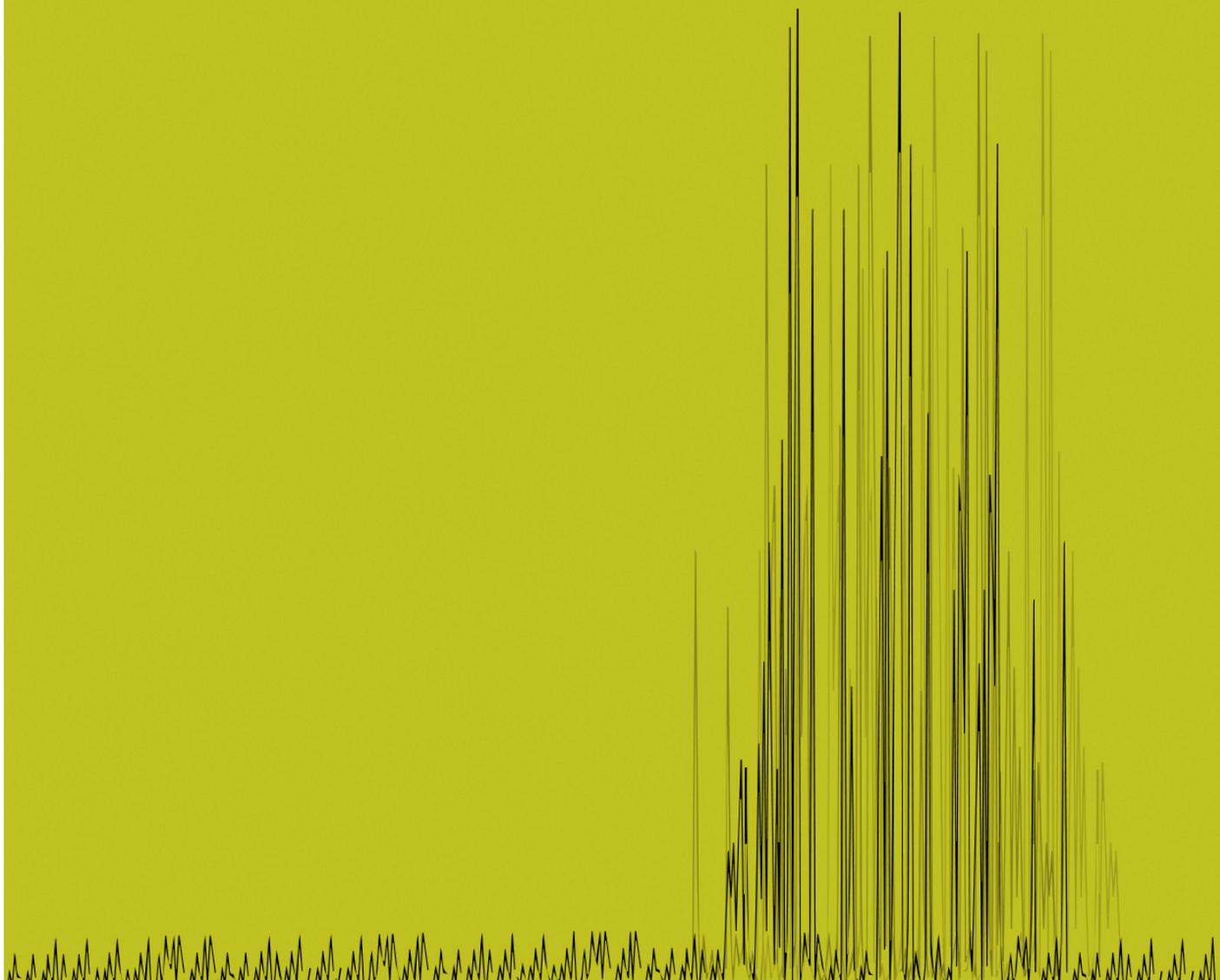


# Producción de xilooligosacáridos y bioetanol a partir de paja de cebada mediante procesos enzimáticos.

Estudio de su actividad prebiótica

**Cristina Álvarez Vaquerizo**

ABRIL 2020





# **TESIS DOCTORAL**

**Mayo 2020**

**Producción de xilooligosacáridos y bioetanol a partir de paja de cebada mediante proceso enzimático. Estudio de su actividad prebiótica.**

**Cristina Álvarez Vaquerizo**

**Programa de doctorado en Ciencias**

**Directora: Dra. María José Negro Álvarez**

**Tutor: Dr. Antonio Zapardiel Palenzuela**

A todos mis seres queridos





## AGRADECIMIENTOS

Tengo muchas personas a las que dar la gracias, porque todo el mundo de mi alrededor me ha ayudado en este proceso, aunque ellos no lo sepan, unos profesionalmente y otros personalmente.

Primeramente, me gustaría darle las gracias encarecidamente a la Dra. María José Negro por animarme a dar este paso y aceptar ser mi directora. Gracias por tú dedicación y confiar en mí. Al profesor Dr. Antonio Zapardiel, me gustaría agradecerle que siempre haya estado disponible.

Mi agradecimiento también es para la Dra. Raquel Iglesias, por su continuo ánimo. Gracias a Mercedes por abrirme las puertas del CIEMAT y seguir ocupándose de mi desde las altas esferas. A Nacho, Paloma y José María siempre dispuestos a ayudarme. No puedo olvidarme de José Miguel, por guardarme siempre un sitio en su coche.

Gracias a todos los compañeros del grupo, Ana, David, Aleta, Javi, Miguel, Carlos, Marina, José Luis, Isabel, Pablo, Olga y Estefanía por esos desayunos y comidas tan divertidas. A Alta Gracia, por guardarme el material. Gracias a mis “primos” Antonio y Adela por vuestro apoyo. A mi excompañero de despacho José Manuel, que seguro que me echa de menos y al nuevo fichaje María, que nos surte de caramelos ricos. ¡¡Ah!! No, me puedo olvidar de mi vecina soriana

Quiero hacer un agradecimiento especial a Feli y Alberto, esto hubiera sido muy distinto y más duro sin ellos. Gracias Feli por tu paciencia y espero que estés orgullosa. Como dicen por ahí, gracias por formar un pack indivisible conmigo, Alberto. Parte de este trabajo os pertenece.

No puedo olvidarme de Beatriz, gracias por tu involucración y ser la mejor guía de Orense.

Por supuesto, gracias a la química que trajo a mi vida a mis queridas Marta (+3) y María (+2) creando un enlace indestructible entre nuestras vidas.

A mis “sorellas” Flaminia, Francesca y Donatella por hacerme disfrutar de unas vacaciones en Roma.

Gracias a Ana porque siempre que nos vemos parece que lo hemos hecho ayer mismo. A ti Isolda por compartir veranos inolvidables, que, aunque hayan pasados, nuestra amistad continua.

A Pedro, Ángel<sup>2</sup>, María Ángeles, Alejandra, Eva, Alejandro, Mario, Marta, Begoña, José, Álvaro, Rodrigo, Miguel Ángel, Silvia y Mónica, por enseñarme que hay muchos modelos de familia, pero al fin al cabo todos familia.

Gracias Vaquerizada (Julio, Patricia, Pedros, Javier, Tamara) por que tenemos más de cien motivos para estar juntos. A Miguel, Jorge, Javi, Candela, Martina y Diego, gracias por practicar con vosotros el papel más importante de mi vida.

Tía María Jesús, gracias por enseñarme todos los días lo que es el cariño verdadero, soy muy afortunada por tenerte de segunda madre.

A todas las personas que no puedo besar físicamente todos los días, pero no me abandonan ni un segundo de mi vida.

Gracias a mis padres, Juana y Juan Carlos, por enseñarme a ser una persona trabajadora y porque haga lo que haga siempre están orgullosos de mí. Esther, que puedo decir que no te haya dicho ya, sin ti no sería ni la “mitad” de lo que soy. No imagino a nadie mejor con la que crecer.

A Gonzalo, por formar junto a mí, una estructura insoluble a pesar de las dificultades de la vida y comprender los nervios que conlleva esta etapa.

A mi bebe por elegirme.

## RESUMEN

La biorrefinería es una instalación que integra los procesos necesarios para producir energía, materiales y productos químicos de manera similar a una refinería de petróleo convencional utilizando la biomasa como producto de partida. La biomasa, materia prima de estas plantas, es muy versátil ya que puede ser transformada en multitud de valiosos productos químicos y energía, generando la mínima cantidad de desechos y emisiones.

Este concepto de aprovechamiento máximo de recursos naturales soporta el concepto de bioeconomía. La bioeconomía considera el aprovechamiento económico de las fuentes renovables, procesos industriales no tóxicos y productos basados en recursos naturales, lográndose una economía plenamente sostenible. Siguiendo esta filosofía, los residuos agrícolas están siendo investigados por su naturaleza lignocelulósica, su alta disponibilidad y su bajo coste como una materia prima ideal para biorrefinerías capaces de generar productos de alto valor añadido y energía en procesos económicamente sostenibles.

En el territorio español, la cebada es un cereal muy abundante, además, su paja es un residuo barato y con un alto contenido en carbohidratos lo que le hace un candidato idóneo para ser utilizado como sustrato en biorrefinerías. Para su utilización, la paja de cebada debe de ser tratada para lograr mayor accesibilidad a los carbohidratos que contiene.

El primer paso es alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica mediante una etapa denominada pretratamiento. De los descritos en la bibliografía, la explosión por vapor utilizado en este trabajo ha demostrado ser un pretratamiento eficaz para dicha materia prima. El grupo de Biocarburantes del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), donde se ha realizado este trabajo, presenta una larga trayectoria en procesos de pretratamiento para biomasa.

Tras el pretratamiento y mediante filtración a vacío se obtiene una fracción soluble compuesta fundamentalmente por la hemicelulosa solubilizada y un residuo sólido insoluble rico en celulosa y lignina.

Esta Tesis Doctoral se centra en la obtención de productos de valor añadido a partir de las distintas fracciones descritas previamente. En este trabajo se realiza un estudio de caracterización y evaluación prebiótica de los xilooligosacáridos presentes en la fracción soluble de la hemicelulosa. Por otro, el residuo sólido insoluble será utilizado para la obtención de etanol.

En los últimos años, el interés por la utilización de la hemicelulosa ha crecido debido a sus aplicaciones y propiedades inexploradas, iniciando la búsqueda de biocombustibles o la conversión a productos de alto valor añadido como son los xilooligosacáridos. Los xilooligosacáridos pertenecen a compuestos prebióticos emergentes, siendo estos, uno de los alimentos funcionales más prometedores. Un prebiótico se define como “aquel ingrediente alimentario no digerible que permite cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal y confiere beneficios para la salud del huésped”.

Por otro lado, el bioetanol obtenido a partir de la celulosa contenida en el residuo sólido insoluble representa una de las pocas alternativas renovables para la sustitución a corto plazo de los combustibles fósiles en el sector del transporte ya que pueden integrarse en los sistemas de distribución de combustible actuales.

El primer hito para la realización de este trabajo fue, el estudio de la efectividad del pretratamiento de explosión por vapor en diferentes condiciones utilizando la paja de la cebada como sustrato. El criterio de evaluación fue la recuperación de la hemicelulosa en la fracción soluble y la recuperación de celulosa en la fracción insoluble.

Una vez seleccionada las condiciones de pretratamiento, el siguiente paso fue conseguir una buena despolimerización de la hemicelulosa presente en la fracción soluble. Debido a su alta complejidad, se requiere el uso de enzimas hidrolíticas. Así, la fracción soluble se sometió a una serie de ensayos de hidrólisis enzimática con diferentes enzimas comerciales tanto de manera individual como formando cocteles enzimáticos para lograr la mayor cantidad de xilooligosacáridos con bajo grado de polimerización (DP2-DP6).

Finalmente, se llevó a cabo la purificación de los xilooligosacáridos por medio de dos estrategias cromatografía de exclusión molecular y ultrafiltración/nanofiltración. Todos los xilooligosacáridos fueron caracterizados mediante MALDI-TOF

(Espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser inducida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo) y FTIR (Espectroscopía de Infrarrojos de Transformada de Fourier) así como evaluados en su potencial aplicación como prebióticos mediante ensayos “*in vitro*”.

Con respecto al residuo sólido insoluble, se estudiaron el efecto de diferentes dosis de la enzima hidrolítica comercial Cellic CTec2 (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) para poder obtener la mayor cantidad de glucosa en el proceso de hidrólisis enzimática para distintas cargas de sólido. La glucosa obtenida fue utilizada como material de partida para la obtención del bioetanol mediante fermentación, utilizando una levadura industrial convencional. Se estudiaron diferentes estrategias de proceso: hidrólisis y fermentación separadas (HFS) o prehidrólisis, sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS).



## Índice

<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>13</i>
<i>Listado de figuras</i>	<i>17</i>
<i>Listado de tablas</i>	<i>21</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
<b>1.1. Biorrefinerías</b>	<b>25</b>
1.1.1. Biorrefinería según el grado de desarrollo tecnológico	28
1.1.2. Biorrefinería según la materia prima	28
1.1.3. Biorrefinerías según el proceso	30
1.1.4. Biorrefinería según el producto intermedio	32
1.1.5. Productos de la biorrefinería	33
1.1.5.1. Productos energéticos	35
1.1.5.2. Bioproductos	36
<b>1.2. Materiales lignocelulósicos</b>	<b>41</b>
1.2.1. Compuestos estructurales del material lignocelulósico	41
1.2.1.1. Celulosa	41
1.2.1.2. Hemicelulosa	43
1.2.1.3. Lignina	46
1.2.2. Compuestos no estructurales	48
1.2.3. Residuos lignocelulósicos como materia prima	49
1.2.4. Aprovechamiento de la paja de cebada	49
1.2.5. Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos	50
1.2.5.1. Pretratamiento por explosión por vapor	54
1.2.6. Solubilización de la hemicelulosa	56
1.2.7. Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa	58
1.2.7.1. Enzimas xilanolíticas	59
1.2.8. Producción de xilooligosacáridos mediante hidrólisis enzimática	63
1.2.9. Purificación de los xilooligosacáridos	66
<b>1.3. Alimentos funcionales: Prebióticos</b>	<b>69</b>
1.3.1. Alimento funcional	69
1.3.2. Prebióticos	71
1.3.3. Oligosacáridos No Digeribles (OND)	73
1.3.3.1. OND comerciales	73
1.3.4. Métodos de evaluación del potencial prebiótico	75
1.3.5. Determinación de los ácidos grasos de cadena corta	77
1.3.6. Técnicas de determinación de las poblaciones bacterianas	79
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>81</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>85</b>
<b>3.1. Materia prima</b>	<b>87</b>
<b>3.2. Pretratamiento de explosión por vapor (PEV)</b>	<b>87</b>

<b>3.3. Etapa previa de purificación de la fracción líquida obtenida en el pretratamiento de explosión por vapor</b>	<b>89</b>
<b>3.4. Enzimas</b>	<b>90</b>
3.4.1. Determinación de las actividades enzimáticas	91
<b>3.5. Ensayos de hidrólisis enzimática</b>	<b>92</b>
3.5.1. Ensayos de hidrólisis enzimática sobre un sustrato comercial	92
3.5.2. Ensayos de hidrólisis enzimática sobre sustrato FIPCP	94
<b>3.6. Métodos de purificación de la FIPCP</b>	<b>96</b>
3.6.1. Fraccionamiento de la FIPCP	96
3.6.2. Purificación por membrana	97
<b>3.7. Ensayos de actividad prebiótica</b>	<b>99</b>
3.7.1. Preparación del inóculo fecal	99
3.7.2. Preparación del medio de fermentación	100
3.7.3. Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)	101
3.7.4. Visualización en el microscopio y cuantificación	102
3.7.5. Determinación de ácidos grasos de cadena corta	102
<b>3.8. Ensayos de hidrólisis enzimática y fermentación del RSI</b>	<b>102</b>
3.8.1. Proceso HFS	103
3.8.2. Proceso PSFS	103
<b>3.9. Determinaciones analíticas</b>	<b>104</b>
3.9.1. Caracterización de la materia prima y residuo sólido insoluble	104
3.9.2. Métodos analíticos	105
3.9.2.1. Determinación de los azúcares monoméricos	105
3.9.2.2. Determinación de compuestos de degradación	106
3.9.2.3. Determinación de la concentración de etanol	106
<b>3.10. Análisis estructural de los xilooligosacáridos</b>	<b>107</b>
3.10.1. Determinación de los oligosacáridos	107
3.10.2. Análisis de distribución molecular	108
3.10.3. Espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser inducida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS)	109
3.10.4. Espectroscopia de Infrarrojos de Transformada de Fourier (FTIR)	110
<b>3.11. Análisis estadístico</b>	<b>110</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>111</b>
<b>4.1. Materia prima</b>	<b>113</b>
<b>4.2. Evaluación del pretratamiento EV</b>	<b>114</b>
<b>4.3. Purificación previa de la fracción soluble obtenida en el pretratamiento de EV</b>	<b>123</b>
<b>4.4. Producción de XOS vía enzimática</b>	<b>125</b>
4.4.1. Hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas pertenecientes a las familias GH10	125

4.4.1.1. Efecto de la dosis de enzima la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa XlnTh en la hidrólisis de la FIPCP	127
4.4.2. Hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa perteneciente a la familia GH11	130
4.4.3. Hidrólisis enzimática de FIPCP con mezcla de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH10 y GH11	134
4.4.4. Comportamiento de las $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa Arf51 (GH51) y Arf43 (GH43) en la HE con XlnM1 de dos arabinoxilanos comerciales de baja (LOW) y media (MEDIUM) viscosidad	135
4.4.5. Hidrólisis enzimática de la FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa XlnM1 (GH11) y $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas Arf51 y Arf43	143
4.4.6. Efecto de la adición de las enzimas esterases en los ensayos de hidrólisis enzimática	145
4.4.6.1. Ensayo de hidrólisis enzimática de la FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas XlnM1, $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y feruloil esterasa	146
4.4.6.2. Ensayo de hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas XlnM1 con la adición de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Arf51), feruloil esterasa (Fe_E) y acetilxilano esterasa (AcX_E)	149
4.4.7. Hidrólisis enzimática de la FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas NS50030	153
4.4.7.1. Hidrólisis enzimática de FIPCP con endo- $\beta$ -1,4-xilanasas NS50030	153
4.4.7.2. Hidrólisis enzimática de FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas NS50030 junto con las enzimas accesorias (Arf51, AcX_E y Fe_E)	155
<b>4.5. Estrategia de purificación para la obtención de XOS</b>	<b>158</b>
4.5.1. Purificación de la FIPCP mediante cromatografía de exclusión molecular	158
4.5.1.1. Hidrólisis enzimática de la F1	163
4.5.1.2. Purificación de los polisacáridos no hidrolizable durante la HE de la FIPCP con XlnM1+Arf51+Fe_E	165
4.5.2. Obtención de XOS mediante purificación por membranas	168
<b>4.6. Caracterización estructural de los xilooligosacáridos</b>	<b>171</b>
4.6.1. Análisis mediante MALDI-TOF-MS	171
4.6.2. Análisis mediante FTIR	181
<b>4.7. Evaluación de la actividad prebiótica</b>	<b>185</b>
<b>4.8. Bioetanol a partir de RSI</b>	<b>197</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>205</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>209</b>
<b>ANEXO</b>	<b>239</b>



## Lista de abreviaturas

AcXE: Acetilxilano esterasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE: Acetil esterasa

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

APCI: Ionización química a presión atmosférica

ARN: Ácido ribonucleico

*Arf*:  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa

AXOS: Arabinoxilanos

BCP: Bioproceso consolidado

CEDER: Centro de Desarrollo de Energías Renovables

CIEMAT: Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas

D1: Dosis baja

D2: Dosis alta

DOE: Departamento de Energía de Estados Unidos

DP: Grado de polimerización

EC: Clasificación de Enzimas

ECN: Centro de Investigación de Energía de Holanda

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EM: Espectrometría de masas

ESI: Ionización por electrospray

EV: Explosión por vapor

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

FID: Detector de ionización de llama

FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia

FIPCP: Fracción líquida de paja de cebada pretratada

FOSHU: Alimentos para uso específico en salud

FOS: Fructooligosacáridos

FPU: Unidades de papel de filtro

FTIR: Espectroscopia de infrarrojos de transformada de Fourier

FUFOSE: Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa

GaOS: Galactooligosacáridos

GC: Cromatografía de gases

GH: Glicosil hidrolasas

GMOS: Galactoglucomananos

GOS: Glucooligosacáridos

HE: Hidrólisis enzimática

HFS: Hidrólisis y fermentación separadas

HMF: 5-Hidroximetilfurfural

HPAEC/PAD: Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC/IR: Cromatografía líquida de alta resolución/ Índice de Refracción

IEA: Agencia Internacional de Energía

IMOS: Isomaltooligosacáridos

IR: Índice de refracción

LAP: Procedimientos analíticos de laboratorio

MALDI-TOF-MS: Espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser inducida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo

m.p.: Materia prima

NREL: National Renewable Energy Laboratory

OND: Oligosacáridos no digeribles

OS: Oligosacáridos

OSLu: Oligosacáridos derivados de lactulosa

*p*NPA: *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosido

*p*NPG: *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido

$\rho$ NPX:  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilapiranosido

p/p: relación peso /peso

p/v: relación peso/volumen

PLA: Ácido poliláctico

PSFS: Prehidrólisis sacarificación y fermentación simultáneas

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

RSI: Residuo sólido insoluble

RMN: Resonancia magnética nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

SEC: Cromatografía de exclusión molecular

SHIME: Simulador del ecosistema microbiano intestinal humano

SIGMI: Simulador gastrointestinal dinámico

SFS: Sacarificación y fermentación simultáneas

TOF: Tiempo de vuelo

Tr: Tiempo de retención

UE: Unión Europea

UI: Unidades internacionales

UV: Ultravioleta Visible

WOS: Web of Science

v/v: relación volumen/ volumen

*Xln*: Xilanasas

XOS: Xilooligosacáridos



## Listado de figuras

### Introducción

Figura 1.1. Rutas de conversión de la biomasa _____	30
Figura 1.2. Diferentes niveles de integración de las etapas del proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica _____	36
Figura 1.3. Esquema de procedencia de los bioproductos a partir de biomasa _____	39
Figura 1.4. Esquema de la estructura de la celulosa <a href="https://public.ornl.gov/site/gallery/highressurvey.cfm">https://public.ornl.gov/site/gallery/highressurvey.cfm</a> _____	42
Figura 1.5. Unidades estructurales de la lignina _____	48
Figura 1.6. Compuestos de degradación potencialmente inhibidores y su procedencia formados durante el pretratamiento de EV en los materiales lignocelulósicos ____	56
Figura 1.7. Esquema de actuación de las diferentes $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas _____	61
Figura 1.8. Evolución de los artículos científicos publicados en los últimos 30 años ____	71

### Materiales y métodos

Figura 3.1. Unidad piloto de explosión por vapor en las instalaciones del CIEMAT ____	88
Figura 3.2. Esquema de la obtención del residuo sólido insoluble y del líquido procedente en el pretratamiento de explosión por vapor de la paja de cebada	89
Figura 3.3. Estructura del arabinoxilano de trigo commercial _____	92
Figura 3.4. Esquema de las enzimas implicadas en la degradación de la hemicelulosa pretratada de paja de cebada _____	95
Figura 3.5. Esquema del fraccionamiento de la FIPCP _____	97
Figura 3.6. Esquema del procedimiento de trabajo con el sistema de purificación de las membranas _____	99
Figura 3.7. Esquema para la caracterización del material lignocelulósico _____	104
Figura 3.8. Secuencia de los diferentes pulsos para la detección de carbohidratos ____	108
Figura 3.9. Equipo de HPLC con las columnas de HPSEC colocadas en serie _____	109

### Resultados

Figura 4.1. Cromatogramas HPSEC de las diferentes fracciones líquidas tras ser sometidas a las distintas condiciones de pretratamiento de explosión por vapor _____	118
Figura 4.2. Composición de la materia prima y del RSI obtenido en el pretratamiento a 180°C durante 30 minutos expresado en porcentaje en peso seco _____	119
Figura 4.3. Cromatograma de HPAEC-PAD de los xilooligómeros obtenidos en la fracción líquida de paja de cebada tratada por explosión de vapor a 180 °C durante 30 min _____	122

Figura 4.4. Perfil cromatográfico de HPSEC de la fracción líquida de paja de cebada pretratada con EV a 180 °C 30 min _____	122
Figura 4.5. Cromatogramas HPLC/UV de la fracción líquida obtenida tras el PEV antes y después del tratamiento con la resina _____	123
Figura 4.6. Efecto de la etapa de purificación previa de la fracción líquida en la hidrólisis enzimática: (a) HE sin purificación previa y (b) HE con etapa de purificación _____	125
Figura 4.7. Perfiles de producción de xilosa, X <sub>2</sub> y X <sub>3</sub> durante las HE con las enzimas <i>XlnJa</i> y <i>XlnTh</i> _____	127
Figura 4.8. Perfil de producción de xilosa durante la HE con <i>XlnTh</i> con las dosis D1 y D2 _____	128
Figura 4.9. Cinéticas de producción de XOS con <i>XlnTh</i> D1 (a) y D2 (b). Distribución de xilosa y XOS en la HE con <i>XlnTh</i> a las 3 h (c) _____	129
Figura 4.10. Perfil de producción de xilosa durante la HE con <i>XlnM1</i> con las dosis D1 y D2 _____	131
Figura 4.11. Cinéticas de producción de XOS con <i>XlnM1</i> D1 (a) y D2 (b). Distribución de xilosa y XOS en la HE con <i>XlnM1</i> a las 3 h (c) _____	133
Figura 4.12 a) Cinética de producción de XOS con la mezcla de <i>XlnTh</i> y <i>XlnM1</i> (1:1 D1) b) Distribución de los XOS y xilosa determinados en la HE con <i>XlnTh</i> (D1) y <i>XlnM1</i> (D1) y mezcla de las dos enzimas a las 3 h _____	134
Figura 4.13. Producción de arabinosa (a) y de xilosa (b) en la HE de un arabinoxilano comercial (LOW) utilizando diferentes enzimas _____	137
Figura 4.14. Cromatograma de HPSEC/IR de la hidrólisis enzimática a 6 h de arabinoxilano <i>LOW</i> con distintas enzimas ( <i>XlnM1</i> ; <i>Arf51</i> ; <i>Arf43</i> ; <i>XlnM1+Arf51</i> ; <i>XlnM1+Arf43</i> y <i>XlnM1+Arf51+Arf43</i> ) _____	139
Figura 4.15. Producción de arabinosa (a) y de xilosa (b) en la HE de un arabinoxilano comercial ( <i>MEDIUM</i> ) utilizando diferentes enzimas _____	140
Figura 4.16. Cromatogramas de HPSEC/IR de la hidrólisis enzimática del sustrato arabinoxilano <i>MEDIUM</i> con distintas enzimas ( <i>XlnM1</i> ; <i>Arf5</i> ; <i>Arf43</i> ; <i>XlnM1+Arf51</i> ; <i>XlnM1+Arf43</i> y <i>XlnM1+Arf51+Arf43</i> ) _____	141
Figura 4.17. Efecto de la suplementación de <i>Arf43</i> y <i>Arf51</i> a la HE de FIPCP con la endo-β-(1,4)-D-xilanasasa <i>XlnM1</i> _____	145
Figura 4.18. Liberación de ácidos <i>p</i> -cumárico y ferúlico durante la hidrólisis enzimática de la <i>FIPCP</i> con las enzimas <i>XlnM1</i> y <i>Arf51</i> en combinación con <i>Fe_E</i> (Mezcla enzimática <i>Maf</i> ) _____	146
Figura 4.19. a) Cinéticas de producción de XOS en la HE de la FIPCP utilizando la mezcla enzimática <i>Maf</i> ; b) Comparación de la producción de XOS y monosacáridos en la HE de la FIPCP con <i>XlnM1</i> y la mezcla enzimática <i>Maf</i> ( <i>XlnM1+Arf51+Fe_E</i> ) _____	147
Figura 4.20. Cromatograma HPSEC/IR de la hidrólisis <i>Maf</i> a 4 h _____	148

