una estructura de la celulosa mayormente amorfa, favorecida por la baja temperatura del antisolvente. El mayor rendimiento de hidrólisis a 60°C representa además, una ventaja económica debido al ahorro energético que representa trabajar temperaturas menores que 80°C.

La adecuación de las CRs para la hidrólisis enzimática, puede observarse también en la Figura 3.4. Como puede apreciarse, la hidrólisis enzimática de la CR obtenida por precipitación con la solución equimolar etanol-agua (Tabla 1, entrada 5), mostró una correspondencia excelente entre los perfiles de azúcares reductores totales, glucosa y celobiosa, observándose celobiosa sólo al comienzo de la reacción, cuando la concentración de CR era alta. Posteriormente, la acción sinérgica de la celulasa y la celobiasa hizo posible la hidrólisis de celobiosa tan rápido como fue formada. La idoneidad de este sustrato para la hidrólisis enzimática también se hizo evidente en el cambio de turbidez del medio de reacción (medida por

transmitancia a 660 nm) (imagen contenida en la Figura 3.4), pasando de 0 a 70% al cabo de 4 h de reacción.

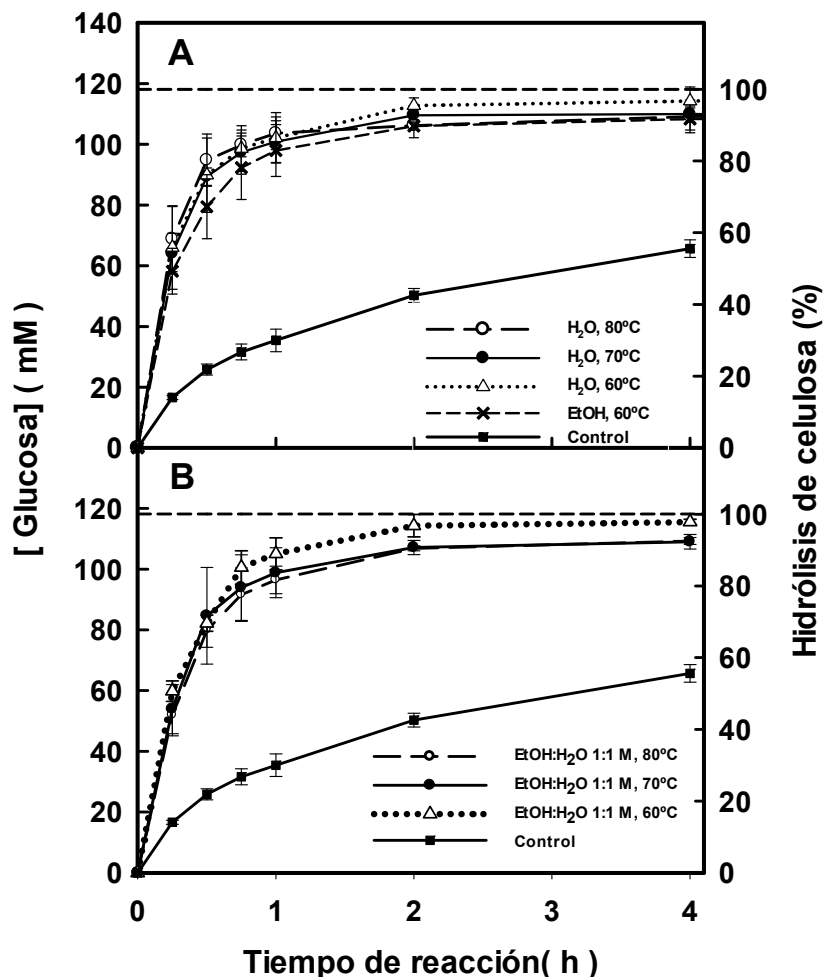


Figura 3.3. Perfil de hidrólisis y de producción de azúcares reductores por acción combinada de celulasas y celobiasas usando celulosa regenerada (CR) como sustrato. Las diferentes celulosas regeneradas se obtuvieron de disoluciones de celulosa al 2% en [Bmim][Cl], utilizando agua o etanol (A) o una solución etanol-agua 1:1(mol:mol) (B) como antisolventes a distintas temperaturas. La reacción control se realizó utilizando celulosa microcristalina como sustrato (para más detalles, consultar la sección de Materiales y Métodos).

La obtención de estos resultados puede ser directamente atribuida a la pérdida de cristalinidad y la interrupción de la organización de las fibras de celulosa, producida por el pretratamiento de disolución-precipitación, lo cual resultó en un sustrato más accesible para las enzimas (Grande y De María, 2012). Sin embargo, la completa hidrólisis enzimática de la CR a sus unidades monoméricas de glucosa sólo pudo

explicarse por el valor añadido obtenido gracias a la completa recuperación del [Bmim][Cl] durante el pretratamiento de celulosa.

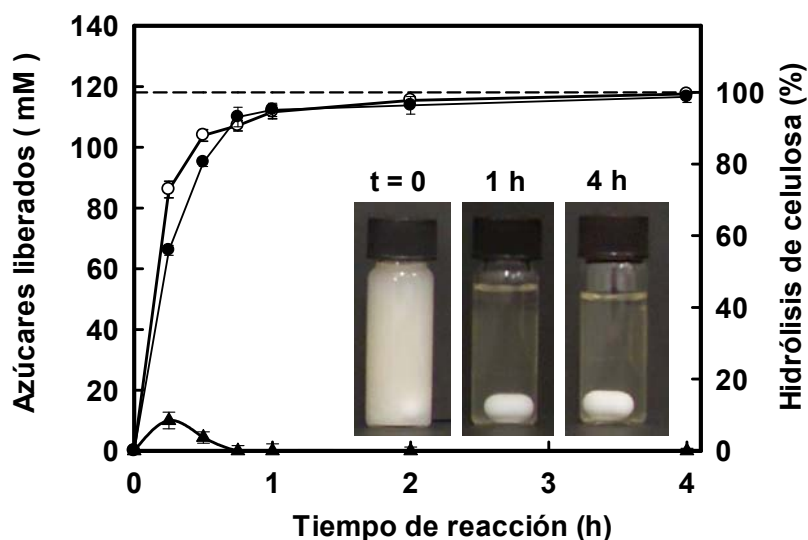


Figura 3.4. Perfiles de producción de azúcares reductores (O), glucosa (●) y celobiosa (▲), liberados por la acción combinada de celulosa y celobiasa, usando como sustrato celulosa regenerada (CR) proveniente de la precipitación con etanol/agua (Tabla 1, entrada 5).

En este contexto, es necesario destacar el efecto negativo de los ILs capaces de disolver celulosa, sobre la actividad enzimática de la celulasa, que ha sido descrito en numerosos trabajos (Turner *et al.*, 2003; Dadi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008, 2009; Kamiya *et al.*, 2008; Vitz *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Salvador *et al.*, 2010; Samayam y Schall, 2010; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Husson *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Ninomiya *et al.*, 2012). Para el caso tanto del [Bmim][Cl] (Salvador *et al.*, 2010) como del dimetilfosfato 1,3-dimetilimidazolio (Mmim) [DMP] (Engel *et al.*, 2010), se ha descrito la pérdida continua de la actividad de la celulasa con el aumento de concentración de IL en el medio de reacción, proporcionando una actividad residual de 35-45% para concentraciones de IL del 10% (v/v).

En su trabajo, Engel *et al.* (2010) describieron la reducción del grado de hidrólisis de celulosa por la presencia de IL residual (10% [Mmim][DMP]), proporcionando rendimientos de hidrólisis del 40-70% después de 24 h de reacción,

sin observar mejoría a mayor tiempo de hidrólisis (Engel *et al.*, 2010). El uso de sistemas "compatibles" IL-celulasa (15% [Emim][AcO]) para la hidrólisis enzimática de biomasa celulósica tampoco mejoró su conversión en glucosa y celobiosa, resultando en un rendimiento de hidrólisis del 40-50% durante las primeras 24h (Wang *et al.*, 2011). La presencia de moléculas residuales de IL unidas a la celulosa pudo disminuir la eficiencia de la celulasa para alcanzar la sacarificación completa del polímero.

Por lo tanto, la secuencia de lavados llevada a cabo con la celulosa regenerada descrita en este capítulo (Tabla 3.1) puede ser considerada una etapa ideal de acondicionamiento del sustrato para la hidrólisis enzimática, en lugar de un simple proceso de recuperación de IL. La celulosa regenerada sometida a sacarificación enzimática, deberá estar totalmente libre de IL residual para llegar a la plena transformación a unidades monoméricas de glucosa.

A pesar del gran interés por recuperar todo el IL utilizado en el acondicionamiento de celulosa para la hidrólisis enzimática, su reutilización en ciclos consecutivos de disolución / precipitación es un factor clave para la sostenibilidad económica de esta propuesta tecnológica para el procesamiento de biomasa. Así, el IL desplazado durante la precipitación con agua o la mezcla equimolar etanol-agua, (Tabla 3.1, entradas 3 y 5, respectivamente) fue recuperado y utilizado para la realización de ciclos consecutivos de producción de CR.

La idoneidad de las CRs resultantes de cada ciclo para ser hidrolizadas por la celulasa y la celobiasa se muestra en la Figura 3.5, donde se presenta los perfiles de la producción de azúcares reductores totales en función del tiempo.

Como puede verse, la reutilización y el reciclado de [Bmim][Cl] durante 5 ciclos de disolución-precipitación proporcionaron un excelente sustrato para la hidrólisis enzimática, alcanzado el máximo rendimiento de conversión (mayor que 96% para todos los casos) tras 4 h de reacción. La capacidad del [Bmim][Cl] para disolver la celulosa se mantuvo sin cambios durante los 5 ciclos, a pesar del ligero oscurecimiento en su el color, el cual pudo eliminarse mediante el uso de carbón activo.

La Figura 3.6 muestra el rendimiento de recuperación de [Bmim][Cl] tras cada ciclo de disolución/precipitación de celulosa con agua o la mezcla equimolar etanol-agua como antisolventes

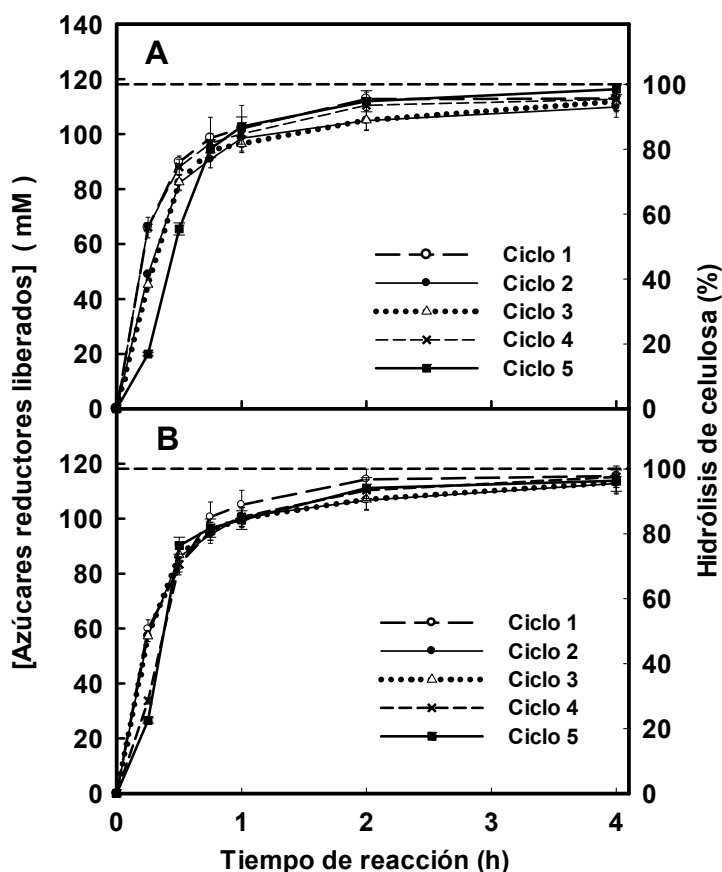


Figura 3.5. Perfil de hidrólisis y de producción de azúcares reductores por acción combinada de celulasa y celobiasa usando celulosa regenerada (CR) como sustrato. Las CRs se obtuvieron en ciclos consecutivos de recuperación y reciclado de [Bmim][Cl] a partir de la precipitación de celulosa mediante agua a 80°C (A), o una solución etanol:agua (1:1mol) a 60°C (B) como antisolventes.

La efectividad de la metodología propuesta para recuperar el IL se demuestra claramente por el excelente rendimiento de recuperación (superior a 93%) obtenido en todos los casos. La ligera disminución de IL recuperado, observada con el aumento en el número de ciclos, puede ser atribuida a errores manuales durante la manipulación de la gran cantidad de fracciones líquidas de lavado.

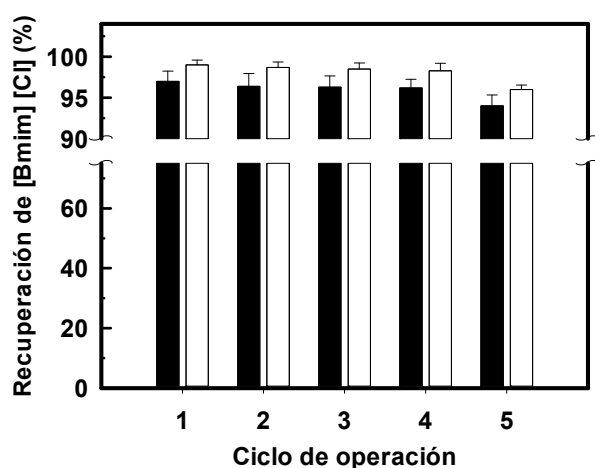
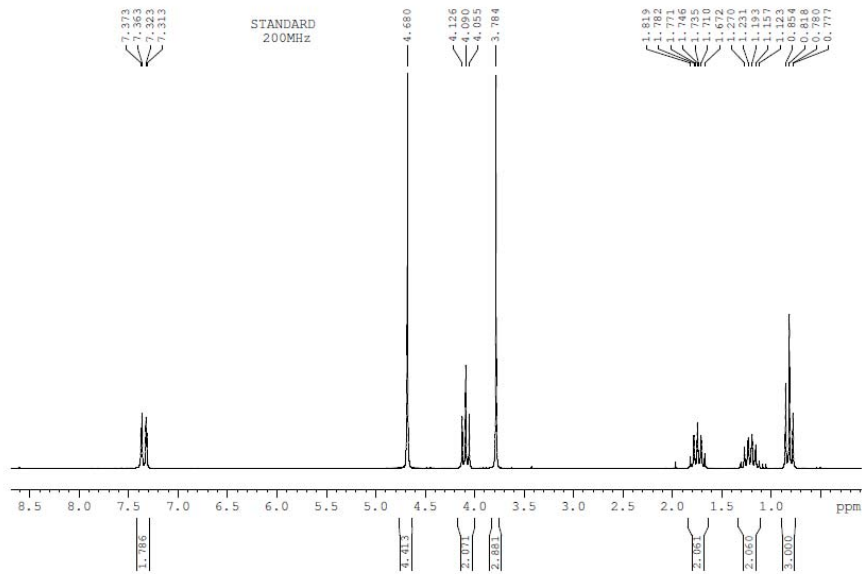


Figura 3.6. Rendimiento de recuperación de [Bmim][Cl] durante ciclos consecutivos de operación para la disolución-precipitación de celulosa utilizando agua (barras negras) o etanol-agua 1:1 mol (barras blancas) como antisolventes en la etapa de precipitación.

El análisis de $^1\text{H-RMN}$ realizado a 3 muestras de [Bmim][Cl], “[Bmim][Cl] estándar” (IL puro), “[Bmim][Cl] reutilizado” (IL después de 5 ciclos de regeneración/precipitación) y “[Bmim][Cl] reutilizado + carbón activo” (IL después de un proceso de limpieza mediante carbón activo) (Figura 3.7), no mostró ningún signo de descomposición y/o contaminación de productos secundarios con respecto al IL estándar. Como puede verse en la Figura 3.7, los 3 espectros presentan las mismas señales, notándose una pequeña señal adicional en el caso del “[Bmim][Cl] reutilizado” misma que se ve considerablemente reducida después del proceso de limpieza del IL mediante carbón activo. Además de esto, la desaparición del oscurecimiento del IL mediante la limpieza con carbón activo demostró la idoneidad del IL para un nuevo ciclo de disolución-precipitación de celulosa.

Finalmente se estudió la idoneidad de la solución de glucosa resultante de la hidrólisis enzimática de CR como fuente de carbono en el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. El medio YPD necesario para el crecimiento de la levadura se preparó añadiendo la cantidad correspondiente de extracto de levadura y peptona a una solución de glucosa al 2% (w/v) en citrato 5 mM, pH 4.8, previamente obtenida por hidrólisis enzimática de CR libre de IL (Materiales y métodos). Como control se preparó un medio YPD con una solución de glucosa comercial al 2% (w/v) en citrato 5mM, pH 4.8.

Muestra 1. [Bmim][Cl] estándar



Muestra 2. [Bmim][Cl] reutilizado

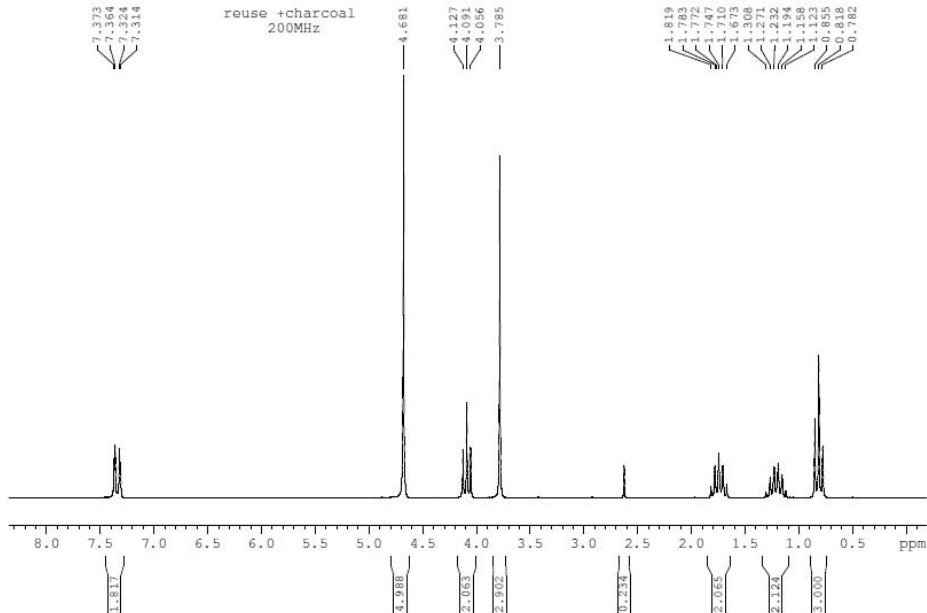


Figura 3.7. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de muestras de [Bmim][Cl] 10 mg/mL, realizadas en un equipo Bruker-AC-200E (200 MHz), utilizando D_2O como solvente. Muestra 1) [Bmim][Cl] estándar: LI puro; muestra 2) [Bmim][Cl] reutilizado: IL recuperado y reutilizado 5 veces siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos.