Figura 4.21. a) Perfil de producción de los XOS con la combinación enzimática <i>Complex</i> . b) Evolución de XOS (X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> , X <sub>4</sub> , X <sub>5</sub> y X <sub>6</sub> ) en la HE con <i>XlnM1</i> , mezcla enzimática <i>Maf</i> y la combinación enzimática <i>Complex</i> _____	151
Figura 4.22. Cromatograma de HPAEC/PAD de la HE con la combinación enzimática <i>Complex</i> en comparación con la FIPCP sin hidrolizar _____	152
Figura 4.23. Perfil de producción de XOS durante la HE de la FIPCP con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa comercial <i>NS50030</i> _____	155
Figura 4.24. XOS liberados en la HE de FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa <i>NS50030</i> , suplementada con enzimas accesorias ( <i>Arf51</i> , <i>AcX_E</i> + <i>Fe_E</i> ) _____	157
Figura 4.25. Perfil de elución de FIPCP a) en la columna semipreparativa HPSEC Bio-Gel P2; b) Distribución de los XOS analizados por HPSEC-IR en cada una de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular _____	159
Figura 4.26. Distribución de los XOS analizados por HPAEC-PAD en cada una de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular _____	161
Figura 4.27. Perfil de producción de xilosa y XOS en la HE de la fracción F1 con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa ( <i>NS50030</i> ) y las enzimas accesorias <i>Novozym 188</i> , <i>AcX_E</i> y <i>Fe_E</i> _____	164
Figura 4.28. Perfil cromatográfico HPSEC de FIPCP hidrolizado enzimáticamente con el ensayo <i>Maf</i> _____	166
Figura 4.29. Distribución de monosacaridos y XOS contenidos en la fracción F1 <sub>HE_Maf</sub> y los producidos en la HE de la F1 <sub>HE_Maf</sub> con <i>XlnM1</i> suplementado con <i>Arf51</i> y <i>Fe_E</i> _____	167
Figura 4.30. Distribución de monosacáridos y XOS contenidos en la fracción F1 <sub>HE_Maf</sub> y los producidos en la HE de la F1 <sub>HE_Maf</sub> con <i>NS50030</i> junto con <i>Arf51</i> y <i>Fe_E</i> _____	168
Figura 4.31. Cromatograma de HPSEC/IR antes y después de la hidrólisis enzimática de la muestra que contiene a los compuestos retenidos en el proceso de ultra/nanofiltración _____	170
Figura 4.32. Balance del proceso de purificación de membrana _____	171
Figura 4.33. Espectro de MALDI-TOF-MS de a) XOS1; b) XOS2 c) XOS3 y d) F2 _____	175
Figura 4.34. Espectros de FTIR de las muestras XOS1, XOS2, XOS3 y F2 _____	183
Figura 4.35. Cromatograma de HPSEC/IR de XOS2 y F2 _____	188
Figura 4.36. Perfil de degradación en la fermentación <i>in vitro</i> de XOS1 (a) y XOS2 (b) después de 4 y 24 h mediante HPAEC-PAD _____	195
Figura 4.37. Incremento (con respecto al tiempo 0 h) del recuento total de bacterias y <i>Bifidobacterium</i> a las 24 h determinado por la técnica FISH en cultivos fecales que utilizan FOS, XOS1 y XOS2 como fuente de carbono y la muestra control (sin fuente de carbono), <sup>a,b</sup> indican diferencias significativas (P<0,05). Las barras de error indican la desviación estándar _____	197

Figura 4.38. Cinéticas de producción de glucosa (g/L) durante la hidrólisis enzimática del RSI de paja de cebada pretratada a 180 °C y 30 min utilizando distintas concentraciones de sustrato y dosis de enzima _____	199
Figura 4.39. Rendimientos de hidrólisis enzimática y concentración de glucosa (g/L) obtenidos a 72 h con diferentes concentraciones de sustrato y dosis de enzima _____	200
Figura 4.40. Cinéticas de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando diferentes esquemas de producción de etanol. a): HFS; b). P <sub>8h</sub> SFS y c) P <sub>24h</sub> SFS _____	202

## Listado de tablas

### Introducción

Tabla 1.1. Descripción de los componentes de las plataformas _____	34
Tabla 1.2. Productos energéticos obtenidos a partir de biomasa _____	37
Tabla 1.3. <i>Building block</i> obtenidos a partir de la biomasa según DOE en 2004 _____	38
Tabla 1.4. Obtención de diferentes productos partiendo del furfural y derivados _____	40
Tabla 1.5. Tipos de mananos existentes en la hemicelulosa _____	47
Tabla 1.6. Resumen de los principales pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica _____	52
Tabla 1.7. Ensayos de hidrólisis enzimática sobre diferentes sustratos utilizadas para la producción de XOS descritos en la bibliografía _____	64
Tabla 1.8. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de fraccionamiento y purificación en la utilización de XOS _____	67
Tabla 1.9. Prebióticos comerciales y su fabricante _____	74
Tabla 1.10. Evaluación del efecto prebiótico con diferentes métodos _____	76

### Materiales y métodos

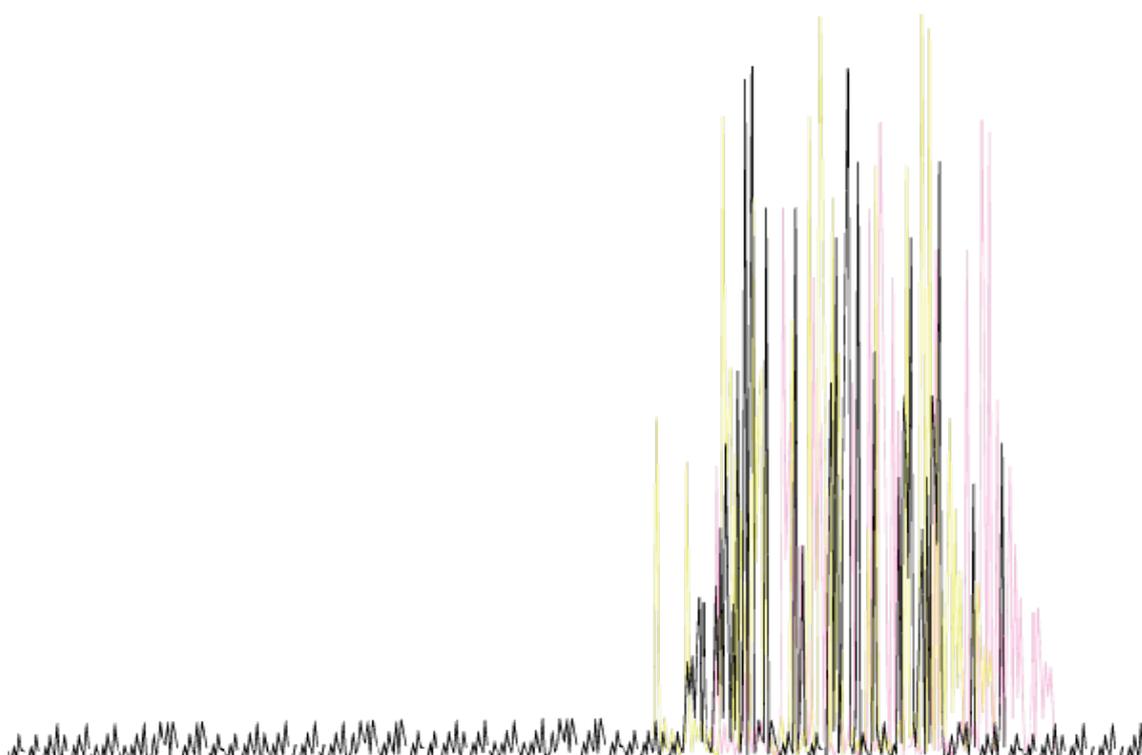
Tabla 3.1. Resumen de las enzimas utilizadas en esta Tesis _____	93
Tabla 3.2. Resumen de las condiciones de hidrólisis sobre el arabinosilano comercial _____	94
Tabla 3.3. Resumen de los ensayos de hidrólisis enzimática sobre FIPCP _____	96

### Resultados

Tabla 4.1. Composición de la paja de cebada pretratada mediante explosión por vapor _____	116
Tabla 4.2. Recuperación de hemicelulosa y celulosa en las distintas condiciones de pretratamiento _____	117
Tabla 4.3. Composición del prehidrolizado de paja de cebada _____	120
Tabla 4.4. Porcentaje de liberación de xilosa, arabinosa y X <sub>2</sub> -X <sub>4</sub> sobre el arabinosilano <i>LOW</i> _____	139
Tabla 4.5. Porcentaje de liberación de xilosa, arabinosa y X <sub>2</sub> -X <sub>4</sub> sobre el arabinosilano <i>MEDIUM</i> _____	142
Tabla 4.6. Composición en forma oligomérica y monomérica (g/L) de las fracciones recogidas mediante cromatografía de exclusión molecular _____	160
Tabla 4.7. Asignación estructural de las señales de las masas obtenidas mediante MALDI-TOF-MS de las muestras XOS1, XOS2, XOS3 y F2 _____	179
Tabla 4.8. Asignación de bandas en el espectro de FTIR de las diferentes muestras _____	184
Tabla 4.9. Composición de las muestras al inicio del ensayo de fermentación _____	185
Tabla 4.10. Variación del pH durante el ensayo de fermentación de los diferentes xilooligosacáridos _____	187
Tabla 4.11. Concentraciones de AGCC (mM) durante la fermentación de los xilooligosacáridos a partir de paja de cebada _____	192
Tabla 4.12. Concentración de etanol y rendimiento de fermentación con diferentes configuraciones de proceso _____	203



# 1.INTRODUCCIÓN





### ***1.1. Biorrefinerías***

La sociedad actual se enfrenta a un grave problema energético ya que más del 80% del suministro mundial de la energía procede de fuentes fósiles (petróleo, gas natural y carbón) (IEA, 2017) además, estos recursos son limitados y no renovables. El aumento de la población mundial demanda diariamente una gran cantidad de energía, lo que supone un agotamiento inevitable de los recursos energéticos. Además, el uso de los recursos fósiles es el responsable de las grandes emisiones de gases contaminantes, las cuales han repercutido negativamente en el medio ambiente creando el cambio climático actual.

Ante esta situación, en las últimas décadas se ha despertado un gran interés en la búsqueda de fuentes alternativas que satisfagan la demanda energética actual siendo respetuosas con el medio ambiente (Vohra y col., 2014). En este contexto las energías renovables se presentan como una alternativa para el desarrollo de una bioeconomía circular alternativa a la economía lineal (Comisión Europea 2014).

Analizando el consumo energético por sectores, el sector transporte de los países de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), son los responsables del 29% de las emisiones de CO<sub>2</sub> según la Agencia Internacional de Energía (IEA, 2016). Ante esta perspectiva, la Unión Europea (UE) tomó conciencia del problema y se ha marcado el reto de reducir para 2030 las emisiones globales en un mínimo del 40% con respecto a 1990, aumentando la cantidad de energía renovable utilizada (cuota mínima 32%) en combinación con una mejora en la eficiencia energética (al menos el 32,5%) (Comisión Europea 2017).

De entre las energías renovables, la biomasa lignocelulósica se presenta como una alternativa real para obtener energía “limpia” ayudando a reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> del sector transporte. La biomasa es un recurso sostenible y renovable que presenta la peculiar característica de ser la única energía renovable que permite producir productos químicos y materiales a partir de ella, adicionalmente de la citada energía.

El término biomasa engloba a toda materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía, excluyendo aquellos

que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización. Según la Directiva 2009/28/EC del 23 de abril de 2009 relativa al fomento del uso de la energía procedente de fuentes renovables, la biomasa se define como “fracción biodegradable de productos de desecho y residuos procedentes de la agricultura, silvicultura y de las industrias relacionadas, así como de la fracción biodegradable de residuos industriales y municipales”.

El aprovechamiento de la biomasa lleva asociado el “balance neutro” en las emisiones de CO<sub>2</sub>, debido a que la combustión de la biomasa no contribuye al aumento en emisiones de gases de efecto invernadero, ya que el CO<sub>2</sub> emitido en la combustión es que fue absorbido durante el crecimiento, por lo que no se altera el ciclo biológico del CO<sub>2</sub>.

Al comparar a la biomasa con las otras fuentes renovables, la biomasa presenta la ventaja que a partir de ella se pueden generar biocombustibles para sectores donde no existen otras alternativas, como son la aviación o la navegación.

Así, la biomasa se convierte en una materia prima clave como fuente de energía renovable, ya que la eficiencia, la flexibilidad del uso de esta junto con la innovación tecnológica actual permite ser usada en las denominadas biorrefinerías. En una biorrefinería se integran diferentes procesos de conversión para lograr producir energía, combustibles, productos químicos y/o materiales a partir de las materias primas en una sola instalación, de manera similar a las refinerías convencionales de petróleo (Biernat y Grzelak, 2015).

El concepto de biorrefinería está centrado en dos ideas fundamentales: el uso de la biomasa como insumo principal y la producción de una diversidad de productos con alto valor añadido. Así, la utilización de la biomasa en una instalación equipada con la tecnología necesaria y con la integración de los procesos para producir combustibles, energía, productos químicos y/o biomateriales, mantiene una similitud con el petróleo en las refinerías convencionales.

El concepto de biorrefinería ha ido evolucionando con el tiempo y /o institución así en la bibliografía se encuentran distintas definiciones del concepto:

- El Laboratorio Nacional de Energías Renovables NREL (National Renewable Energy Laboratory) define el concepto de biorrefinería como “aquella instalación que integra procesos de transformación de biomasa y equipos adecuados para producir combustibles, energía y químicos a partir de la biomasa” (NREL).
- La IEA (International Energy Agency), propone la siguiente definición “el procesamiento sostenible de biomasa en un espectro de productos para el mercado y la producción de energía” (IEA, 2007).
- El ECNs (Centro de Investigación de Energía de Holanda), define la biorrefinería como “aquella instalación donde tiene lugar el fraccionamiento de la biomasa en diferentes componentes, que pueden dirigirse al mercado directamente o ser transformados previamente mediante diferentes tratamientos” (ECN).

A pesar de las similitudes que existen con las refinerías convencionales, la naturaleza química de la biomasa y las numerosas posibilidades de transformación de esta, multiplican los posibles esquemas de operaciones que pueden desarrollarse en una biorrefinería pudiendo ser clasificadas en función de:

- Grado de desarrollo tecnológico
- Materia prima
- Procesos de conversión
- Producto intermedio

Esta clasificación de las biorrefinerías es la más extendida (Cherubini y col., 2009; Kamm y Kamm, 2004).

### ***1.1.1. Biorrefinería según el grado de desarrollo tecnológico***

Dentro de esta clasificación se puede hablar de **biorrefinerías de primera generación (Phase I-biorefineries)** donde se focaliza en la conversión de una sola materia prima, utilizando solamente un único proceso para su conversión a un producto diana. En estas instalaciones apenas existe flexibilidad en el proceso. Como ejemplo de este tipo de biorrefinería están aquellas en las que se obtiene el bioetanol a partir de los azúcares fermentables de la caña de azúcar o el biodiesel mediante transesterificación de aceites vegetales utilizando metanol y un catalizador (Shahid y Jamal, 2011). El principal inconveniente de este tipo de instalaciones es la producción de un único producto. En cambio, en las **biorrefinerías de segunda generación (Phase II- biorefineries)**, se obtienen varios productos a partir de la materia prima utilizada, la biomasa lignocelulósica. Este recurso es el material orgánico más abundante en el planeta (producción anual en torno a  $10^9$  toneladas) (Reddy y Yang, 2005) y no entra en competencia con los cultivos alimentarios. En el caso de las **biorrefinerías de tercera generación (phase III- biorefineries)** o integradas son más flexibles que las anteriores, utilizan cualquier residuo procedente de la ganadería, agricultura e incluso los residuos sólidos urbanos con el fin de producir biocombustibles, productos químicos como productos agroquímicos y biomateriales como los plásticos, presentando un mayor aprovechamiento de las biomásas, reduciendo la generación de residuos y haciendo más sostenibles las plantas.

### ***1.1.2. Biorrefinería según la materia prima***

La materia prima que puede ser utilizada en las biorrefinerías procede de diferentes sectores como los agrícolas, forestales, domésticos. Las algas también son utilizadas como materias primas en las biorrefinerías. Atendiendo a la biomasa que se usa, se pueden distinguir distintos tipos de biorrefinería.

A partir de la **biomasa** lignocelulósica (formada fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina) se obtiene energía y productos químicos (Cherubini, 2010; de Jong y Gosselink, 2014). En las instalaciones que utilizan materiales lignocelulósicos se obtiene principalmente bioetanol mediante el proceso de fermentación de los azúcares de 6 átomos de carbono. La fracción de azúcares procedentes de pentosas son utilizados para producir

compuestos de alto valor añadido y finalmente a partir de la lignina, se produce mayoritariamente biocombustibles que pueden ser utilizados para la obtención de calor y electricidad (de Jong y Jungmeier, 2015) aunque también se utiliza como materia prima para la obtención de productos químicos como el catecol, vainillina, etc. Para poder disponer de estos compuestos y que sean utilizables, la biomasa lignocelulósica debe someterse a una etapa de pretratamiento, cuyo objetivo es alterar la estructura de la biomasa para que los carbohidratos se encuentren más accesibles.

La principal limitación que tiene este tipo de biorrefinería es que debido a la heterogeneidad de la biomasa lignocelulósica no existe un pretratamiento universal para todas las biomásas.

Este tipo de biorrefinerías son ya una realidad y se encuentran en distintas partes del mundo. A partir del 2020, está previsto que las compañías Clariant y St1 (Noruega) puedan empezar a operar con las plantas ubicadas en Rumania y Noruega respectivamente, para producir bioetanol a partir de celulosa.

Otras materias primas utilizadas por las biorrefinerías son:

*La biomasa marina*, donde las microalgas (algas verdes entre otras) y las macroalgas (algas pardas y rojas), dependiendo de la especie y las condiciones crecimiento, acumulan cantidades significativas de aceites, carbohidratos y almidón (de Jong y Jungmeier, 2015). Esta biomasa ofrece un enorme potencial para la producción de energía, aunque todavía se encuentra en estadios muy tempranos.

*Las semillas de cultivos oleaginosos* como son los cultivos de colza, girasol o la soja se pueden utilizar para la producción de combustibles para motores, principalmente biodiesel. El coproducto mayoritario obtenido es la glicerina, la cual tiene aplicación en diferentes sectores como el cosmético o farmacéutico. También es utilizado en la fabricación de resinas o lubricantes.

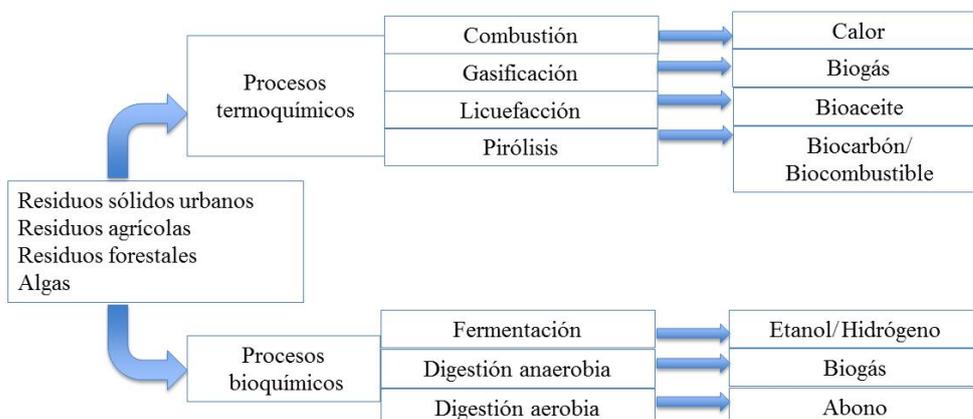
*En las biorrefinerías verdes*, la materia prima utilizada es biomasa verde como son las hierbas y pastos. Entre las ventajas de este tipo de biorrefinería se pueden destacar: a) la

materia prima es barata y abundante, b) se producen proteínas y azúcares como productos secundarios c) el rendimiento por hectárea es relativamente alto (Kamm y Kamm, 2004).

### 1.1.3. Biorrefinerías según el proceso

El objetivo de la biorrefinería es producir, además de energía, productos de alto valor añadido a partir de biomasa. Para lograrlo, la materia prima es sometida a una serie de operaciones que ayudan a transformar la biomasa en los productos deseados, pero teniendo en cuenta la heterogeneidad de la biomasa, existen múltiples combinaciones de biomasa y procesos (Fig. 1.1). Los procesos se pueden clasificar en dos grupos de conversión, principalmente, termoquímica o bioquímica.

Además, la mayoría de las biomásas requieren una etapa previa a la conversión para poder reducir mediante molienda a la granulometría deseada de las partículas de biomasa, facilitando la homogeneidad para ser adecuada a los requisitos de la instalación. También, algunas biomásas requieren un tratamiento de extracción para después someterse a los procesos de conversión termoquímica o bioquímica. En esta etapa la estructura de la biomasa es lo único que se ve alterado, no cambia ni el estado ni la composición.



**Figura 1.1.** Rutas de conversión de la biomasa

### ***Conversión termoquímica***

Este tipo de procesos implican una descomposición térmica de la biomasa produciendo una liberación de energía en forma de calor o de un biocombustible intermedio. Estos procesos se pueden clasificar en:

Combustión: es el proceso por el cual la biomasa es oxidada por el oxígeno del aire liberando agua y dióxido de carbono. Es la forma más directa de aprovechamiento de la biomasa.

Gasificación: En este proceso también se oxida la biomasa, pero con una cantidad limitada de oxígeno, aproximadamente un tercio del requerido, para conseguir una oxidación parcial, a altas temperaturas (800-1500 °C). Así se forma un producto denominado gas de síntesis, que está formado por una mezcla de CO y H<sub>2</sub> en diferentes proporciones, que puede ser utilizado como biocombustible o transformarse mediante síntesis química en biocombustible más energéticos como biocombustibles sintéticos, BTL (biomass to liquid), en productos químicos como alcoholes (metanol, etanol) o ácido acético (Cherubini, 2010).

Pirólisis: es la descomposición térmica de la biomasa en ausencia de oxígeno dando como resultado el carbón vegetal (en cuya composición se encuentran carbones, alquitrán y cenizas), una mezcla gaseosa (formada por CO, H<sub>2</sub> e hidrocarburos como el CH<sub>4</sub>) y el aceite de pirólisis (García-Aparicio y col., 2009; Fernández y col., 2011).

Licuefacción: es una variante del proceso de pirólisis, en este caso se incorpora un gas reductor (CO, H<sub>2</sub> o gas de síntesis) a alta presión (120-200 bares) y tiempos cortos 5-15 minutos, logrando así la hidrogenación de la biomasa. El resultado es la obtención de una mezcla de hidrocarburos en fase líquida con mayor poder calorífico llamado bioaceite de licuefacción.

### ***Conversión bioquímica***

En este proceso las macromoléculas son transformadas en moléculas más pequeñas por la acción de enzimas y/o microorganismos. A diferencia de los procesos

termoquímicos, la conversión biológica tiene lugar a temperaturas y velocidades bajas. La conversión bioquímica puede clasificarse en:

Fermentación: es la etapa en la que la mezcla azucarada que contiene los monosacáridos es transformada por los microorganismos en diferentes compuestos como son bioetanol, xilitol, etc. La fermentación para la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulosa es un proceso muy investigado existiendo algunas plantas de demostración como es la perteneciente a la empresa Borregaard Technology en Noruega.

Digestión anaerobia: es el proceso en el que se obtiene como producto el biogás, para ello se requiere una serie de reacciones químicas y la actuación de una serie de microorganismos que irán transformando la materia orgánica en gas, fundamentalmente metano. Son necesarios unos 30 días para una degradación total de la materia orgánica.

Digestión aerobia o compostaje, es el proceso biológico aeróbico mediante el cual diversos grupos de microorganismos llevan a cabo la biodegradación de la biomasa, obteniendo un abono excelente para la agricultura.

#### **1.1.4. Biorrefinería según el producto intermedio**

Alrededor del 75% de la composición de la biomasa lignocelulósica son carbohidratos, que pueden ser utilizables para obtener compuestos energéticos y bioproductos mediante las plataformas tecnológicas. La plataforma es el conjunto de productos intermedios que se producen en los procesos primarios de las biorrefinerías, que son los utilizados para lograr los productos finales (bioproductos y bioenergía). En estos procesos se generan los productos químicos base, llamados “*building blocks*”. Se definen los *building blocks* o producto químico base a aquellas moléculas con múltiples funcionalidades con el potencial de ser transformadas en nuevas familias de moléculas de interés industrial, a partir de las cuales se obtienen compuestos químicos y materiales con las prestaciones demandadas por el mercado (IEA, 2007).

La **plataforma de azúcares y lignocelulosa** se centra en la conversión química de los azúcares extraídos procedentes de las diferentes biomásas. Así, se diferencian la

plataforma de azúcares de 6 átomos de carbonos (glucosa, manosa, galactosa entre otros) obtenidos por la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica para producir ácidos orgánicos y alcoholes mediante fermentación. Por otro lado, la plataforma azúcares de 5 y 6 átomos de carbono obtenidos en la hidrólisis de la hemicelulosa por reacciones de hidrogenación y oxidación y deshidratación da lugar a productos químicos (Aristizábal-Marulanda y Cardona Alzate, 2019).

En la *plataforma de gas de síntesis*, todos los componentes de la biomasa son utilizados, incluidos los hidratos de carbono, para obtener energía y bioproductos. En esta plataforma, la biomasa se somete al proceso de gasificación para obtener gas de síntesis, formado por H<sub>2</sub> y CO. Con este gas se puede obtener biocombustibles libres de azufre, electricidad, hidrógeno, además de ser precursor de varios bioproductos como las olefinas, alcanos y otros compuestos oxigenados.

Adicionalmente a estas plataformas, existen otras que utilizan compuestos diferentes a los carbohidratos, para obtener bioproductos y bioenergía. Algunas de estas plataformas tienen un relevante futuro como son la de proteínas y de biogás. En la tabla 1.1 se muestra una breve descripción de estas plataformas.

#### ***1.1.5. Productos de la biorrefinería***

Los productos obtenidos en la biorrefinería se pueden agrupar en dos categorías, la bioenergía, que engloba todas sus aplicaciones (térmica, eléctrica y mecánica) y los bioproductos (carbohidratos, proteínas, lípidos y metabolitos). Estos productos pueden llegar a ser los sustitutos de los productos obtenidos a partir del petróleo.

Tabla 1.1 .Descripción de los componentes de las plataformas

Plataforma	Materia prima	<i>Building Blocks</i>	Bioproductos	Bioenergía
Proteínas	Residuos industriales	Aminoácidos	Vitaminas	Calor
	Residuos forestales	Péptidos	Antioxidantes	Electricidad
	Algas		Colágeno	
	Residuos ganaderos		Pigmentos	
Biogás	Residuos urbanos	Acetatos	Ácidos carboxílicos volátiles	Biometano
	Residuos industriales	Ácidos carboxílicos volátiles	Fertilizantes	Calor
	Residuos ganaderos		H <sub>2</sub>	Electricidad
Aceites vegetales/ lípidos	Cultivos oleaginosos	Ácidos y ésteres grasos	Biodisolventes	Biocombustibles líquidos
	Aceites usados	Alcoholes grasos	Antioxidantes	Bioqueroseno
	Grasas industriales	Dioles	Emulsionantes	Calor
		Glicerol	Biolubricantes	Electricidad
		Epiclorhidrina		

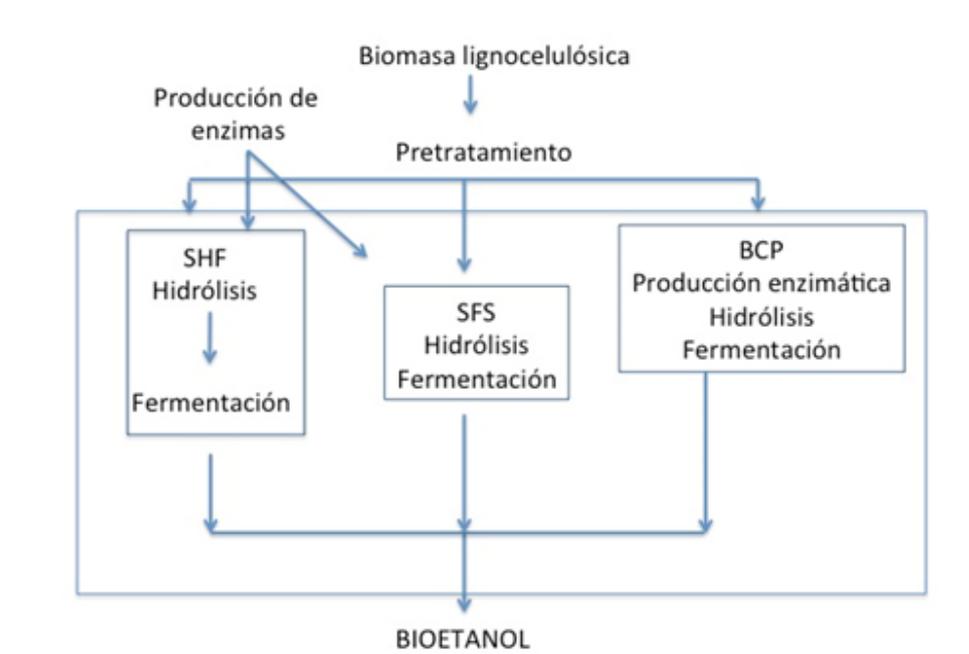
### ***1.1.5.1. Productos energéticos***

El término bioenergía hace referencia a toda energía obtenida a partir de la biomasa y comprende todas las formas y estados de la energía derivadas de combustibles de origen biológico.

- El combustible para el transporte, también llamado biocarburante, se puede obtener de materias primas que tienen una aplicación alimentaria (biocarburante de primera generación), con lo que puede surgir una competencia. Este conflicto se resuelve con los biocarburantes de segunda generación (Nigam y Singh, 2011), ya que provienen de materiales lignocelulósicos (abundantes y baratos) y cultivos energéticos, por lo que su utilización contribuye tanto a aumentar la sostenibilidad como a reducir el coste del proceso de producción de bioetanol (Sims y col., 2010). Los biocarburantes de tercera generación son una evolución de la segunda generación y utilizan materiales acuáticos como las algas o microalgas (Rizwan y col., 2013).

- El etanol producido a partir de biomasa se denomina bioetanol. El proceso de producción a partir de materiales lignocelulósicos consta generalmente de las siguientes etapas: pretratamiento, producción de enzimas, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación. En el pretratamiento se altera la estructura de la biomasa para que la hidrólisis enzimática sea efectiva y se obtenga la mayor cantidad de azúcares monoméricos que finalmente serán fermentados a etanol. Tras el pretratamiento, las etapas de producción de enzimas, hidrólisis y fermentación pueden integrarse mediante distintas opciones. Las operaciones de transformación se pueden llevar a cabo por separado mediante el proceso de hidrólisis y fermentación separadas (HFS), o de forma simultáneas, mediante el proceso denominado sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). Existe otra posibilidad conocida como bioproceso consolidado (BPC), en el que se integra las etapas biológicas de producción de enzimas (celulolíticas y hemicelulolíticas) y de fermentación necesarias para la transformación de la obtención de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. Esta configuración consiste en la utilización de un microorganismo o conjunto de microorganismos capaces de producir las enzimas, hidrolizar los sustratos y fermentar los azúcares en un mismo reactor (Fig. 1.2) (Jouzani y Taherzadeh, 2015). Dentro del

concepto de biorrefinería, la integración de los procesos resulta fundamental para el aprovechamiento de todos los componentes de los materiales lignocelulósicos.



**Figura 1.2.** Diferentes niveles de integración de las etapas del proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

- Otros productos energéticos obtenidos en una biorrefinería que pueden ser capaces de reemplazar a los productos procedentes del petróleo quedan resumidos en la siguiente tabla 1.2.

### 1.1.5.2. Bioproductos

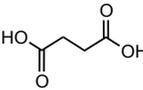
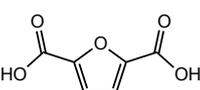
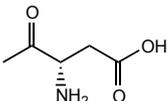
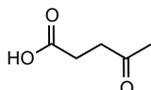
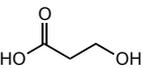
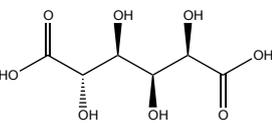
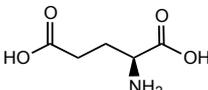
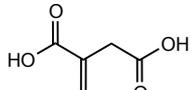
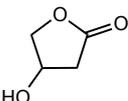
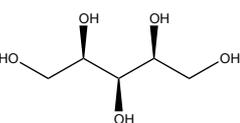
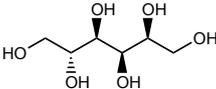
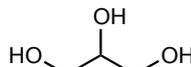
A partir de la biomasa se pueden obtener una serie de compuestos con interés como son los hidratos de carbono, las proteínas o los lípidos. Algunos de ellos, se obtienen mediante una simple extracción y otros necesitan transformaciones más complejas. Existen numerosas rutas de proceso para poder obtener los compuestos deseados pero la mayoría de los productos se pueden obtener a partir de los “*building blocks*”.

**Tabla 1.2.** Productos energéticos obtenidos a partir de biomasa

Producto	Procesos	Aplicaciones
Hidrógeno	Pirólisis o gasificación	Combustible, pilas de combustible
Gas de síntesis	Proceso químico a altas temperaturas	Producto intermedio en industrias químicas o biorrefinerías
Biodiesel	Tecnología BTL	En motores diésel en estado puro o en mezcla. Sustituto del gasoil puede emplearse en calderas para usos térmicos
Biogás	Descomposición de la biomasa en ausencia de oxígeno	Generación de calor y electricidad. Para automoción debe ser licuado o comprimido
Biobutano	Fermentación ABE (acetona-butanol-etanol)	Precursor de disolventes y de ácidos grasos
Biometano	Depuración del biogás o por el gas de síntesis producido en la gasificación.	Calor, electricidad y vapor

El Departamento Americano de Energía (DOE) identificó en 2004 doce moléculas (Tabla 1.3) que pueden obtenerse de la biomasa, a partir de las cuales se pueden obtener una gran serie de compuestos intermediarios y derivados de interés (Werpy y Petersen, 2004). En años posteriores, la producción de estas moléculas ha sido objeto de varias revisiones basadas en distintos criterios que abarcaban desde sí el compuesto o la tecnología ha tenido atención en la literatura científica hasta sí el escalado tanto a nivel piloto como industrial es ya una realidad (Bozell y Petersen, 2010). Choi y col. (2015) realizó una nueva revisión destacando que, teniendo en cuenta el tiempo transcurrido desde la publicación del informe, muchos de estos compuestos, comenzaron a ser producidos industrialmente partiendo de materia prima biológica. Con el transcurso del tiempo, tanto el ácido aspártico como 3-hidroxiubutirolactona han dejado de considerarse como “*building blocks*” debido a su baja proyección industrial.

**Tabla 1.3.** *Building block* obtenidos a partir de la biomasa según DOE en 2004

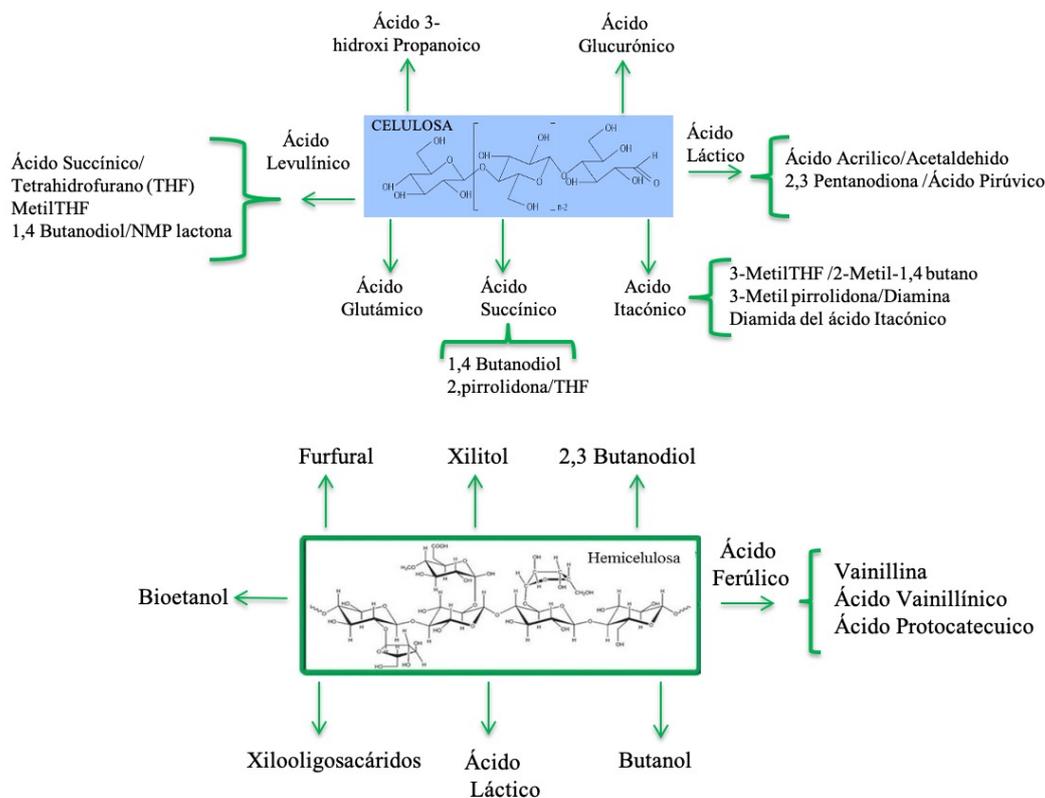
1,4 Diácidos	Ácido, furanodicarboxílico	2,5-	Ácido aspártico	Ácido levulínico
				
Ácido 3 hidroxipropiónico	Ácido glucárico		Ácido glutámico	Ácido itacónico
				
3 Hidroxi-butirolactona	Xilitol/Arabitol		Sorbitol	Glicerol
				

Por otro lado, a partir de los azúcares fermentables de las biomásas se pueden obtener una serie de productos con un sinfín de aplicaciones. Por ejemplo, la glucosa es precursora para la obtención de ácido láctico, ácido succínico, así como butanol, lisina, 1,3 propanodiol y los polihidroxicanoatos. En cambio, a partir de la xilosa se puede obtener el ácido itacónico y furanos (furfural, alcohol furfurílico y el 2-hidroximetiltetrafurano).

A continuación, se describe algunos de los posibles productos con fines no energéticos que se pueden obtener a partir de los compuestos de la biomasa (Fig. 1.3) y ayudan a rentabilizar los procesos.

El **ácido succínico** se utiliza en la fabricación de detergentes y tensoactivos, en la industria alimentaria es usado para regular la acidez o como potenciador de sabor. También se emplea en la síntesis de fármacos, vitaminas y aminoácidos. A partir de este ácido se

puede obtener tetrahydrofurano, anhídrido maléico o el ácido fumárico entre otros compuestos con amplia aplicación en la industria química.



**Figura 1.3.** Esquema de procedencia de los bioproductos a partir de biomasa (adaptada de la información de **Menon y Rao 2013**)

El **ácido levulínico** es uno de los *building blocks* más estudiado. Es precursor de compuestos como las pirrolidonas, dioles y lactonas cíclicas o  $\gamma$ -valerolactona, que pueden usarse en aditivos alimentarios, perfumes o como precursores de disolventes verdes (Climent y col., 2014). Por ejemplo, la empresa Avantium comercializa el ácido levulínico producido a partir de la deshidratación de la biomasa

El **ácido láctico** es una molécula interesante ya que es el punto de partida para formar compuestos de interés como el ácido pirúvico o el acrílico. La aplicación más importante del ácido láctico está en la síntesis de la lactida, compuesto cíclico utilizado en la síntesis del ácido poliláctico (PLA) mediante la reacción de polimerización (Dusselier y Sels, 2014). El volumen de mercado del ácido láctico se valoró en 2,64 billones de dólares

en 2018, y se espera que crezca con una tasa anual estimada del 18,7% entre 2019-2025 ([www.grandviewresearch.com](http://www.grandviewresearch.com)).

El **furfural** procede de la deshidratación de los azúcares de cinco átomos de carbono. Este compuesto tiene muchas aplicaciones industriales entre ella se emplea, como disolvente en el refinado de los aceites lubricantes, adicionalmente, se usa en la obtención de resinas de alta resistencia a la corrosión y a elevadas temperaturas. Se considera un *building block*, ya que se puede someter a múltiples reacciones químicas para así lograr una nueva batería de productos. En la tabla 1.4 se muestra algunos de los productos obtenidos a partir del furfural y sus aplicaciones (Machado y col., 2016).

El **xilitol** es un polialcohol de cinco átomos de carbono que se encuentra en algunas frutas y verduras en pequeñas concentraciones. Actualmente se utiliza en la industria alimentaria (como edulcorante y conservante) y en la industria farmacéutica (Mohamad y col., 2015). La producción industrial se hace siguiendo un proceso de hidrogenación catalítica de la xilosa a alta presión usando catalizadores de níquel Raney. Pero en este proceso se obtienen unos rendimientos bajos, en torno al 50-60% (Rafiqul y Sakinah, 2013), lo que lo convierte en un proceso bastante costoso desde un punto de vista energético.

**Tabla 1.4.** Obtención de diferentes productos partiendo del furfural y derivados

Compuesto	Reacción química	Producto	Aplicaciones
Furfural 	Hidrogenación	Alcohol Furfurílico 	Producción de resinas, intermedios en la producción de fragancias, lisina y vitamina C
Alcohol Furfurílico 	Hidrogenolisis	2-Metilfurano 	Monómero, disolventes
Furfural 	Descarbonilación	Furano 	Producción de THF por hidrogenación
Furano 	Hidrogenación	THF 	Disolvente industrial, fabricación de polímeros, adhesivos y productos farmacéuticos
Furfural 	Oxidación	Ácido Furóico 	Síntesis de medicamentos y perfumes
Ácido Furóico 	Reducción	THF 	Disolvente industrial, fabricación de polímeros, adhesivos y productos farmacéuticos

La producción biotecnológica de xilitol mediante un proceso biológico utilizando microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) es una alternativa al proceso químico. Su inconveniente es que al utilizar residuos lignocelulósicos se necesita realizar una etapa de pretratamiento para poder acceder a la xilosa presente en la fracción hemicelulósica. Esta etapa puede generar compuestos que inhiban la fermentación (Rao y col., 2016).

## ***1.2. Materiales lignocelulósicos***

Como se ha comentado anteriormente, el presente trabajo está basado en la utilización de materiales lignocelulósicos.

La biomasa lignocelulósica es un material heterogéneo formado por compuestos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina) y en menor proporción por compuestos no estructurales (cenizas, pectinas, proteínas y otros). La proporción de cada uno de ellos depende del tipo de material y su especie.

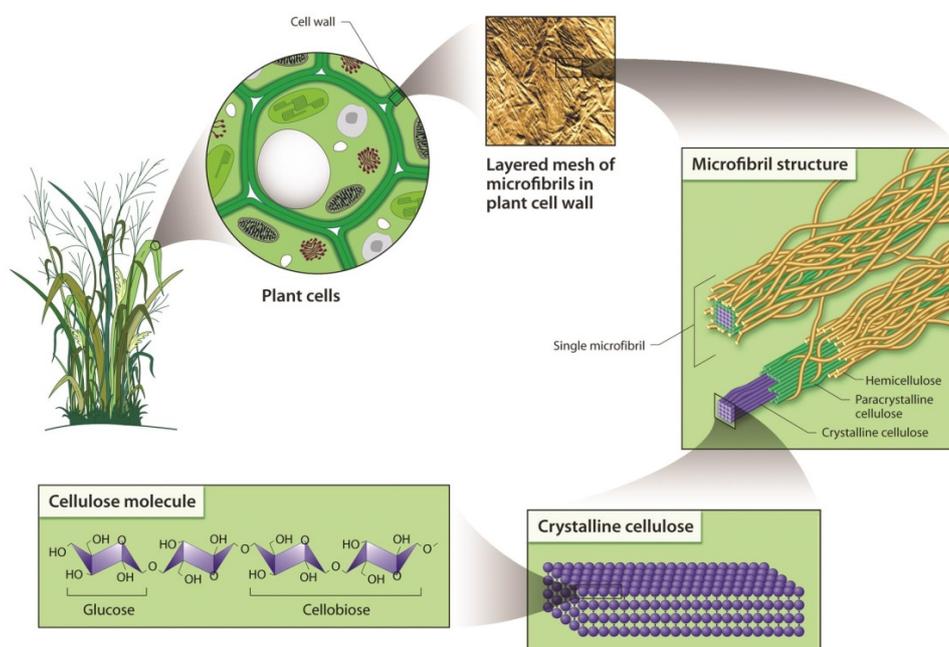
Un alto porcentaje de la composición de los compuestos estructurales de la pared celular son los carbohidratos presentes en la celulosa y hemicelulosa (55-75% en peso seco), los cuales pueden ser empleados para obtener un amplio abanico de productos, desde biocombustibles hasta productos de alto valor añadido. El otro componente mayoritario de los compuestos estructurales es la lignina (10-25%), formada a partir de subunidades de fenilpropano oxigenadas, cuya finalidad es conferir un mayor empaquetamiento y rigidez a la estructura de la biomasa lignocelulósica.

### ***1.2.1. Compuestos estructurales del material lignocelulósico***

#### ***1.2.1.1. Celulosa***

La celulosa es un homopolímero lineal, formado por monómeros de glucosa unidos mediante enlace glucosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) siendo la unidad de repetición la celobiosa. El grado de polimerización de la celulosa es muy elevado, llegando incluso hasta las 150.000 unidades (Fig. 1.4).

Entre las cadenas de glucosa de la celulosa, se forman lateralmente puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals como consecuencia de la presencia de los grupos hidroxilo de las glucosas, dando lugar a agregaciones fibrilares. Estas fibrillas se empaquetan entre ellas, dando lugar a la formación de unidades superiores denominadas microfibrillas. A su vez, estas microfibrillas se agrupan formando macrofibrillas y estas a su vez dan lugar a la formación de fibras que constituyen la estructura cristalina de la celulosa. El alto grado de compactación de la celulosa establece una estructura cristalina y rígida. Esta rigidez puede dificultar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos. Además, la celulosa, presenta zonas más amorfas, de cristalinidad inferior que le hacen ser más susceptible a la degradación (Dai y Fan, 2011). Algunos autores han determinado que la zona amorfa aparece periódicamente por lo que las fibras de celulosa se pueden dividir en zonas amorfas o zonas cristalinas. Cuando la zona amorfa es eliminada se obtienen los nanocristales o las nanofibrillas de celulosa (presentan rangos de nanómetro). Estas nanocelulosas son altamente cristalinos por lo que tienen propiedades mecánicas altas (altos coeficientes de módulo de Young) y una baja densidad lo que le hace perfecta para ser usadas como refuerzo en matrices poliméricas.



**Figura 1.4.** Esquema de la estructura de la celulosa  
<https://public.ornl.gov/site/gallery/highressurvey.cfm>

La celulosa nativa, puede cristalizar de dos formas: celulosa I y celulosa II, siendo la I la mayoritaria, en ella las cadenas de glucosa se encuentran más ordenadas y orientadas paralelamente. En cambio, en la celulosa II, sintetizada por ciertas algas y bacterias, las cadenas se disponen de manera antiparalelas (Brown, 2004). Bajo las condiciones de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, como son altas temperaturas y presiones, el uso de productos químicos etc., se altera la estructura dando lugar a otro tipo de estructuras cristalinas denominadas tipo III y IV (Mittal y col., 2011).

Algunas propiedades como la longitud de las fibras y el grado de cristalinidad pueden variar según el origen, ya sea paja, madera, algodón (Liu y Sun, 2010).

A partir de la celulosa se puede obtener biocarburantes como el bioetanol, o materiales como las pastas celulósicas o la nanocelulosa. La nanocelulosa tiene aplicaciones en biomedicina o en cosmética debido a que es inocua, por lo que puede usarse en el desarrollo de injertos vasculares (Domingues y col., 2014) o para la administración de fármacos, curación de heridas, aplicaciones cardiovasculares entre otras aplicaciones (Jorfi y Foster, 2015).

### ***1.2.1.2. Hemicelulosa***

La hemicelulosa es un heteropolímero de estructura amorfa constituido por cadenas más cortas y ramificadas que la celulosa, tienen un grado de polimerización entre 80-200 unidades. La naturaleza ramificada de las hemicelulosas determina el carácter amorfo, siendo más fáciles de hidrolizar que la celulosa (Ebringerová, 2005).

La función de la hemicelulosa está relacionada con la interacción entre la celulosa y la lignina (Sun R.C. y col., 1998).

### **Características de la hemicelulosa**

La hemicelulosa representa entre un 15-35% de la composición de la biomasa lignocelulósica. La hemicelulosa está formada por una cadena principal de monosacáridos de pentosas ( $\beta$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinosa) o de hexosas ( $\beta$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-

galactosa) que presentan ramificaciones que pueden ser: ácidos urónicos (ácido  $\alpha$ -D-glucurónico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturónico y  $\alpha$ -D-galacturónico) mediante enlace glucosídico, grupos acetilos por enlace éster o carbohidratos como la arabinosa.

Se han publicado clasificaciones según la naturaleza de los monómeros de la cadena principal en xilanos, xiloglucanos, mananos y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-glucanos (Scheller y Ulvskov, 2010), siendo los xilanos los más abundantes en maderas duras y herbáceas.

### **Clasificación de la hemicelulosa**

#### **i. Xilano**

La cadena principal de xilano está formado por unidades de D-xilopiranososa (90%) unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Las ramificaciones pueden contener hexosas y pentosas, ácidos urónicos, o grupos acetilos. Estas ramificaciones se unen mediante los grupos hidroxilos de las xilosas y no tienen por qué seguir un patrón dentro de la cadena hemicelulosa (Rodríguez y col., 2004). Otros grupos de ramificaciones encontradas son los ácidos ferúlico y *p*-cumárico unidas a las arabinosas por la posición C-5 mediante enlace éster.

El xilano es la estructura típica de maderas duras (25-35% en materia seca). Los residuos como las pajas de cereales, bagazo de la caña de azúcar o el bagazo de sorgo también son excelentes fuentes de xilanos (Mikkonen y Tenkanen, 2012). En algunas algas (rojas y verdes), la estructura del xilano no presenta ramificaciones por lo que se denomina homoxilanos (Gírio y col., 2010).

En función de las sustituciones, los xilanos se clasifican en:

- **Arabinoxilanos**, la cadena principal está formada por unidades de D-xilopiranososa con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), sustituida por ramificaciones de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil con uniones O-glicosídico (1 $\rightarrow$ 3) y (1 $\rightarrow$ 2). En estas mismas posiciones, también pueden ser sustituidas por grupos acetilos. Los arabinoxilanos pueden ser ligeramente ácidos por la presencia del ácido 4-O-

metil- $\alpha$ -D-glucurónico, en una proporción de por cada diez xilosas un grupo ácido. Los arabinoxilanos son abundantes en tejidos de gramíneas como el trigo, cebada centeno, arroz y sorgo (Gullón y col., 2010). La relación xilosa: arabinosa (X:A) es un factor importante en las propiedades junto con el tamaño molecular o el modo de sustitución de la arabinosa, proporción que varía según el material. En cereales como la cebada o el trigo esta relación es menor comparada con la del arroz. Otra peculiaridad de arabinoxilano de cebada es que puede presentar ramificaciones de ácido ferúlico o cumárico (Izydorzcyk y Biliaderis, 1995; Wende y Fry, 1997).