Muestra 3. [Bmim][Cl] reutilizado + carbón activo

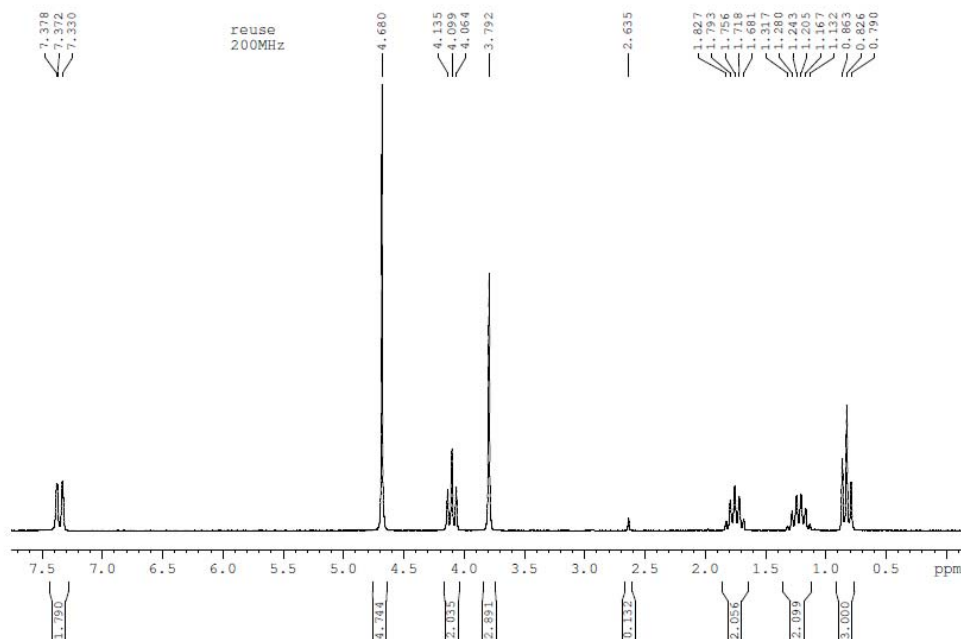


Figura 3.7 continuación. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de muestras de [Bmim][Cl] (10 mg/mL), realizadas en un equipo Bruker-AC-200E (200 MHz), utilizando D_2O como solvente. Muestra 3) [Bmim][Cl] reutilizado+ carbón activo: LI de la muestra 2 después de su limpieza con carbón activo a temperatura ambiente durante 48h.

La concentración utilizada de tampón de citrato en ambos cultivos fue 10 veces menor a la concentración habitual de los ensayos de actividad enzimática, ello para reducir al mínimo el papel de éste como fuente alternativa de carbono para la levadura en crecimiento. En ambos casos el pH del medio YPD fue ajustado a 6.5 antes de su esterilización e inoculación. La Figura 4.8 muestra el crecimiento aeróbico a 30°C de *Saccharomyces cerevisiae* en ambos medios YPD.

Como puede observarse en la Figura 4.8, los dos perfiles de crecimiento microbiano resultaron idénticos, lo que demostró la viabilidad como fuente de carbono de la solución de glucosa obtenida mediante hidrólisis enzimática de CR. Estos resultados pueden ser atribuidos a la ausencia de IL residual en la CR, proporcionando una solución final de glucosa tan efectiva como la preparada con glucosa comercial para la transformación microbiana. Algunos autores han descrito el efecto negativo del contenido residual de IL en medios de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, considerándolo como fuente de inhibición del crecimiento microbiano y de la producción de etanol. Cabe señalar que en estos trabajos la separación del IL de

los monosacáridos no condujo a la completa recuperación del IL. Por tanto, de acuerdo con el primer principio de la química verde (Anastas y Warner, 1998) relacionado con la prevención, es mejor (y más fácil) recuperar el IL contenido en la CR que tratar o limpiar la solución de glucosa resultante de la hidrólisis del polímero.

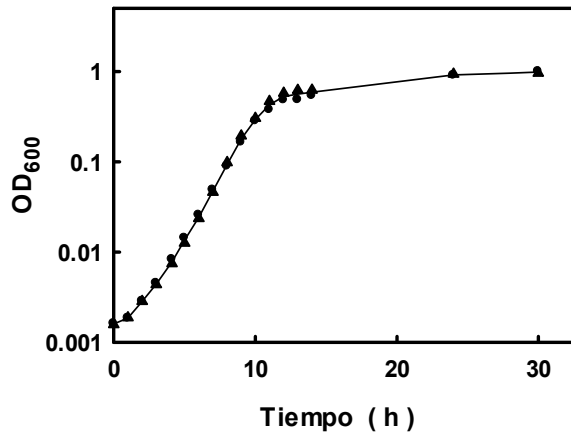


Figura 4.8. Crecimiento aeróbico de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD preparado en una solución de glucosa al 2% (W/v) a pH 6.5 y 30°C. La glucosa se obtuvo mediante hidrólisis enzimática de CR libre de IL (▲) y mediante proveedor comercial (●)

En conclusión, en este capítulo se demuestra cómo la efectividad de la tecnología de pretratamiento de biomasa mediante ILs, para proporcionar sustratos adecuados para la hidrólisis enzimática, se ve reforzada por la recuperación total del IL.

Mediante la combinación de antisolventes moleculares verdes, como el agua o el etanol, y el uso de ultrasonidos, pueden diseñarse protocolos eficientes para recuperar completamente el IL a partir de disoluciones de celulosa. Por otra parte, el IL puede ser purificado por simple destilación, antes de ser reutilizado en el procesamiento de biomasa.

Además de los beneficios económicos y ambientales proporcionados por la recuperación total del IL, también debe notarse la naturaleza idónea de la celulosa amorfa obtenida para su completa hidrólisis enzimática. Estudios posteriores en reactores enzimáticos de membrana deberán llevarse a cabo para determinar las mejores condiciones en cuanto a cantidad de mezcla enzimática, así como el tipo de sustrato más adecuado para la producción continua de glucosa a partir de biomasa

pretratada. Una vez más, la tecnología de los IL aparece como un potenciador de la tecnología de enzimática para el desarrollo de bioprocesos químicos verdes.

3.5. Referencias

- Abbott, A.P., Bell, T.J., Stoddart, B., 2005. O-Acetylation of cellulose and monosaccharides using a zinc based ionic liquid. *Green Chem.* 7, 705–707.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–85.
- Alonso, D.M., Bond, J.Q., Dumesic, J. A., 2010. Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chem.* 12, 1493.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–61.
- Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. *Green Chem.: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York.
- Baker, G. a., Heller, W.T., 2009. Small-angle neutron scattering studies of model protein denaturation in aqueous solutions of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Chem. Eng. J.* 147, 6–12.
- Bose, S., Armstrong, D.W., Petrich, J.W., 2010. Enzyme-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquids: a green approach toward the production of biofuels. *J. Phys. Chem. B* 114, 8221–8227.
- Bose, S., Barnes, C.A., Petrich, J.W., 2012. Enhanced Stability and Activity of Cellulase in an Ionic Liquid and the Effect of Pretreatment on Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 434–443.
- Cho, C.-W., Pham, T.P.T., Jeon, Y.-C., Vijayaraghavan, K., Choe, W.-S., Yun, Y.-S., 2007. Toxicity of imidazolium salt with anion bromide to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*: effect of alkyl-chain length. *Chemosphere* 69, 1003–7.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., 2006. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 904–910.
- Domínguez de María, P., Maugeri, Z., 2011. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 220–5.

- Engel, P., Mladenov, R., Wulfhorst, H., Jäger, G., Spiess, A.C., 2010. Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose. *Green Chem.* 12, 1959.
- Feng, D., Li, L., Yang, F., Tan, W., Zhao, G., Zou, H., Xian, M., Zhang, Y., 2011. Separation of ionic liquid [Mmim][DMP] and glucose from enzymatic hydrolysis mixture of cellulose using alumina column chromatography. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 91, 399–405.
- Ferreira, A.R.F.C., Figueiredo, A.B., Evtuguin, D. V., Saraiva, J. a., 2011. High pressure pre-treatments promote higher rate and degree of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Green Chem.* 13, 2764.
- Fort, D. a., Remsing, R.C., Swatloski, R.P., Moyna, P., Moyna, G., Rogers, R.D., 2007. Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 9, 63.
- Grande, P.M., De María, P.D., 2012. Enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in concentrated seawater. *Bioresour. Technol.* 104, 799–802.
- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S., Yang, G., Jönsson, L.J., 2012. *Bioresour. Technol.* Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresour. Technol.* 104, 503–508.
- Husson, E., Buchoux, S., Avondo, C., Cailleu, D., Djellab, K., Gosselin, I., Wattraint, O., Sarazin, C., 2011. Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses: contribution of CP-MAS ¹³C NMR and SEM. *Bioresour. Technol.* 102, 7335–7342.
- Imai, M., Ikari, K., Suzuki, I., 2004. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochem. Eng. J.* 17, 79–83.
- Kamiya, N., Matsushita, Y., Hanaki, M., Nakashima, K., Narita, M., Goto, M., Takahashi, H., 2008. Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media. *Biotechnol. Lett.* 30, 1037–40.
- Lee, I., Evans, B.R., Lane, L.M., Woodward, J., 1996. Substrate-enzyme interactions in cellulase systems. *Bioresour. Technol.* 58, 163–169.
- Lindman, B., Karlström, G., Stigsson, L., 2010. On the mechanism of dissolution of cellulose. *J. Mol. Liq.* 156, 76–81.
- Lozano, P., 2010. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.* 12, 555–569.
- Lozano, P., Bernal, B., Bernal, J.M., Pucheault, M., Vaultier, M., 2011. Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 13, 1406–1410.

- Lozano, P., Garcia-Verdugo, E., V. Luis, S., Pucheault, M., Vaultier, M., 2011. (Bio)Catalytic Continuous Flow Processes in scCO₂ and/or ILs: Towards Sustainable (Bio)Catalytic Synthetic Platforms. *Curr. Org. Synth.* 8, 810–823.
- Mansfield, S., Mooney, C., Saddler, J., 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15, 804–816.
- Nakashima, K., Yamaguchi, K., Taniguchi, N., Arai, S., Yamada, R., Katahira, S., Ishida, N., Takahashi, H., Ogino, C., Kondo, A., 2011. Direct bioethanol production from cellulose by the combination of cellulase-displaying yeast and ionic liquid pretreatment. *Green Chem.* 13, 2948.
- Ninomiya, K., Kamide, K., Takahashi, K., Shimizu, N., 2012. Enhanced enzymatic saccharification of kenaf powder after ultrasonic pretreatment in ionic liquids at room temperature. *Bioresour. Technol.* 103, 259–265.
- Ouellet, M., Datta, S., Dibble, D.C., Tamrakar, P.R., Benke, P.I., Li, C., Singh, S., Sale, K.L., Adams, P.D., Keasling, J.D., Simmons, B. a., Holmes, B.M., Mukhopadhyay, A., 2011. Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production. *Green Chem.* 13, 2743.
- Rose, M., Palkovits, R., 2012. Isosorbide as a renewable platform chemical for versatile applications-quo vadis? *ChemSusChem* 5, 167–76.
- Salvador, Â.C., Santos, M.D.C., Saraiva, J. a., 2010. Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase. *Green Chem.* 12, 632–635.
- Samayam, I.P., Schall, C. a, 2010. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. *Bioresour. Technol.* 101, 3561–3566.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* 37, 19–27.
- Sheldon, R. a, 2012. Fundamentals of Green Chem.: efficiency in reaction design. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1437–1451.
- Shill, K., Padmanabhan, S., Xin, Q., Prausnitz, J.M., Clark, D.S., Blanch, H.W., 2011. Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 511–520.
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., Taylor, M., 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.* 101, 1570–1580.
- Smiglak, M., Reichert, W.M., Holbrey, J.D., Wilkes, J.S., Sun, L., Thrasher, J.S., Kirichenko, K., Singh, S., Katritzky, A.R., Rogers, R.D., 2006. Combustible ionic liquids by design: is laboratory safety another ionic liquid myth? *Chem. Commun. (Camb.)* 2554–6.
- Stepnowski, P., Nichthauser, J., Mroziak, W., Buszewski, B., 2006. Usefulness of pi...pi aromatic interactions in the selective separation and analysis of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1483–91.

- Sukharnikov, L.O., Cantwell, B.J., Podar, M., Zhulin, I.B., 2011. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends Biotechnol.* 29, 473–9.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2002. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4974–4975.
- Thomas, M.F., Li, L.-L., Handley-Pendleton, J.M., Van der Lelie, D., Dunn, J.J., Wishart, J.F., 2011. Enzyme activity in dialkyl phosphate ionic liquids. *Bioresour. Technol.* 102, 11200–11203.
- Torrecilla, J.S., García, J., Rojo, E., Rodríguez, F., 2009. Estimation of toxicity of ionic liquids in Leukemia Rat Cell Line and Acetylcholinesterase enzyme by principal component analysis, neural networks and multiple lineal regressions. *J. Hazard. Mater.* 164, 182–94.
- Turner, M.B., Spear, S.K., Huddleston, J.G., Holbrey, J.D., Rogers, R.D., 2003. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* 5, 443.
- Vitz, J., Erdmenger, T., Haensch, C., Schubert, U.S., 2009. Extended dissolution studies of cellulose in imidazolium based ionic liquids. *Green Chem.* 11, 417.
- Wang, Y., Radosevich, M., Hayes, D., Labbé, N., 2011. Compatible ionic liquid-cellulases system for hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1042–8.
- Yang, F., Li, L., Li, Q., Tan, W., Liu, W., Xian, M., 2010. Enhancement of enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media by ultrasonic intensification. *Carbohydr. Polym.* 81, 311–316.
- Zakrzewska, M.E., Bogel-Łukasik, E., Bogel-Łukasik, R., 2010. Solubility of Carbohydrates in Ionic Liquids. *Energy Fuels* 24, 737–745.
- Zhang, T., Datta, S., Eichler, J., Ivanova, N., Axen, S.D., Kerfeld, C. a., Chen, F., Kyrpides, N., Hugenholtz, P., Cheng, J.-F., Sale, K.L., Simmons, B., Rubin, E., 2011. Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance. *Green Chem.* 13, 2083.
- Zhao, H., Baker, G. a., Song, Z., Olubajo, O., Crittle, T., Peters, D., 2008. Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem.* 10, 696.
- Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G. a, Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N., 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139, 47–54.
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chem.* 8, 325–327.

**Capítulo 4. Reactor enzimático de membrana para la
sacarificación de celulosa**

4.1. Resumen

El presente capítulo propone un proceso sostenible para la sacarificación enzimática de celulosa en un reactor de membrana, operando comparativamente en modo continuo y discontinuo. La hidrólisis enzimática de la celulosa pretratada con cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim][Cl]) mostró un excelente rendimiento de hidrólisis (95% en 4h) para una suspensión de celulosa regenerada (60mL, 2 g/L) en operación discontinua utilizando un caudal de recirculación de 120 mL/min. La operación en modo discontinuo se realizó en un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial, equipado con membranas de polietersulfona y límite de exclusión de 5 y 10 kDa, observándose un perfil de concentración para los productos de hidrólisis idéntico al obtenido sobre un volumen de reacción 4 veces inferior, lo que demuestra la ausencia de limitaciones difusionales externas por el uso de un adecuado caudal de recirculación. Además, tras la separación de la glucosa resultante mediante filtración tangencial, las enzimas retenidas por la membrana fueron utilizadas durante 9 ciclos operacionales consecutivos, sin pérdida de actividad catalítica ni eficacia de filtrado. Además, también se realizaron ensayos en modo continuo utilizando un sistema de ultrafiltración tangencial equipado con membranas cerámicas de alúmina (5 kDa), estudiándose la influencia de la concentración de sustrato, y del tiempo de residencia, observándose un incremento en la concentración de producto con el incremento del tiempo de residencia, así como una excelente eficacia de filtración sin observarse ningún tipo de colmatación de la membrana. Estos resultados mostraron que la sacarificación enzimática de celulosa regenerada en un reactor de membrana permite una eficaz acción catalítica de las enzimas, así como su reutilización operando en modo discontinuo y/o continuo, sin pérdida aparente de actividad con el tiempo de operación.

4.2. Introducción

Actualmente, se están realizando intensas investigaciones para el desarrollo de procesos rentables y limpios de sacarificación enzimática de celulosa, el biopolímero más abundante de la Tierra. En este contexto, la hidrólisis enzimática de la celulosa resulta ventajosa comparada con la hidrólisis química, mediante ácidos y/o bases, ya que la gran especificidad de las celulasas (endoglucanasas y exoglucanasas) permite la obtención de glucosa con la máxima selectividad posible y evita su transformación inespecífica en subproductos indeseados, que además de disminuir los rendimientos de producción, también suelen ser inhibidores del proceso de fermentación microbiana para producir etanol (Agbor *et al.*, 2011). Sin embargo, la baja velocidad de la hidrólisis enzimática observada es atribuida tanto a la alta cristalinidad de la celulosa, como a la inhibición de las celulasas por el producto celobiosa, lo que supone un importante obstáculo para la incorporación de las enzimas en los procesos de producción industrial de bioetanol celulósico (Gan *et al.*, 2002).

Con el fin de mejorar la velocidad de hidrólisis enzimática y el rendimiento de la sacarificación de la celulosa, se han adoptado diversas estrategias: pretratamiento de la celulosa para romper la estructura cristalina de la celulosa, la adición de NaOH al medio de reacción como facilitador de la despolimerización (Liu *et al.*, 2011), el uso de agua de mar concentrada como medio de reacción para romper la cristalinidad de la celulosa (Grande y De María, 2012) o la mejora de las propiedades catalíticas de la celulasas mediante técnicas de ingeniería genética (Zhang *et al.*, 2006).

Entre los numerosos métodos de pretratamiento desarrollados (explosión por vapor, AFEX, organosolv, etc), el uso de ciertos líquidos iónicos (*i.e.* [Bmim,Cl], [Amim][Cl] etc.) para la disolución de la celulosa y su re-precipitación por adición de antisolventes han atraído especial interés (Zhu *et al.*, 2006). Las bajas presiones de vapor así como la estabilidad térmica y química de los líquidos iónicos, los hace óptimos para procesos limpios y sostenibles.

Además de la cristalinidad de la celulosa, la inhibición por producto causada por la celobiosa también limita la sacarificación de la celulosa. Esta limitación se puede aliviar mediante la acción combinada de dos estrategias: 1) adición de celobiasa al medio de reacción para la transformación de celobiosa en glucosa, y 2) retirada del producto por ultrafiltración de los azúcares en reactores de membrana. En este sentido,

las naturaleza del sustrato y su pretratamiento, el material de la membrana y modo operacional son aspectos de la máxima relevancia para conseguir una eficaz separación del producto y la completa recuperación de las enzimas para su reutilización, un aspecto de enorme importancia para reducir los costes del proceso (Rios *et al.*, 2004, 2997)

La extensa investigación llevada a cabo en reactores de membrana ha puesto de manifiesto que la velocidad de hidrólisis está limitada no sólo por la retroinhibición por producto, sino también por otros factores como la disminución de la cantidad de enzima adsorbida al sustrato y la transformación de la celulosa en una forma menos digerible (Yang *et al.*, 2006). Así, el desarrollo de un proceso eficiente de sacarificación enzimática de celulosa deberá contemplar tanto el diseño óptimo de un reactor que facilite la acción catalítica de las enzimas como la utilización de un sustrato altamente susceptible a la hidrólisis enzimática, obtenido a partir de un pretratamiento limpio y eficaz.

El objetivo de este capítulo ha sido la puesta en marcha de distintos modos de operación de un reactor enzimático de membrana para el procesamiento limpio y sostenible de celulosa regenerada, analizando la influencia de diferentes parámetros de operación tales como la concentración de enzimas y su relación, concentración de sustrato y el tiempo de residencia.

Se realizaron diferentes ensayos en modos de operación continuo y discontinuo para lograr la sacarificación total de celulosa regenerada (CR), mediante reprecipitación de celulosa disuelta en el líquido iónico 1-butil-3-metilimidazolio cloruro ([Bmim][Cl]), tal como se describe en el capítulo 3. La efectividad y la naturaleza limpia de este pretratamiento quedó demostrada en el capítulo anterior (Lozano *et al.*, 2012) describiendo el incremento de la velocidad inicial de reacción y una adecuación excelente para la hidrólisis enzimática de la celulosa, con una conversión total a glucosa en tan sólo 4h.