- **Glucuronoxilanos:** Esta hemicelulosa es la mayoritaria en maderas duras, especies caducifolias y gramíneas. Su esqueleto de xilano presenta ramificaciones del ácido 4- O- $\alpha$ -metilglucurónico unido por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) siendo este enlace muy resistente (Peng y col., 2012). Estas ramificaciones aparecen uno por cada diez xilosas. También presentan ramificaciones de grupos acetilos en las posiciones (1 $\rightarrow$ 2) y (1 $\rightarrow$ 3) (Girio y col., 2010). Puede contener pequeñas cantidades de ramnosa y ácido galactourónico.
- **Arabinoglucuronoxilanos:** El esqueleto está formada por unidades de  $\beta$ -D-xilanopiranosil sustituidos por grupos ácido-4-O- $\alpha$ -metilglucurónico mediante enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) y  $\alpha$ -L-arabinofuranosil unidas por enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) (Woodward, 1984). Estas sustituciones aproximadamente se repiten cada 5-12 unidades. Los residuos arabinofuranosidos pueden estar esterificados con ácidos *p*-cumárico y ferúlico. Estas hemicelulosas son características de cereales y en menor medida de maderas blandas (5-10% en peso seco), y gramíneas (Naidu y col., 2018).
- **Glucuronoarabinoxilano:** En este caso, presenta una estructura es similar a la de los arabinoglucuronoxilanos, con la variación en el número de cadenas laterales de arabinosa siendo en esta estructura 10 veces mayor que las ramificaciones de ácidos urónicos. En algunos casos, se encuentran xilosas doblemente sustituidas por unidades de arabinosa (Ebringerová, 2005). Se encuentra en gramíneas y cereales como salvado de trigo o el maíz.

## ii. *Xiloglucanos*

La cadena principal está formada por un esqueleto de unidades de glucosas unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), con un 75% de estos sustituidos con D-xilosas mediante enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). A su vez las xilosas pueden estar sustituidas por fucosa, galactosa y ocasionalmente por arabinosa mediante el enlace (1 $\rightarrow$ 2), encontrándose una proporción de glucosa: xilosa: galactosa de 4:3:1 (Hayashi, 1989).

## iii. *Mananos*

Los mananos están compuestos por un esqueleto principal de unidades de manosas, se clasifican en galactomananos, glucomananos y galactoglucomananos como se detalla en la tabla 1.5.

## iv. $\beta$ -Glucanos

Se trata de un polímero de  $\beta$ -glucosas unidas mediante un enlace  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), al igual que la celulosa, pero estas cadenas tienen un grado de polimerización menor y no presentan alta cristalinidad. Su principal función es estructural y son insolubles al estar unido a proteínas covalentemente.

La estructura de las hemicelulosas en la paja de cereal consiste en una cadena principal de  $\beta$ -(1-4)-D-xilosas con un número variable de sustituyentes (arabinosas, ácidos glucurónicos, ferúlicos, *p*-cumáricos y/o acéticos), unidos a los grupos OH libres de los carbonos C2 y C3 de las xilopiranosas. En concreto, en la paja de cebada, se determinó que una de cada ciento veintiuna pentosas está unida a un grupo feruloil, y una de cada doscientas cincuenta y tres a un grupo *p*-cumaril (Mueller-Harvey y col., 1986).

### 1.2.1.3. *Lignina*

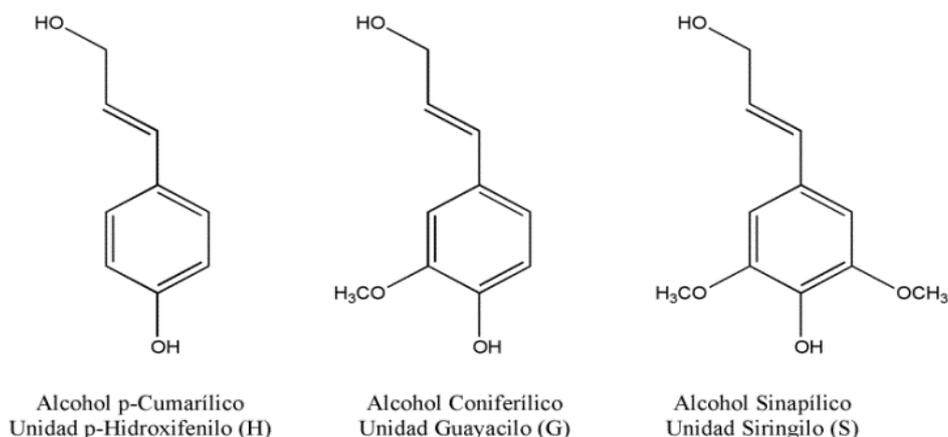
La lignina es un polímero complejo tridimensional amorfo cuya composición y estructura depende del origen de la biomasa. Su función principal es de carácter estructural, ya que actúa de puente entre la celulosa y la hemicelulosa, confiriendo rigidez y resistencia, impermeabilizándolas y protegiéndolas de ataques enzimáticos. Está

compuesta por tres unidades de fenilpropanoides (Fig. 1.5), las cuales son precursores de las unidades p-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo.

La proporción de estas unidades varía en función del origen de la biomasa lignocelulósica, representando entre un 10-25% en peso seco de los materiales lignocelulósicos.

**Tabla 1.5.** Tipos de mananos existentes en la hemicelulosa

Hemicelulosa	Estructura	Origen biológico
Galactomananos	Cadena de manosas unidas por enlaces $\beta$ -(1-4), mayoritariamente ramificadas por galactosas unidas por enlaces $\beta$ -(1-6)	Leguminosas
Glucomananos	Cadena aleatoria de $\beta$ -D-glucopiranosil y $\beta$ -D-manopiranosil unida mediante enlace $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). La relación glucosa: manosa varía entre 1:2 y 1:1 dependiendo del material lignocelulósico	Maderas duras
Galactoglucomananos	Su estructura principal es la de glucomananos se encuentra sustituida por ramificaciones de $\alpha$ -D-galactopiranosil unidos por enlaces $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)	Maderas blandas



**Figura 1.5.** Unidades estructurales de la lignina

### ***1.2.2. Compuestos no estructurales***

En los materiales lignocelulósicos se encuentran otros componentes en menor proporción (5-10% en peso seco) como son pectinas, extractos, cenizas y proteínas.

- Pectinas: Son polisacáridos formados por unidades de ácido galacturónico y otros monosacáridos como la ramnosa o la galactosa en menor proporción, se encargan de la porosidad de la pared celular. También intervienen en el balance iónico y en la regulación del pH. Son fácilmente extraíbles.
- Extractos: En este grupo se pueden incluir compuestos no estructurales como grasas, cera, resinas, terpenos etc. Son fácilmente extraíbles con alcohol o agua sin necesidad de realizar reacciones químicas. Son las sustancias responsables del color, olor y de la resistencia a los ataques microbianos.
- Cenizas: formadas por las sales inorgánicas como carbonatos, silicatos presentes en los materiales.
- Proteínas: actúan de puente de unión entre la lignina y los polisacáridos mediante enlace covalente. La familia más estudiada son las extensivas, formadas por aminoácidos de hidroxiprolina, serina y lisina. En las pajas de cereales, estos compuestos son minoritarios encontrándose entre 3-5%.

### ***1.2.3. Residuos lignocelulósicos como materia prima***

En algunos sectores como el agrícola o el forestal entre otros, se generan grandes cantidades de residuos o subproductos sin valor económico y su eliminación genera problemas ambientales. Estos residuos, pueden ser aprovechados como recurso renovable con el fin de lograr obtener compuestos de alto valor añadido.

Este es el caso de los materiales lignocelulósicos que pueden ser sometidos a distintos procesos de fraccionamiento con el objetivo de obtener alguno o varios de sus componentes mayoritarios a partir del cual, se pueden obtener compuestos bioenergéticos como el bioetanol u otros compuestos de alto valor añadido. En las últimas décadas, los residuos agrícolas están siendo utilizados como una fuente de materia prima por las biorrefinerías.

Entre los residuos procedentes de cultivos de cereales, la paja de cebada es uno de los residuos con más potencial. La cebada fue el tercer cereal más cultivado en la Unión Europea, 56 millones de toneladas por detrás del trigo y maíz (Faostat 2018).

Teniendo en cuenta que un tercio de los residuos permanecen en el campo, otro tercio se utiliza para otros usos como puede ser la ganadería, se estima que, en la Unión Europea, la disponibilidad neta de residuo de cultivo en 2030 será alrededor de 25 millones de toneladas (Searle y Malins, 2013), lo que lo convierte en un residuo con una alta disponibilidad.

### ***1.2.4. Aprovechamiento de la paja de cebada***

La paja de cebada es un recurso abundante y disponible que puede ser utilizada por las biorrefinerías para lograr obtener bioproductos como bioetanol (García-Aparicio y col., 2011; Duque y col., 2014 a y b), butanol (Qureshi y col., 2010), u otro tipo de compuestos como xilitol (Moraes y col., 2018).

Para lograr obtener estos compuestos entre otros, la primera etapa a la que debe ser sometida la materia prima, en este caso el residuo, es el pretratamiento con el fin de romper la estructura de la biomasa.

A continuación, se detallan algunos de los pretratamientos más utilizados en los materiales lignocelulósicos.

### ***1.2.5. Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos***

En el proceso de obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, la primera etapa del proceso es el pretratamiento.

El objetivo de esta etapa es lograr una mayor accesibilidad a la celulosa. En esta etapa además se logra modificar la estructura de la lignina, disolver la hemicelulosa, alterar la estructura de la lignocelulosa rompiendo la estructura cristalina de la celulosa y aumentar la digestibilidad en la etapa posterior de hidrólisis enzimática. Es importante poder limitar la formación de inhibidores que puedan afectar a las etapas siguientes (Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010; Thulluri y col., 2013).

El pretratamiento es una etapa crucial en el proceso, ya que las etapas sucesivas del proceso se ven afectadas por el tipo y la efectividad del pretratamiento. El pretratamiento ideal sería aquel, a partir del cual se logra obtener un sólido pretratado con azúcares digestibles, que permitiera la recuperación de la hemicelulosa y la lignina por separado, requiriendo la mínima cantidad de energía, agua y productos químicos (da Silva y col., 2016).

Lograr un pretratamiento versátil al que someter a las distintas biomásas lignocelulósicas es un desafío de la tecnología en la conversión de los materiales lignocelulósicos (Krishnan y col., 2010) ya que este proceso depende de entre otros factores del tipo de biomasa (Gírio y col., 2010) o del producto final del proceso.

Pueden clasificarse según la naturaleza del agente empleado. Así, encontramos pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. En la tabla 1.6, se recogen los aspectos más de relevantes de estos pretratamientos.

Durante los pretratamientos físicos, la materia prima es sometida a fuerzas de cizalladura o de impacto, lo que consigue reducir el tamaño de partícula y una desestructuración de las fibras, afectando a la cristalinidad de la celulosa y el tamaño de poro (Sun y Cheng, 2002). A nivel industrial, la molienda es un pretratamiento que requiere largos tiempos y un alto consumo energético. Sin embargo, la molienda es utilizada con todo tipo de materias primas antes de someterlas a otros pretratamientos (Moreno y Olsson, 2017).

La extrusión es un pretratamiento termo-mecánico relativamente novedoso, su acción se basa en el giro de uno o dos tornillos sin fin dentro de una carcasa ajustada y con control de la temperatura, produciéndose un rozamiento entre la biomasa, el tornillo y las paredes del módulo bajo unas condiciones controladas de temperatura (Duque y col., 2014b). Esta tecnología es considerada como prometedora debido a su adaptabilidad al proceso y a su versatilidad en el uso de materias primas.

En los pretratamientos químicos al utilizar agentes químicos se produce un cambio en la composición de los materiales aumentando la digestibilidad de la materia prima. Dentro de los pretratamientos químicos, podemos diferenciar los pretratamientos con ácidos y los pretratamientos alcalinos. Los pretratamientos ácidos logran disolver la hemicelulosa con el fin de obtener mayor accesibilidad a la celulosa. El uso de ácidos concentrados requiere equipos resistentes a la corrosión. En los pretratamientos alcalinos se produce una solubilización de la lignina y tiene lugar una reacción con los grupos acetilos de la hemicelulosa que permite una mayor accesibilidad a la celulosa. La efectividad de este pretratamiento depende del contenido en lignina de la biomasa, siendo más efectivo en los residuos agrícolas que en materiales leñosos.

Otros pretratamientos químicos son la ozonólisis, el tratamiento con organosolventes o con líquidos iónicos, que utilizan ozono, disolventes (orgánicos o acuosos) y cationes orgánicos de gran tamaño y pequeños aniones inorgánicos respectivamente para eliminar la lignina.

**Tabla 1.6.** Resumen de los principales pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica

Naturaleza	Pretratamiento	Principio	✓ Ventajas	✗ Desventajas
Físico	Molienda	Reducción en el tamaño de partícula	Disminuye la cristalinidad de la celulosa	Alto consumo energético
	Extrusión	La biomasa se somete a un proceso de calentamiento, mezclado y cizalladura que provoca alteraciones	Puede combinarse con la aplicación de reactivos químicos	Alto consumo de energía
Químico	Ácido diluido	Se produce un efecto catalítico sobre la hemicelulosa	Solubilización de la hemicelulosa	Generación de tóxicos a altas temperaturas
	Alcalinos	Deslignificación e hinchamiento de las fibras vegetales	Solubilización de la lignina y apenas altera la fracción hemicelulósica	Incorporación de sales
	Organosolventes	Solubiliza la lignina empleando disolventes orgánicos	Solubilización de la lignina y la hemicelulosa	Alto coste de los solventes y /o necesidad de reciclado
Biológicos	Ozonolisis	Utiliza el potente efecto oxidante del ozono	Eliminación de la lignina	Gran consumo de ozono
	Líquidos iónicos	Solubilización de los carbohidratos y la lignina	No produce compuestos tóxicos	Alto coste
	Hongos	Degradación de lignina y hemicelulosa mediante un hongo	Requiere poca energía	Hidrólisis lenta

**Tabla 1.6.** Resumen de los principales pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica (**Continuación**)

Naturaleza	Pretratamiento	Principio	✓ Ventajas	✗ Desventajas
	Oxidación húmeda	Oxidación con oxígeno a altas temperaturas y presiones	Retira la lignina	Alto costes de los catalizadores
	Microondas	Uso de microondas en medio acuoso para generar efectos térmicos y degradativos de la lignocelulosa	Posibilidad de integrar la hidrólisis enzimática	Adición de productos químicos
	Ultrasonidos	Cavitación en medio líquido que facilita la acción enzimática y abre la superficie de las fibras	Integración junto a la hidrólisis enzimática, disminuyendo así el tiempo de proceso	Efecto muy superficial
Físico-Químico	Agua caliente en fase líquida	Uso del agua a alta presión y temperatura	No requiere catalizador	Alta recuperación de azúcares hemicelulósicos
	Explosión de vapor	Tratamiento con vapor a alta presión y temperatura seguido de una rápida despresurización	Solubilización de la hemicelulosa y transformación de la lignina	Degradación parcial de la hemicelulosa. Generación de tóxicos
	Explosión con amoníaco	Similar a la explosión de vapor, pero con amoníaco en vez de vapor de agua	Baja formación de tóxicos	Alto coste del amoníaco No es efectivo en biomasa con alto contenido en lignina

Los procesos que implican pretratamientos biológicos se llevan a cabo mediante microorganismos ligninolíticos o sus enzimas capaces de degradar la pared celular, generando una cantidad mínima de compuestos de degradación (Sindhu y col., 2016). Como ventaja se puede señalar que son procesos respetuosos con el medio ambiente, como desventaja los largos tiempos requeridos.

Finalmente, en los pretratamientos fisicoquímicos al combinar las acciones físicas (temperaturas, presiones, etc.) y química (empleo de disolventes tanto ácidos como alcalinos, etc.) se modifican la estructura de la biomasa. Los más empleados son la explosión por vapor (con y sin catalizador), pretratamiento con agua caliente en fase líquida, la explosión por vapor con amoníaco y la oxidación húmeda. La combinación de ambos pretratamientos permite una mejora creando una sinergia, ya que se pueden utilizar condiciones más suaves (menor concentración de ácidos, temperaturas más suaves) y es posible una reducción de costes (Bensah y Mensah, 2013). Así, encontramos como Oliva y col., (2017) utilizan el pretratamiento de explosión por vapor junto con la extrusión reactiva para lograr un rendimiento de obtención de azúcares de 1,4 veces superior al obtenido simplemente con explosión por vapor.

En este trabajo se ha elegido el pretratamiento con explosión por vapor como método de pretratamiento, para obtener la hemicelulosa solubilizada para la producción de xilooligosacáridos y la fracción de celulosa para su transformación en etanol.

#### ***1.2.5.1. Pretratamiento por explosión por vapor***

El tratamiento de explosión con vapor es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa se somete a vapor saturado (160-260 °C), a alta presión (0,69-4,83 MPa) (Singh y col., 2014) durante un período de tiempo que varía desde segundos a varios minutos seguido de una rápida despresurización. Los factores que influyen en la eficiencia del proceso son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, la humedad y la utilización de catalizador (ácido sulfúrico). La combinación de estos factores determina la severidad del proceso y por ello, las características del material pretratado. En este pretratamiento se combinan efectos mecánicos y químicos. El efecto químico es debido a la liberación de los

grupos acetilos existentes en la hemicelulosa que se hidrolizan en el pretratamiento, formando ácido acético por lo que disminuye el pH y hace efecto de autohidrólisis. En la autohidrólisis se produce la ruptura de la cadena de la hemicelulosa, liberando carbohidratos de menor tamaño oligómeros y monosacáridos, entre otros compuestos. En cambio, el efecto mecánico es producido por la rápida despresurización lo que provoca la evaporación del agua intrafibrilar creando fuerzas de cizalla que hacen que se separen las fibras físicamente y produciendo una desestructuración física del material. Si las condiciones de pretratamiento son severas los monosacáridos pueden degradarse a furfural o 5-hidroximetilfurfural (HMF). Durante el pretratamiento se produce una ligera solubilización de la lignina.

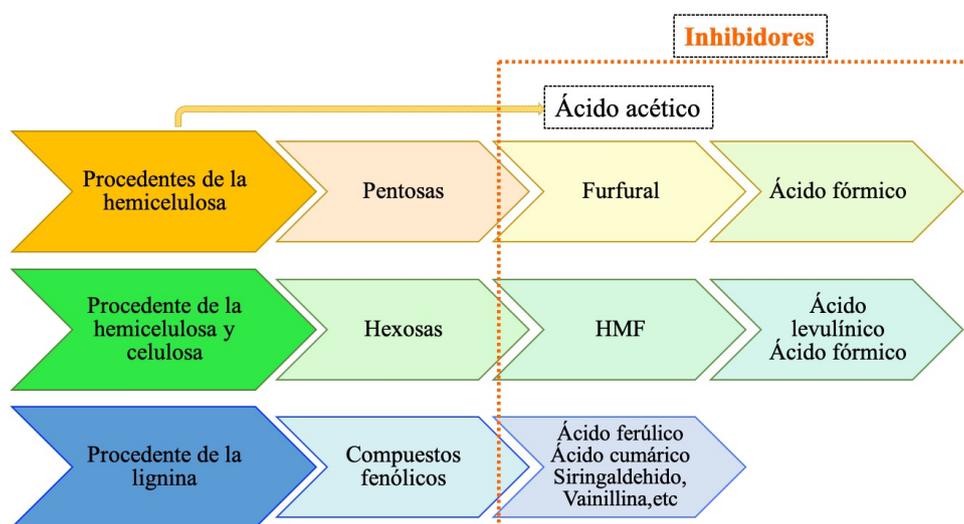
Este pretratamiento ha sido ampliamente utilizado para diferentes materias primas como paja de trigo (Alvira y col., 2016), residuos de banana (Guerrero y col., 2018), *Eucalyptus globulus* (Martín-Sampedro y col., 2012), residuos de poda del olivar (Negro y col., 2014). En maderas blandas, debido a la escasa acetilación de la hemicelulosa presente en estos materiales se requiere la adición de un catalizador.

El pretratamiento de explosión por vapor se considera un pretratamiento rentable, aunque consuma alrededor del 53 % de la energía del proceso (Susmozas y col., 2018) y se utiliza ampliamente incluso a escala comercial (Wang K., y col., 2015).

Dependiendo de las condiciones del pretratamiento (tiempo de residencia, temperatura, tamaño de partícula, humedad entre otros), el material pretratado presenta una composición diferente, así las condiciones más extremas (altas temperaturas y largos tiempos de exposición) producen un material más alterado, es decir, se produce una mayor solubilización de la hemicelulosa y se mejora la accesibilidad de las enzimas a la fracción de celulosa, pero por el contrario también dan lugar a la formación de productos de degradación de los azúcares y de la lignina. Estos compuestos podrían ser compuestos potencialmente tóxicos o pueden afectar a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación. En la figura 1.6 se muestra un esquema de la formación de compuestos de degradación y su procedencia a partir de la biomasa lignocelulósica.

Estos compuestos inhibidores pueden clasificarse dependiendo de su naturaleza en derivados furánicos, ácidos alifáticos y derivados fenólicos. Los principales derivados

furánicos son el 2-furaldehído (furfural) y el HMF que provienen de la degradación de las pentosas y hexosas respectivamente. Estos compuestos furánicos a su vez pueden degradarse en ácidos alifáticos como es el ácido fórmico. Además, el HMF puede transformarse en ácido levulínico. Entre los ácidos alifáticos mayoritarios que se generan está el ácido acético que deriva de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa. Los derivados fenólicos proceden de la degradación o solubilización parcial de la lignina. En los materiales herbáceos los compuestos más abundantes detectados son ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vainílico, vainillina, ácido ferúlico o ácido cumárico entre otros. Aunque estos compuestos se encuentran en concentraciones de mg/L, pueden actuar como inhibidores de celulasas y hemicelulasas (Ximenes y col., 2011).



**Figura 1.6.** Compuestos de degradación potencialmente inhibidores y su procedencia formados durante el pretratamiento de EV en los materiales lignocelulósicos

### 1.2.6. Solubilización de la hemicelulosa

Una vez alterada la estructura de la biomasa, la accesibilidad a los carbohidratos tanto celulosa como hemicelulosa es mayor. Por lo que, la solubilización de la hemicelulosa puede llevarse a cabo por diferentes métodos de pretratamiento, ya resumido algunos de ellos en la tabla 1.6. Dependiendo del producto deseado se puede aplicar un proceso u otro, ya que con unos procesos se logra obtener oligómeros de grado de polimerización con diferentes

sustituyentes y con otros se logran monosacáridos y productos de degradación.

A continuación, se describen los métodos más empleado para obtener hemicelulosas con cierto grado de polimerización, para poder obtener compuestos de alto valor añadido como son los xilooligosacáridos (XOS), objetivo de esta Tesis.

La solubilización de la hemicelulosa con la utilización de un agente ácido provoca una ruptura de los enlaces ésteres de las ramificaciones de la hemicelulosa como ocurría en la autohidrólisis. Este mecanismo fue estudiado por primera vez por (Fengel y Wegener, 1984) en el cual la protonación de la hemicelulosa se puede producir en el oxígeno glicosídico o en el oxígeno del anillo, formándose un grupo cargado (carbocación), que es liberado de la cadena permitiendo la entrada del grupo hidroxilo del agua y liberándose un protón para regenerar el medio.

Utilizando este tipo de compuesto químico, se produce mayor cantidad de monosacáridos y productos de degradación, aunque depende de la severidad del proceso (Santucci y col., 2015). Generalmente los ácidos utilizados son el  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $HNO_3$  y  $H_3PO_4$  (Hu y Ragauskas, 2012) presentando muchos de ellos, la desventaja de ser corrosivos, por lo que se necesitan reactores especiales (Talebnia y col., 2010; Brodeur y col., 2011) y gran cantidad de reactivos para su neutralización (Shekiro y col., 2014). Además, el ácido debe ser recuperado y reciclado para rentabilizar el proceso (Gírio y col., 2010). Este tipo de reacciones se lleva a cabo en recipientes que soporten alta presión como reactores y autoclaves. La autohidrólisis producida en pretratamientos como en la explosión por vapor, requiere temperaturas de entre 120- 260°C.

La utilización de unas condiciones suaves de hidrólisis ácida ( $H_2SO_4$  0,7M; 90 °C y 45 min) permitieron obtener xilooligosacáridos, a partir de xilano de abedul comercial, cuya estructura promedio estaba formada por 6 unidades de xilosa y una sola unidad de ácido 4-O-metil-D-glucurónico (Chemin y col., 2015).

Se pueden usar en concentraciones elevadas (40-72%, p/p) aunque en los últimos años, se han estudiado la utilización de ácidos diluidos (0,2%-2,5%, p/p) que tienen la ventaja de utilizar menos cantidad de catalizador, pero demanda altas temperaturas para poder obtener

rendimientos similares (Menon y Rao, 2012). Otras investigaciones utilizan ácidos orgánicos como el maléico y el fumárico (Lee y Jeffries, 2011), los cuales producen menores cantidades de productos de degradación en comparación al ácido sulfúrico en condiciones similares de reacción (Modenbach y Nokes, 2012).

En cambio, la utilización de un álcali es capaz de solubilizar tanto a la hemicelulosa como a la lignina (Menon y Rao, 2012) debido a la saponificación de los ésteres intermoleculares.

Las bases más comunes empleadas son los hidróxidos de sodio, potasio, litio, calcio y amónico. Este tipo de pretratamiento requiere menor temperatura (por debajo de 140 °C) y presión (Badiei y col., 2014), por lo que provoca menor cantidad de productos de degradación, pero en cambio, la reacción necesita más tiempo, llegando incluso a durar semanas (Bali y col., 2015). La extracción alcalina es una etapa efectiva para materiales como el orujo de pera (Rabetafika y col., 2014), la paja de colza (Svärd y col., 2015).

En presencia de NaOH (4–40 g NaOH/100 g paja seca) y a temperaturas ambiente, Wan y col. (2011) lograron solubilizar el 46,5% de la hemicelulosa presente en la paja de soja.

En general, para la producción de XOS, parece más adecuado la utilización de ácido diluido o autohidrólisis, que los pretratamientos alcalinos, debido a la menor cantidad de etapas necesarias, así como un tiempo de reacción menor (Carvalho y col., 2018).

### ***1.2.7. Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa***

Una vez que la hemicelulosa está extraída, puede ser hidrolizada a oligómeros o incluso a monosacáridos mediante el uso de enzimas. Las enzimas pueden ser obtenidas de hongos, levaduras o bacterias entre otros (Peng y col., 2012), y se utilizan para obtener productos tan diferente como biocombustibles en procesos comerciales, productos de alto valor añadido, o en la mejora de la calidad del papel en la industria del papel (Mussatto y Mancilha, 2007; Valls y col., 2010).

El uso de enzimas para la producción de xilooligosacáridos de bajo grado de

polimerización presenta la ventaja de poder controlar la reacción, ya que el modo de acción de las enzimas es específico para la hidrólisis de un tipo de enlace, lográndose la mayor despolimerización del xilano. Las condiciones de reacción son más suaves que con la hidrólisis mediante agentes químicos, y produciéndose, además, menor cantidad de productos de degradación que podrían ser potencialmente tóxicos. No obstante, la utilización de enzimas presenta un rango limitado de trabajo tanto de pH como de temperatura. Además, pueden presentar inhibición tanto por producto como por sustrato.

Las enzimas que hidrolizan la hemicelulosa pueden dividirse en enzimas que escinden el esqueleto y enzimas que afectan a los enlaces de las ramificaciones. En algunos casos, estos sustituyentes pueden obstaculizar por impedimento estérico a las enzimas.

Las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano, pertenecen a la familia de las endoxilanasas dando como resultado xilooligosacáridos de menor grado de polimerización y xilosa monomérica. Debido a la composición de la hemicelulosa, en el sistema enzimático debe existir una cooperación con otras enzimas que liberen esos sustituyentes mediante un efecto sinérgico para lograr hidrolizar eficazmente la hemicelulosa (Biely y col., 2016; Peng y col., 2012).

Las enzimas pueden ser añadidas directamente en el medio de reacción, pueden producirse *in situ* por microorganismos productores o finalmente puede ser inmovilizadas dentro del sustrato (Mano y col., 2018).

#### ***1.2.7.1. Enzimas xilanolíticas***

El complejo de enzimas xilanolíticas engloba una serie de enzimas que actúan sobre los distintos grupos que forman parte de la cadena de la hemicelulosa.

##### ***Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas***

Las enzimas *endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas*, son necesarias para romper el enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), entre las unidades de xilosa que forman la hemicelulosa. Dependiendo de donde produzcan la ruptura, pertenecen a las endoxilanasas o las exoxilanasas. Las *endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas* catalizan la ruptura del enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), de la cadena de xilanos en cualquier sitio al interior

de esta, dando como resultado una reducción en el grado de polimerización del compuesto. En esta categoría quedan clasificadas las enzimas pertenecientes a los grupos EC 3.2.1.8 y EC 3.2.1.32

Además, las endoxilanasas que son enzimas con actividad hemicelulasa más frecuentes utilizadas, se clasifican en diferentes familias de glicosil hidrolasas atendiendo a su estructura tridimensional y su similitud en la secuencia de aminoácidos e hidrofobicidad.

La clasificación de las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas en diferentes familias nos proporciona información sobre las propiedades estructurales y el mecanismo catalítico de la enzima. La mayoría de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas pertenecen a las glicosil hidrolasa (GH) de las familias 5, 7, 8, 10, 11 y 43 (Lombard y col., 2014), aunque la mayoría pertenecen a las GH10 y GH11.

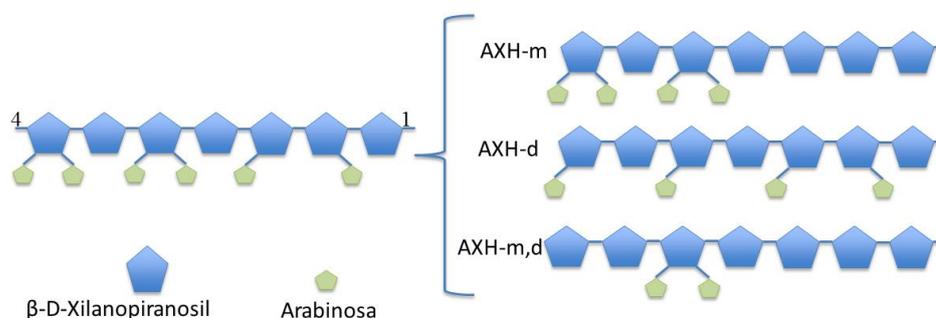
- **GH10:** La mayoría de las enzimas pertenecientes a esta familia son EC 3.2.1.8 y algunas excepciones a EC 3.2.1.32. Las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas de esta familia hidrolizan tanto sustratos lineales como ramificados debido a que son capaces de acomodarse entre las cadenas laterales que están unidas al xilano. Estas endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas requieren la presencia de dos xilosas no sustituidas para poder hidrolizar a la cadena principal hacia el extremo reductor de una sustitución simple o doble de la xilosa. Por este motivo, las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas de la familia GH 10 liberan oligosacáridos de bajo grado de polimerización (Motta y col., 2013).
- **GH11:** Las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas pertenecientes a estas familias son las enzimas más utilizadas, gracias a que trabajan en un amplio intervalo tanto de temperatura como de pH. Se caracterizan por su elevada selectividad al sustrato. Son específicas de sustratos con tres unidades de xilosas consecutivas no sustituidas para poder actuar, por ello son poco eficientes en xilanos con muchos sustituyentes (Biely y col., 2016). En comparación con las GH10, los xilooligosacáridos obtenidos utilizando estas enzimas tienen un mayor grado de polimerización.

### *Xilosidasas*

Las exoxilanasas (exo- $\beta$ -1,4-xilosidasa (EC 3.2.1.37) y exo- $\beta$ -1,3-xilosidasa (EC 3.2.1.72)) son necesarias por catalizar los extremos no reductores de la cadena de xilano, dando como resultado la liberación de unidades de xilosa. Cuando se desea una despolimerización completa de la cadena de xilano, la utilización de estas enzimas es importante para lograr hidrolizar los xilooligosacáridos de bajo grado de polimerización acumulados en el medio, ya que pueden inhibir la acción de las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas.

### *Arabinofuranosidasas*

Estas enzimas (EC 3.2.1.55) catalizan las uniones entre las arabinosas que forman parte como sustituyentes de la cadena principal, liberando a la  $\alpha$ -L-arabinosa. Típicamente pertenecen a las familias GH43, 51, 54 y 62 (Borsenberger y col., 2014). A su vez están divididas tres grupos (Fig. 1.7), las que pueden actuar sobre arabinosas monosustituidas en posición (1 $\rightarrow$ 2) y (1 $\rightarrow$ 3) denominadas (AXH-m), otras son capaces de liberar la arabinosa sustituida en residuos D-xilanopiranosil disustituidas (AXH-d) (McCleary y col., 2015). El último grupo de arabinofuranosidasas actúan sobre los residuos sustituidos de D-xilanopiranosil tanto monosustituidos como doblemente sustituidas terminales (AXH-m,d). Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas pertenecientes a la categoría AXH-d, son exclusivamente de la familia GH43 (Biely y col., 2016). A menudo, puede expresarse mediante números la especificidad del sustrato, así las AXH-d3 indica la liberación de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil enlazados (1 $\rightarrow$ 3) a residuos xilanopiranol doblemente sustituidos (Borsenberger y col., 2014; Koutaniemi y col., 2013; McCleary y col., 2015).



**Figura 1.7.** Esquema de actuación de las diferentes  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas

### ***Esterasas***

Estas enzimas hidrolizan el enlace éster formado entre la cadena de xilano y varios grupos como los grupos acetilos, ferúlicos o cumáricos.

- ***Acetil esterasa (AE)***. Este tipo de enzimas (E.C.3.1.1.6) actúan sobre el enlace formado entre los grupos acetilos y la cadena de xilano, liberando los grupos acetilos unidos a xilooligosacáridos. Estas enzimas tienen un papel importante en la hidrólisis del xilano, ya que los grupos laterales de acetilo pueden interferir con la orientación de las enzimas que escinden el esqueleto, por impedimento estérico, y su eliminación facilita la acción de las endoxilanasas.
- ***Acetilxilano Esterasas (AcXE)*** liberan el enlace éster entre los grupos acetilos y la cadena de xilano en polisacáridos mono o di-O-acetilados. Están clasificadas como carbohidrato esterasa (CE) familias 1, 4, 5 y 6. Las enzimas pertenecientes a la familia CE4 no atacan a posiciones doblemente acetiladas y ninguna de ellas es capaz de desacetilar la posición 3 del residuo sustituido con ácido 4-O-metil-D-glucurónico (Neumüller y col., 2015).
- **Feruloil esterasa**: Gracias a estas enzimas se produce la liberación de los ácidos cinámicos (ácido ferúlico y el ácido cumárico) que se encuentran unidos a la posición 5 de los residuos de arabinosa.

### **$\alpha$ -Glucuronidasa**

El enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) del grupo glucurónico a la cadena principal es uno de los más estables en las células de las plantas. Para conseguir hidrolizar dicho enlace es necesario la utilización de la enzima  $\alpha$ -glucuronidasa. Las  $\alpha$ -glucuronidasas (EC 3.2.1.131/139) se han clasificado en las familias GH67 y GH115. Las  $\alpha$ -glucuronidasas de la familia GH67 actúan sobre los grupos glucurónicos unidos a los extremos no reductores de la cadena principal, siendo incapaces de actuar sobre grupos que estén unidos internamente a la cadena (Biely y col., 2016). Para lograr conseguir liberar estos grupos es necesario utilizar una  $\alpha$ -glucuronidasa perteneciente a la familia GH115, que presenta una hendidura en su estructura (Wang y col., 2016).

La presencia de los grupos acetilos en posiciones cercanas puede dificultar la acción de la  $\alpha$ -glucuronidasa.

El desarrollo de un coctel enzimático adecuado y económicamente rentable es uno de los principales desafíos de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. Para intentar solucionar este problema, en la actualidad se está enfocando hacia el desarrollo de nuevas enzimas multifuncionales que sean capaces de hidrolizar una gran variedad de enlaces presentes en los polisacáridos. Otra estrategia, es la aplicación de técnicas de evolución dirigida mediante el uso de ingeniería genética y metabólica para mejorar las propiedades y estabilización de las enzimas (Binod y col., 2018).

#### ***1.2.8. Producción de xilooligosacáridos mediante hidrólisis enzimática***

Con el pretratamiento de explosión por vapor, el heteropolímero de hemicelulosa es solubilizado y pueden obtenerse oligómeros empleando métodos enzimáticos. Para el objetivo de este estudio, se utilizan enzimas que permitan la liberación de oligómeros sin producir monómeros.

La hidrólisis enzimática es un proceso interesante para la producción de XOS, debido a que generalmente no se producen subproductos de reacción al no ocurrir reacciones secundarias al realizarse en condiciones suaves tanto de temperatura como de presión. Los rendimientos de la hidrólisis enzimática dependen tanto de la estructura del sustrato como de la interacción sustrato-enzima (Brienzo, 2016).

La utilización de enzimas a nivel industrial no está muy generalizado debido a la dificultad de ser recuperada y reciclada, lo que encarece el proceso y su limitada estabilidad operacional, lo que provoca la inactivación irreversible del catalizador.

En la producción enzimática de XOS, las enzimas xilanolíticas pueden ser añadidas directamente al medio de reacción, pueden producirse *in situ* por microorganismos productores de enzimas o pueden estar inmovilizadas. Existe un gran número de publicaciones de estudios acerca de métodos de hidrólisis enzimáticos para la producción de XOS a partir de diferentes materias primas. La tabla 1.7 recoge algunos de estos estudios.

**Tabla 1.7.** Ensayos de hidrólisis enzimática sobre diferentes sustratos utilizadas para la producción de XOS descritos en la bibliografía

Materia Prima	Pretratamiento	Enzimas	Referencia
Bagazo de caña de azúcar	Extracción alcalina	Endoxilanasas fúngicas ( <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> )	(Carvalho y col., 2015)
Salvado de centeno	Autoclave	Endoxilanasas (GH 10 y GH11)	(Falck y col., 2015)
Kenaf	Explosión con vapor	Endoxilanasas ( <i>Trichoderma reesei</i> ) y arabinofuranosidas ( <i>Aspergillus niger</i> ) recombinantes	(Izyan y col., 2016)
Pasto varilla ( <i>Panicum virgatum</i> )	Alcalino con amoníaco	Endoxilanasas (GH11) Arabinofuranosidas (GH62)	(Bowman y col., 2014)
Bagazo	Ácido Peracético	Endoxilanasas (GH 10 y GH11)	(Gonçalves y col., 2015)
Paja de trigo	Agua caliente en fase líquida	Endoxilanasas ( <i>Trichoderma reesei</i> ) comercial	(Huang y col., 2017)
Serrín de álamo	Extracción con agua caliente	Endoxilanasas (GH10) Acetilxilanoesterasa (CE16)	(Biely y col., 2013)

**Tabla 1.7.** Ensayos de hidrólisis enzimática sobre diferentes sustratos utilizadas para la producción de XOS descritos en la bibliografía (**Continuación**)

Materia Prima	Pretratamiento	Enzimas	Referencia
<i>Eucalyptus globulus</i>	Hidrotérmico	Endoxilanas (GH10); Acetil esterasa (CE16); Acetilxilano esterasa (CE1 y CE5); $\alpha$ -Glucuronidasa (GH67; GH115)	(Koutaniemi y col., 2013)
Cáscara de trigo	Sin pretratamiento	Endoxilanas sin purificar producidas por <i>Aspergillus fumigatus</i> R1	(Jagtap y col., 2017)
Mazorca de maíz	Alcalino suave	Endoxilanas purificada producida por <i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	(Chapla y col., 2012)
Madera de abedul comercial	-	Endoxilanas inmovilizada recombinante producida por <i>Bacillus subtilis</i>	(Milessi y col., 2016)
Xilano de haya comercial	-	Endoxilanas comercial (Depol™ 333MDP) Inmovilizada	(Martins de Oliveira y col., 2018)
Xilano sintético de abedul, trigo y alerce	-	Endoxilanas (GH10; GH11) Xilosidasa (GH43) y arabinofuranosidasa (GH43; GH51)	(Mechelke y col., 2017)

### ***1.2.9. Purificación de los xilooligosacáridos***

En el medio de reacción, además de obtener los xilooligosacáridos deseados, se generan otros compuestos producidos que, en muchos casos, son compuestos indeseados (monosacáridos y compuestos que no son azúcares) (Jönsson y col., 2013). Por este motivo, los medios de reacción se someten a procesos de purificación que sean capaces de eliminar las impurezas. Además, esta etapa es indispensable si el producto final va a ser empleado por la industria alimentaria ya que se requiere un grado de pureza del 75-95% (Gullón y col., 2009). En el estudio de los XOS, la etapa de purificación facilita la etapa de caracterización.

En la tabla 1.8 se resumen las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas de purificación descritas en la bibliografía.

La ultrafiltración es una filtración especial que requiere la utilización de membranas porosa que permite el paso de moléculas con un tamaño igual o menor al del tamaño de corte específico de la membrana. Requiere una fuerza impulsora, que aumenta al disminuir el tamaño de poro de la membrana. El rendimiento de este proceso se ve afectado por las sustituciones el grado de polimerización, ramificación y la viscosidad de la disolución. (Naidu y col., 2018) entre otros factores.

Existen una gran variedad de membranas, tanto en configuración, materiales (celulosa, cerámica, polímeros orgánicos, etc.), como en tamaño de poro. El uso de la filtración por membrana en la recuperación, purificación y fraccionamiento de las hemicelulosas permite disminuir el consumo de agentes químicos. Como desventajas se puede señalar que a menudo son hidrófobas y, por tanto, muy susceptibles de ensuciarse. Koivula y col. (2011) encontraron que se producía una disminución del flujo de permeado en pocos minutos al purificar el hidrolizado de abedul utilizando una membrana de polisulfona.

Este método ha sido utilizado para concentrar, purificar y fraccionar los oligosacáridos procedentes de abeto, caña de azúcar, pino (Al Manasrah y col., 2012; de

Figueiredo y col., 2017; González-Muñoz y col., 2013) o la hemicelulosa del salvado de trigo (Arkell y col., 2013).

**Tabla 1.8.** Ventajas e inconvenientes de las técnicas de fraccionamiento y purificación en la utilización de XOS

Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Bajo coste</li> <li>✓ Fácil escalado</li> <li>✓ Reutilización por regeneración</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Rendimientos bajos</li> <li>✗ No separa por tipo de enlace</li> </ul>
Ultrafiltración	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Más rápido y menos tedioso</li> <li>✓ Eficiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Pérdida elevada de OS</li> <li>✗ Menor pureza</li> </ul>
Nanofiltración y ultrafiltración y nanofiltración	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mayor pureza y rendimientos</li> <li>✓ Menor pérdida de OS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Eficacia moderada</li> </ul>
Cromatografía de intercambio iónico	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Purificación de fracciones de elevada pureza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Rendimientos bajos</li> </ul>
Cromatografía de exclusión molecular	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Altos rendimientos</li> <li>✓ Purificación de hasta DP8</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Proceso largo y tedioso</li> <li>✗ Grandes volúmenes de elución</li> </ul>

La adsorción es otra técnica sencilla de separación muy utilizada, basada en la diferencia de afinidad de los compuestos por unirse físicamente al adsorbente. En el mercado existen numerosas y diferentes adsorbentes capaces de atrapar metales pesados, ácidos orgánicos incluso colorantes (Chen y col., 2016).

El carbón activo es utilizado para purificar los XOS procedentes de las mazorcas de maíz, cascarilla de cebada (Amorim y col., 2019b; Chapla y col., 2012) incluso se usa a escala industrial (Sato y col., 2010).

La técnica de cromatografía de intercambio iónico mediante la utilización de resinas permite eliminar iones de naturaleza orgánica e inorgánica presentes en los medios de hidrólisis. Las resinas de intercambio iónico están compuestas por una matriz polimérica con grupos funcionales con carga positiva o negativa que actúan de intercambiadores de aniones y de cationes dependiendo de la afinidad por los contraiones. Ejemplos de los intercambiadores de cationes débiles pueden ser compuestos que contienen grupos funcionales de sulfitos y los intercambiadores fuertes presentan ácido sulfónico. En cambio las resinas de intercambio catiónico débiles presentan grupos funcionales como los ácidos carboxílicos y los intercambiadores fuertes tienen sales de amonio cuaternario (Soto y col., 2011).

Buruiana y col. (2017) con el uso combinado de resinas de intercambio aniónico fuerte (tipo Amberlita IRA 400) seguida de una débil (Amberlita IRA 96) lograron obtener xilooligosacáridos con una pureza superior al 88%. El empleo de etapas sucesivas de intercambio iónico con resinas de diferente naturaleza permite mejorar los resultados.

Otros autores realizan una purificación utilizando una estrategia con la combinación de ambas técnicas, Gullón y col. (2014) llevaron a cabo primeramente una filtración por membranas seguidas de una purificación tanto con una resina de intercambio aniónico débil (Amberlita IRA 96), como con un intercambiador de cationes ácido (Amberlita IRA 200) con el fin de purificar los arabinoxilanos obtenidos a partir de salvado de trigo. Con esta estrategia lograron reducir el 98% los compuestos no volátiles.

La cromatografía de intercambio iónico es capaz de separar, en base a las interacciones electroestáticas, entre la fase estacionaria de naturaleza iónica y las macromoléculas. La fase estacionaria contiene grupos cargados (bien de cationes o de aniones), los cuales están unidos covalentemente a la matriz. Las matrices son polímeros naturales de agarosa o celulosa o sintéticos de poliestireno-divilbenceno.

En cambio, la cromatografía de filtración en gel o también denominada de exclusión molecular, la separación tiene lugar al hacer pasar la mezcla de compuestos por una fase estacionaria formada por un gel con partículas esféricas con poros de un determinado tamaño, el cual ordena los solutos por orden decreciente de tamaño molecular. Los geles más empleados son de tipo Bio-Gel o Sephadex (Bertin y col., 2015).

Mediante esta cromatografía se purificaron XOS de la paja de arroz. Moniz y col. (2014) lograron eliminar el 94% de los compuestos indeseables y una recuperación del 81% de los azúcares hemicelulósicos procedentes de la madera mediante un proceso combinado de pretratamiento con cal, purificación con resina de intercambio iónico de lecho mixto y finalmente, un fraccionamiento por gel.

Un fraccionamiento de la muestra utilizando la cromatografía iónica o de exclusión molecular permite llevar a cabo un estudio de la relación estructura-función y obtener muestras con características fisicoquímicas definidas como son la carga, el tamaño, etc., que pueden ser analizadas mediante HPAEC-PAD o espectrometría de masas.

### **1.3. Alimentos funcionales: Prebióticos**

#### ***1.3.1. Alimento funcional***

En la actualidad, la alimentación es un tema que preocupa a la sociedad por su posible relación con la salud (perjudicial o beneficiosa), por lo que surge el término de alimento funcional entendido como la capacidad que tienen ciertos alimentos para favorecer la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades. El concepto surgió en Japón como necesidad de fomentar programas de desarrollo de productos alimentarios que pudieran ejercer un efecto positivo sobre la salud, reducir el riesgo de enfermedad y, como consecuencia, reducir los altos costes sanitarios (Siró y col., 2008).

La Unión Europea dentro del proyecto denominado, FUFOSE, (Funtional Food Science in Europe, Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa) estableció la siguiente definición “un alimento puede considerarse funcional si se demuestra

satisfactoriamente, o bien que posee un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo que además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud y del bienestar o bien que reduce el riesgo de una enfermedad” (Diplock y col., 1999).

Los alimentos funcionales pueden ser naturales como la fibra dietética, o procesados. Los procesados son aquellos cuya composición ha sido alterada por adicción, eliminación o sustitución de uno o de varios de sus componentes, o su biodisponibilidad ha sido modificada, o cualquier combinación de estas posibilidades, mediante procedimientos tecnológicos diversos (enzimáticos, químicos, biotecnológicos, etc.) (Howlett, 2008).

Un ejemplo de alimentos procesados son los lácteos suplementados con probióticos. Un probiótico se define como microorganismos exógenos vivos que resisten a la digestión normal alcanzando el colon e influyendo así de manera positiva en la composición de la microflora intestinal (Fuller, 1989; Gonçalves y col., 2018).

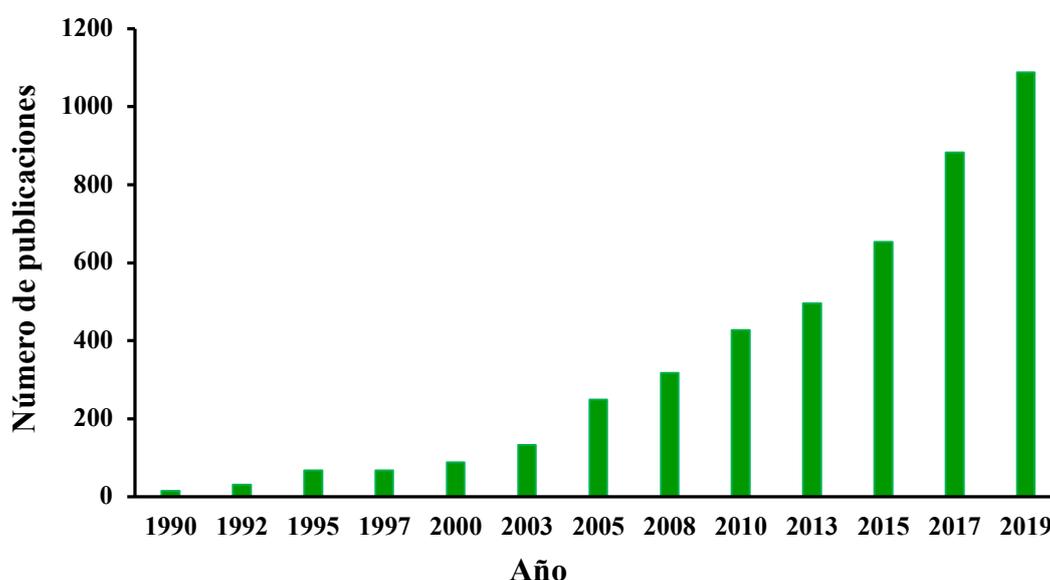
Los prebióticos son ingredientes que son selectivamente fermentados por la microflora intestinal provocando cambios específicos tanto en su composición como en su actividad aportando efectos beneficiosos sobre la salud humana (Roberfroid, 2007).

Los simbióticos resultan de la combinación de probiótico y prebiótico en un mismo producto con el fin de mejorar la supervivencia e implantación de los microorganismos en el tracto gastrointestinal. Son lo más representativos en el mercado europeo (Collins y Gibson, 1999; Schrezenmeir y Vrese, 2001). El tamaño del mercado global de prebióticos superó los 4,1 mil millones de dólares en 2017 y tiene una expectativa alcanzar los 7,4 en 2023 (Amorim y col., 2019a); con un beneficio aproximado de 10,5 mil millones de dólares (Mano y col., 2018).

Debido al espectacular aumento del mercado, es necesario que exista un marco legislativo que proteja a los consumidores de las atribuciones de propiedades falsas o confusas. Así en Japón existe FOSHU (Food For Specified Health Use), en Estados Unidos FDA (Food and Drugs Administration) y en la Unión Europea EFSA (European Food Safety Authority). El proceso de presentación de nuevas declaraciones de alimentos

seguros es complejo. ya que evidencia de cambios en el microbiota no es en sí mismo un beneficio, y requiere, además, la demostración de un efecto o resultado fisiológico beneficioso al ser humano (EFSA, 2010).

En las dos últimas décadas, el número de publicaciones relacionadas con los prebióticos ha despertado gran interés en la comunidad científica, como puede observarse en la figura 1.8, que recoge el número de publicaciones relacionadas con el tema de prebióticos según WOS (Web of Science).



**Figura 1.8.** Evolución de los artículos científicos publicados en los últimos 30 años

### 1.3.2. Prebióticos

El término prebiótico fue definido por primera vez por Gibson y Roberfroid, (Gibson y Roberfroid, 1995) como “ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped”. El término está constantemente en revisión, pero sin perder sus características iniciales. Así lo refleja la definición planteada por el organismo International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) que lo definió en 2017 como “un sustrato que es selectivamente utilizado por microorganismos del hospedador confiriendo un beneficio para la salud” (Gibson y col., 2017). Para que un

ingrediente pueda ser considerado como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos (Roberfroid y col., 2010):

- Presentar resistencia a la acidez gástrica y a la hidrólisis de las enzimas digestivas. Tampoco puede ser hidrolizado ni absorbido en el tracto gastrointestinal.
- Poder ser fermentado selectivamente por las bacterias beneficiosas del microbiota intestinal.
- Debe inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud del hospedador.

Entre los efectos beneficiosos que pueden presentar se pueden destacar (Roberfroid y col., 2010; Slavin, 2013):

- Prevención del cáncer: La producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) tiene un papel protector en el desarrollo de cáncer colono-rectal (Ríos-Covián y col., 2016).
- Efectos contra infecciones del tracto gastrointestinal
- Modulación del microbiota intestinal
- Alivian el estreñimiento
- Ayudan a controlar los niveles de colesterol: Everard y col. (2011) demostraron que el consumo de prebióticos en roedores obesos y diabéticos provocaba la disminución de lípidos en músculo y plasma.
- Mejoran el sistema inmune: Los prebióticos pueden modular la respuesta inmune directa o indirectamente cambiando el equilibrio de la población de microbios intestinales o mediante la producción de compuestos microbianos, como los ácidos grasos de cadena corta (Dwivedi y col., 2016).
- Aumentan la biodisponibilidad de los minerales: Por ejemplo, la asimilación del calcio y magnesio es crucial para la estructura de los huesos y evitar así la osteoporosis. Se

ha demostrado que la ingesta de 15 g al día de oligofructosa o 40 g de inulina por día, ayuda a incrementar la absorción del calcio (Roberfroid, 2002).

De entre los alimentos funcionales los carbohidratos no digeribles, se postulan como los candidatos más importantes para ser considerados como prebióticos.