Para la realización los ensayos en discontinuo de la hidrólisis enzimática de celulosa regenerada se emplearon membranas de ultrafiltración de polietersulfona (PES), con límites de exclusión de 5 y 10 kDa respectivamente. Al igual que las demás membranas de naturaleza polisulfona (bisfenol-A polisulfona (PSF), tetrametil bisfenol-A polisulfona (TM-PSF), las membranas de PES poseen una gran resistencia térmica y

química combinada con una excelente estabilidad mecánica en ambientes calientes y húmedos (Kim y Kim, 2005). Además de estas propiedades, las membranas de PES han demostrado un buen rendimiento a largo plazo a altas temperaturas, lo que las hace ideales para ensayos prolongados. Para los ensayos en continuo la separación de producto y recuperación de las enzimas se realizó mediante una membrana cerámica de ultrafiltración cuya naturaleza inerte y capacidad para operar mayores presiones y caudales que las membranas poliméricas las ha hecho interesantes para aplicaciones industriales. La evaluación de la eficiencia del proceso empleado se determinó a partir la evaluación del rendimiento global de cada reactor así como por su capacidad de evitar problemas de colmatación de las membranas.

En este capítulo se estudia por primera vez la adecuación de dos tipos reactores de membrana, basados en membranas de naturaleza polimérica y cerámica, respectivamente, para la realización de la sacarificación enzimática de celulosa, en modos de operación continuo y discontinuo. En este capítulo se demuestra la excelente viabilidad operacional de la estrategia en base a la reutilización total de la enzima empleada, sin pérdida aparente de actividad catalítica con los ciclos de operación, así como el mantenimiento constante de los flujos de la disolución de glucosa resultante con el tiempo de operación.

4.3. Materiales y Métodos

La celulasa de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5 L, EC 3.2.1.4) y la celobiasa de *Aspergillus niger* (Novozyme 188, beta-1,4-glucosidasa, EC 3.2.1.21) fueron un regalo de Novozymes S.A (España). El módulo de membrana de PES (Vivaflow50) fue suministrado por Sartorius (España). La membrana cerámica con geometría tubular con tres canales fue suministrada por Tami Industries (Francia). La celulosa microcristalina (en polvo, 20 µm) y otros productos químicos fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka (España). El líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio cloruro, [Bmim][Cl], (99% de pureza) fue suministrado por IoLiTec GmbH (Alemania).

▪ **Diafiltración de enzimas**

Previamente a su uso, las preparaciones de enzimas fueron ultrafiltradas, para eliminar todos los aditivos de bajo peso molecular, de la siguiente manera: 25 ml de Celluclast o Novozyme 188 se diluyeron en 225 ml de tampón citrato 50 mM, pH 4,8, y las disoluciones resultantes se concentraron 10 veces por ultrafiltración a 8 °C, utilizando un sistema Vivaflow 50 (Sartorius) equipado con membranas de polisulfona (10 kDa de límite de exclusión). Para cada enzima, el proceso se repitió tres veces, resultando en una disolución de celulasa de 154.9 U mg ml⁻¹ de concentración de proteína con actividad específica de 0.162 U mg proteína⁻¹, y una solución de celobiasa de 128.6 mg ml⁻¹ de concentración de proteína con actividad específica de 1.329 U mg de proteína⁻¹.

▪ **Preparación de celulosa regenerada**

Los protocolos de disolución y regeneración de celulosa con [Bmim][Cl] han sido descritos en el capítulo 3 (Lozano *et al.*, 2012).

▪ **Operación con el reactor de membrana en modo discontinuo**

El diseño del reactor utilizado para realizar la sacarificación de celulosa en modo discontinuo se muestra en la Figura 4.1. El sistema consistió en reactor tanque discontinuo (100 mL capacidad) conectado mediante una bomba de recirculación a una unidad de ultrafiltración (Vivaflow 50) equipada con membranas de polietersulfona (PES, límite de exclusión: 5 o 10 KDa, área de filtración: 50 cm².) En todos los casos, los ensayos se iniciaron adicionando al reactor 60 mL de una suspensión de celulosa regenerada (2 g/L) con el correspondiente volumen de enzimas para disponer de una concentración, equivalente a los ensayos realizados en el capítulo 3, a saber celulasa (38 U/g celulosa) y de celobiasa (128 U/g celulosa). La mezcla de reacción se mantuvo en recirculación constante (120 mL/min) a 50 °C y sin aplicar presión transmembrana, lo que resultó en un caudal de filtrado nulo durante dicho periodo. Transcurridas las 4 horas de ésta etapa catalítica, el sistema se presurizó a 1.2 bar durante 20 min, y manteniendo el caudal de recirculación, permitiendo la recogida de la disolución de glucosa resultante a través del canal de filtrado del sistema mediante filtración tangencial. En todos los casos, el volumen total recogido fue de 40 mL, y se inició un

nuevo ciclo de hidrólisis mediante la adición del mismo volumen de una suspensión de sustrato fresco en tampón citrato 50 mM, pH 4.8. A lo largo de cada ciclo catalítico, se tomaron las correspondientes muestras del reactor para su análisis de la actividad enzimática y del contenido en azúcares por un método colorimétrico y por HPLC.

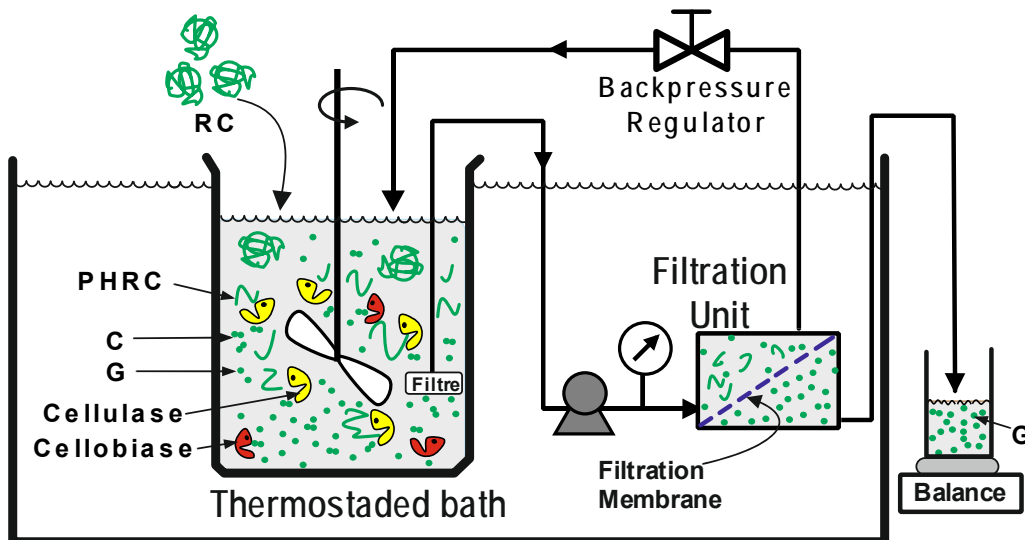


Figura 4.1 Representación esquemática de un reactor discontinuo de membrana PES para la hidrólisis enzimática de celulosa regenerada (RC).

▪ Operación con el reactor de membrana en modo continuo

La Figura 4.2 muestra un esquema del reactor utilizado para realizar la sacarificación de celulosa en modo continuo. El sistema consistió en reactor tanque (1 L de capacidad) y cierre hermético, conectado mediante una bomba de recirculación a una unidad de ultrafiltración. Dicha unidad contenía una membrana cerámica (5 kDa de límite de exclusión y un área de 76 cm²) de morfología tubular.

Los ensayos se realizaron adicionando al reactor, bien 200 mL de una suspensión de celulosa regenerada (0.8 ó 1.2 g/L), o bien 500 mL de una suspensión de celulosa regenerada (1.6 ó 1.2 g/L), con el correspondiente volumen de enzimas para disponer de una concentración final, equivalente a los ensayos realizados en el capítulo 3, a saber celulasa (38 U/g celulosa) y de celobiasa (128 U/g celulosa). Las mezclas de reacción se mantuvieron en recirculación constante (215 mL/min) a 50 °C durante 1.5 h (cuando el volumen del reactor era de 200 mL) ó 2 h (cuando el volumen del reactor era de 500 mL), tiempo necesario para que el sistema alcanzara el estado estacionario en cada caso. Transcurrido dicho periodo, se aplicó una presión

transmembrar de 0.1 bar mediante el cierre parcial de la válvula de recirculación, que provocó la consecuente salida del producto por el canal de filtrado. El reactor se mantuvo en operación continua durante un periodo equivalente al tiempo de residencia, cuantificándose el caudal de filtrado mediante la incorporación de una balanza continua en el tanque de recogida de sustrato. Este hecho permitió alimentar manualmente al sistema, en intervalos de 2 minutos, con una suspensión de sustrato fresco a un caudal idéntico al caudal de filtrado cuantificado por la balanza. A lo largo de cada periodo de operación en continuo, se tomaron las correspondientes muestras del reactor para el análisis de la actividad enzimática, y del contenido en azúcares por un método colorimétrico y por HPLC.

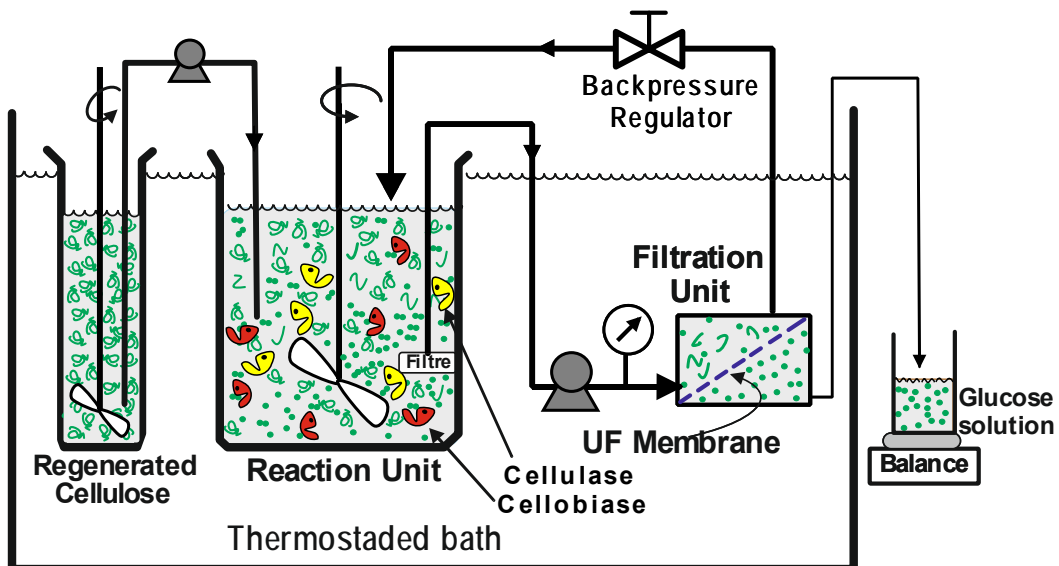


Figura 4.2. Representación esquemática de un reactor continuo de membrana de alúmina para hidrólisis de celulosa regenerada (RC).

▪ Hidrólisis enzimática de celulosa regenerada

Las reacciones de hidrólisis se realizaron a 50°C en tampón citrato 50 mM, pH 4,8, mediante la acción combinada de celulasa de *Trichoderma reesei* (38 U/g de celulosa) y celobiasa de *Aspergillus niger* (128 U/ g de celulosa). Se extrajeron alícuotas del medio de reacción a intervalos regulares de tiempo y se diluyeron en tampón bicarbonato 0,01 M, pH 9,8 para detener la reacción. Todas las muestras fueron analizadas por HPLC y por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

- **Análisis por HPLC**

-

Las concentraciones de glucosa y celobiosa se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), usando una columna Rezex RCM-monosacárido-Ca⁺² como fase estacionaria, y agua a 60°C como fase móvil. Las condiciones de análisis han sido descritas previamente en capítulo 3 (Lozano *et al.*, 2012).

- **Retención de enzimas por las membranas de ultrafiltración**

La retención de la celulasa y la celobiasa por las membranas se determinó mediante ensayos de ultrafiltración. Una solución de celulasa (2.87% v/v) y otra de celobiosa (1.4% v/v), ambas preparadas en tampón citrato 50 mM, pH 4.8, se ultrafiltraron en el reactor de membrana correspondiente aplicando un gradiente de presión (0.8 y 1 bar para la membrana cerámica y PES, respectivamente). La ultrafiltración se llevó a cabo durante 2h a la misma temperatura que los ensayos de hidrólisis (50°C), reciclando el permeado a la unidad de reacción. Se tomaron muestras de retenido y permeado cada 30 min para determinar las unidades de actividad de celulasa o celobiasa presentes en cada fracción (determinadas mediante ensayos de actividad).

- **Ensayos de actividad en retenido y permeado**

Actividad celulasa

Se añadió celulosa regenerada a 1 ml de retenido o permeado, manteniendo una concentración del 2 g/L con respecto al volumen de reacción. Se dejó transcurrir la reacción a 50°C en agitación continua durante 2h. Se tomaron muestras de 65 µl en momentos seleccionados y se diluyeron en tampón bicarbonato 10 mM, pH 9.8 para detener la reacción. Una vez detenida la reacción, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 13000 rpm. Se usó un volumen de 500 µl de los sobrenadantes para determinar la concentración de azúcares reductores mediante el método del DNS. La actividad enzimática se determinó a partir de la velocidad inicial de hidrólisis de celulosa. Una unidad de actividad celulasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de azúcares reductores por minuto.

Actividad celobiasa

Se transfirió un volumen de 100µl de retenido o permeado a 900 µl de tampón citrato 50 mM, pH 4,8 conteniendo 20 mg de celobiosa en disolución. Se dejó transcurrir la reacción a 50°C en agitación continua durante 2h Se tomaron muestras de 30 µl en momentos seleccionados durante 2h y se transfirieron a un volumen de 470 µl de tampón bicarbonato 10 mM, pH 9,8 para detener la reacción. Los extremos reductores producidos se cuantificaron mediante el método del DNS. La actividad enzimática se determinó a partir de la velocidad inicial de hidrólisis de celobiosa. Una unidad de celobiasa se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de celobiosa por minuto.

▪ **Cálculos**

Se calculó la capacidad de retención de todas las membranas con las fórmulas siguientes:

$$E_R (\%) = \left(\frac{A_R}{A_R + A_P} \right) \times 100 \quad (1)$$

donde

E_R =retención de enzima (%)

A_P = la actividad detectada en el permeado (U) y

A_R =la actividad detectada en el retenido (U).

El porcentaje de hidrólisis de celulosa se calculó como sigue:

$$Hidrolisis (\%) = \frac{\text{concn de glucosa}}{\frac{\text{concn de glucosa}}{\text{volumen}} \times 1000} \times 100 \quad (2)$$

donde:

Conc. de glucosa= concentración de glucosa (mM)

V_R = volumen de reacción (L)

4.4. Resultados y discusión

El procesamiento de celulosa mediante ILs como el [Bmim][Cl] ha demostrado ser un medio eficaz para eliminar la alta cristalinidad del polímero y proveer de una mayor área superficial para la adsorción de la enzima, reflejándose en altas velocidades iniciales de reacción y excelentes rendimientos de hidrólisis enzimática a tiempos cortos de residencia (97.7% a 50°C en 4h de reacción) (Lozano *et al.*, 2012). Si bien la completa recuperación y el reutilización del líquido iónico es un factor clave en el desarrollo de un proceso sostenible para la producción de celulosa susceptible a la degradación enzimática, la sostenibilidad de dicho proceso debe considerar igualmente la recuperación y reutilización del biocatalizador. Así el diseño de un reactor que favorezca la completa hidrólisis enzimática de celulosa, a la vez que posibilite la separación del producto y permita la total retención del biocatalizador para su reutilización en ciclos consecutivos de hidrólisis o en la producción en continuo de azúcares fermentables, es uno de los mayores retos en el escalamiento de reactores enzimáticos para la hidrólisis de celulosa.

Dos reactores de membrana de flujo tangencial constituidos por una unidad de reacción y una unidad de separación de ultrafiltración (Figuras 4.1 y 4.2), fueron diseñados para llevar a cabo la sacarificación de celulosa así como para separar el producto y retener el biocatalizador. La unidad de separación de uno de los reactores consistió en un cartucho de separación Vivaflow 50, con membrana de polietersulfona (PES). Dos membranas de PES con límites de exclusión de 5 kDa y 10 kDa fueron ensayadas (Figura 4.1). Para el caso del segundo reactor, la unidad de separación consistió en módulo tubular con membrana de alúmina de 5 kDa (Figura 4.2). Los límites de exclusión de las membranas se escogieron considerando el peso molecular de la celobiasa (91 kDa, según el proveedor) y el de la menor de las enzimas presentes en el complejo de la celulasa (20 kDa), según (Enari & Niku-Paavola, 1987).

Previamente a los ensayos de hidrólisis de celulosa, la capacidad de retención de cada membrana fue determinada mediante recirculación (2h), con gradiente de presión (0.8-1 bar), de disoluciones de celulosa (2.87% v/v) y celobiasa (1.435% v/v), preparadas de forma separada, en tampón citrato 50 mM, pH 4.8. Las condiciones de operación (temperatura, flujo de permeado, agitación) de estos ensayos simulaban aquellas de los ensayos de hidrólisis enzimática. Cada media hora se tomaron muestras de permeado y retenido para realizar ensayos de actividad enzimática

(Materiales y métodos), determinando la retención de las enzimas (Tabla 4.1) mediante la fórmula 1 descrita en la sección Materiales y métodos.

Como puede verse en la Tabla 4.1, los valores de retención obtenidos para cada enzima fueron superiores al 96%, para todas las membranas, demostrando su excelente idoneidad para retener ambas enzimas (celulasa y celobiasa), y permitir su reutilización en un sistema operacional para la sacarificación de celulosa. Si bien la efectividad de otras membranas poliméricas (*i.e.* de poliamida, polisulfónicas) para retener las enzimas celulolíticas ha sido también descrita en otros estudios (Ohlson *et al.*, 1984; Gan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010), poco se sabe sobre las membranas cerámicas en esta aplicación. La capacidad ligeramente mayor, observada en este estudio, de las membranas PES sobre la membrana cerámica podría deberse a una mayor heterogeneidad en la distribución de los tamaños de poro de esta última. (Rios *et al* 2007).

Tabla 4.1. Capacidad de retención de diferentes membranas de UF bajo condiciones de hidrólisis enzimática

Enzima	Material/Límite de exclusión	Retención de Enzima ² (%)
Complejo celulasa (Celluclast 1.5 L)	PES ¹ / 10 kDa	99.8 ± 0.2
	PES / 5 kDa	100 ± 0.1
	Alúmina / 5 kDa	98.1 ± 0.3
Celobiasa (Novozym 188)	PES / 10 kDa	96.4 ± 0.5
	PES / 5 kDa	97.4 ± 0.4
	Alúmina / 5 kDa	96.5 ± 0.3

¹ Polietersulfona

² Determinada mediante ensayos de actividad realizados en las fracciones de retenido y permeado. Ver la sección de Materiales y métodos.