### ***1.3.3. Oligosacáridos No Digeribles (OND)***

El concepto de no digerible hace referencia a que el carbono anomérico del monosacárido forma parte del enlace, por lo que las enzimas digestivas no son capaces de hidrolizarlo (Roberfroid y Slavin, 2000; Mussatto y Mancilha, 2007).

Los carbohidratos pueden clasificarse según su grado de polimerización en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Se considera oligosacárido aquel compuesto que tiene un grado de polimerización entre 3-10 unidades (IUPAC 1982) (Tungland y Meyer, 2002). Algunos autores consideran que los oligosacáridos son compuestos formados entre 2 y 20 unidades (Manning y col., 2004).

Los carbohidratos no digeribles a su vez pueden clasificarse en compuestos colónicos, aquellos compuestos que llegan intactos al colon, es decir no han sido hidrolizados por las enzimas digestivas y no se absorben en la parte alta del tracto gastrointestinal y los prebióticos que además de lo anterior estimulan el crecimiento de determinadas especies beneficiosas de la microbiota intestinal (Corzo y col., 2015). Por lo que se puede decir que todos los compuestos prebióticos son colónicos, pero no todos los ingredientes colónicos son prebióticos.

#### ***1.3.3.1. OND comerciales***

Los carbohidratos se encuentran en alimentos que se consumen todos los días en una dieta variada como son las frutas, verduras, leche y miel. Pero en muchas ocasiones la cantidad que contiene es insuficiente, o el organismo no es capaz de asimilarlos por completo. Por este motivo, estos compuestos pueden obtenerse en el laboratorio mediante procedimientos químicos y/o biotecnológicos. A partir de productos naturales como el almidón, inulina o xilano se pueden extraer para después ser hidrolizados, o pueden ser

sintetizados en el laboratorio a partir de monosacáridos mediante reacciones de transglicosilación (Siró y col., 2008).

Existe una gran variedad de productos prebióticos comerciales utilizados por las industrias farmacéuticas y alimentarias como se recoge en la tabla 1.9.

**Tabla 1.9.** Prebióticos comerciales y su fabricante

Nombre comercial	Empresa elaboradora	Prebiótico
Promovita	Dairy Crest, Reino Unido	GOS
Panorup	Hayashibara Shoji Inc. Japón	IMOS
Orafti®P95	Beneo, Alemania	FOS
Cup Oligo	Nissin Sugar Manufacturing Company, Japón	GOS
Duphalac	Solvay Pharmaceuticals, Holanda	Lactulosa
Soya-Oligo	The Calpis Food Industry Company, Japón	Oligosacáridos de soja

Este tipo de compuestos son fácilmente incorporados a los alimentos, ya que tienen las mismas propiedades fisicoquímicas que el resto de los carbohidratos, como alta solubilidad en agua, poseen un poder edulcorante entre 0,3-0,6 veces menor que la sacarosa (aunque esta propiedad depende del grado de polimerización del oligosacárido) o pueden alterar el punto de congelación de los alimentos (Mussatto y Mancilha, 2007). Una ingesta excesiva de ONDs, puede provocar efectos perjudiciales relacionados con molestias intestinales (Swennen y col., 2006).

En la actualidad, los oligosacáridos procedentes de la fructosa (FOS), de la galactosa (GOS) y de la leche materna (HMO), son los OND más consumidos, pero existen otros carbohidratos que se consideran prebióticos emergentes como los derivados

de xilosa (XOS), arabinosilanos (AXOS) o los isomaltosacáridos (IMO) (Corzo y col., 2015; Otieno y Ahring, 2012; Patel y Goyal, 2011). Las propiedades prebióticas, tanto la resistencia a la digestión como su comportamiento como sustrato para las fermentaciones colónicas de estos compuestos emergentes están siendo evaluadas (Chen y col., 2011; Gullón y col., 2014; Ruiz y col., 2017).

#### ***1.3.4. Métodos de evaluación del potencial prebiótico***

Como hemos señalado anteriormente en la definición de prebiótico, éste debe ser capaz de estimular selectivamente las bacterias del colon. Para determinar el carácter prebiótico, se llevan a cabo estudios *in vitro* o *in vivo*. En la tabla 1.10 se recogen algunos trabajos encontrados en la bibliografía donde se utilizan estas metodologías.

##### ***I. Modelos de fermentación "in vitro"***

Es el procedimiento más sencillo para evaluar la actividad prebiótica. Consiste en poner en contacto el carbohidrato a evaluar con los microorganismos, los cuales pueden ser un cultivo puro, normalmente perteneciente al género de *Lactobacillus* o de *Bifidobacterium*, o una mezcla bien conocida de cultivos puros. También se utiliza inóculo fecal, aunque presentan el inconveniente de que los métodos microbiológicos convencionales precisan que las muestras sean procesadas rápidamente tras su obtención. En estos ensayos siempre se trabaja en condiciones anaeróbicas y a un pH en torno a 7.

Se analizan la dinámica (diversidad y/o número) de las poblaciones microbianas, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta a diversos tiempos definidos (Corzo y col., 2015). Este tipo de modelo (estáticos) permite estudiar los efectos de los sustratos de una manera económica y reproducible. Un inconveniente es que solo se puede simular las condiciones de la zona más distal del colon, pero se sabe que la composición de la microflora y el pH es diferente en distintas regiones del intestino.

**Tabla 1.10.** Evaluación del efecto prebiótico con diferentes métodos

Ensayo	Población	Sustrato	Autor
<i>In vitro</i>	Cultivos puro	GOS /GaOS	(Gullón y col., 2011)
<i>In vitro</i>	Inóculo fecal humano	OsLu/ GOS	(Cardelle-Cobas y col., 2012)
<i>In vitro</i>	Inóculo fecal de cerdo	XOS	(Dotsenko y col., 2018)
<i>In vitro</i>	SHIME	FOS	(Sivieri y col., 2014)
<i>In vivo</i>	Perro	GMOS	(Faber y col., 2011)
<i>In vivo</i>	Cobaya	XOS/ GOS	(Ebersbach y col., 2010)
<i>In vivo</i>	Ratones	Inulina/ FOS	(Buddington y col., 2002)
<i>In vivo</i>	Niños sanos (7-19 meses)	FOS	(Waligora-Dupriet y col., 2007)
<i>In vivo</i>	Recién nacidos prematuros	FOS/GOS/AOS	(Van Den Berg y col., 2016)
<i>In vivo</i>	Voluntarios sanos (18–55 años)	AXOS	(Walton y col., 2012)
<i>In vivo</i>	Voluntarios sanos (21-49 años)	XOS	(Finegold y col., 2014)
<i>In vivo</i>	Cerdos	GOS	(Alizadeh y col., 2016)
<i>In vivo</i>	Ratones	GOS polidextranos	(Waworuntu y col., 2014)

Por ello, un avance en este tipo de estudios es la utilización de modelos de simulación gastrointestinal, como los sistemas SHIME o SIGMI (Payne y col., 2012). Estos modelos permiten evaluar las transformaciones que sufren los carbohidratos a lo

largo del tracto gastrointestinal como paso previo a los estudios de intervención en humanos, los cuales son más costosos y con limitaciones éticas (Tamargo y col., 2016). El equipo simula las distintas regiones del intestino grueso, donde se controla la temperatura y pH, permitiendo el estudio de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los nutrientes entre otros. Algunos equipos más avanzados pueden incorporar movimientos peristálticos (Barroso y col., 2015). La principal ventaja de estos modelos es la toma de muestras en regiones de difícil acceso, así como la reproducibilidad de los resultados. No obstante, se puede señalar la dificultad para reproducir las condiciones dinámicas como la absorción de compuestos o la interacción con las células del huésped.

## ***II. Modelos de fermentación “in vivo”***

Estos modelos requieren el uso de animales y son útiles para confirmar la dinámica y actividad del microbiota, así como, estudiar los mecanismos de acción (Corzo y col., 2015). También permite conocer, si el consumo de prebióticos produce efectos adversos. Con todo ello se consigue un estudio completo de cómo estos compuestos se comportan en los individuos que los consumen siendo una herramienta poderosa para estudiar los papeles del microbiota intestinal en el contexto de diferente perspectiva de salud y enfermedad.

Los animales más utilizados para este fin son los roedores (rata y ratón), a partir de los cuales se puede obtener animales gnotobióticos (libres de microorganismos) y ser colonizados con microbiota humana. Actualmente se utilizan animales de granja, como los cerdos, debido a su parecido fisiológico a los humanos (Corzo y col., 2015).

El último estudio en la demostración científica es la eficacia en humanos (fase 2 de la evaluación clínica). En estos ensayos, el sustrato se suministra a voluntarios y se evalúan los cambios microbiológicos en las heces (Gibson y Roberfroid, 1995).

### ***1.3.5. Determinación de los ácidos grasos de cadena corta***

Los compuestos prebióticos son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos intestinales (fundamentalmente bifidobacterias y lactobacilos) en el proceso de fermentación, produciéndose AGCC. Los AGCC son ácidos volátiles y se caracterizan por no tener más de 6 átomos de carbonos, pero los mayoritarios son el ácido

acético (C2), ácido propiónico (C3), ácido butírico (C4), ácido isobutírico (C4), ácido valérico (C5), ácido isovalérico (C5) y ácido caproico (C6). En esta reacción también se generan gases tales como H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> y ácido láctico (Sarhini y Rastall, 2011).

La producción de los ácidos grasos de cadena corta se ve afectada por la fuente del sustrato (Cook y Sellin, 1998), la microbiota (tanto en número como en tipo) (Roberfroid, 2005), presente en el colon y por el tiempo del tránsito intestinal (Hijova y Chmelarova, 2007). La producción de AGCC parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la función de la barrera intestinal (Ríos-Covián y col., 2016).

Al liberarse compuestos ácidos se produce un descenso del pH del medio provocando una inhibición en el crecimiento de ciertas especies de Bacteroides, *Clostridium* y Coliformes (Roberfroid, 2002). Además, esta bajada de pH, reduce la degradación de los péptidos y los compuestos nocivos como el amoníaco y las aminas que se transforman en compuestos no tóxicos (Mohanty y col., 2018).

La absorción de los AGCC influye en el metabolismo del hospedador provocando ciertas acciones positivas como:

El ácido acético, es el principal ácido producido en el intestino y es metabolizado en el músculo. Puede actuar como lipogénico y colesterolémico en el hígado. Algunas bacterias lo transforman en butirato. También se sabe que el acetato aumenta la producción de anticuerpos en la sangre periférica y la actividad de las células asesinas naturales (natural killer cell) en pacientes con cáncer (Patel y Goyal, 2012).

El ácido propiónico, es metabolizado por bacteroides y puede ser formado por tres rutas metabólicas; la ruta del succinato, acrilato o la de propanodiol (Reichardt y col., 2014). También ayuda a inhibir la síntesis del colesterol en el hígado (Bajury y col., 2018) y se está estudiando si bajos niveles de propionato están relacionado con el asma en niños (Arrieta y col., 2015).

El ácido butírico es utilizado como fuentes de energía por las células epiteliales. Regula la apoptosis, la división y la diferenciación celular. Funciona como un factor de

protección primario contra los trastornos colónicos (Vernazza y col., 2006).

En las fermentaciones, también se produce por acción de bifidobacterias y proteobacterias el ácido láctico, aunque no es propiamente un AGCC. En condiciones fisiológicas normales no se acumula en el colon, ya que ciertas especies como *Eubacterium hallii*, lo transforman en AGCC (Flint y col., 2015). El lactato mejora la absorción de Ca, Mg y Fe e influye en el control del crecimiento microbiano.

### ***1.3.6. Técnicas de determinación de las poblaciones bacterianas***

La determinación de las comunidades microbianas es otro parámetro necesario que se debe analizar, para ello, se requiere métodos fiables. En la actualidad, esta tarea es más precisa debido al desarrollo de la biología molecular. Estas técnicas pueden englobarse en:

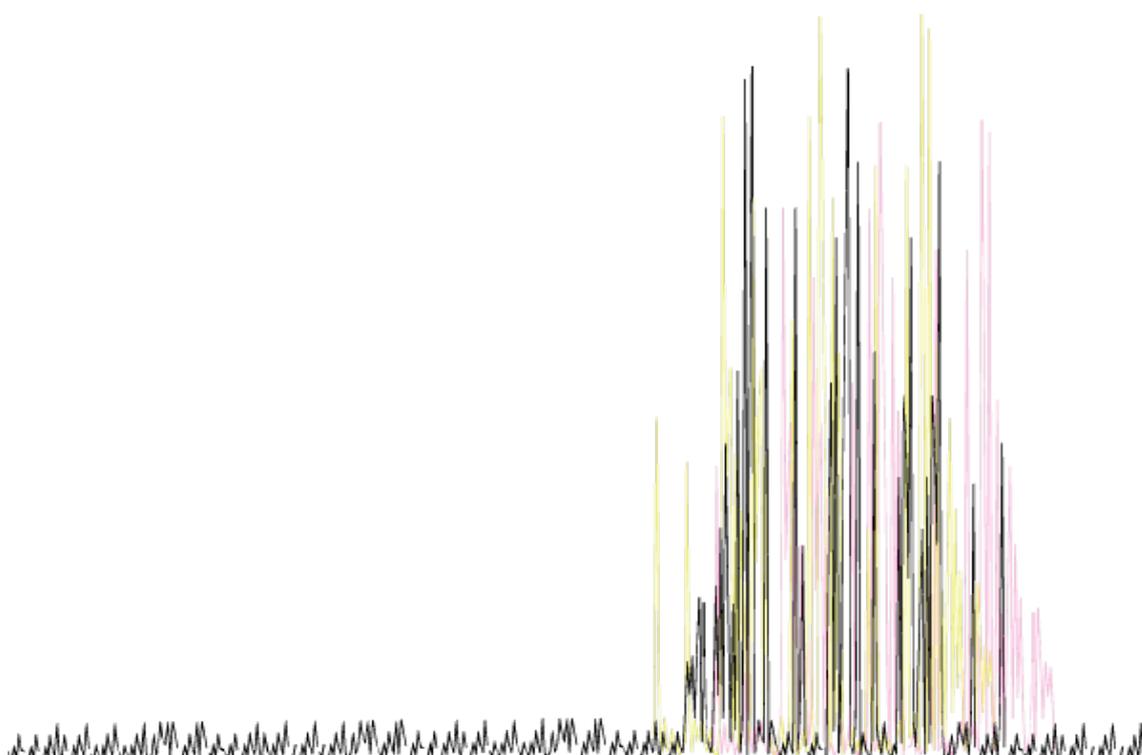
- *Fluorescencia con Hibridación In Situ* (FISH). Esta técnica permite la visualización de bacterias presentes en la muestra. Para ello, se utilizan sondas coloreadas de ácidos nucleicos marcadas con grupos fluorescentes (específica para cada especie bacteriana) para detectar las regiones 16S del ARN del interior de las células, combinando así la información visual con la precisión molecular.

Esta técnica permite conocer la filogenia de las bacterias, así como la morfología, localización, abundancia y actividad. Su principal inconveniente es que no puede ser aplicado para el estudio de cianobacterias, al tener éstas gran fluorescencia intrínseca. También se puede realizar un recuento de células totales utilizando la sonda DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) conocida como PCR. Se basa en la amplificación de un gen o una parte de un gen a partir de una pequeña cantidad de ADN o ARN mediante la repetición de ciclos alternos de temperaturas para la desnaturalización, unión de cebadores y extensión de la cadena mediante una enzima Taq polimerasa. A tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior.

- La metagenómica se define como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos colectivos contenidos en una muestra, basándose ya sea en expresión o secuenciación (Handelsman, 2004) proporcionando la capacidad de caracterizar de forma global la diversidad genética presente en dicha muestra. Las principales ventajas son un menor sesgo taxonómico en la secuenciación y la capacidad de analizar simultáneamente la taxonomía y funcionalidad de una misma comunidad. Una de las limitaciones se refiere a la ausencia de estandarización en las metodologías de obtención de datos, causando una enorme heterogeneidad en la información contenida en los análisis metagenómicos.

## 2.JUSTIFICACIÓN Y OBJETVOS





El trabajo de esta Tesis doctoral se enmarca en las actividades de investigación de la Unidad de Biocarburantes del CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas), cuyo principal objetivo es el desarrollo de procesos para la producción de bioetanol combustible a partir de diferentes materiales lignocelulósicos, como alternativa renovable a los combustibles fósiles.

En concreto, este trabajo se realizó en el marco del Proyecto de Investigación financiado por la Comunidad de Madrid, titulado «RESTOENE2: Producción de combustibles limpios para transporte a partir de residuos agroforestales» (Referencia S2013/MAE-2882).

En este trabajo se seleccionó la paja de cebada por ser un material abundante en España, barato y con un alto contenido en carbohidratos. Todas estas características lo convierten en una materia prima con un gran potencial tanto para la producción de xilooligosacáridos como de bioetanol.

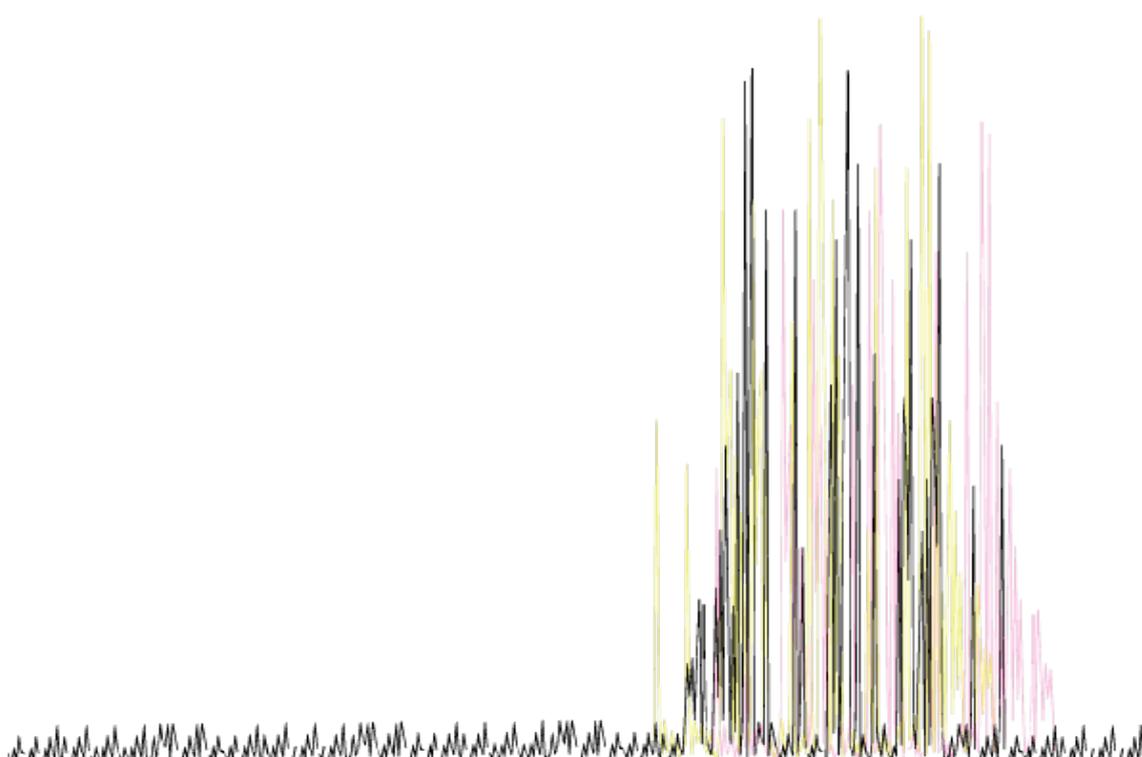
La estructura compleja y su composición hacen necesario que la biomasa lignocelulósica sea sometida a un proceso de pretratamiento, para alterar la estructura y aumentar la accesibilidad a las fibras de celulosa. Se ha elegido el pretratamiento de explosión por vapor, ya que se ha demostrado que es un método efectivo y apropiado para obtener bioetanol a partir de este tipo de biomasa. Tras el pretratamiento, la fracción insoluble, rica en celulosa y lignina será utilizada para la producción de bioetanol. Mientras que la fracción soluble, que contiene la hemicelulosa solubilizada, será utilizada para la producción de compuestos de alto valor añadido como son los xilooligosacáridos.

El objetivo de esta Tesis es la producción de xilooligosacáridos con bajo grado de polimerización (DP2-DP6) a partir de la fracción hemicelulósica solubilizada de paja de cebada pretratada y su posterior evaluación como agentes prebióticos. Otro reto planteado en la Tesis es la producción de bioetanol utilizando la fracción insoluble.

Para la consecución de este objetivo final se planteó un plan de trabajo con los siguientes objetivos parciales o más específicos:

- Evaluación del pretratamiento de explosión por vapor de paja de cebada: selección de condiciones que permitan la mayor solubilización de la hemicelulosa en la fracción soluble y la mayor cantidad de celulosa en la fracción insoluble.
- Obtención una fracción soluble libre de inhibidores que afecten a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática.
- Evaluación de diferentes configuraciones de hidrólisis enzimática para la obtención de xilooligosacáridos.
- Purificación de los xilooligosacáridos
- Caracterización estructural de los xilooligosacáridos obtenidos en las distintas etapas del proceso.
- Realización de ensayos *in vitro* para la evaluación de la actividad prebiótica de los xilooligosacáridos.
- Utilización del residuo sólido insoluble, obtenido en tras el pretratamiento, en la producción de etanol: evaluación del efecto de la dosis de enzima y concentración sustrato y estudio de diferentes configuraciones de proceso

### 3.MATERIALES Y MÉTODOS





### 3.1. Materia prima

El material utilizado para llevar a cabo esta Tesis ha sido un residuo agrícola, paja de cebada (*Hordeum vulgare*), suministrado por el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER-CIEMAT) (Lubia, Soria).

La biomasa fue molida hasta 2 mm con un molino de cuchillas (Retsch GmbH & Co. Hann, Alemania) para realizar la determinación de la composición tanto en componentes estructurales de la paja (celulosa, hemicelulosa, lignina), como en cenizas y extractos.

### 3.2. Pretratamiento de explosión por vapor (PEV)

La paja de cebada (con un contenido en humedad inferior al 10%) fue molida a 10 mm mediante un molino de martillos (Franssons HK-AIR.26, Västernorrland, Suecia), para ser sometida al pretratamiento seleccionado de explosión por vapor.

El PEV se ha llevado a cabo en una unidad piloto que el CIEMAT posee en sus instalaciones de Madrid (Fig. 3.1). La instalación opera siguiendo la tecnología “Mansonite”, tecnología originalmente aplicada en la producción industrial de pastas de papel. La planta opera en discontinuo y está formada por un generador de vapor, un reactor de 10 L de capacidad y un ciclón de descarga. El generador suministra vapor saturado al interior del reactor, donde se encuentra la biomasa, que se somete a las condiciones controladas de temperatura, presión y tiempo de residencia. Alcanzada la temperatura deseada y pasado el tiempo de residencia establecido, se produce una rápida despresurización mediante la apertura de la válvula inferior, pasando el material pretratado al ciclón de descarga.

Las condiciones de operación se seleccionaron de acuerdo con trabajos previos realizados con materiales herbáceos en el CIEMAT, donde se estudiaron las condiciones de pretratamiento más adecuado desde el punto de vista de mayor recuperación de azúcares. La selección de estas condiciones se estableció en base a unas condiciones de compromiso para la obtención de la mayor recuperación de la fracción de celulosa en la fracción sólida y de la fracción de hemicelulosa en la fracción líquida. En concreto en esta Tesis, las condiciones de

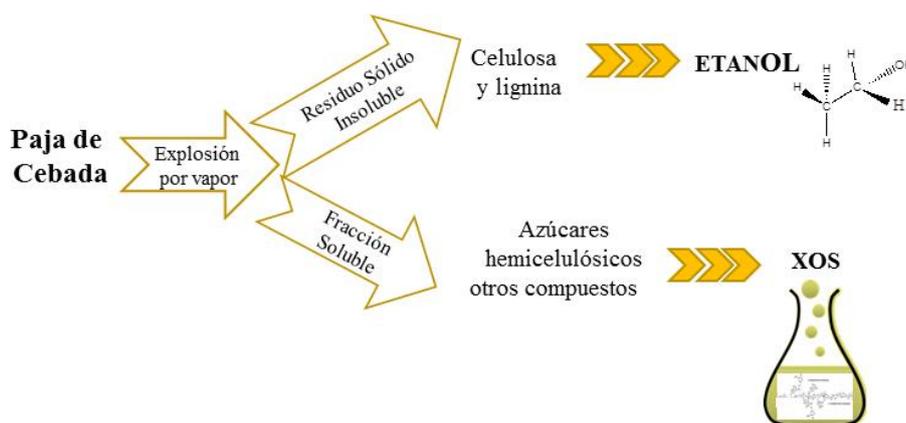
pretratamiento utilizadas tenían como objetivo la mayor recuperación de azúcares hemicelulósicos para lograr así obtener la mayor producción de xilooligosacáridos en etapas posteriores.



**Figura 3.1.** Unidad piloto de explosión por vapor en las instalaciones del CIEMAT

Las condiciones estudiadas a las que se sometió a la paja de cebada, previamente impregnada con agua, fueron: temperatura de 180 °C (en todas las experiencias) y diferentes tiempos de residencia: 15, 25, 30 y 35 minutos. Después de realizar la explosión por vapor (EV), el material pretratado completo es recogido en el ciclón, y se procedió a una filtración a vacío, separándose una fracción sólida o residuo sólido insoluble (RSI) y una fracción líquida o prehidrolizado. El RSI se caracterizó en cuanto a su composición, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.9.1 (pág. 104). En la fracción soluble se analizaron los azúcares monosacáridos, los compuestos de degradación y se determinaron los oligosacáridos presentes en dicha fracción, siguiendo las metodologías detalladas en el apartado 3.9.

Esta fracción soluble fue utilizada como sustrato en los diferentes ensayos para la obtención de los xilooligosacáridos, uno de los objetivos de la esta Tesis. Mientras que el RSI fue utilizado como sustrato para la producción de etanol. En la figura 3.2 se muestra un esquema del proceso de la obtención del sustrato.



**Figura 3.2.** Esquema de la obtención del residuo sólido insoluble y del líquido procedente en el pretratamiento de explosión por vapor de la paja de cebada

### 3.3. Etapa previa de purificación de la fracción líquida obtenida en el pretratamiento de explosión por vapor

Durante el pretratamiento, la biomasa es sometida a altas temperaturas y presión, lo que provoca una alteración en la celulosa y se produce una degradación tanto de la lignina como de los azúcares derivados de la fracción hemicelulósica, dando lugar a los compuestos de degradación (Fig. 1.6). Estos compuestos, pueden interferir tanto en la calidad de los análisis cromatográficos como en el proceso de hidrólisis enzimática para la obtención de xilooligosacáridos. Por este motivo se ha procedido a someter a la fracción líquida obtenida en el pretratamiento (después de separarla del RSI) a un proceso de purificación para eliminar estos compuestos. Esta etapa se realizó utilizando una resina de intercambio iónico Microionex MB-200 (Rohm-Hass Copenhagen, Dinamarca) con el fin de retener la mayor cantidad de compuestos de degradación de azúcares (furfural, HMF), ácidos carboxílicos (ácido acético y ácido fórmico), compuestos fenólicos y otros inhibidores solubles (Kim y col., 2011).