Habiendo comprobado la capacidad de retención enzimática de las membranas, el siguiente paso consistió en un primer ensayo de hidrólisis de celulosa en discontinuo (batch). El ensayo consistió en la sacarificación de celulosa regenerada (preparada según el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos) para un volumen de reacción total de 60 mL. Tras 2 h de hidrólisis de celulosa, el medio de reacción comenzó a recircularse a un flujo de 120 mL/min con gradiente de presión de 1.2 bar, pasando a través de un módulo de ultrafiltración Vivaflow equipado con membranas de PES de 5 kDa, y retornando el permeado al medio de reacción. La figura 4.3 muestra los perfiles de producción de azúcares en función del tiempo por

acción combinada de celulasa y celobiasa. Como puede verse, la hidrólisis de celulosa alcanzó un rendimiento de 95% de transformación de celulosa a glucosa tras 4h de reacción, valor próximo al obtenido en la sacarificación de celulosa regenerada en viales de 5 ml, descritos en el capítulo 3 (Figura 3.4) (Lozano *et al.*, 2012). Al igual que en el perfil de hidrólisis de la Figura 3.4, la sacarificación de celulosa en discontinuo describió una rápida cinética de hidrólisis inicial seguida de una caída en la velocidad de producción de azúcares hasta lograr un estado estacionario a las 2h de reacción, observándose un aspecto traslúcido del medio de reacción. Dichos resultados muestran la idoneidad tanto del sustrato como de las condiciones de operación del reactor para llevar a cabo la completa sacarificación de celulosa regenerada a mayores volúmenes de reacción. En este sentido, la identidad entre los perfiles de reacción observados entre los ensayos realizados para un volumen de reacción de 4 mL (Fig 3.4) y los obtenidos para un volumen 15 veces superior (Fig. 4.3) demuestra la idoneidad del caudal de recirculación empleado, que es capaz de eliminar las posibles limitaciones difusionales externas, características en los reactores con bajo caudal de recirculación (Lozano *et al.* 1987, 1990).

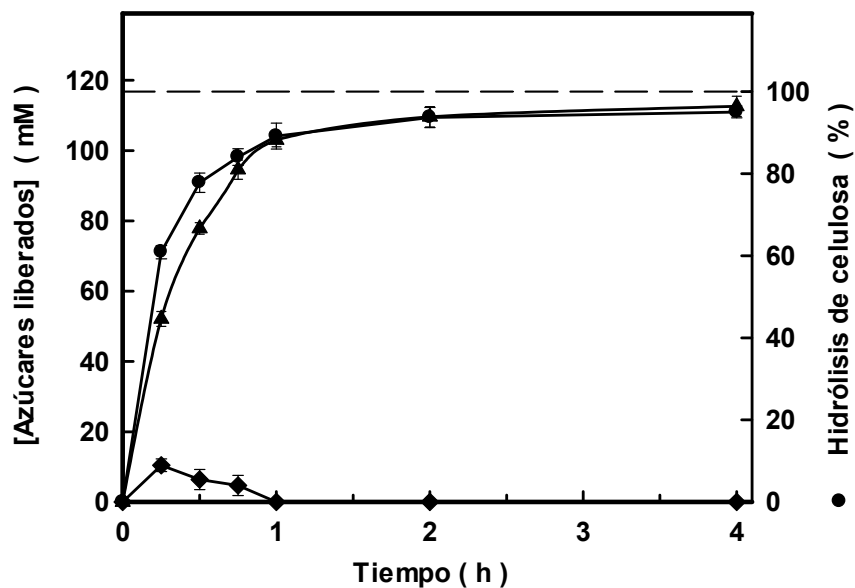


Figura 4.3. Perfiles de producción de azúcares reductores (●), glucosa (▲) y celobiosa (◆) liberados a partir de celulosa regenerada (2 g/L) por la acción combinada de celulasa (38 U/g celulosa) y celobiasa (128 U/g celulosa) en un reactor de membrana de flujo tangencial (60 mL, $F_R=120$ mL/min) en modo discontinuo de operación ($P_F = 1.9$ mL/min) a 50°C.

Con objeto de diseñar un proceso de hidrólisis cíclico de hidrólisis enzimática de celulosa con reutilización de las enzimas empleadas, se realizaron dos ensayos en modo discontinuo utilizando módulos Vivaflow de 5 y 10 kDa, respectivamente, para llevar a cabo la separación del producto y la recuperación/reutilización de las enzimas. El reactor utilizado consistió en una unidad de reacción de 100 ml y un módulo de ultrafiltración Vivaflow 50 con membrana PES en su interior (5 kDa ó 10 KDa). Una malla de 0.1 mm fue integrada a la entrada de la alimentación del reactor para evitar el paso de partículas de celulosa cuyo tamaño pudiera causar variaciones en la presión del reactor y desestabilizar el sistema. El modo cíclico consistió en periodos catalíticos de 4 horas en discontinuo, seguidas de una etapa de ultrafiltración a 1.2 bares. Una vez recuperado el máximo volumen posible de permeado (40 mL), se añadió al reactor el mismo volumen de tampón citrato 50 mM, con la correspondiente concentración de celulosa regenerada (2 g/L), manteniendo constante el volumen de reacción (60 mL). Este proceso se repitió de manera consecutiva hasta completar 6 ciclos de hidrólisis, para el caso de la membrana de 5 kDa, y 9 ciclos, para el caso de la membrana de 10 kDa. La Figura 4.4 muestra la producción de glucosa y el porcentaje de conversión de celulosa, obtenidos tras cada ciclo de hidrólisis. Como puede verse, la producción de glucosa se mantuvo constante para ambas membranas, a lo largo de todos los ciclo, descartando la posible pérdida de actividad catalítica por paso de la enzima a través de la membrana o por inactivación en las condiciones de operación (agitación, velocidad de recirculación, presión, temperatura) ensayadas.

Los altos rendimientos de conversión obtenidos mediante la sacarificación enzimática de celulosa regenerada en modo discontinuo podría explicarse por el efecto combinado de 3 factores: 1) la efectividad del pretratamiento de celulosa aplicado, lo cual resulta en una mayor superficie disponible del sustrato para la adsorción enzimática (Dadi *et al.*, 2006; Lozano *et al.*, 2012), 2) El ratio óptimo de celulosa:celobiasa para evitar la presencia de la celobiosa inhibitoria alrededor del sitio activo de la celulasas (Lee y Kim, 1993; Bommaris *et al.*, 2008), y 3) el ratio óptimo de enzima:sustrato, lo cual favoreció la hidrólisis de celulosa (Yang *et al.*, 2006) en tiempos razonablemente cortos de reacción, garantizando que el producto obtenido en el permeado fuera glucosa.

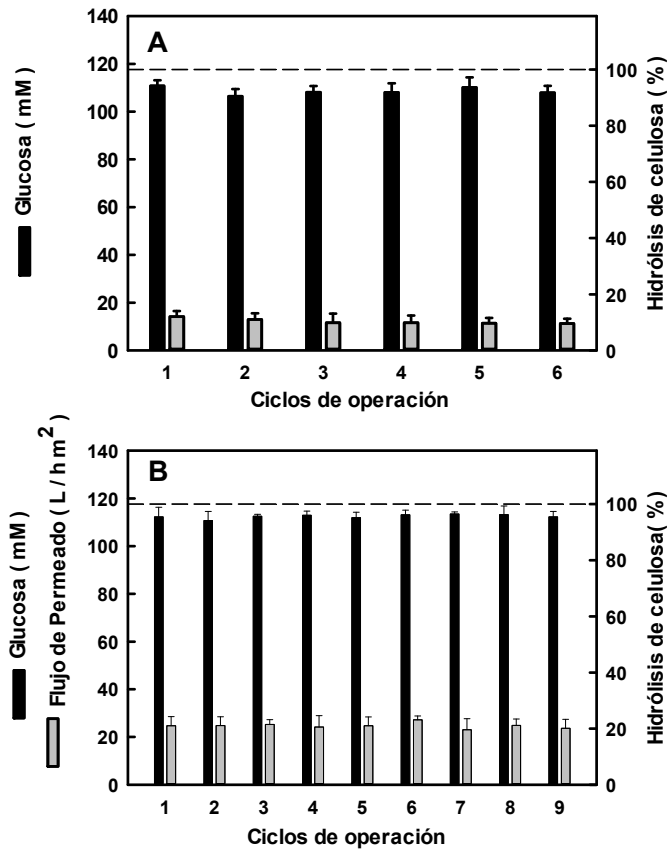


Figura 4.4 Evolución de flujo de permeado, concentración de glucosa e hidrólisis de celulosa a la salida del reactor durante ciclos consecutivos de sacarificación enzimática de celulosa (2 g/L) mediante la acción combinada de celulasa (38 U/g de celulosa) y celobiasa (128 U/g de celulosa) utilizando un sistema de recirculación de flujo tangencial (volumen = 60 mL, $F_R = 120$ mL/min con membranas PES (A: límite de exclusión de 5kDa; límite de exclusión de 10 kDa).

Si bien la conversión de sustrato en producto es uno de los principales criterios para evaluar el desempeño de un reactor, la colmatación de membranas en cualquier sistema de filtración, debida a sustancias de tamaño molecular cercano al límite de exclusión de la membrana, es uno de los principales cuellos de botella para mantener óptimas condiciones de reacción. Entre las soluciones que se han propuesto para superar la colmatación de membranas en la hidrólisis enzimática de celulosa se encuentran la agitación vigorosa por el lado más próximo de la membrana (para las membranas planas), el incremento de la presión transmembrana para obtener flujos de permeado más altos (Bélafi-Bakó *et al.*, 2006) o incluso, la limpieza *in situ* de la membrana mediante un pulso eléctrico (Gan *et al.*, 2002). Así, el diseño de un reactor

de enzimático de membrana eficiente deberá, no sólo facilitar la catálisis enzimática, sino mantener al mínimo el fenómeno de colmatación.

Estudios realizados con reactores de membrana para la hidrólisis de almidón han descrito la colmatación de membranas por la presencia de oligosacáridos de alto peso molecular producidos durante la hidrólisis (Paloucci-Jeanjean *et al.*, 2000). Con la finalidad de monitorear la colmatación de las membranas utilizadas en la hidrólisis de celulosa, la evolución del flujo de permeado de ambas membranas a lo largo de los ciclos se utilizó como indicador de posibles problemas de colmatación. Como puede verse en la Figura 4.4 el flujo de permeado de la membrana de 10 kDa se mantuvo constante en todos los ciclos ($24.7 \pm 1.15 \text{ L / h m}^2$) descartando problemas de colmatación. Con respecto a la membrana de 5 kDa se observó una caída del flujo de permeado durante los primeros 3 ciclos (de 14.2 a 11.6 L / h m², respectivamente), posiblemente debida a la acumulación de alguna especie (enzimas, oligosacáridos, celulosa no hidrolizada, aditivos de la enzima de gran tamaño molecular) en la superficie de la membrana. Si bien la especie acumulada en la superficie de la membrana podría ser celulosa sin hidrolizar, debido a una posible pérdida de actividad catalítica por fuga de enzima o su inactivación, el rendimiento de conversión constante obtenido a lo largo de todos los ciclos descartó esta posibilidad. Los excelentes rendimientos de conversión de celulosa en glucosa junto con el interés por obtener altos flujos de permeado que reduzcan al mínimo el tiempo de filtrado, permiten presentar a la membrana de 10 kDa como la más adecuada para la puesta en marcha de un reactor enzimático en modo discontinuo.

Los excelentes resultados obtenidos en el modo discontinuo llevaron a considerar el diseño de un reactor continuo para la hidrólisis enzimática de celulosa. Entre las ventajas de la puesta en marcha del modo continuo se encuentran, la eliminación del tiempo requerido para separar el producto del medio de reacción, la eliminación de posibles diferencias en la calidad de la glucosa producida entre diferentes ciclos de hidrólisis así como la eliminación de los tiempos de arranque y parada entre ciclos. Si bien estas ventajas representan una mayor eficiencia en cuanto a la productividad del reactor por unidad de tiempo, la puesta en marcha del reactor en continuo supuso el estudio y optimización de distintos parámetros operacionales tales como la concentración de enzima, la relación de concentración entre celulosa y celobiasa, la concentración de sustrato y el tiempo de residencia necesario para alcanzar altos niveles de conversión en el reactor.

La puesta en marcha de un reactor en modo continuo de operación requiere la eliminación continua del producto y su reemplazamiento mediante sustrato fresco al medio de reacción. Sin embargo, puesto que la celulosa regenerada es un sustrato insoluble, la adición de sustrato fresco al medio de reacción podría resultar en una suspensión heterogénea de celulosa capaz de producir el bloqueo de la alimentación del reactor o de la membrana, induciendo la pérdida de estabilidad del sistema. Así, la velocidad de hidrólisis de la celulosa regenerada añadida, reflejada en la velocidad de producción de glucosa, resulta un factor importante para minimizar la concentración de sólidos (celulosa no hidrolizada) en el medio de reacción. Además de ello, la velocidad de producción de glucosa adecuada permite mantener constante la concentración de azúcares presente en el permeado, evitando el posible efecto de dilución generado por la celulosa fresca alimentada aún sin hidrolizar.

Previamente a la puesta en marcha del reactor en modo continuo y con objeto de optimizar la velocidad de producción de glucosa hasta ahora obtenida, se realizaron ensayos de hidrólisis de celulosa regenerada en viales de 5 mL aumentando la concentración de celulasa y celobiasa (manteniendo un ratio de 1:3.4) para una misma concentración de sustrato (2 g/L). La Tabla 4.2 resume las velocidades de producción de azúcares utilizando las cantidades equivalentes de celulasa y celobiasa a las utilizadas en el modo discontinuo (entrada 1) así como para cantidades 2, 3 y 4 veces superiores (entradas 2, 3 y 4). Como puede apreciarse y contrariamente a lo esperado, el aumento en las unidades de actividad por unidad de sustrato no mejoró la velocidad de producción de glucosa. Este fenómeno, denominado efecto “jamming”, se explica en base al comportamiento del sistema cuando existe una mayor proporción de moléculas de celulasa que de sitios disponibles de unión en la celulosa, produciéndose una reducción en la velocidad de hidrólisis debida a la interferencia (“jamming”) generada entre las moléculas de la enzima al competir por los sitios libres del sustrato (Bommarius *et al.*, 2008).

Tabla 4.2. Efecto de la concentración de celulasa y celobiasa en la velocidad de producción de glucosa mediante hidrólisis enzimática de celulosa regenerada en modo discontinuo de operación a 50 °

Entrada	Enzima (U / g celulose)		Velocidad de producción de glucosa ($\mu\text{mol} / \text{min mg Prot.}$)
	Celulasa	Celobiasa	
1	38	128	0.50
2	57	192	0.34
3	76	256	0.27
4	152	512	0.18
5	38	256	0.36
6	38	512	0.32
7	38	768	0.22

Puesto que es conocido que la cinética hidrólisis de la celulosa es afectada de manera significativa por la actividad celobiasa presente (Lee y Kim, 1993; Bélafi-Bakó *et al.*, 2006), ensayos de hidrólisis de celulosa regenerada se realizaron con crecientes concentraciones de actividad celobiasa, los resultados han sido resumidos en la Tabla 4.2 (entradas 5, 6 y 7). Como puede verse el incremento en la concentración de celobiasa tampoco mejoró la velocidad de producción de glucosa indicando que el ratio celulasa:celobiasa de 1:3.4 es adecuado para producir glucosa tan pronto como se produce celobiasa. Los resultados obtenidos señalaron que las concentraciones de actividad enzimática correspondientes a la entrada 1 eran las más óptimas para la puesta en marcha del reactor en continuo.

El reactor en continuo consistió de una unidad de reacción con una capacidad de hasta 1 L y un módulo de ultrafiltración tubular conteniendo una membrana de alúmina con límite de exclusión de 5kDa. Una malla de 0.5 mm fue integrada a la entrada de la alimentación del reactor para evitar el paso de partículas de celulosa cuyo tamaño pudiera causar variaciones en la presión del reactor y desestabilizar el sistema. Los ensayos en continuo se iniciaron con un periodo catalítico en discontinuo hasta lograr un estado estacionario de hidrólisis, seguido por la eliminación de permeado y su reemplazamiento por sustrato fresco suspendido en tampón citrato 50 mM, pH 4.8. Diferentes concentraciones de sustrato y tiempos de residencia (1.5 y 4 h) se ensayaron con objeto de evaluar la estabilidad del reactor. El tiempo de residencia, *i. e.* el tiempo que pasa una molécula de sustrato en el reactor, se calculó de la siguiente manera:

$$\tau = \frac{V_R}{F_P}$$

donde:

τ = Tiempo de residencia

V_R = Volumen utilizado del reactor (L)

F_P = Flujo del permeado (L/h)

Partiendo de esta ecuación puede concluirse que el tiempo de residencia puede ser controlado a partir del volumen de reacción.

La concentración de sustrato es un parámetro muy importante para el uso eficiente de las enzimas y para mantener la concentración de azúcares en el permeado. Por lo tanto, dos diferentes concentraciones de sustrato (0.8-1.2 g/L) fueron probadas en el reactor en continuo para un volumen de reacción de 200 mL y un tiempo de residencia de 1.5 h, manteniendo fija la concentración de enzima (38 U de celulasa/mg de celulosa y 128 U de celobiasa/ g de celulosa). Los perfiles del estado estacionario para ambos ensayos pueden apreciarse en la Figura 4.5.

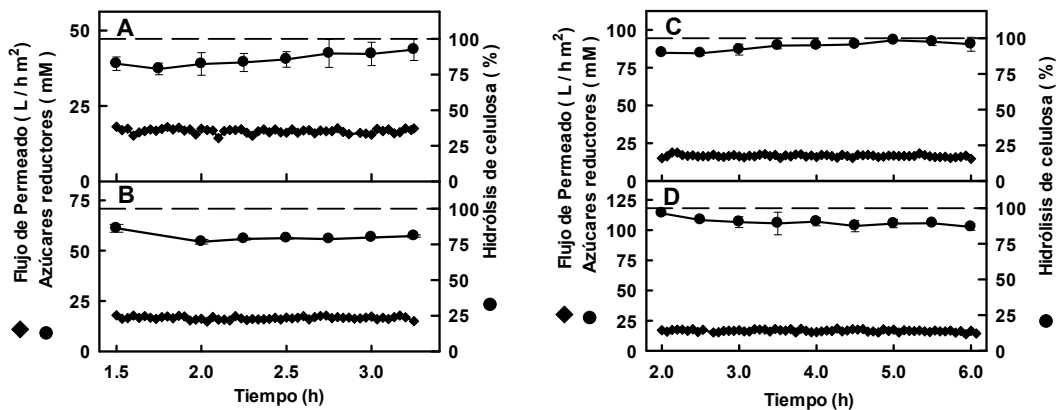


Fig. 4.5 Estado estacionario de los perfiles de flujo de permeado, producción de azúcares reductores e hidrólisis de celulosa regenerada a la salida del reactor durante la hidrólisis enzimática llevada a cabo mediante la acción combinada de celulasa (38 U/g de celulosa) y celobiasa (128 U /g de celulosa) utilizando un sistema de recirculación de flujo tangencial con membrana cerámica ($F_R=215$ ml/min) a 50 °C **A**: celulosa 0.8 g/L, tiempo de residencia 1.5 h; **B**: celulosa= 1.2 g/mL cellulose, tiempo de residencia=1.5 h; **C**: celulosa=1.6 g/L cellulose, tiempo de residencia; **D**: celulosa=2 g/L, tiempo de residencia=4 h. Ver sección de Materiales y métodos para más detalles.

Como puede verse en la Figura 4.5 A y 4.5 B, el aumento en la concentración de sustrato significó un incremento en el número de sitios de unión para la enzima y un aumento en la concentración de azúcares reductores producidos; sin embargo, este aumento no correspondió con un mayor rendimiento de hidrólisis de la celulosa, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por Yang *et al*, 2009. La disminución del porcentaje de hidrólisis con el aumento en la concentración de sustrato podría deberse a la falta de tiempo necesario para completar la hidrólisis, por tal motivo, dos ensayos adicionales en continuo se realizaron con mayores concentraciones de sustrato (1.6 - 2 g/L) y mayor tiempo de residencia (4h). Como puede apreciarse en las Figura 4.5 C y 4.5 D, el aumento en el tiempo de residencia mediante el aumento del volumen del reactor a 500 mL, permitió el aumento en los rendimientos de hidrólisis para concentraciones mayores de sustrato fresco alimentado al reactor. Sin embargo, para un mismo tiempo de residencia, al igual que para una misma concentración de enzima, el aumento en la concentración de sustrato disminuyó el porcentaje de hidrólisis.

La Figura 4.5 también muestra los perfiles del caudal de filtrado observados para cada uno de los casos ensayados. Como puede observarse los flujos de permeado se mantuvieron constantes para todas las concentraciones de sustrato, demostrando la estabilidad del reactor a una presión de 0.1 bar.

En conclusión, en este capítulo se demuestra cómo el éxito del desempeño de un reactor enzimático de membrana para la hidrólisis de celulosa depende de parámetros operacionales tales como la cantidad de sustrato, cantidad de enzima y tiempo de residencia. Si bien la evolución del flujo de permeado permaneció constante en ambos modos de operación, demostrando la estabilidad de ambos reactores, el modo en continuo mostró una mayor sensibilidad a la concentración de sustrato y al tiempo de residencia. Los resultados obtenidos mostraron que la sacarificación enzimática de celulosa regenerada en un reactor de membrana permite una eficaz acción catalítica de las enzimas, así como su reutilización operando en modo discontinuo y/o continuo, sin pérdida aparente de actividad con el tiempo de operación.

4.5. Referencias

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–85.
- Bélafi-Bakó, K., Koutinas, a., Nemestóthy, N., Gubicza, L., Webb, C., 2006. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. *Enzyme Microbiol. Technol.* 38, 155–161.
- Bommarius, A.S., Katona, A., Cheben, S.E., Patel, A.S., Ragauskas, A.J., Knudson, K., Pu, Y., 2008. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. *Metabolic Engineering* 10, 370–81.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., 2006. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 904–910.
- Enari, T.M., Niku-Paavola, M.L., 1987. Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid? *Critical Reviews in Biotechnology* 5, 67–87.
- Gan, Q., Allen, S., Taylor, G., 2002. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 12, 223–229.
- Grande, P.M., De María, P.D., 2012. Enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in concentrated seawater. *Bioresour. Technol.* 104, 799–802.
- Kim, J.H., Kim, C.K., 2005. Ultrafiltration membranes prepared from blends of polyethersulfone and poly(1-vinylpyrrolidone-co-styrene) copolymers. *J. Memb. Sci.* 262, 60–68.
- Lee, S.G., Kim, H.S., 1993. Optimal operating policy of the ultrafiltration membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 737–46.
- Liu, J., Lu, J., Cui, Z., 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulose in a membrane bioreactor: assessment of operating conditions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34, 525–32.
- Lozano, P., Manjón, A., Romojaro, F., Cánovas M., Iborra J.L., 1987, A cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes for juice clarification. *Biotechnol. Lett.*, 9, 875-880.
- Lozano, P., Manjón, A., Iborra J.L., Cánovas M., Romojaro, F. 1990. Kinetic and operational study of a cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12, 499-505.
- Lozano, P., Bernal, B., Recio, I., Belleville, M.-P., 2012. A cyclic process for full enzymatic saccharification of pretreated cellulose with full recovery and reuse of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 14, 2631.

- Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Paloucci-jeanjan, D., Belleville, M.P., Rios, G.M., Zakhia, N., 2000. The effect of enzyme concentration and space time on the performance of a continuous recycle membrane reactor for one-step starch hydrolysis. *J. Memb. Sci.* 5, 17–22.
- Rios, G.M., Belleville, M.P., Paolucci, D., Sanchez, J., 2004. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. *J. Memb. Sci.* 242, 189–196.
- Rios, G. M.; Belleville, M.P.; Paolucci-Jeanjan, D. 2007. Membrane engineering in biotechnology: quo vamus?. *Trends Biotechnol.*, 25, 242-246.
- Yang, S., Ding, W., Chen, H., 2006. Enzymatic hydrolysis of rice straw in a tubular reactor coupled with UF membrane. *Process Biochem.* 41, 721–725.
- Yang, S., Ding, W., Chen, H., 2009. Enzymatic hydrolysis of corn stalk in a hollow fiber ultrafiltration membrane reactor. *Biomass Bioenergy* 33, 332–336.
- Zhang, M., Su, R., Li, Q., Qi, W., He, Z., 2010. Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. *Bioenergy Res.* 4, 134–140.
- Zhang, P.Y.-H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452–81.
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application□: a mini-review. *Green Chem.* 8, 325–327.

Conclusiones

1. The coating of immobilized cellulose by hydrophobic ILs based on [NTf₂] anion, *e.g.* [N₁₁₁₄][NTf₂] or [Bmim][NTf₂], as recognized enzymes stabilizing agents against non-conventional conditions, is an effective approach to maintain the active conformation of cellulase during cellulose saccharification in [Bmim][Cl] medium. From this point of view, both the mechanical stability as well as the thickness of the IL layer coating the enzyme should be optimized in order to reach the best stabilization and easy cellulose transport to the enzyme.

2. Bioprocessing of cellulose by means of [Bmim][Cl] provides useful substrates for enzymatic hydrolysis. The cellulose dissolution and regeneration protocols proposed in this thesis are effective in providing amorphous cellulose suitable for full saccharification in short reaction times (4h). The transparent aspect of the glucose solutions obtained, confirmed the complete hydrolysis of cellulose. Moreover HPLC analysis revealed complete conversion of cellulose to glucose, denoting an optimal cellulase:cellobiase ratio, which enabled the cellobiose transformation to glucose as soon as it was formed.

3. The use of different anti-solvents and temperatures for the cellulose regeneration step pointed out water and the equimolar mixture water:ethanol, at temperatures of 80°C and 60°C, respectively, as the best anti-solvents and temperatures to fully recover the IL without affecting the digestibility of the cellulose produced

4. The full recovery and reuse of ionic liquids is essential for both the economical and sustainable success of any implementation of this technology at industrial levels. By the first time, a protocol for [Bmim][Cl] recovery and reuse after cellulose pretreatment has been proposed, allowing to reach up to 99.7% of initial IL.

5. The complete recovery of IL from cellulose backbone allows the production of IL-free regenerated cellulose enabling to obtain clean hydrolysates optimal for the microbial growth. This fact is in agreement with the first principle of green chemistry dealing with prevention. It is better (and easier) to recover ILs from the RC than to treat or clean up the resulting glucose solution from the RC hydrolysis step

6. The ionic liquid [Bmim][Cl] is able to be reused in consecutive cycles of cellulose dissolution-precipitation without decreasing its dissolution capacity. In this respect, it is

important to remark the necessity of eliminating the water contained in the IL to permits its appropriate reuse for dissolving cellulose. Moreover, [Bmim][Cl] is a stable cellulose dissolvent, as demonstrated by H^1 -RMN realized on samples of the solvent after 5 cycles of dissolution, where no sign of decomposition of the solvent was found. The reusability of [Bmim][Cl] confers a sustainable quality to the cellulose processing by this IL.

7. The glucose obtained from enzymatic saccharification of pretreated cellulose with [Bmim][Cl] are suitable for *Saccharomyces cerevisiae* aerobic growing, being comparable to commercial glucose. In this respect, it is important to remark the necessity of eliminating completely any trace of IL, i.e. by using the washing protocol proposed in this PhD Thesis.

8. The cleaning protocol of [Bmim][Cl] by charcoal was effective in eliminating the dark color of the IL after 5 cycles of dissolution. The use of the ethanol and charcoal in this cleaning process maintained the green aspect of the cellulose processing by [Bmim][Cl].

9. The use of enzymatic membrane reactors is an effective strategy for enzyme recovery and reuse. PES and ceramic membranes with limit exclusion of 10 and 5 kDa, respectively are able to retain cellulase and cellobiase.

10. Enzymatic hydrolysis of cellulose pretreated by [Bmim][Cl] is scalable to different reactors capacities without affecting the hydrolysis yields. The saccharification of regenerated cellulose realized in 60 ml of reaction medium, demonstrated excellent batch hydrolysis yields (95%) after 4h, being similar to that obtained in reactors with 5 ml of capacity, demonstrating the success of scaling-up the enzymatic hydrolysis of cellulose to reactors with larger capacity.

11. The excellent suitability in the operational behavior of the discontinuous enzymatic membrane reactor for hydrolysis of regenerated cellulose is demonstrated, being maintained unchanged for repeated operation for 9 cycles of enzyme reuse with no fouling problems of membrane

12. The operational behavior for continuous saccharification of cellulose can be more sensitive to operational parameters like enzyme concentration (cellulase, cellobiase),

inlet substrate concentration and residence time than in discontinuous mode, being necessary to study the influence of these parameters on the performance of the reactor. For all cases, the excellent suitability of the proposed continuous reactor was also observed, because of the constant hydrolytic degree observed at the steady state of the system. Additionally, outlet flow profiles were always unchanged with time, as results of the appropriate enzymatic degradation of the substrate that avoid any membrane-fouling problem.

13. The combination of the ionic liquid technology for the pretreatment of cellulose with the enzymatic saccharification in membrane reactors provides an easy and sustainable approach for carrying out the valorization of plant biomass towards the production of bioethanol.

14. It is clearly demonstrated how the ionic liquid technology is an enhancer of enzyme technology for developing the green chemical bioprocesses for the sustainable society of the near future.

Anexo I

Cite this: *Green Chem.*, 2011, **13**, 1406

www.rsc.org/greenchem

COMMUNICATION

Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride^{†‡}Pedro Lozano,^{*a} Berenice Bernal,^a Juana M. Bernal,^a Mathieu Pucheault^b and Michel Vaultier^b

Received 17th March 2011, Accepted 11th April 2011

DOI: 10.1039/c1gc15294g

A new approach to improve the cellulase stability against 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]), based on coating of immobilized enzyme particles with hydrophobic ILs, is proposed. The stability of commercial cellulase (Celluclast[®]), immobilized onto a polymeric support (Amberlite XAD4), was first studied in ten different ionic liquids (ILs) at 50 and 80 °C. Hydrophobic ILs clearly enhanced the enzyme thermal stability. Butyltrimethyl-ammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([N₁₁₁₄][NTf₂]) enhances half-life time of the immobilized enzyme at 50 °C up to 4 times, while [Bmim][Cl] behaved as a powerful enzyme deactivating agent. Thus, the stability of cellulase in hydrophobic IL/[Bmim][Cl] mixtures was greatly improved with respect to [Bmim][Cl] alone. A stabilized cellulase derivative obtained by coating immobilized enzyme particles with [N₁₁₁₄][NTf₂], has been then successfully used for the saccharification of dissolved cellulose in [Bmim][Cl] (*i.e.* up to 50% hydrolysis in 24 h) at 50 °C and 1.5 w/v water content.

1 Introduction

Ionic liquids (ILs) have emerged as exceptionally interesting non-aqueous reaction media for enzymatic transformations because of their unique solvent properties, headed by their negligible vapour pressure and their exceptional ability to maintain enzymes in active and stable conformations.¹ In 2002, Rogers's group published a pioneering work showing that some ILs, such as 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]), 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride ([Hmim][Cl]), *etc.*, were able to dissolve cellulose, *i.e.* the most abundant renewable source in

the world.² This discovery has opened new opportunities for the valorisation of large amounts of waste cellulose-containing materials (*e.g.* forest biomass), since the depolymerisation of cellulose to its glucose units, followed by their transformation into bioethanol by fermentation, is the most attempted one.³ Furthermore, it was also reported how cellulose can be solubilized in deep-eutectic-solvents (DES), such as choline chloride/zinc chloride mixtures.⁴ The use of DES could also represent an interesting approach by virtue of their simplicity of preparation and lower associated cost. However, there are few examples regarding biocatalysis in these neoteric media.⁵

The interest in performing cellulase-catalyzed reactions on cellulose solutions is doubtless. Cellulases provide the highest selectivity for the hydrolysis of the β-glycosidic bonds of the cellulose backbone, with respect to any other chemical catalyst (*i.e.* acids, alkali, *etc.*).⁶ However, it has been widely reported how ILs that are excellent for dissolving cellulose, such as [Bmim][Cl], 1-allyl-3-methylimidazolium chloride [Amim][Cl], *etc.*, induce fast enzyme deactivation by protein unfolding.⁷ In this context, alternative approaches for enzymatic saccharification of cellulose based on aqueous systems has been assayed. The re-precipitation of cellulose from IL solutions into polar molecular solvents (*i.e.* water, ethanol, *etc.*) produces disruption of the crystalline structure of this polysaccharide, thus improving the subsequent enzymatic hydrolysis in buffered media.⁸ Other authors tried to overcome the negative effect on the cellulase stability of ILs dissolving cellulose by using buffered media containing "benign" dissolved ILs at low concentration (*e.g.* 1-ethyl-3-methylimidazolium diethylphosphate,⁹ 1,3-dimethylimidazolium dimethylphosphate,^{7b} *etc.*) to improve the cellulase activity. The use of genetically stabilized cellulases, obtained by screening metagenomic libraries,^{10a} or extracted from extremophile microorganisms (*e.g.* *Thermatoga maritima*),^{10b} is another recent approach to carry out the enzymatic saccharification of cellulose solutions in ILs (*e.g.* [Bmim][Cl]).

Outside this context, the excellent stability displayed by enzymes in water-immiscible ILs has been widely reported.¹ The hygroscopic character of these ILs (*e.g.* 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [Bmim][NTf₂], is able to absorb up 1.4% w/w water¹¹) was considered as a key property to maintain the essential degree of hydration in proteins, resulting in an efficient protective effect against the usual unfolding that occurs in non-aqueous

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. Facultad de Química, Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100, Murcia, Spain. E-mail: plozanor@um.es; Fax: +34 868 88 41 48; Tel: +34 868 88 73 92

^bLaboratoire de Chimie et Photonique Moléculaires, UMR CNRS 6510, Université de Rennes-1, Campus de Beaulieu, Av. Général Leclerc, F-35042, Rennes, France; Fax: +33 2 99 28 69 55; Tel: +33 2 99 28 62 74

[†]This paper was published as part of the themed issue of contributions from the Green Solvents – Alternative Fluids in Science and Application conference held in Berchtesgaden, October 2010.

[‡]Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c1gc15294g

environments.¹² Enzyme immobilization is another classical way to improve enzyme stability under non-conventional conditions. Furthermore, the coating of immobilized enzyme particles with water-immiscible ILs has been demonstrated as another useful tool to enhance enzyme stability,¹³ even under extremely harsh conditions (e.g. scCO_2 at 100 bar and 150 °C).¹⁴ In the case of cellulase, it was widely reported how its physical adsorption on solid supports (e.g. acrylic co-polymers,^{14a} polystyrene,^{14b} etc.), provided stabilized derivatives towards reuse, which were based on an aggregated enzyme layer onto the carrier surface, as it was observed by atomic force microscopy.^{14c}

This work analyzes for the first time the thermal stability of immobilized cellulases both in pure ILs and IL/[Bmim][Cl] binary mixtures. The suitability of this stabilization approach for cellulase, based on immobilization onto a solid support followed by coating with hydrophobic ILs, to carry out the saccharification of cellulose solution in [Bmim][Cl] was tested at low water content (1.5 w/v) and 50 °C (see Fig. 1).

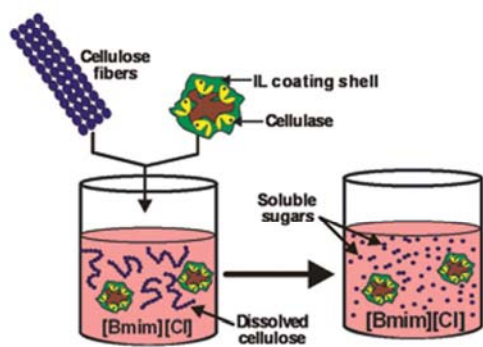


Fig. 1 Saccharification of cellulose dissolved in [Bmim][Cl] catalyzed by immobilized cellulase coated with a hydrophobic IL.

2 Experimental

Cellulase from *T. reesei* (Celluclast 1.5 L, batch number, CCN03110, EC 3.2.1.4) was a gift from Novozymes S.A. (Spain). Microcrystalline cellulose (20 μm powder), Amberlite® XAD4 resin and other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich–Fluka (Madrid, Spain). The ILs (99% purity), i.e. 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Emim][BF₄]); 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([Emim][NTf₂]); 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([Bmim][NTf₂]); 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim][PF₆]); 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmim][BF₄]); 1-octyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([Omim][NTf₂]); 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Omim][PF₆]); 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Omim][BF₄]); 1-dodecyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([Ddmim][NTf₂]); 1-dodecyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Ddmim][PF₆]); 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Ddmim][BF₄]); butyltrimethylammonium

bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([N₁₁₁₄][NTf₂]) and methyl-trioctylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, ([N₁₈₈₈][NTf₂]), were purchased from IoLiTec GmbH (Germany).

Cellulase immobilization onto Amberlite XAD4

Firstly, the enzyme preparation was ultrafiltered to eliminate all the low molecular weight additives, as follows: 25 mL of Celluclast were diluted in 225 mL of 10 mM citrate buffer pH 4.8, and the resulting solution was concentrated 10-fold by ultrafiltration at 8 °C, using a Vivaflow 50 (Sartorius) system equipped with polysulfone membranes (10 kDa cut-off). This process was repeated three-times, leading to a 150.8 mg protein per mL cellulase solution (as determined by the Lowry method), that showed a specific activity of 0.11 U per mg protein (see cellulase activity test). The immobilized cellulase derivative was prepared by simply mixing the aqueous solution of cellulase (1 mL) with Amberlite XAD4 (1 g). The mixture was shaken for 6 h at room temperature for enzyme adsorption. Then the supernatant was recovered, and the support washed with water to remove non-adsorbed enzyme. The immobilized derivative was frozen at –60 °C, then lyophilised, and finally stored under controlled a_w (0.11) conditions over LiCl in desiccator at 8 °C until use. The protein content of the immobilized cellulase was determined by the corresponding mass balance between the offered enzyme for immobilization and the recovered enzyme in supernatants, resulting in a derivative with 65.9 mg protein per g support, as determined by the Lowry method.

Preparation of cellulose solutions in [Bmim][Cl]

The [Bmim][Cl] (1.98 g) was placed into a 4 mL screw-capped vial with Teflon-lined septum, and incubated at 110 °C thermoblock for 2 min, until the IL was fully melted. Then, microcrystalline cellulose (20 mg) was added, and the mixture incubated with gentle shaking for 30 min at 110 °C, giving a clear, colorless and viscous cellulose solution.

Thermal stability of immobilized cellulase in ILs

For each IL, 200 mg immobilized cellulase derivative and 500 mg IL were added in screw-capped vials (1.5-mL total capacity). The resulting suspensions were mechanically mixed with spatula for 5 min to provide a full coating of biocatalyst particles with IL, and then incubated at 50 or 80 °C in a thermoblock apparatus. At selected times, IL-biocatalyst samples (30 mg) were withdrawn, and the enzymatic activity was tested. In the case of IL/[Bmim][Cl] mixtures, biocatalyst particles were firstly coated with the selected amount of the hydrophobic IL (e.g. [Bmim][NTf₂] or [N₁₁₁₄][NTf₂]) by mechanical mixing with spatula, and then [Bmim][Cl] or 1% (w/w) cellulose in [Bmim][Cl] was added to complete to 1 g (overall ILs amount). The resulting mixture was mechanically mixed for 5 min, and then incubated at 50 °C in a thermoblock apparatus. To study the cellulase stability in buffered medium, immobilized enzyme (15 mg) was suspended in 50 mM citrate buffer pH 4.8 (500 μL), and then incubated at 50 °C. At selected times, residual activity was tested by adding 500 μL of a 4% (w/v) cellulose suspension in 50 mM citrate buffer pH 4.8.