Esta etapa de purificación consistió en poner en contacto la fracción líquida con la resina de intercambio iónico de lecho mixto en la proporción de 0,3 g de resina por mL de fracción líquida (Negro y col., 2014). Mediante filtración a vacío, se obtuvo la fracción soluble procedente del pretratamiento libre de compuestos fenólicos y ácidos, los cuales quedan retenidos en la resina. Finalmente, se filtró por 0,45  $\mu\text{m}$ .

El líquido procedente del pretratamiento de explosión por vapor, y libre de compuestos de degradación será lo que se denomine **fracción líquida de paja de cebada pretratada (FIPCP)** y será el sustrato de partida para la obtención de los xilooligosacáridos de bajo grado de polimerización objetivo de esta Tesis.

Considerando el alto porcentaje de oligosacáridos con grado de polimerización superior al deseado en esta investigación ( $<DP_6$ ) presentes en la FIPCP, se ha optado por utilizar la hidrólisis enzimática como la mejor manera de romper dichos oligómeros minimizando la formación de monosacáridos.

### 3.4. Enzimas

La utilización de enzimas específicas, como son las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, permite realizar una hidrólisis selectiva y controlada y así minimizar la generación de compuestos que puedan interferir en etapas posteriores. Otras ventajas de la aplicación de procesos enzimáticos son que requiere condiciones suaves de pH y temperatura. Para llevar a cabo la etapa de hidrólisis enzimática del FIPCP se pueden utilizar diversas endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas y enzimas accesorias como  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, esterases, etc. que puedan actuar sobre enlaces específicos de las ramificaciones del heteropolisacárido.

A lo largo de la experimentación de esta Tesis se han utilizado diversas preparaciones enzimáticas comerciales, que se recogen en la Tabla 3.1, con el objetivo de lograr la despolimerización de la FIPCP y obtener la mayor cantidad de XOS de bajo grado de polimerización.

Como queda reflejado en la Tabla 3.1, se han utilizado una serie de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, pertenecientes a distintas familias con el objetivo de estudiar su comportamiento frente al sustrato FIPCP. La hemicelulosa es un heteropolímero con ramificaciones, éstas pueden ser desde otros carbohidratos como arabinosa, grupos acetilos o compuestos derivados de la lignina como son los ácidos ferúlico o *p*-cumárico. En consecuencia, una vez estudiado el comportamiento de las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas individualmente, se ha estudiado el efecto de enzimas complementarias o accesorias con el fin de lograr una mayor despolimerización de la hemicelulosa.

### 3.4.1. Determinación de las actividades enzimáticas

#### a) Actividad xilanasa

La actividad xilanasa se llevó a cabo utilizando como sustrato una disolución de xilano de abedul (Merck, Darmstadt, Alemania) al 1% en tampón citrato sódico 0,05 M y pH 5. Se incubaron a 50 °C, 225  $\mu$ L de sustrato y 25  $\mu$ L de disolución de enzima convenientemente diluida durante un intervalo de tiempo entre 2,5 y 10 minutos. Tras terminar la reacción, la concentración de azúcares se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de la actividad de xilanasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un  $\mu$ mol de xilosa por minuto a partir del sustrato utilizado. La actividad enzimática se expresó en U/mL.

#### b) Actividad $\beta$ -glucosidasa

Para la determinación de actividad  $\beta$ -glucosidasa se utilizó el sustrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (*p*NPG) que al hidrolizarse libera glucosa y *p*-nitrofenol. Se preparó una disolución de *p*NPG al 7,2 mM (Sigma- Aldrich Merck, Darmstadt, Alemania) en tampón citrato sódico 0,05 M y pH 5. La mezcla de reacción se preparó con 40  $\mu$ L de sustrato y 40  $\mu$ L de la dilución del complejo enzimático. La actividad se determinó a 50 °C y a diferentes tiempos de incubación (2,5; 5; 7,5 y 10 min). Tras la incubación, se adicionaron 200  $\mu$ L de carbonato sódico al 2% para detener la reacción. Se midió la absorbancia del *p*-nitrofenol liberado a 410 nm (espectrofotómetro V-530, JASCO). La actividad (UI/mL) se calculó utilizando una recta patrón (5-100  $\mu$ g/mL) de *p*-nitrofenol. La unidad de  $\beta$ -glucosidasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un  $\mu$ mol por minuto de *p*-nitrofenol utilizando  $\beta$  (*p*NPG) como sustrato en tampón citrato sódico pH 5 y 50 °C.

#### c) Actividad $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

La actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa se determinó usando como sustrato de la reacción una disolución al 0,2% de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido (*p*NPA) (Sigma) y una dilución de la enzima. La reacción se preparó con 40  $\mu$ L del complejo enzimático diluido y 40  $\mu$ L de sustrato en tampón citrato sódico 0,05 M pH 5, a 50°C y 400 rpm. La reacción fue

medida a diferentes tiempos (5, 15 y 30 min). Como en los casos anteriores, se utilizó una disolución al 2% de carbonato sódico para detener la reacción. Se determinó la absorbancia del *p*-nitrofenol liberado a 410 nm y se calculó su actividad como UI/mL.

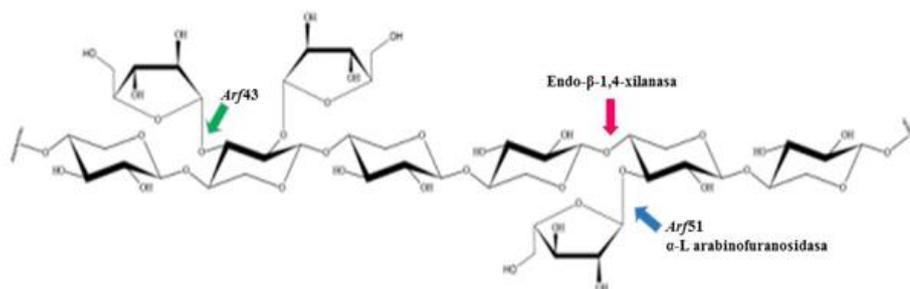
### 3.5. Ensayos de hidrólisis enzimática

Durante esta Tesis, se han llevado a cabo una serie de ensayos de hidrólisis enzimática (HE), con el objetivo de hidrolizar la cadena de xilano solubilizado presente en la fracción líquida de la paja de cebada pretratada (FIPCP).

Para estudiar el comportamiento de las enzimas sobre nuestro sustrato, previamente se han llevado a cabo unos estudios preliminares sobre dos arabinoxilanos de trigo comerciales con el fin de estudiar el comportamiento de estas enzimas sobre sustratos comerciales.

#### 3.5.1. Ensayos de hidrólisis enzimática sobre un sustrato comercial

En la figura 3.3 se representa la estructura del arabinoxilano de trigo comercial, utilizado para estudiar el comportamiento de las enzimas. Estos estudios preliminares se han llevado a cabo utilizando como sustrato arabinoxilanos de trigo comerciales (95% de pureza) (Megazyme, Bray, Irlanda) de baja y media viscosidad, 10,2 y 31,4 cSt respectivamente. Al arabinoxilano de menor densidad le denominamos **LOW** y presenta una relación arabinosa/xilosa (A/X) de 0,4. En el caso del arabinoxilano de densidad media, denominado **MEDIUM**, presenta una relación A/X de 0,6.



**Figura 3.3.** Estructura del arabinoxilano de trigo comercial

Tabla 3.1. Resumen de las enzimas utilizadas en esta Tesis

Nombre comercial	Referencia enzima	Actividad principal/Familia/Enlace hidrolizado	Procedencia
E-XYTRI M1	<i>XlnM1</i>	Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas/ GH11/ $\beta$ (1-4) entre D-xilanopiranosas	<i>Trichoderma viride</i> (Megazyme)
NS 50030	<i>NS50030</i>	Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas/ $\beta$ (1-4) entre D-xilanopiranosas	<i>Aspergillus oryzae</i> (Novozymes)
E- XYNACJ	<i>XlnJa</i>	Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas/ GH10/ $\beta$ (1-4) entre D-xilanopiranosas	<i>Cellvibrio japonicus</i> (recombinante) (Megazyme)
E-XYLATM	<i>XlnTh</i>	Endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas/ GH10/ $\beta$ (1-4) entre D-xilanopiranosas	<i>Thermotoga maritima</i> (recombinante) (Megazyme)
Novozym 188	<i>Novozym 188</i>	$\beta$ Glucosidasa/ Ec.3.2.1.21/ $\beta$ (1-4) entre D-glucopiranosas	<i>Aspergillus niger</i> (Novozymes)
E-AFAM2	<i>Arj43</i>	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa/ GH43/ $\alpha$ -L-(1-3) entre la arabinosa y la cadena principal	<i>Bifidobacterium sp</i> (recombinante) (Megazyme)
E-AFASE	<i>Arj51</i>	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa/ GH51/ $\alpha$ -L (1-2); $\alpha$ -L-(1-3) entre la arabinosa y la cadena principal	<i>Aspergillus niger</i> (Megazyme)
E-FAEZCT	<i>Fe_E</i>	Feruloil esterasas/ CE1/ Ésteres entre el xilano y los ácidos ferúlico y <i>p</i> -cumárico	<i>Clostridium thermocellum</i> (recombinante) (Megazyme)
E-AXEAO-IKU	<i>AcX_E</i>	Acetilxilano esterasa/ CE6/ libera grupos acetilos unidos al xilano	<i>Orpinomyces sp. (recombinante)</i> (Megazyme)
NS22035	<i>NS22035</i>	$\alpha$ -Glucoamilasa/ $\alpha$ (1-6) y $\alpha$ (1-4) entre las D-glucopiranosas	(Novozymes)

Sobre una disolución de 10 g/L de estos sustratos, se ha estudiado el comportamiento de la enzima *XlnM1* (endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas) individualmente o en combinación con dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (*Arf43* y *Arf51*), con el objetivo de estudiar el comportamiento del complejo enzimático utilizado.

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando un tampón de citrato sódico 0,05 M a pH 4 y 40 °C. El ensayo se incubó en el intervalo desde 30 minutos a 6 horas. En este caso, las dosis utilizadas se recogen en la tabla 3.2. Se tomaron muestras periódicamente determinándose la concentración de azúcares mediante HPLC.

**Tabla 3.2.** Resumen de las condiciones de hidrólisis sobre el arabinoxilano comercial

Enzima	Dosis (U/mL)
<i>XlnM1</i>	10,2
<i>Arf43</i>	10,2
<i>Arf51</i>	6,3
<i>XlnM1+Arf43+Arf51</i>	10,2 /10,2/ 6,3

### 3.5.2. Ensayos de hidrólisis enzimática sobre sustrato *FIPCP*

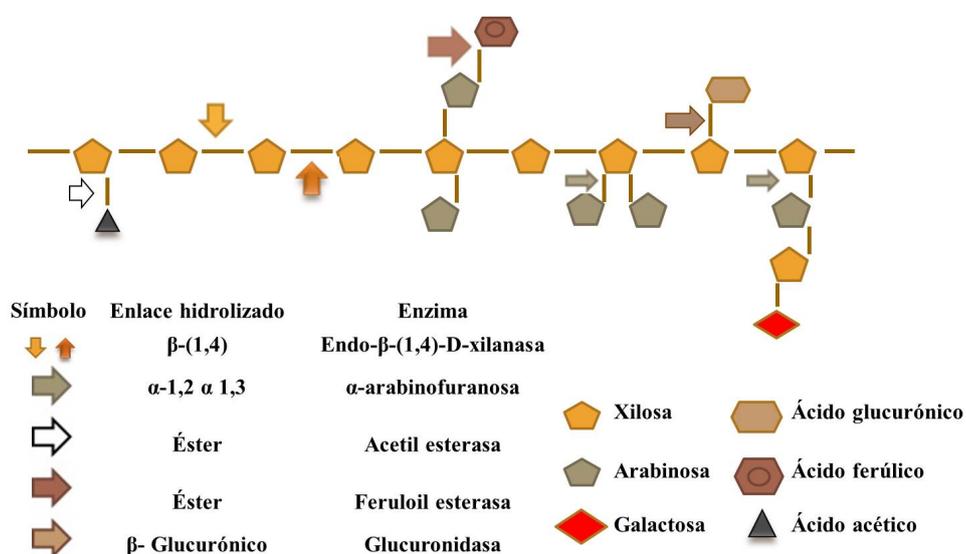
Debido a la complejidad de la estructura de la hemicelulosa de las herbáceas, como es nuestro caso, se requiere el uso de otras enzimas accesorias que hidrolicen otros enlaces presentes en la estructura y favorezcan la liberación de xilooligosacáridos (XOS) de bajo grado de polimerización (DP2-DP6).

En la figura 3.4 se muestra un esquema de las distintas actividades necesarias para lograr una degradación completa de la hemicelulosa pretratada de paja de cebada.

Estos ensayos se realizaron bajo distintas condiciones de trabajo, dependiendo de las enzimas utilizadas. Las hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo utilizando tampón citrato sódico 0,05M con un pH comprendido entre 4 y 4,8 y un rango de temperatura entre 40-50 °C.

En todos los experimentos se tomaron muestra periódicamente a distintos tiempos, para

inactivar las enzimas y parar la reacción, las muestras se llevaron a 100 °C durante 5 min. Las muestras fueron analizadas por HPLC para conocer la concentración de los distintos compuestos liberados en la muestra, como monosacáridos, oligosacáridos, compuestos fenólicos, grupos acetilos entre otros.



**Figura 3.4.** Esquema de las enzimas implicadas en la degradación de la hemicelulosa pretratada de paja de cebada

Una vez estudiado el comportamiento de las enzimas endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasasa, de manera individual se han realizado batería de ensayos creando mezclas enzimáticas con distintas actividades con el fin de lograr obtener la mayor despolimerización de la cadena de xilano, y obtener mejores resultados en la formación de XOS (DP2-DP6). En la tabla 3.3, se recoge un resumen de aquellas pruebas que se han utilizado varias enzimas simultáneamente y sus dosis respectivas, así como la denominación de estos ensayos en este trabajo.

**Tabla 3.3.** Resumen de los ensayos de hidrólisis enzimática sobre FIPCP

Ensayos Individuales		Ensayo Mezclas Enzimáticas		
Enzima	Dosis (U/mL)	Nombre del ensayo	Enzimas	Dosis (U/mL)
<i>XlnJa</i>	1,5	<i>XlnM1 +XlnTh</i>	<i>XlnM1</i> <i>XlnTh</i>	5,1 5,6
<i>XlnTh</i>	5,6	<i>Maf</i>	<i>XlnM1</i>	5,1
<i>XlnTh</i>	22,5		<i>Arf51</i> <i>Fe_E</i>	6,3 0,05
<i>XlnM1</i>	5,1	Complex	<i>XlnM1</i>	5,1
<i>XlnM1</i>	20,4		<i>Arf51</i> <i>Fe_E</i>	6,3 0,05
<i>NS50030</i>	7,2		<i>AcX_E</i>	5
		<i>NS50030 + Accesorias</i>	<i>Ns50030</i>	7,2
			<i>Arf51</i>	3
			<i>Fe_E</i> <i>AcX_E</i>	0,05 5

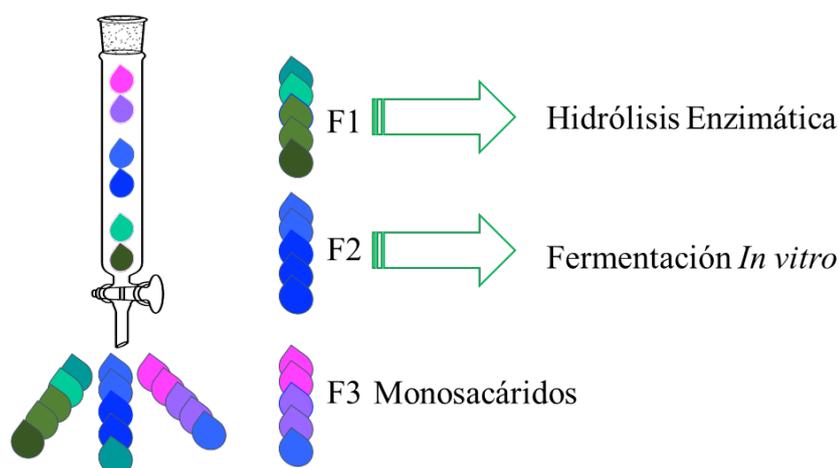
### 3.6. Métodos de purificación de la FIPCP

#### 3.6.1. Fraccionamiento de la FIPCP

La fracción líquida obtenida en el pretratamiento de paja de cebada contiene azúcares con distinto grado de polimerización desde monosacáridos, oligómeros con bajo grado de polimerización (DP2-DP6) y oligosacáridos >DP6. Con el objeto de producir la mayor concentración de xilooligosacáridos de DP2-DP6 evitando la ruptura de estos XOS a azúcares monoméricos, se ha realizado un fraccionamiento de la muestra de prehidrolizado.

En el fraccionamiento aplicado se han separado tres fracciones en función de su tamaño molecular, siguiendo el esquema recogido en la figura 3.5. La primera fracción contiene los compuestos con grado de polimerización superior a 6 (F1) y fue colectada desde el minuto 140 hasta el 230. La segunda fracción (F2) contiene los compuestos con grado de polimerización

entre DP2-DP6 y fue colectada desde el minuto 230 al 315. Finalmente, la fracción tres (F3) donde se recogen los monosacáridos y compuestos de bajo peso molecular como alcoholes etc., presentes en la muestra. Esta fracción comprende desde el minuto 315 hasta el 350.



**Figura 3.5.** Esquema del fraccionamiento de la FIPCP

Este procedimiento de fraccionamiento se ha llevado a cabo utilizando una columna cromatográfica con relleno de exclusión molecular Bio-GEL P2 (Bio-Rad, California, EE.UU.), el cual está formado por un polímero sintético de poliacrilamida capaz de separar moléculas con un peso molecular entre 100 y 1800 Da. Se ha utilizado como fase móvil ácido acético 0,1 M con un flujo de 0,1 mL/min y a temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 600  $\mu$ L. La columna se encuentra conectada a un inyector automático (Autosampler Waters 717 plus) junto a una bomba (Waters 600 controller) y un detector de índice de refracción (Waters 2414) (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.). Una vez que se recolectaron las muestras, se liofilizaron y fueron regeneradas en agua ultrapura (Millipore, Massachusetts, EE.UU.) para ser utilizadas posteriormente.

### **3.6.2. Purificación por membrana**

El método de purificación de la fracción líquida de paja de cebada pretratada se ha llevado a cabo mediante la utilización de un sistema de ultrafiltración, empleando un equipo Amicon Stirred Cell (8400) (Merck, Darmstadt, Alemania). Este equipo consiste en una celda que utiliza una fuente externa de gas nitrógeno y un agitador magnético, lográndose una alta concentración de la muestra y buenos niveles de recuperación. El equipo dispone de un soporte

para membranas, con un diámetro de 76 mm, lo que supone un área efectiva de 41,8 cm<sup>2</sup>. La presión de trabajo de gas fue alrededor de 3 bares. Esta presión está proporcionada por un equipo generador de nitrógeno modelo LC-MS-40.1 (Claind, Como, Italia). Las membranas utilizadas fueron de celulosa regenerada con un tamaño de corte molecular entre 5 y 1 kDa.

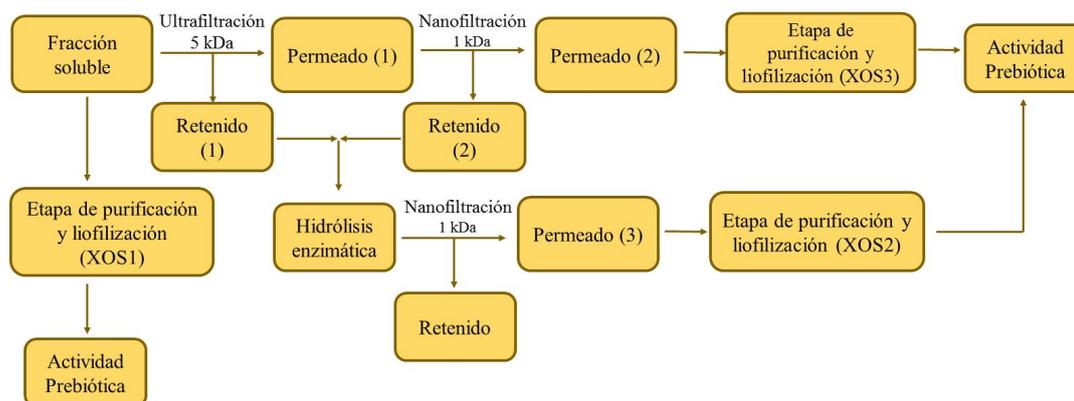
En la figura 3.6, se muestra el esquema de trabajo que se ha seguido para lograr obtener compuestos de bajo grado de polimerización mediante ultrafiltración.

La primera etapa, consistió en la ultrafiltración utilizando la membrana de 5 kDa, de la que se obtuvo dos corrientes, un permeado (1) o producto que contiene compuestos con un peso molecular inferior a 5 kDa, y un retenido (1) o concentrado que contiene compuestos con un peso igual o superior a 5 kDa. El permeado se sometió de nuevo a filtración utilizando ahora la membrana de corte molecular de 1 kDa, y como en el caso anterior se obtuvo un permeado (2) y un retenido (2). El permeado (2) se pasó por la resina de intercambio iónico, y se liofilizó dando lugar al producto denominado XOS3.

Las fracciones retenidas (1 y 2) obtenidas en las filtraciones (ultrafiltración/nanofiltración), se sometieron a una hidrólisis enzimática con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* (Megazyme, Bray Irlanda) en combinación con la  $\beta$ -glucosidasa *Novozym 188* (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) con el fin de reducir el grado de polimerización de los compuestos. Las dosis de enzima fueron de 5,1 y 0,6 UI/mL de FIPCP para *XlnM1* y *Novozym 188* respectivamente. Las condiciones de hidrólisis fueron las mismas que en los otros ensayos de hidrólisis enzimática.

El producto de hidrólisis se sometió de nuevo al proceso de filtración con la membrana de 1 kDa, obteniendo así el permeado (3), el cual se sometió al proceso de purificación con la resina y se liofilizó para obtener un sólido XOS2.

Los denominados XOS1 son los xilooligosacáridos presentes en la fracción líquida del pretratamiento con explosión por vapor. Finalmente, el estudio de actividad prebiótica de los productos obtenidos (XOS1, XOS2 y XOS3) se realizó mediante los ensayos descritos en el apartado 3.7.



**Figura 3.6.** Esquema del procedimiento de trabajo con el sistema de purificación de las membranas

### 3.7. Ensayos de actividad prebiótica

Los ensayos de actividad prebiótica se han llevado a cabo usando inóculo fecal humano utilizando los sólidos (xilooligosacáridos) obtenidos a partir de la paja de cebada pretratada como fuente de carbono.

#### 3.7.1. Preparación del inóculo fecal

Las muestras de inóculos fecales fueron obtenidas de tres donantes voluntarios sanos, los cuales no son conocedores de padecer ninguna enfermedad metabólica o del tracto gastrointestinal, con edades comprendidas entre los 25-40 años. Los donantes no han consumido ningún tipo de antibiótico ni suplementos prebióticos o probióticos en los tres meses anteriores al estudio. El inóculo fue preparado en una cámara de anaerobiosis modelo Bactron IV, ShellLab (Cornelius, Oregón, EE.UU.), con una atmósfera inerte compuesta de 5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 85% N<sub>2</sub>.

La preparación de la muestra se hizo siguiendo la metodología descrita por Gullón y col. (2014). Las muestras fueron recogidas en unos viales estériles mantenidas a 37 °C hasta el momento de la preparación de la fermentación, no excediendo el tiempo de 2 h desde su recolección. El inóculo de heces fue diluido en una solución fisiológica salina reducida compuesta por cisteína-HCl y NaCl hasta una concentración de 100 g de heces/L de la disolución salina. La suspensión fue mezclada y homogeneizada durante 2 minutos bajo una corriente de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. La mezcla fue filtrada a través de unas gasas quirúrgicas estériles, con el fin de retirar

los materiales no disueltos y se transfirió a una botella de suero estéril. Durante toda la preparación de las muestras se mantuvo las condiciones de anaerobiosis y el pH a 6,8.

### ***3.7.2. Preparación del medio de fermentación***

El medio basal para llevar a cabo la fermentación fue preparado siguiendo la metodología descrita por Gullón y col. (2014). Este medio se preparó mezclando una disolución de NaOH 0,1 M suplementado con diferentes fuentes de proteína: 5 g/L de trypticase soya broth sin dextrosa (BBL, Lockesville, Maryland, EE.UU.); 5 g/L de bactopectona (Becton–Dickinson, Buckinghamshire, Reino Unido). De igual modo, se añadió: 1% (v/v) de una disolución denominada A que contiene, (100,0 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 10,0 g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 10,0 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2% (v/v) de la disolución B (200,0 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ); 0,2% (v/v) de una disolución de resazurina de 0,5 g/L (disolución C) y 1% (v/v) de una disolución D compuesta por diferentes minerales ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,15 g/L;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,1 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g/L;  $\text{ZnCl}_2$  0,1 g/L;  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,04 g/L;  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,03 g/L;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,02 g/L;  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02 g/L;  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  0,01 g/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,01 g/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01 g/L). Este medio fue desoxigenado, con corriente de  $\text{N}_2$ , durante 8 h, se le añadió 0,5 g/L cisteína-HCl (Merck, Darmstadt, Alemania) y se ajustó el pH 6,8. También se requiere preparar una disolución de yeast nitrogen base (YNB) (Becton-Dickinson, Buckinghamshire, Reino Unido), una disolución de fructooligosacáridos (Merck, Darmstadt, Alemania) que se utiliza como control positivo de la fermentación y una disolución que contiene los xilooligosacáridos a ensayar. Todas las disoluciones fueron esterilizadas mediante filtración en botes estériles de suero y desoxigenadas posteriormente.

Después de la desoxigenación, se dispensaron bajo condiciones de anaerobiosis, 7 mL de este medio en tubos Bellco (Bellco Biotechnology Inc., Nueva Jersey, EE.UU.) de anaerobiosis sellados con un tapón de caucho y con una chapa de aluminio. Finalmente fueron esterilizados durante 15 minutos en autoclave a 121 °C.

A cada tubo de cultivo que contiene el medio basal, se le añadieron en condiciones asépticas dentro de la cabina de anaerobiosis 2% (p/v) de la disolución de inóculo, la disolución 5 g/L de YNB (como fuente de nitrógeno) y los carbohidratos (XOS o FOS) hasta alcanzar una concentración final de 10 g/L.