View Online

Cellulase activity test

Cellulase activity was determined at 50 °C by the spectrophotometric quantification of the reducing sugars produced, using the bicinchoninic acid (BCA) method,¹⁵ as glucose equivalents, by means of a standard curve of glucose ($r^2 = 0.998$). Reactions were carried out in screw-capped vials with Teflon-lined septa (1.5-mL total capacity) containing 1 mL of 2% (w/v) cellulose suspension in 50 mM citrate buffer pH 4.8. The reaction was started by adding 15 mg of immobilized cellulase, or 30 mg of immobilized cellulase/IL mixture, and allowed to progress with magnetic stirring for 24 h in a glycerol bath at 50 °C. At regular time intervals, 25 μ L aliquots were withdrawn and suspended in 475 μ L of 0.1 M bicarbonate buffer pH 9.8 to stop the reaction. Then, 1.5 mL BCA reagent was added, and the mixture was strongly shaken for 2 min, and then incubated at 80 °C for 30 min. The resulting solutions were centrifuged at 100 rpm for 10 min, and absorbance was measured at 560 nm by using a UV/Vis S1200 diode array spectrophotometer (Biochrom Ltd, UK), with respect to a control reaction without immobilized enzyme. One unit of cellulase activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of reducing sugars per minute. All experiments were carried out in duplicate.

3 Results and discussion

The interest in cellulase stabilization against temperature and/or [Bmim][Cl], an IL able to dissolve cellulose, stems from the clear advantage which arises by carrying out the enzymatic hydrolysis of cellulose solutions in this IL. Furthermore, the high dependence of [Bmim][Cl] viscosity with temperature (*e.g.* 11 000 and 300 mPa s at 30 and 70 °C, respectively) is a retarding factor for the rate of enzymatic catalysis, because it slows down the diffusion of the enzyme to its target.¹⁶ The ability of immobilized cellulase to catalyze the saccharification of 2% (w/v) cellulose suspension in citrate buffer at 50 °C is shown in Fig. 2. Although the reaction proceeds slowly due to the insolubility of cellulose in the aqueous reaction media, the immobilized cellulase derivative was able to reach up to 41% hydrolysis in 24 h, which is in agreement with previous works with soluble cellulases.⁹ Furthermore, this immobilized derivative shows a

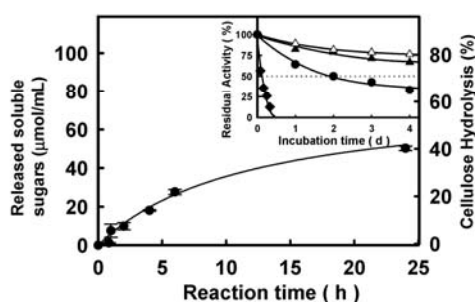


Fig. 2 Time-course of saccharification of 2% (w/v) cellulose suspension in 50 mM citrate buffer pH 4.8 catalyzed by immobilized cellulase (15 mg) at 50 °C. Figure inset depicts deactivation profiles of immobilized cellulase in [Bmim][Cl] (◆), [Bmim][NTf₂] (▲), [N₁₁₁₄][NTf₂] (△), and citrate buffer (●) at 50 °C.

specific activity of 0.1 U per mg protein (91% immobilization yield). In this context where large operation times should be involved in processes to perform saccharification of cellulose, the stability of the immobilized enzyme in some ILs ([Bmim][Cl], [Bmim][NTf₂] and [N₁₁₁₄][NTf₂]) at 50 °C was studied, and compared with those observed in aqueous media (see Fig. 2, inset). As reported by Rogers's team,^{7a} the best IL to dissolve cellulose is the worst to maintain cellulase activity, producing full deactivation in few hours. However, ILs based on the [NTf₂] hydrophobic anion, *i.e.* [Bmim][NTf₂], [N₁₁₁₄][NTf₂], were shown as clear stabilizing agents for the cellulase activity with respect to the buffered medium at 50 °C, in agreement with results obtained for other proteins, such as lipase,^{12a,b} α -chymotrysin,^{12c} monellin^{12d} and human serum albumin.^{12e} As can be seen, deactivation profiles show two-step kinetics, allowing us to determine half-life times of immobilized derivative by using the corresponding series-type deactivation model.^{12a} Thus, both [Bmim][NTf₂] and [N₁₁₁₄][NTf₂] increased half-life times of immobilized cellulase by 2.8 and 4 times, respectively, in comparison with the buffered medium. As a result of this stabilization effect provided by hydrophobic ILs on cellulase activity, a broader study based on the nature of IL was carried out under harsher thermal conditions (*e.g.* 80 °C) to evaluate the protective effect of hydrophobic ILs. Thirteen ILs with different hydrophobic character, as determined by the length of the alkyl-side chain of cation and the nature of the anion (*e.g.* [NTf₂], [PF₆], [BF₄]), were selected. In all cases, cellulase activity diminished continuously, following a two-step deactivation kinetic (see ESI†). Furthermore, it was observed how the initial activity falls during the first 5 h, and then remained practically unchanged for one week, in agreement with previous results.^{12b} Table 1 shows the residual cellulase activity exhibited by the immobilized derivative after 5 days incubation at 80 °C. As can be seen, ILs based on the hydrophobic [NTf₂] anion provided the best stabilization effect, which was improved by the increase of the alkyl chain length of the cation. However, the best results were obtained for ILs based on ammonium cation, where the residual

Table 1 Residual activity of immobilized cellulase after incubation in ILs for 5 days at 80 °C

Ionic liquid	Residual Activity (%)
[Emim][NTf ₂]	17.6
[Bmim][NTf ₂]	27.2
[Omim][NTf ₂]	34.3
[Ddmim][NTf ₂]	38.2
[Bmim][PF ₆]	23.4
[Omim][PF ₆]	30.9
[Ddmim][PF ₆]	27.6
[Emim][BF ₄]	16.1
[Bmim][BF ₄]	17.1
[Omim][BF ₄]	19.8
[Ddmim][BF ₄]	11.6
[N ₁₁₁₄][NTf ₂]	42.3
[N ₁₈₈₈][NTf ₂]	39.1
Citrate buffer	0

[Emim]: 1-Ethyl-3-methylimidazolium; [Bmim]: 1-butyl-3-methylimidazolium; [Omim]: 1-octyl-3-methylimidazolium; [Ddmim]: 1-dodecyl-3-methylimidazolium; [N₁₁₁₄]: butyltrimethylammonium; [N₁₈₈₈]: methyltrioctylammonium; [NTf₂]: bis(trifluoromethyl)sulfonylimide.

cellulase activity after 5 days under these harsh conditions was still around 40%. The worst results were obtained for ILs based on short alkyl chain in cation, e.g. [Emim], and the [BF₄]⁻ anion, which provided IL with lower hydrophobicity. These results could clearly be related with the ability of these ILs to maintain the essential water shell in the protein microenvironment, as previously demonstrated by fluorescence and CD spectroscopic studies for several proteins.^{12b-e}

However, taking into account the fact that these hydrophobic ILs are not able to dissolve cellulose as well as the increase in viscosity that usually occurs in ILs by increasing the length of the alkyl side chain of the cation, both [Bmim][NTf₂] and [N₁₁₁₄][NTf₂] were selected to carry out further studies focused on a stabilization approach of immobilized cellulase against the presence of [Bmim][Cl]. In this context, immobilized cellulase derivative was firstly coated with different amounts of stabilizing ILs, either [Bmim][NTf₂] or [N₁₁₁₄][NTf₂], and then the [Bmim][Cl] was added at different molar ratios. The activity decay of the resulting heterogeneous IL-biocatalyst particles mixtures was studied at 50 °C as a function of incubation time (see Fig. 3). The suitability of both hydrophobic ILs as stabilizing agents of the cellulase activity against the negative effect of [Bmim][Cl] was clearly observed (see Fig. 2 for comparison). By increasing the hydrophobic IL concentration, the deactivation effect of [Bmim][Cl] was reduced, which could be attributed to the active role of [Bmim][NTf₂] or [N₁₁₁₄][NTf₂] in the preservation of the essential water molecules around the protein. The water-stripping phenomenon has been widely described as a key factor for enzyme deactivation in non-aqueous environments.^{1,12,13} Furthermore, the immobilization support may provide an additional protective effect on cellulase, because it may act as a reservoir for water molecules helping at the maintenance of the folded state protein, as well as participating in hydrolytic reactions.

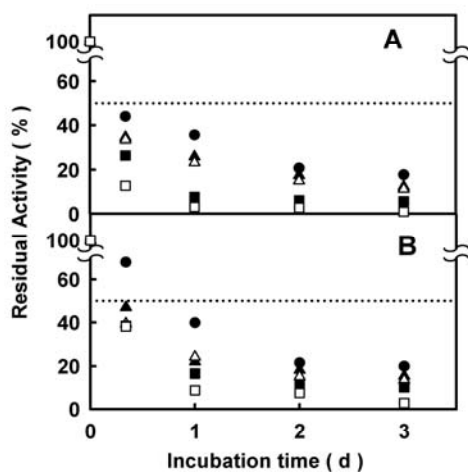


Fig. 3 Deactivation profiles of immobilized cellulase in (A) [Bmim][NTf₂]:[Bmim][Cl] and (B) [N₁₁₁₄][NTf₂]:[Bmim][Cl] mixtures at 50 °C. Assayed mixtures (mol : mol) were as follows: 3 : 1 (●), 2 : 1 (▲), 1 : 1 (△), 1 : 2 (■) and (1 : 3) □.

The suitability of [N₁₁₁₄][NTf₂] coating of immobilized cellulase to carry out the saccharification of a cellulose solution in [Bmim][Cl] was tested at 50 °C. The immobilized enzyme (30 mg) was firstly hydrated with 50 mM citrate buffer pH 4.8 (15 μL), then coated with [N₁₁₁₄][NTf₂] and finally the corresponding amounts of 1% cellulose solution in [Bmim][Cl] were added (see Fig. 4). Thus, the effect of the hydrophobic IL shell around the immobilized cellulase particle on the ability to hydrolyze cellulose solutions was studied. As can be seen, the immobilized cellulase remained active for all the assayed ILs mixtures. However, a decrease of the saccharification degree of cellulose was correlated with the increase in the amount of [N₁₁₁₄][NTf₂] coating immobilized cellulase particles. Taking into account that the cellulose concentration was continuously reduced (from 5.69 to 1.28 mg mL⁻¹), but remaining ten-times higher than the reported *K_M* value in aqueous solution,¹⁷ this decrease in activity could directly be attributed to increased difficulty in the accessibility of cellulose substrate to the enzyme microenvironment, because of the low solubility of sugars in [NTf₂]-based ILs.¹⁸ The increase in the hydrophobic IL shell reduces the cellulase activity, because of the enhancement of mass-transfer limitations from the bulk media to the enzyme. This observation is in contrast with the positive role played by this hydrophobic IL as a protective coating shell of biocatalyst particles against enzyme deactivation by water-stripping, and shows that there is an optimum amount of hydrophobic IL to be added for coating in order to observe the best protective effect.

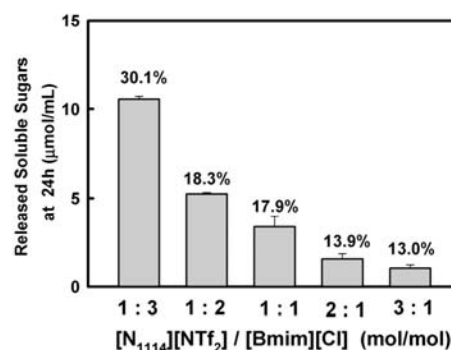


Fig. 4 Enzymatic *in situ* saccharification of cellulose in [Bmim][Cl] media at 24 h and 50 °C. Immobilized cellulase (30 mg) was firstly coated with [N₁₁₁₄][NTf₂] (431, 532, 694, 819 or 872 mg, respectively), and then 1% (w/w) cellulose in [Bmim][Cl] (569, 468, 306, 181 or 128 mg, respectively) was added. Resulting final [N₁₁₁₄][NTf₂]:[Bmim][Cl] concentration ratios were 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1 and 3 : 1, (mol/mol) respectively. Inset data correspond to the hydrolysis degree.

In conclusion, the use of hydrophobic ILs based on [NTf₂]⁻ anion, e.g. [N₁₁₁₄][NTf₂], as enzyme stabilizing agents towards non-conventional conditions^{12a,b} is an interesting approach to maintain cellulases in active conformation during saccharification processes in [Bmim][Cl]. From that point of view, both the mechanical stability and the thickness of the IL layer coating the enzyme should be optimized to reach the best stabilization and easy cellulose transport to the enzyme. Thus, the use of covalently attached ILs phases (SILPs),^{19a} as well

[View Online](#)

as the appropriate selection of the carrier^{19b} (*i.e.* to act as microreservoir for supplying water molecules during the hydrolytic reaction) and the use of efficient reaction systems for viscous media (*i.e.* cross-flow membrane reactor^{19c}) seems to be key parameters to be studied in order to reach successful application in saccharification processes. Once again, the importance of the microenvironment for enzyme-catalyzed reactions in ILs is demonstrated, opening new sustainable approaches for a green chemical industry in the near future.

Acknowledgements

This work was partially supported by CICYT (CTQ2008-00877) and SENECA Foundation (08616/PI/08) grants. We thank Ramiro Martínez (Novozymes España, S.A.) for a gift of Celluclast®.

Notes and references

- For recent reviews on enzyme catalysis in ILs: (a) C. Roosen, P. Müller and L. Greiner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **81**, 607–614; (b) M. Sureshkumar and C. K. Lee, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **60**, 1–12; (c) M. Moniruzzaman, N. Kamiya and M. Goto, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2887–2899; (d) P. Lozano, *Green Chem.*, 2010, **12**, 555–569.
- R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey and R. D. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4974–4975.
- (a) S. Zhu, Y. Wu, Q. Chen, Z. Yu, C. Wang, S. Jin, Y. Ding and G. Wu, *Green Chem.*, 2006, **8**, 325–327; (b) D. M. Alonso, J. Q. Bond and J. A. Dumesic, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1493–1513.
- A. P. Abbott, T. J. Bell, S. Handa and B. Stoddart, *Green Chem.*, 2005, **7**, 705–707.
- (a) J. T. Gorke, F. Sreencand and R. J. Kazlauskas, *Chem. Commun.*, 2008, 1235–1237; (b) J. T. Gorke, R. J. Kazlauskas, and F. Sreencand, *US Patent* 2009/0117628; (c) P. Dominguez de Maria and Z. Maugeri, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 220.
- (a) C. Li and Z. K. Zhao, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 1847–1850; (b) R. Rinaldi, R. Palkovits and F. Schuth, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 8047–8050; (c) C. Li, Q. Wang and Z. K. Zhao, *Green Chem.*, 2008, **10**, 177–182.
- (a) M. B. Turner, S. K. Spear, J. G. Huddleston, J. D. Holbrey and R. D. Rogers, *Green Chem.*, 2003, **5**, 443–447; (b) P. Engel, R. Mladenov, H. Wulthorst, G. Jäger and A. C. Spiess, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1959–1966.
- (a) A. P. Dadi, S. Varanasi and C. A. Schall, *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, **95**, 904–910; (b) H. Zhao, C. L. Jones, G. A. Baker, S. Xia, O. Olubajo and V. N. Person, *J. Biotechnol.*, 2009, **139**, 47–54.
- N. Kamiya, Y. Matsushita, M. Hanaki, K. Nakashima, M. Narita, M. Goto and H. Takahashi, *Biotechnol. Lett.*, 2008, **30**, 1037–1040.
- (a) J. Pottkamper, P. Barthen, N. Ilmberger, U. Schwaneberg, A. Schenk, M. Schulte, N. Ignatiev and W. R. Streit, *Green Chem.*, 2009, **11**, 957–965; (b) S. Datta, B. Holmes, J. I. Park, Z. Chen and D. C. Dibble, *Green Chem.*, 2010, **12**, 338–345.
- P. Bonhote, A. P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram and M. Gratzel, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1168–1178.
- (a) P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biotechnol. Prog.*, 2004, **20**, 661–669; (b) T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 1457–1464; (c) T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **88**, 916–924; (d) S. N. Baker, T. M. McCleskey, S. Pandey and G. A. Baker, *Chem. Commun.*, 2004, 940–941; (e) T. A. Page, N. D. Kraut, P. M. Page, G. A. Baker and F. V. Bright, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 12825–12830.
- (a) R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2009, **45**, 405–418; (b) H. Zhao, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 891–907; (c) T. Itoh, Y. Matsushita, Y. Abe, S. Han, S. Wada, S. Hayase, M. Kawatsura, S. Takai, M. Morimoto and Y. Hirose, *Chem.–Eur. J.*, 2006, **12**, 9228–9237; (d) P. Lozano, R. Piamtongkam, K. Kohns, T. De Diego, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Green Chem.*, 2007, **9**, 780–784; (e) J. Mutschler, T. Rausis, J. M. Bourgeois, C. Bastian, D. Zufferer, I. V. Mohrenz and F. Fischer, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1793–1800.
- (a) F. Dourado, M. Bastos, M. Mota and F. M. Gama, *J. Biotechnol.*, 2002, **99**, 121–131; (b) I. R. M. Tebeka, A. G. L. Silva and D. F. S. Petri, *Langmuir*, 2009, **25**, 1582–1587; (c) S. L. Hirsh, M. M. M. Bilek, N. J. Nosworthy, A. Kondyurin, C. G. Dos Remedios and D. R. McKenzie, *Langmuir*, 2010, **26**, 14380–14388.
- S. Kongruang, M. J. Han, C. I. G. Breton and M. H. Penner, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2004, **113**, 213–231.
- S. Bose, D. W. Armstrong and J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 8221–8227.
- (a) G. Halliwell and M. Griffin, *Biochem. J.*, 1973, **135**, 587–594; (b) B. Nidetzky, W. Steiner, M. Hayn and M. Claeysens, *Biochem. J.*, 1994, **298**, 705–710.
- A. A. Rosatella, L. C. Branco and C. A. M. Afonso, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1406–1413.
- (a) P. Lozano, E. García-Verdugo, N. Karbass, K. Montague, T. De Diego, M. I. Burguete and S. V. Luis, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1803–1810; (b) J. Kim, J. W. Grate and P. Wang, *Chem. Eng. Sci.*, 2006, **61**, 1017–1026; (c) G. M. Rios, M. P. Belleville, D. Paolucci and J. Sanchez, *J. Membr. Sci.*, 2004, **242**, 189–196.

Anexo II

Cite this: *Green Chem.*, 2012, **14**, 2631

www.rsc.org/greenchem

PAPER

A cyclic process for full enzymatic saccharification of pretreated cellulose with full recovery and reuse of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride†

Pedro Lozano,^{*a} Berenice Bernal,^a Imanol Recio^a and Marie-Pierre Belleville^b

Received 14th June 2012, Accepted 10th July 2012

DOI: 10.1039/c2gc35905g

A sustainable cyclic process for the enzymatic saccharification of ionic liquid (IL)-pretreated cellulose, in which the IL is recovered and recycled, has been developed. Homogeneous cellulose solutions in the IL 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]) were used to prepare amorphous cellulose by antisolvent precipitation with water, ethanol or equimolar water–ethanol mixtures as green molecular solvents. Several operation parameters (*e.g.*, solvent, temperature, ultrasounds, *etc.*) for both cellulose precipitation and the washing steps were tested to achieve full desorption of the IL from the cellulose backbone. In the best conditions, up to 99.7% IL was recovered, which was then successfully reused in further cellulose dissolution/precipitation cyclic processes. Furthermore, the cellulose regenerated in each cycle was an excellent substrate for enzymatic hydrolysis, permitting full hydrolysis (*i.e.*, up to 97.7% hydrolysis after 4 h at 50 °C) by the combined action of both cellulase and cellobiase enzymes, that provides a clear glucose solution. The excellent suitability of this glucose solution for growing aerobic *Saccharomyces cerevisiae* was demonstrated.

1 Introduction

The production of second generation bioethanol from non-edible biomass (*e.g.*, lignocellulosic biomass) using clean and sustainable approaches is one of the greatest challenges on the research and industrial agenda.¹ Bioethanol production from cellulosic sources consists of three consecutive steps, such as, the pretreatment of cellulose to disrupt its highly ordered and rigid structure, hydrolysis of the cellulose to fermentable sugars, and finally, the ethanol fermentation by microorganisms. Full enzymatic hydrolysis of cellulose to its glucose units can be carried out by the synergistic action of different glycohydrolases, such as cellulases (endoglucanases EC 3.2.1.4, exoglucanases EC 3.2.1.91) and cellobiase (EC 3.2.1.21). The high specificity of enzymes is the characteristic that identifies them as the greenest approach for the saccharification of cellulose.² However, the crystalline structure of cellulose, which is supported by multivalent inter- and intramolecular hydrogen bonds, involves a recalcitrance to its degradation by biocatalysts. Several chemical and physical

methods have been employed to improve the accessibility of biomass polysaccharides to enzymatic hydrolysis (*e.g.*, ball and compression milling, dilute acids and hydrothermal treatment, bases, *etc.*), however, none are able to increase the surface area and decrystallize cellulose sufficiently to permit full enzymatic hydrolysis, short residence times and low enzyme concentrations.³

The pioneering work of Rogers' group, showing that some ILs, such as 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim][Cl]), 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride ([Hmim][Cl]), *etc.*, are able to dissolve cellulose,⁴ has opened up new opportunities for the valorisation of large amounts of waste cellulose-containing materials (*e.g.*, forest biomass). Among those the biocatalytic depolymerisation of cellulose to its glucose units, and their subsequent transformation into bioethanol by fermentation, is the most widely attempted.⁵

Although most ILs have been shown to act as excellent reaction media for enzyme-catalyzed reactions,⁶ it has been widely reported that ILs that are excellent for dissolving cellulose (*e.g.*, [Bmim][Cl], *etc.*), produce fast enzyme deactivation by protein unfolding.⁷ In this context, alternative approaches to overcome the negative effect of ILs-dissolving cellulose on cellulase activity and stability have been assayed for cellulose saccharification, *e.g.*, by using buffered media containing "benign" dissolved ILs at low concentrations, such as dialkylphosphate or acetate ILs,⁸ or by coating immobilized cellulase with a protective shell of hydrophobic ILs, like 1-butyl-3-methylimidazolium bistriflimide,⁹ the identification and application of cellulases from microbial sources others than fungus (*e.g.*, the halophilic

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. Facultad de Química, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain. E-mail: plozanor@um.es; Fax: +34 868 88 41 48; Tel: +34 868 88 73 92

^bIEM (Institut Européen des Membranes), UMR 5635 (CNRS-ENSCM-UM2), Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, F- 34095 Montpellier, France. Fax: +33 467149119; Tel: +33 467149148

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2gc35905g

archaeon *Halorhabdus utahensis*) with improved IL tolerance,¹⁰ or the use of concentrated sea water as a free-IL alternative reaction medium.¹¹ However, the most popular approach involves the re-precipitation of cellulose from IL solutions into polar molecular solvents (*e.g.*, water, ethanol, *etc.*) in order to disrupt the crystalline structure of this polysaccharide, thus improving its subsequent enzymatic hydrolysis in buffered media.¹² The digestibility of pretreated biomass by cellulase is limited by cellulose accessibility. However, the full degradation of cellulose to its glucose monomer units has not been reported. Some authors have applied ultrasonic intensification during the pretreatment of cellulose with ILs to improve the disruption of the cellulose structure, which enhances enzymatic *in situ* saccharification of cellulose in aqueous/IL media, providing up to 95% yield after 24 h reaction.¹³ Other authors carried out the enzymatic hydrolysis step of [Bmim][Cl]-pretreated cellulose (5 mg mL⁻¹) in a pH 4.8 citrate buffer system containing up to 20% of another IL, such as the tris-(2-hydroxyethyl)methylammonium methylsulfate (HEMA), which yields up to 4 mg mL⁻¹ glucose after 15 h at 60 °C.¹⁴

To the different advantages that IL technology may provide, as regards cellulose processing in the bioethanol industry, should be added the economical and environmental sustainability of the process based on the full recovery and recycling of ILs.^{1b,6,7b} Some ILs have been described as being not fully green solvents because of their low biodegradability and high (eco)toxicological properties.¹⁵

Several approaches to recover ILs from biomass-IL solutions have recently been proposed, *e.g.*, the use of aqueous

kosmotropic salt solutions after a cellulose re-precipitation step with polar solvent to form a three-phase system forming an IL-rich phase,^{16a} or the chromatographic separation of the IL and glucose from the enzymatic reaction mixture using alumina as the stationary phase, which provided up to 93% IL recovery.^{16b} However, since the final destination of the hydrolyzed cellulose solutions is fermentation by yeast to produce bioethanol, the effect of ILs on the viability of yeast cells should also be taken into account. Recently, it has been reported how the residual 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc]) content of cellulose hydrolysates act as a primary source of inhibition on *Saccharomyces cerevisiae* growth and ethanol production.^{17a} In the same way, it was observed how an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain, with cellulases on its cell surface, was resistant to some cellulose-dissolving ILs (*i.e.*, [Emim][OAc], [Emim][Cl], *etc.*) up to 200 mM.^{17b}

In this context, the present work describes for the first time a cyclic experimental approach (see Fig. 1) based on the enzymatic hydrolysis of regenerated cellulose from [Bmim][Cl] solutions, and the recovery and reuse of this IL in successive cellulose dissolution-regeneration cycles. The experimental protocol to produce regenerated cellulose (RC) was selected as a function of both the amount of IL recovered, and the suitability of this RC for enzymatic hydrolysis. Thus, water, ethanol, and a 50% (mol/mol) water-ethanol solution were tested as green antisolvents for the precipitation of cellulose from a cellulose-[Bmim][Cl] solution, and several operation parameters, such as temperature, stirring, ultrasound, *etc.*, were assayed in an attempt to fully recover this IL for reuse in consecutive dissolution-precipitation cycles.

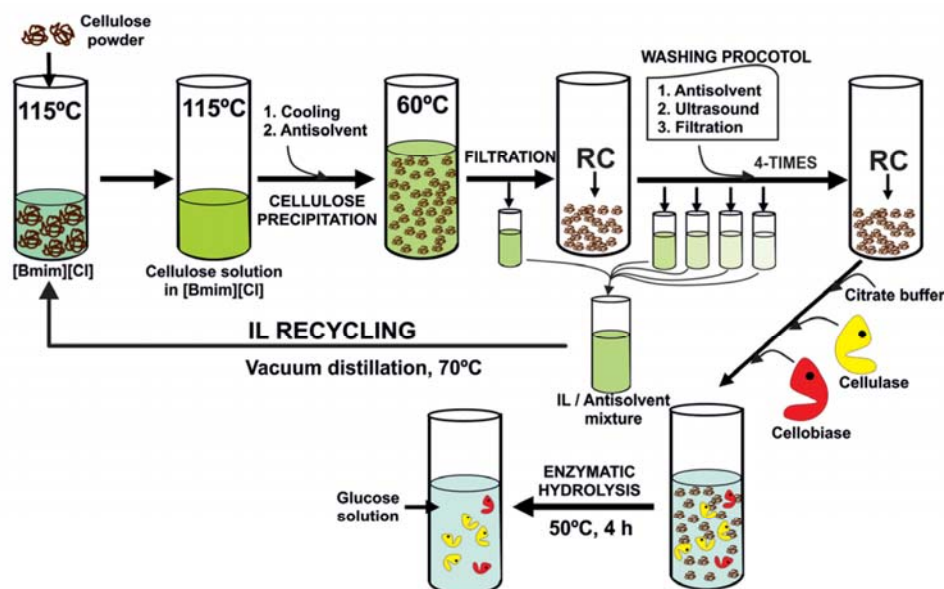


Fig. 1 Scheme of the cyclic protocol for the enzymatic saccharification of IL-pretreated cellulose and the recycling of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium ([Bmim][Cl]). RC: regenerated cellulose. For details see the Experimental section.

2 Experimental

Cellulase from *T. reesei* (Celluclast 1.5 L, EC 3.2.1.4), and cellobiase from *Aspergillus niger* (Novozyme 188, beta-1,4-glucosidase, EC 3.2.1.21) were a gift from Novozymes S.A (Spain). Microcrystalline cellulose (20 μm powder) and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, Spain). The IL 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, [Bmim][Cl], (99% purity) was purchased from IoLiTec GmbH (Germany).

Prior to use, enzyme preparations were ultrafiltered to eliminate all the low molecular weight additives, as follows: 25 mL of Celluclast or Novozym 188 were diluted in 225 mL of 50 mM citrate buffer pH 4.8, and the resulting solutions were concentrated 10-fold by ultrafiltration at 8 °C using a Vivaflow 50 (Sartorius) system equipped with polysulphone membranes (10 kDa, cut-off). For each enzyme, the process was repeated three-times, leading to cellulase (0.115 U mg^{-1} protein, 147.5 mg protein per mL) or cellobiase (0.814 U mg^{-1} protein, 93.6 mg protein per mL) solutions, respectively.

Preparation of regenerated cellulose (RC)

Firstly, the [Bmim][Cl] (10 g) was introduced into a 100 mL Erlenmeyer flask, and incubated at 115 °C in a thermoblock for 15 min, until the IL was fully melted. Then, microcrystalline cellulose (1 g) was added, and the mixture incubated with mechanical stirring for 1 h at 115 °C, which gave a clear, colourless and viscous cellulose solution. This solution was then cooled to 60 °C in a glycerol thermostatic bath. The cellulose was regenerated by adding 50 mL (approx. 5-fold IL-cellulose volume) of water, ethanol or an equimolar (23.5 : 76.5, v/v) water-ethanol solution, pre-heated to 60, 70 or 80 °C, and the resulting cellulose suspension was vigorously stirred for 15 min. The RC gel was recovered by filtration through a nylon membrane (0.1 mm mesh), while the liquid fraction was collected and stored for further analysis by HPLC and IL recovery. Then, the RC gel was washed five times with 50 mL of different antisolvent solutions at room temperature so that the IL was fully desorbed from the cellulose gel. This involved two-washing steps, using the same antisolvent as for cellulose regeneration, applying 150 W ultrasounds (Ultrasons, Selecta, Spain) for 15 min; two-washing steps with ultrapure water (MilliQ-Millipore System) and mechanical stirring for 15 min; and a final washing step with 50 mM citrate buffer pH 4.8 and mechanical stirring. The five resulting washing fractions were carefully collected and stored for further analysis by HPLC and IL recovery. The moisture content of the resulting regenerated cellulose was 84% (w/w), as measured by weight loss of RC after drying in an oven for 14 h at 105 °C.

Recovery of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride

The [Bmim][Cl] content of each washing liquid sample was separated by vacuum distillation at 70 °C and 74 hPa for 4 h. Then, all the fractions containing the recovered IL were jointly introduced into a 100 mL Erlenmeyer flask and incubated for 16 h in an oven at 80 °C to dryness. The dry [Bmim][Cl] recovered was repeatedly used to dissolve cellulose in further experiments, as described above.

HPLC analysis of [Bmim][Cl]

The IL concentration of all the washing fractions was determined in a Shimadzu HPLC equipped with a multi-channel (LC-20AD) pump and DAD (SPD-M20A) detector, using a Synergi Polar-RP 150 \times 4.6 mm column (Phenomenex) packed with polar end-capped particles (4 μm , pore size 80 Å) as the stationary phase. The analyses were performed under isocratic conditions (0.75 mL min^{-1} flow rate) using a 70 : 30 (v/v) 5 mM phosphate buffer (KH_2PO_4 - H_3PO_4) pH 3.0/acetone as the mobile phase.¹⁸ The elution profiles were monitored at 218 nm, and identification and quantification of the [Bmim][Cl] peak (2.8 min retention time) was made by the corresponding calibration straight line using acetophenone (11 min retention time) as the internal standard.

Enzymatic hydrolysis of regenerated cellulose (RC)

The 2% (w/v) RC suspension used as the substrate was prepared by introducing 500 mg of wet RC (80 mg dry RC) into a screw-capped vial with a Teflon-lined septum (5 mL total capacity), containing 4 mL of 50 mM citrate buffer pH 4.8. The mixture was maintained under magnetic stirring in a glycerol bath at 50 °C until a homogeneous suspension was observed. The reaction was then started by adding both cellulase (120 μL , 147.5 mg prot. mL^{-1}) and cellobiase (60 μL , 93.6 mg prot. mL^{-1}) glycohydrolases and was magnetically stirred for 4 h. At regular time intervals, 65 μL -aliquots were taken and suspended in 0.1 M bicarbonate buffer, pH 9.8 (1.035 mL) to stop the reaction, the samples were then centrifuged at 13 000 rpm for 5 min. The resulting clear phase was used to quantify glucose and cellobiose by HPLC, and the total reducing sugars by the dinitrosalicylic acid (DNS) method. One unit of cellulase activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of reducing sugars per minute. One unit of cellobiase activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μmol of cellobiose per minute. All experiments were carried out in duplicate.

Microbial growth test

Growth assays were performed using a lyophilised commercial *Saccharomyces cerevisiae* strain (Maurivin-PDM, AB Mauri, Australia) in YPD media [2% (w/v) glucose, 2% (w/v) peptone and 1% (w/v) yeast extract].^{17,19} The pH of the media were adjusted to 6.5 before sterilising. A starter culture was first prepared by adding 20 mg commercial *S. cerevisiae* lyophilised powder to 40 mL standard YPD medium, which was incubated under shaking (300 rpm) for 16 h at 30 °C in aerobic conditions. Then, a new YPD medium (40 mL) was prepared by dissolving peptone and yeast extract in a 2% (w/v) glucose solution in 5 mM citrate buffer pH 4.8, previously obtained by enzymatic hydrolysis of RC, as described above. Prior to use, this glucose solution was ultrafiltered using a Vivaflow 50 (Sartorius) system equipped with polysulphone membranes (10 kDa, cut-off) to eliminate soluble enzymes. As a growing control, another standard YPD medium was prepared by dissolving commercial glucose, peptone and yeast extract in 5 mM citrate buffer pH 4.8. Then, the pH of both growing media was adjusted to 6.5 before

View Online

Table 1 Effect of cellulose regeneration protocol on [Bmim][Cl] recovery as a function of antisolvent and washing step conditions^a

Entry	Cellulose precipitation with antisolvent (AS)	Washing steps					Total IL recovery (%)
		1. AS + US	2. AS + US	3. H ₂ O	4. H ₂ O	5. CB	
1	78.0 (H ₂ O, 60 °C)	10.7	6.4	nd	nd	nd	95.1
2	80.0 (H ₂ O, 70 °C)	8.4	6.8	nd	nd	nd	95.2
3	82.0 (H ₂ O, 80 °C)	6.2	7.2	nd	nd	nd	95.4
4	67.1 (EtOH, 60 °C)	21.6	8.9	nd	nd	nd	97.6
5	93.7 (H ₂ O–EtOH, 60 °C)	4.4	1.4	0.2	<0.1	nd	99.7
6	91.8 (H ₂ O–EtOH, 70 °C)	5.3	1.4	0.3	0.1	nd	98.9
7	89.9 (H ₂ O–EtOH, 80 °C)	5.0	1.2	0.4	0.2	nd	96.7

^a AS + US, antisolvent plus ultrasound for 15 min at room temperature; CB, 50 mM citrate buffer pH 4.8; nd, not detected; see Experimental section for details of samples.

sterilising. Growth assays were run by adding 0.1 mL of the above *S. cerevisiae* starter and shaking (300 rpm) at 30 °C for 30 h in aerobic conditions. At regular intervals, the optical densities (O.D.) of both cultures were determined at 600 nm (OD₆₀₀) by appropriate dilution in a spectrophotometer (Novaspec II, LKB-Pharmacia).

HPLC analysis of sugars

The glucose and cellobiose concentrations of the enzymatic reaction samples were determined in a Shimadzu HPLC equipped with a multi-channel (LC-20AD) pump, oven and light scattering (ELSD-LT II) detector. A Rezex RCM-monosaccharide-Ca⁺² column (300 × 7.8 mm, Phenomenex) was used as the stationary phase at 60 °C. Analyses were performed in isocratic conditions (0.6 mL min⁻¹ flow rate) using water as a mobile phase. The glucose (11 min retention time) and cellobiose (9 min retention time) peaks were identified and quantified from the corresponding calibration straight lines, using xylitol (23 min retention time) as the internal standard.

3 Results and discussion

The regeneration of cellulose from IL solutions is a key step in weakening its crystallinity and/or disrupting its fibre organization, resulting in a more accessible substrate for enzymatic hydrolysis into fermentable sugars, and subsequent transformation into bioethanol.¹² However, the recovery and reuse of ILs in cellulose processing for the biofuel industry could be considered as an essential task for ensuring the sustainability of any proposed approach in this field. Taking into account that [Bmim][Cl] has been described as one of the best ILs for dissolving lignocellulosic materials,^{4,5} a 10% cellulose solution in this IL was chosen as starting material to prepare RC, while water, ethanol or an equimolar water–ethanol mixture, were used as antisolvents to precipitate cellulose. In preliminary experiments, it was observed how the RC texture was hard and lumpy when the precipitation step was carried out at room temperature, while a fine and soft RC powder was obtained at higher temperatures, *i.e.*, 60, 70 or 80 °C. Seven different experimental protocols were followed to produce RC, and each RC sample was washed five times in order to attain full IL recovery (see Fig. 1). For all RC cases, the first two washing steps were carried out using the

respective antisolvent applied during the precipitation step, as well as the intensification effect of ultrasounds. Then, the resulting RCs were washed by water (twice), and then by 50 mM citrate buffer pH 4.8. Table 1 shows the [Bmim][Cl] recovery yield for each step in the seven approaches tested to produce RC. As can be seen, the use of water as the antisolvent agent to precipitate cellulose (entry 1) permitted a direct 78% IL recovery at 60 °C, which slightly increased to 82% when the temperature was raised to 80 °C (entries 2 and 3). In these cases, the application of two consecutive washing steps, intensified by the action of ultrasound, allowed improvement of the total IL recovery to 95.1–95.4%. The application of additional washing steps with water and citrate buffer did not provide further improvements in IL recovery. The use of ethanol as the antisolvent (entry 4) provided the worst results during direct cellulose precipitation at 60 °C (67.1% IL yield), which rose to 97.5% after two consecutive washing steps with the same antisolvent and intensification by the action of ultrasound. Once again, this yield was not improved by additional washing steps with both water and citrate buffer. Higher temperatures were not assayed because of the boiling point of ethanol (78 °C). However, the best results were obtained by using the equimolar ethanol–water mixture as the antisolvent at 60 °C (entry 5), resulting directly in a 93.7% IL recovery yield. The increase in temperature during the precipitation step produced a decrease in the IL recovery yield (entries 6 and 7). The application of the proposed washing protocol to the resulting RC samples improved the total IL recovery yield up to 99.7% (entry 5), clearly demonstrating the suitability of the proposed methodology to reach full recovery of ILs in cellulose processing. These results cannot be explained simply by the ability of either the water or ethanol protic solvents to shift [Bmim] and [Cl] ions from the RC, because neither is able to achieve full recovery when used as pure solvent (entries 1 to 4). In this context, Lindman *et al.* suggested that cellulose is significantly amphiphilic and that the hydrophobic interactions are important for explaining its solubility pattern.²⁰ Thus, the full IL recovery obtained for the equimolar water–ethanol mixture could be explained by both the role of water and ethanol as very strongly hydrogen-bonded molecules, as well as, the hydrophobic properties of the aliphatic moiety of the ethanol molecule, behaving together a useful green solvent for IL recovery. Furthermore, the role of ultrasound in the two washing steps could also be considered as the key, because of the demonstrated efficiency for both the disruption and dissolution of cellulose fibres.^{13,21}

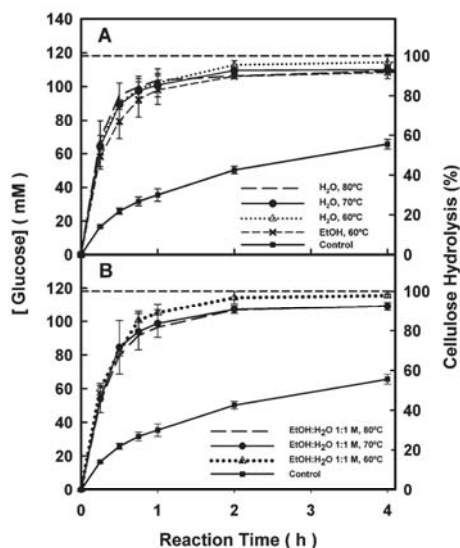


Fig. 2 Time-course profiles of both cellulose hydrolysis degree, and total reducing sugars released by the combined action of cellulase and cellobiase using regenerated cellulose (RC) as substrate. The different RCs were obtained from 2% (w/w) cellulose solutions in [Bmim][Cl] using water or ethanol (A), or a 1 : 1 (mol : mol) ethanol–water solution (B), as antisolvents at different temperatures. The control reaction was carried out using microcrystalline cellulose as substrate (see details in the Experimental section).

Besides the advantage of recovering IL, industrial interest for any such experimental approach will also be based on the suitability of the resulting cellulosic substrate for enzymatic degradation to produce glucose solutions. Fig. 2 shows the time course profiles for the total reducing sugars produced by the combined action of both cellulase and cellobiase on the resulting RC substrates obtained using the protocols described in Table 1. A control reaction was also carried out by using microcrystalline cellulose as substrate, which was practically complete after 4 h. The positive effect of [Bmim][Cl] pretreatment on the disruption of the cellulose structure can be clearly observed by comparison with the reaction control, where the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose stopped at 58%. No further improvements in cellulose hydrolysis were observed even after a reaction time of 24 h. Furthermore, the suitability of these RCs, used as substrates for enzymatic hydrolysis, can also be observed in Fig. 3. By using the RC obtained with water–ethanol as antisolvent (see Table 1, entry 5), the enzymatic hydrolysis of this RC substrate showed excellent agreement between all the time course profiles of total reducing sugars, glucose and cellobiose into the reaction medium. Cellobiose was only observed at the beginning of the reaction course, when the RC concentration was high, after which the synergic action of cellulase and cellobiase hydrolysed cellobiose

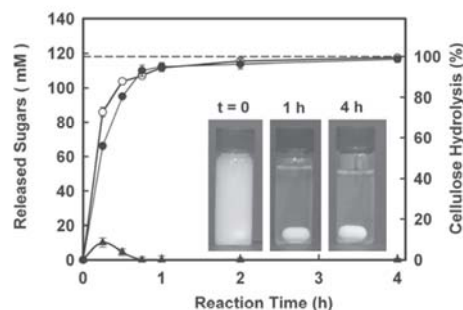


Fig. 3 Time-course profiles of total reducing sugars (○), glucose (●) and cellobiose (▲) released by the combined action of cellulase and cellobiase, using the regenerated cellulose (RC) resulting from precipitation with water–ethanol (see Table 1, entry 5) as substrate.

as fast as it was formed. The suitability of this RC substrate for enzymatic hydrolysis was also evident from the change in turbidity observed in the reaction medium (see inset pictures in Fig. 3), measured by transmittance at 660 nm, which was shifted from 0 to 70% during the 4 h the reaction. These results are clearly related by the weakening of the cellulose crystallinity and disruption of the fibre organization produced by the dissolution/precipitation pretreatment, which resulted in a more accessible substrate for efficient enzymatic hydrolysis.¹¹ However, full enzymatic hydrolysis of the RC substrate to its glucose monomeric units could only be explained by the added value made possible by the full recovery of the [Bmim][Cl] during the cellulose pretreatment process.

The negative effect of all ILs, that are able to dissolve cellulose, on the enzymatic activity of cellulase has been widely described.^{7,8,10,12,13} For the case of both the [Bmim][Cl]^{7b} and 1,3-dimethylimidazolium dimethylphosphate ([Mmim][DMP])^{7c} ILs, it was reported that the cellulase activity decays continuously with increasing IL concentration in the reaction medium, resulting in a residual activity of up to 35–45% at 10% IL concentration. Furthermore, it was described how the cellulose hydrolysis degree was clearly reduced by the presence of residual IL (e.g., 10% [Mmim][DMP]), giving a 40–70% hydrolysis yield at 24 h and did not increase with longer reaction times.^{7c} The use of “compatible” IL–cellulase systems (e.g., 15% [Emim][AcO]) for enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass did not improve its conversion to glucose and cellobiose, giving only a 40–50% hydrolysis yield for the first 24 h.^{8d} The presence of residual IL molecules bound to the cellulose polymer may have been involved in the low efficiency of cellulase in reaching full saccharification. Thus, the washing intensification steps carried out on regenerated cellulose (see Table 1) can be regarded as being the perfect substrate conditioning step for enzymatic hydrolysis, rather than an IL recovery process. The regenerated cellulose, that is to be used for enzymatic saccharification, should be fully free of residual IL content to reach full transformation to glucose monomeric units.

Despite the great interest of recovering all the IL used for conditioning cellulose for subsequent enzyme catalysis, its reuse in

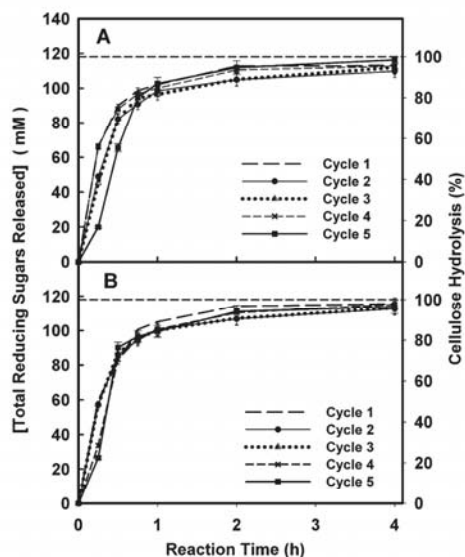


Fig. 4 Time-course profiles of both cellulose hydrolysis degree, and total reducing sugars released by the combined action of cellulase and cellobiase on regenerated cellulose (RC). The RCs were obtained through consecutive cycles of recovery and reuse of the [Bmim][Cl] used to dissolve cellulose, and by using water at 80 °C (A), or 1 : 1 (mol : mol) ethanol–water at 60 °C (B), as antisolvents during the cellulose regeneration step.

the further dissolution/precipitation of cellulose is a key factor for the economic sustainability of the proposed technology for biomass processing to produce biofuels. In this way, the IL recovered by using either water or an equimolar water–ethanol mixture, as antisolvent (see Table 1, entries 3 and 5, respectively) were applied in iterative cycles of RC production. The suitability of the resulting amorphous celluloses to be hydrolysed by the combined action of cellulase and cellobiase can be observed in Fig. 4, where the time course profiles for total reducing sugars are depicted. As can be seen, the reuse and recycling of [Bmim][Cl] for 5 cycles in the production of RC provided an excellent substrate for enzymatic hydrolysis, because the maximum conversion yield (higher than 96% for all cases) was reached at 4 h of reaction. The ability of [Bmim][Cl] to dissolve cellulose remained unchanged for 5 cycles, despite slight darkening, which could be removed by using charcoal. Fig. 5 shows the [Bmim][Cl] recovery yield obtained after each cellulose dissolution/precipitation cycle using either water or equimolar water–ethanol mixture as antisolvent. As can be seen, the suitability of the proposed methodology is clearly demonstrated by the excellent recovery yield (higher than 93%) obtained in all cases. The slight decrease observed as the number of cycles increases can be attributed to handling errors during manipulation of the large number of washing liquid fractions. Furthermore, the $^1\text{H-NMR}$ analysis of the recovered [Bmim][Cl] did not

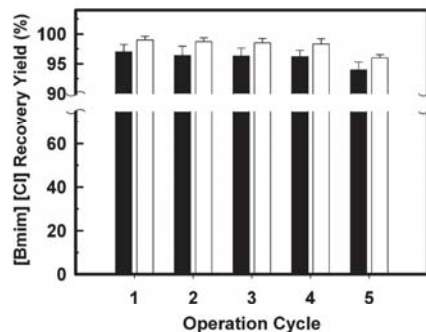


Fig. 5 Recovery yield of [Bmim][Cl] during consecutive operation cycles for cellulose dissolution/regeneration by using either water (black bars), or 1 : 1 (mol : mol) ethanol–water (white bars), as the antisolvent agent in the precipitation step.

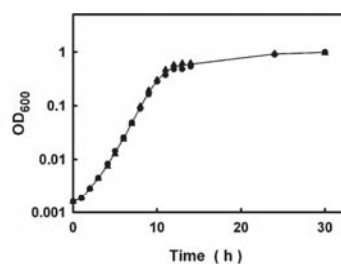


Fig. 6 Aerobic growth of *S. cerevisiae* in YPD medium containing 2% (w/v) glucose solution at pH 6.5 and at 30 °C. The glucose was obtained by enzymatic hydrolysis of free-IL RC (\blacktriangle), and from commercial suppliers (\bullet).

shows any sign of the decomposition and/or contaminating side products (see ESI †) with respect to the standard IL, which clearly demonstrates the excellent suitability of the proposed protocol.

The suitability of the glucose solution resulting from the enzymatic hydrolysis of RC was also tested as a carbon source for growing *Saccharomyces cerevisiae*. A YPD medium for growing microbes was prepared by adding the corresponding amount of peptone and yeast extract to a 2% glucose solution in 5 mM citrate buffer pH 4.8, previously obtained by the enzymatic hydrolysis of IL-free RC (see Experimental section), being compared with a control YPD medium containing commercial glucose. The citrate buffer concentration was ten-times lower than the usual concentration used for enzymatic activity assays to minimize its role as an alternative carbon source for growing yeast. In both YPD cases, the pH of the medium was adjusted to 6.5 before inoculation. Fig. 6 shows the aerobic growth of *S. cerevisiae* in both YPD media at 30 °C. As can be seen, both time-course profiles of microbial growth were identical, which clearly demonstrates the excellent suitability of the glucose solution obtained from the enzymatic reaction media for RC hydrolysis.

These results can be directly attributed to the absence of residual IL in the RC substrate, the final glucose solution showing identical suitability to the commercial one for microbial transformation. The negative effect of the residual content of IL in *S. cerevisiae* growing media has been reported as a primary source of inhibition on downstream microbial growth and ethanol production.¹⁶ It should be noted at this point, how the reported approaches for IL separation from monosaccharides did not lead to full recovery of the IL. Thus, in agreement with the first principle of green chemistry,²² dealing with prevention, it is better (and easier) to recover ILs from RC than to treat or clean up the resulting glucose solution from the RC hydrolysis step.

In conclusion, this work has shown how the suitability of IL technology in biomass processing to provide useful substrates for enzymatic hydrolysis is clearly enhanced by the IL recovery. By combining green molecular antisolvents, like water or ethanol, and ultrasound, efficient protocols to fully recover the IL from cellulose solutions can be designed. Moreover, the IL can be purified by simple distillation, before being applied in further biomass processing. In addition to the economic and environmental benefits provided by the full recovery of IL, the excellent suitability of the resulting amorphous cellulosic substrate for full transformation into directly fermentable glucose should be emphasized. Fundamental studies on enzyme reactors need to be carried out to establish clear criteria for specifically pairing the most appropriate enzyme mixture with the corresponding pretreated biomass substrate in continuous operation. Once again, the IL technology appears as an enhancer of enzyme technology for developing green chemical bioprocesses.

This work was partially supported by MINECO CTQ2011-28903-C02-02, and MICIN CTQ2008-00877) and SENECA Foundation (08616/PI/08) grants. We thank Ramiro Martínez (Novozymes España, S.A.) for a gift of Celluclast and Novozym 188. We also thank Jose M. Pastor for aid in preparing the microbiological experiments.

Notes and references

- For recent reviews on biomass processing to produce biofuels: (a) R. E. H. Sims, E. Mabee, J. N. Saddler and M. Taylor, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 68–75; (b) V. B. Agbor, N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin and D. B. Levin, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 675–685; (c) M. Rose and R. Palkovits, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 167–176; (d) N. Sarkar, S. K. Ghosh, S. Bannerjee and K. Aikat, *Renewable Energy*, 2012, **37**, 19–27.
- L. O. Sukharnikov, B. J. Cantwell, M. Podar and I. B. Zhulin, *Trends Biotechnol.*, 2011, **29**, 473–479.
- S. Zhu, Y. Wu, Q. Chen, Z. Yu, C. Wang, S. Jin, Y. Ding and G. Wu, *Green Chem.*, 2006, **8**, 325–327; P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros and M. J. Negro, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 4851–4861; A. R. F. C. Ferreira, A. B. Figueiredo, D. V. Evtuguin and J. A. Saraiva, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2764–2767.
- R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey and R. D. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4974–4975.
- (a) D. A. Fort, R. C. Remsing, R. P. Swatloski, P. Moyna, G. Moyna and R. D. Rogers, *Green Chem.*, 2007, **9**, 63–69; (b) D. M. Alonso, J. Q. Bond and J. A. Dumesic, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1493–1513; (c) S. Bose, D. W. Armstrong and J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 8221–8227; (d) M. E. Zakrzewska, E. Bogel-Lukasik and R. Bogel-Lukasik, *Energy Fuels*, 2010, **24**, 737–745.
- (a) P. Lozano, *Green Chem.*, 2010, **12**, 555–569; (b) P. Dominguez de Maria and Z. Maugeri, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 220–225; (c) P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, M. Pucheault and M. Vaultier, *Curr. Org. Synth.*, 2011, **8**, 810–823; (d) R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1437–1451.
- (a) M. B. Turner, S. K. Spear, J. G. Huddleston, J. D. Holbrey and R. D. Rogers, *Green Chem.*, 2003, **5**, 443–447; (b) A. C. Salvador, M. C. Santos and J. A. Saraiva, *Green Chem.*, 2010, **12**, 632–635; (c) P. Engel, R. Mladenov, H. Wulffhorst, G. Jager and A. C. Spiess, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1959–1966.
- (a) N. Kamiya, Y. Matsushita, M. Hanaki, K. Nakashima, M. Narita, M. Goto and H. Takahashi, *Biotechnol. Lett.*, 2008, **30**, 1037–1040; (b) H. Zhao, G. A. Baker, A. Song, O. Olubajo, T. Crittle and D. Peters, *Green Chem.*, 2008, **10**, 696–705; (c) J. Vitz, T. Erdmenger, C. Haensch and U. S. Shubert, *Green Chem.*, 2009, **11**, 4117–4424; (d) Y. Wang, M. Radosovich, D. Hayes and N. Labbe, *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, **108**, 1042–1048; (e) M. F. Thomas, L. L. Li, J. M. Handley-Pendleton, D. van der Lelie, J. J. Dunn and J. F. Wishart, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 11200–11203.
- P. Lozano, B. Bernal, J. M. Bernal, M. Pucheault and M. Vaultier, *Green Chem.*, 2011, **13**, 1406–1410.
- T. Zhang, S. Datta, J. Eichler, N. Ivanova, S. D. Axen, C. A. Kerfeld, F. Chen, N. Kyrpides, P. Hugenoltz, J. F. Cheng, K. L. Sale, B. Simmons and E. Rubin, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2083–2090.
- P. M. Grande and P. Dominguez de Maria, *Bioresour. Technol.*, 2012, **104**, 799–802.
- (a) A. P. Dadi, S. Varanasi and C. A. Schall, *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, **95**, 904–910; (b) H. Zhao, C. L. Jones, G. A. Baker, S. Xia, O. Olubajo and V. N. Person, *J. Biotechnol.*, 2009, **139**, 47–54; (c) I. H. Samayan and C. A. Schall, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 3561–3566; (d) E. Husson, S. Buchoux, C. Avondo, D. Cailleu, K. Djellab, I. Gosselin, O. Wattraint and C. Sarazin, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 7335–7342; (e) F. Hong, X. Guo, S. Zhang, S. F. Han, G. Yang and L. J. Jonsson, *Bioresour. Technol.*, 2012, **104**, 503–508.
- (a) F. Yang, L. Li, Q. Li, W. Tan, W. Liu and M. Xian, *Carbohydr. Res.*, 2010, **81**, 311–316; (b) K. Ninomiya, K. Kamide, K. Takahashi and N. Shimizu, *Bioresour. Technol.*, 2012, **103**, 259–265.
- S. Bose, C. A. Barnes and J. W. Petrich, *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, **109**, 434–443.
- C. W. Cho, T. P. T. Pham, Y. C. Jeon, K. Vijayaraghavan, W. S. Choe and Y. S. Yun, *Chemosphere*, 2007, **69**, 1003–1007; J. S. Torrecilla, J. Garcia, E. Rojo and F. Rodriguez, *J. Hazard. Mater.*, 2009, **164**, 182–194.
- (a) K. Shill, S. Padmanabhan, Q. Xin, J. M. Prausnitz, D. S. Clark and H. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, **108**, 511–520; (b) D. Feng, L. Li, F. Wang, W. Tan, G. Zhao, H. Zou, M. Xian and Y. Zhang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **91**, 399–405.
- (a) M. Ouellet, S. Datta, D. C. Dibble, P. R. Tamrakar, P. I. Benke, C. L. Li, S. Singh, K. L. Sale, P. D. Adams, J. D. Keasling, B. A. Simmons, B. M. Holmes and A. Mukhopadhyay, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2743–2749; (b) K. Nakashima, K. Yamaguchi, N. Taniguchi, S. Arai, R. Yamada, S. Katahira, N. Ishida, H. Takahashi, C. Ogino and A. Kondo, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2948–2953.
- P. Stepnowski, J. Nidhauer, W. Mrozik and B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1483–1491.
- E. Albers and C. Larsson, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **68**, 401–405.
- B. Lindman, G. Karlstrom and L. Stigsson, *J. Mol. Liq.*, 2010, **156**, 76–81.
- (a) M. Imai, K. Ikari and I. Suzuki, *Biochem. Eng. J.*, 2004, **17**, 79–83; (b) F. Yang, L. Li, Q. Li, W. Tan, W. Liu and M. Xian, *Carbohydr. Polym.*, 2010, **81**, 311–316; (c) J. P. Mikkola, A. Kirilina, J. C. Tuuf, A. Pranovich, B. Holmbom, L. M. Kustov, D. Y. Murzin and T. Salmi, *Green Chem.*, 2007, **9**, 1229–1237.
- P. T. Anastas and J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, 1998, p. 30.