Los tubos fueron incubados a 37 °C sin agitación durante 30 horas. Se tomaron muestras a 0, 4, 7, 10, 24 y 30 h. Las muestras fueron centrifugadas (5000 g, 5 min). El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana 0,45 µm antes de analizar en HPLC el contenido en carbohidratos, concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y de ácido láctico. El pellet de células fue analizado mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para la cuantificación de bacterias totales y bifidobacterias.

### 3.7.3. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Para llevar a cabo la cuantificación de las poblaciones bacterianas en la fermentación, se utilizó una sonda de oligonucleótidos sintético (TIB Molbiol, Madrid, España) dirigida a regiones específicas del gen 16S rRNA marcado con el colorante fluorescente cianina Cy3 (Sigma, Barcelona, España) para la determinación de bifidobacterias. Para el recuento de bacterias totales se utilizó la tinción 4,6-diamindino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma, Barcelona, España).

Una vez recogida la muestra de cada tiempo de muestreo, se centrifugó a 15.000 g durante 2 minutos, y se tomaron 375 µL de muestra que se mezcló con 1125µL de una disolución de paraformaldehído al 4% (p/v). Las muestras se dejaron fijar durante toda la noche a 4 °C. Las células fijadas se centrifugaron a 15.000 g durante 5 minutos y se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS) 0.1M, pH 7. Una vez lavadas se resuspendieron en una mezcla que contenía 150 µl de PBS y 150 µL de una disolución de etanol 99% frío y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Una vez fijadas las muestras, se llevó a cabo el proceso de hibridación en un microtubo de centrifuga eppendorf (1,5 mL), para el cuál se preparó una disolución de trabajo (ST) formada por 40 µL de la muestra tratada, 160 µL de agua estéril a 50 °C y 500 µL del buffer de hibridación (Tris-HCl 40 mmol/L (Panreac, Madrid, España) pH 7,2; NaCl 1,8 mol/L) y de una solución de 100 g de dodecil sulfato sódico/L (SDS) 20 mL/L (Panreac, Madrid, España). A 36 µL de la ST, se le añadió 4 µL de la sonda (50 ng/µL), la cual ha sido previamente descongelada. Se dejó toda la noche en la cámara de hibridación a 50 °C. Una vez que ha tenido lugar la hibridación, se lavó la muestra con un tampón (Tris-HCl 20 mmol/L (Panreac, Madrid, España) pH 7,2; NaCl 0,9 mol/L).

En un tubo eppendorf se añadió 396  $\mu\text{L}$  del tampón de lavado sin SDS y 4  $\mu\text{L}$  de las muestras hibridadas (en la oscuridad). Estos 400  $\mu\text{L}$  se llevaron a los tubos de centrifuga que contienen 5 mL del tampón de lavado, (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 0.9 mol/L NaCl), y 30  $\mu\text{L}$  de DAPI (500 ng/mL). Se incubaron durante 30 minutos a 50 °C. Finalmente se lavó y se filtró a vacío utilizando un filtro Nuclepore Policarbonate 0.2  $\mu\text{L}$  (Whatman Kent, Reino Unido). Las muestras se almacenaron en oscuridad a 4°C durante un máximo de 3 días hasta su análisis en el microscopio

### ***3.7.4. Visualización en el microscopio y cuantificación***

Una vez que tenemos las muestras, se realizó el recuento de bacterias totales y *Bifidobacterium* en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX41, Tokio, Japón) equipado con lentes Flúor 100. Para ello la muestra se colocó en el portaobjetos con el cubre y se le añadió 5  $\mu\text{L}$  reactivo Fluoroguard™ Antifade Reagent (Bio-Rad, California, EE. UU.) para evitar la pérdida de fluorescencia. El conteo de las muestras se realizó por duplicado.

### ***3.7.5. Determinación de ácidos grasos de cadena corta***

La determinación de los AGCC obtenidos en las fermentaciones *in vitro* de los xilooligosacáridos prebióticos, fueron analizados utilizando un HPLC/IR Agilent 1200 series acoplado a un detector de índice de refracción (Agilent Alemania). Para ello se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, California, EE. UU.) a 50° C utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 0,003 M en modo isocrático a un flujo de 0,6 mL/min.

## ***3.8. Ensayos de hidrólisis enzimática y fermentación del RSI***

El RSI obtenido en el pretratamiento se sometió a un proceso de hidrólisis enzimática con el objetivo de obtener la mayor cantidad de glucosa que finalmente será fermentada a etanol. En este trabajo se han utilizado dos configuraciones de proceso: hidrólisis y fermentación separadas (HFS) y prehidrólisis con sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS).

Los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron en matraces tipo Erlenmeyers de 100 mL, los cuales contienen la mezcla de enzimas y el sustrato en un medio tamponado con tampón citrato 0,05 M a pH 4,8, en un incubador agitador orbital a 150 rpm (Infors AG, Bottmingen,

Suiza) a 50 °C. La cantidad de sustrato se añadió según su contenido en sólidos insolubles. Esta carga se ajustó en peso volumen a 10, 15 y 20% hasta un volumen de reacción de 30 mL. La enzima celulolítica empleada fue la preparación enzimática Cellic CTec2 (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) a distintas dosis D15 (15 FPU/g glucano) y D30 (30 FPU/g glucano). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Para llevar a cabo la fermentación se utilizó el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Red, Fermentis, Francia). El inóculo fue preparado y crecido en un agitador orbital a 150 rpm (Infors AG, Bottmingen, Suiza) a 35 °C durante 16 h en un medio sintético con la siguiente composición: 5g/L de extracto de levadura; 2g/L de NH<sub>4</sub>Cl; 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 30 g/L de glucosa. En todas las experiencias se utilizó 0,25 g/L de inóculo.

### **3.8.1. Proceso HFS**

En el proceso de HFS se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 25 mL de medio después de la HE a una concentración de sustrato del 20% (p/v). Durante 72 horas a 50 °C y 150 rpm, y la fracción líquida se sometió a fermentación a 35 °C durante 48 h. Los experimentos de fermentación fueron iniciados por la inoculación de una suspensión celular que resulta en una concentración inicial de masa celular de 0,25 g/L. Las concentraciones de nutrientes en el medio fueron como se describe anteriormente para el cultivo de inóculo, excepto la glucosa. Las muestras se tomaron periódicamente y se analizaron para conocer la cantidad presente tanto de azúcares como de etanol.

### **3.8.2. Proceso PSFS**

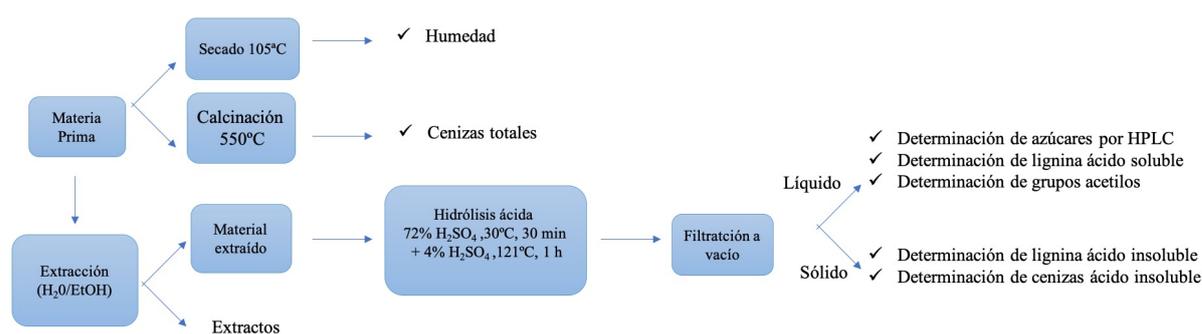
La prehidrólisis y la etapa de SFS se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con una carga de sólido del 20% (p/v) y una reacción final volumen de 50 mL. Se ensayaron dos dosis de enzimas de D15 y D30. La etapa de prehidrólisis se llevó a cabo a 50 °C durante 8 horas o 24 horas a 150 rpm. Después de eso, la temperatura se redujo a 35 °C y el medio fue inoculados con *S. cerevisiae* cultivados durante la noche (0,25 g/L). Como en el caso anterior se tomaron muestras a distintos tiempos de reacción y se analizó su contenido en azúcares y etanol.

### 3.9. Determinaciones analíticas

En este apartado se detallan los distintos métodos analíticos utilizados para llevar a cabo la caracterización de los productos generados en de las diferentes etapas del proceso.

#### 3.9.1. Caracterización de la materia prima y residuo sólido insoluble

La composición estructural de la paja de cebada se realizó siguiendo los protocolos desarrollados por el National Renewable Energy Laboratory para la determinación tanto de carbohidratos estructurales, de lignina (NREL/TP-510-42618) y cenizas (NREL/TP-510-42622) en las biomásas lignocelulósicas. Mediante estos procedimientos, se establece los porcentajes relativos respecto a materia seca de los componentes de la biomasa. La figura 3.7 muestra el esquema de las etapas a seguir para determinar la composición química en la biomasa.



**Figura 3.7.** Esquema para la caracterización del material lignocelulósico

En primer lugar, se calcula la humedad y las cenizas totales de la materia prima. A continuación, se realiza una doble extracción con agua y etanol como se muestra en el procedimiento del NREL /TP-51-42619. A continuación, el material extraído es sometido a una hidrólisis ácida en dos fases para determinar los carbohidratos estructurales en forma de monosacáridos del material libre de extractos. La primera fase se realizó con ácido sulfúrico al 72% (p/p) durante 30 minutos a 30 °C. Posteriormente, se realizó una segunda hidrólisis con ácido sulfúrico diluido al 4% durante una hora a 121 °C. La cuantificación de los azúcares monoméricos en el material hidrolizado se realizó utilizando HPLC/IR. Se asume que la glucosa procede de la celulosa y que la xilosa, arabinosa, manosa y galactosa proceden de la hemicelulosa. Teniendo en cuenta la liberación de una molécula de agua en la formación del

enlace glucosídico, se debe aplicar un factor de corrección de 1,10 para las hexosas, es decir para glucosa, galactosa y manosa y de 1,13 para las pentosas (xilosa y arabinosa).

En la fracción líquida obtenida tras el PEV se analizó tanto la composición en azúcares como la composición en productos de degradación, para ello se tomó una alícuota tras el pretratamiento y se determinó la cantidad de azúcares monoméricos presentes mediante HPLC. Por otro lado, se llevó a cabo una hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% (v/v) a 121 °C durante 30 minutos para determinar la concentración de azúcares totales. Se entiende que la cantidad de azúcares en forma oligomérica corresponde a la diferencia entre la concentración total y monomérica.

Además, en el líquido se determinó el contenido en grupos acetilos (por HPLC) y la lignina soluble en ácido, mediante espectrometría de UV a 205 nm.

En el residuo sólido obtenido después de realizar la hidrólisis total se determinan las cenizas ácido insoluble y la lignina ácido insoluble por calcinación y gravimetría respectivamente.

### ***3.9.2. Métodos analíticos***

#### ***3.9.2.1. Determinación de los azúcares monoméricos***

Los monosacáridos (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución en un HPLC modelo 2695 de Waters, (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.) equipado con un detector de índice de refracción (Waters 2414). Se utilizó la columna cromatográfica CARBO Sep CHO 782 Pb (Transgenomic, Nebraska, EE.UU.) protegida por una pre-columna CARBO Sep CHO 782. La fase móvil fue agua ultrapura desgasificada (Millipore Massachusetts, EE.UU.) a un flujo de 0,5 mL/min y una temperatura de columna de 70 °C.

La determinación total de oligosacáridos en la fracción líquida se realizó por diferencia entre las concentraciones de azúcares totales y monoméricos.

### **3.9.2.2. Determinación de compuestos de degradación**

Durante el pretratamiento de explosión con vapor, se producen compuestos de degradación de azúcares como son: furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y compuestos fenólicos liberados a partir de la lignina como 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, ácido *p*-cumárico o ácido ferúlico, así como la liberación de ácido acético.

Estos compuestos fueron determinados por cromatografía líquida. Para ello se utilizó un HPLC serie 1200 de Agilent (Agilent Technologies California, EE.UU.) acoplado a un detector 1050 Photodiode-Array. Este detector permite hacer un barrido total de longitudes de onda obteniéndose el espectro de absorción UV completo para cada pico cromatográfico y así realizar el análisis cuantitativo de cada compuesto a la longitud de onda de máxima absorción. La separación se llevó a cabo en una columna analítica ICsep COREGEL-87H3 (Transgenomic, Nebraska, EE.UU.) protegida con una pre-columna ICsep COREGEL-87H3. La fase móvil en modo isocrático está formada por 89% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M) y 11% de acetonitrilo a un caudal de 0,7 mL/min y la columna se mantuvo a 65°C.

El ácido acético procedente de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa liberados durante el pretratamiento y el ácido fórmico producto de degradación de furfural y HMF se determinaron por HPLC de Waters Alliance (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.) equipado con una bomba Waters 600 (Multisolvent Delivery System), un Autosampler Waters 2707 y un detector de índice de refracción (Waters 2414) (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.). Se ha utilizado la columna ICsep COREGEL-87H3 (Transgenomic, Nebraska, EE.UU.) a la temperatura de 65 °C y fase móvil de ácido sulfúrico 0,005 M a un flujo de 0,6 mL/min.

### **3.9.2.3. Determinación de la concentración de etanol**

La concentración de etanol se determinó utilizando un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 (Agilent Technology, Alemania) que usa helio como gas portador a un flujo de 30 mL/min. Este equipo está formado por un inyector automático Agilent serie 6890 (Temperatura, 150 °C) y un detector de ionización de llama FID (Temperatura, 150 °C). La columna utilizada fue Carbowax 20M a una temperatura de trabajo de 85 °C.

### ***3.10. Análisis estructural de los xilooligosacáridos***

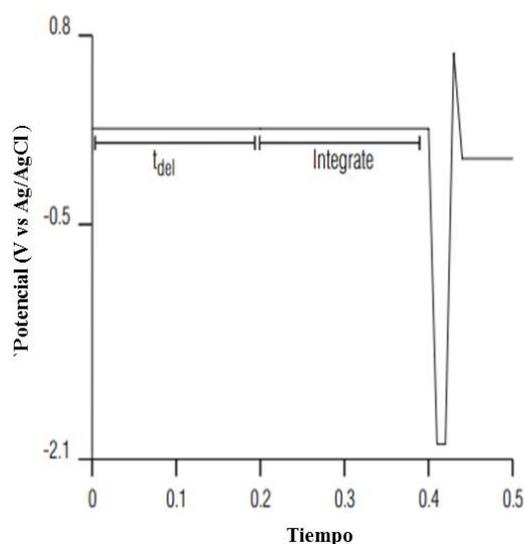
Tanto la composición como la estructura de los carbohidratos pueden influir en las propiedades biológicas de ellos, por lo que se requiere realizar una caracterización detallada. Para llevar a cabo una completa caracterización, es necesario emplear una batería de técnicas analíticas, que se describen a continuación.

#### ***3.10.1. Determinación de los oligosacáridos***

Los oligosacáridos producidos durante el pretratamiento y a lo largo de los ensayos de hidrólisis enzimáticas, se analizaron mediante cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico (HPAEC), utilizando un sistema ICS2500 Dionex (Dionex Corporation, California, EE.UU.) con un detector amperométrico de pulsos (detector electroquímico ED50) (PAD) con un electrodo de oro. El análisis XOS se realizó utilizando una columna analítica Dionex CarboPac PA100 y una columna de protección PA100 a 30 °C. La separación cromatográfica de los oligosacáridos se llevo a cabo utilizando un flujo de 0,6 mL/min en un gradiente lineal iniciado en 99% de A (NaOH 0,1 M) y 1% B (NaOAc 0,5 M/NaOH 0,1 M) hasta alcanzar la composición de 70% A-30% B en el minuto 35. Posteriormente, el método presenta 5 minutos de reequilibrado para recuperar las condiciones iniciales del análisis (99% A-1% B).

Esta técnica de HPAEC/PAD es apropiada para la detección de carbohidratos ya que estos compuestos son ácidos muy débiles que a pH muy básicos sus grupos hidroxilos son ionizables. El sistema de detección está basado en la oxidación de los grupos hidroxilos sobre un electrodo oro, bajo la aplicación de un potencial positivo (Corradini y col., 2013). En la figura 3.8 se representa un esquema de los denominados “pulsos” utilizados para la detección.

En primer lugar, se aplica un potencial de detección de 0,1 V para oxidar al analito, manteniéndose durante 400 ms. A continuación, se aplica un potencial con un valor de -2.0 V para oxidar al electrodo de trabajo (oro), produciendo la desorción de los productos de oxidación de los carbohidratos durante 10 ms, seguido de un cambio rápido de potencial (0.6V) para poder reducir el óxido de oro formado en la superficie y que esté quede preparado para el siguiente análisis.



**Figura 3.8.** Secuencia de los diferentes pulsos para la detección de carbohidratos

Para la cuantificación de los xilooligosacáridos con DP2-DP6 se aplicó un factor de corrección para poder expresar el resultado en g/L de xilosa potencial. Este factor de corrección es diferente para cada compuesto, tomando los siguientes valores  $X_2 = 1,06$ ;  $X_3 = 1,07$ ;  $X_4 = 1,09$ ;  $X_5 = 1,11$  y  $X_6 = 1,11$ .

### **3.10.2. Análisis de distribución molecular**

La distribución de oligosacáridos de diferentes pesos moleculares, contenidos tanto en la fracción líquida de paja de cebada pretratada como en los ensayos de hidrólisis realizados, se analizaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando un equipo de HPLC de Waters Alliance (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.) equipado con una bomba Waters 600 (Multisolvent Delivery System), Autosampler Waters 717 plus como inyector automático y un detector de índice de refracción (Waters 2414). Para ello se dispuso de tres columnas conectadas en serie con distinto tamaño de corte como puede observarse en la figura 3.9. La disposición de las columnas fue en primer lugar, la columna KS-802 Shodex (Showa Denko, K.K., Japón) con un tamaño de corte de 10 kDa, la segunda es una columna Ultrahydrogel 120 Waters (Waters Corporation, Massachusetts, EE.UU.) con un límite de 5 kDa y la tercera una columna TSK G-Oligo-PW Tosoh Bioscience LLC (Tosoh Bioscience GMBH, Stuttgart, Alemania) con un límite de 3 kDa.



**Figura 3.9.** Equipo de HPLC con las columnas de HPSEC colocadas en serie

Para el análisis cromatográfico se utilizó agua MilliQ (Millipore Massachusetts, EE.UU.) como fase móvil a 0,5 mL/min, las columnas se mantuvieron a 60 °C. La estimación de la distribución de pesos moleculares se hizo utilizando diversos estándares con diferente rango de peso molecular como fueron, xilooligosacáridos desde xilobiosa ( $X_2$ ) a xilohexosa ( $X_6$ ) (Megazyme, Bray, Irlanda), maltooligosacáridos desde DP2 hasta DP7, pullulanos y dextranos (ambos Merck, Darmstadt, Alemania). Los pullulanos, son polímeros lineales de  $\alpha$ -(1-6)-unidades de maltotriosa, con pesos moleculares comprendidos entre 340 y 6000 Da. En cambio, los dextranos son polisacáridos con un peso molecular superior a 1 kDa, formado por un esqueleto de cadenas de glucopiranosil con enlace  $\alpha$ -D-(1-6). Este esqueleto puede presentar ramificaciones de glucosa en los enlaces  $\alpha$ -(1-2),  $\alpha$ -(1-3) o  $\alpha$ -(1-4). Los dextranos utilizados fueron de 12; 5 y 1 kDa.

### ***3.10.3. Espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser inducida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS)***

El análisis MALDI-TOF-MS de los xilooligosacáridos se realizó utilizando un equipo Ultraflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) acoplado con un láser de nitrógeno ( $\lambda = 337$  nm). Después de un tiempo de extracción retardado de 150 ns, los iones se aceleraron a una energía cinética de voltajes de 25 kV. Los espectros se adquirieron en más de 100 disparos de láser utilizando la energía más baja necesaria para obtener suficiente intensidad espectral. Los

análisis de las muestras se llevaron a cabo en el modo de refractor positivo en un rango de masa de 500-2200 m/z utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz.

El espectrómetro fue calibrado utilizando estándares de xilooligosacáridos con diferentes grados de polimerización (DP2-DP6) (Megazyme, Bray, Irlanda).

#### ***3.10.4. Espectroscopia de Infrarrojos de Transformada de Fourier (FTIR)***

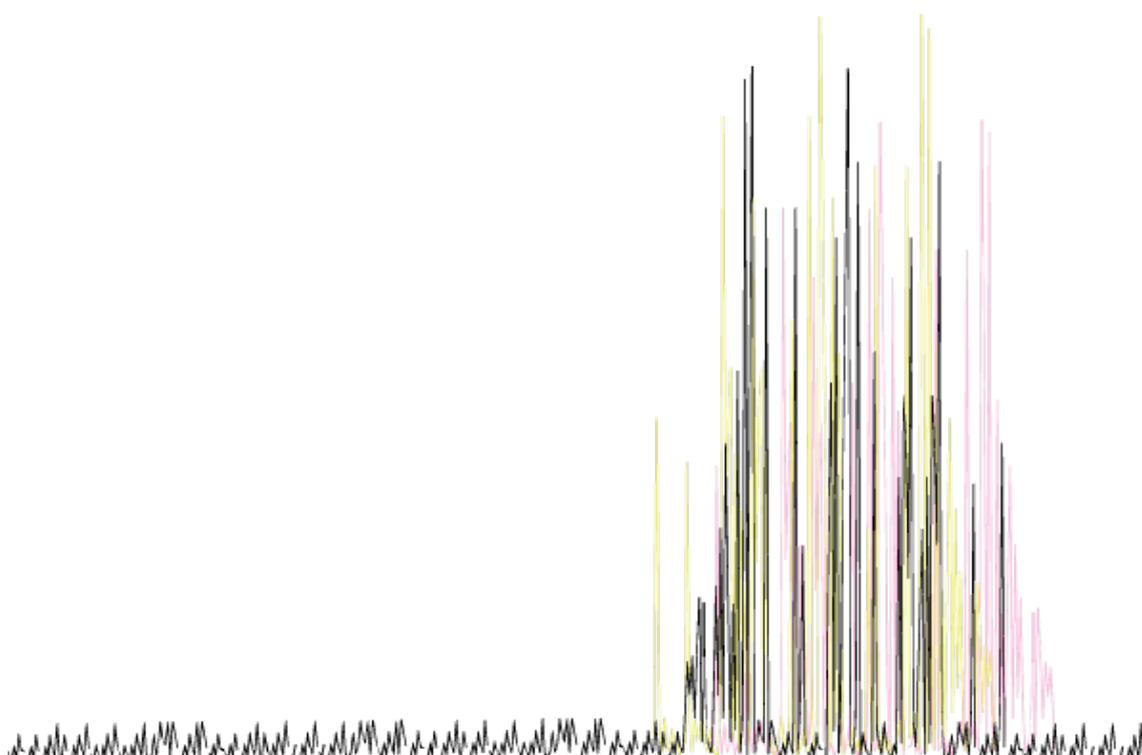
La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (conocida por sus siglas en inglés FTIR) es una técnica ampliamente usada para la identificación de grupos funcionales especialmente en compuestos orgánicos. La asignación de bandas de espectro se llevó a cabo de acuerdo con la bibliografía (Adapa y col., 2011; Sun y col., 2011; Peng y col., 2012; Dávila y col., 2019).

La caracterización espectroscópica de las muestras de xilooligosacáridos se analizó mediante FTIR utilizando un espectrómetro modelo Spectrum Two FT-IR (Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.). El espectrómetro FTIR opera en un rango espectral de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y una acumulación de 8 escanes.

#### ***3.11. Análisis estadístico***

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre las muestras correspondientes al crecimiento de poblaciones bacterianas y el contenido en AGCC utilizando el programa Statgraphic Centurion XVII.I-X64 para Windows. Para esta estadística se tuvo en cuenta un tratamiento *post hoc* para el análisis multifactorial con una diferencia mínima significativa (LSD) del 95%

## 4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN





#### 4.1. *Materia prima*

La materia prima utilizada en este trabajo ha sido la paja de cebada, residuo muy abundante en España y en Europa, cuya caracterización se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3.9.1 (pág. 104). La composición química en componentes lignocelulósicos de la paja de cebada utilizada en este trabajo, expresado en porcentaje (referido a materia seca), está compuesta mayoritariamente por celulosa con un  $32,9 \pm 1,2$ ; seguido de hemicelulosa con un  $27,2 \pm 0,47$ ; lignina: ácido insoluble  $16,8 \pm 1,1$  y ácido soluble  $2,1 \pm 0,03$ .

Aunque existen pequeñas variaciones debidas a diversos factores como la variedad de cebada, composición del suelo, clima o tipo y cantidad de fertilizantes utilizados (Brosse y col., 2012), estos resultados están el rango de los determinados por otros autores, 32-40% en celulosa, 21-27% en hemicelulosa y 15-22% en lignina (García-Aparicio y col., 2006; Pronyk y Mazza, 2012; Sáez y col., 2013; Duque y col., 2014 a y b; Iroba y col., 2014; Lara-Serrano y col., 2018;).

Además de estos componentes mayoritarios la biomasa lignocelulósica de paja de cebada tiene en su composición; cenizas  $3,9 \pm 0,05\%$ ; grupos acetilos,  $1,7 \pm 0,02\%$  y extractos,  $13,4 \pm 0,5\%$ .

La hemicelulosa de la paja de cebada está compuesta fundamentalmente por xilano  $22,1 \pm 0,5\%$ , y en menor medida por arabinanos  $3,6 \pm 0,03\%$ ; galactanos  $1,3 \pm 0,01\%$  y mananos  $0,3 \pm 0,03\%$ .

La cadena de xilano está constituido por un esqueleto principal formado por  $\beta$ -D-xilanopiranosil unidades enlazadas mediante enlace  $\beta$ -(1,4). A su vez, esta cadena principal presenta ramificaciones con otros grupos como pueden ser monosacáridos o grupos ácidos glucurónicos. Estos sustituyentes monoméricos pueden formar enlaces éster con intermediarios de la lignina, como los ácidos *p*-cumárico y ferúlico (Sun R.C. y col., 1998).

De acuerdo con los resultados de la composición de paja de cebada, cerca del 60% de los compuestos estructurales de la paja de cebada corresponde a carbohidratos, que pueden

ser utilizables para obtener biocombustibles, como el etanol, y bioproductos, tales como los xilooligosacáridos, haciendo de este material un sustrato apropiado para ser utilizado en las biorrefinerías.

#### ***4.2. Evaluación del pretratamiento EV***

La primera etapa necesaria para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica en el proceso de obtención de sus carbohidratos para su transformación a bioproductos es el pretratamiento. En este trabajo se ha seleccionado el pretratamiento de explosión por vapor (PEV) para tratar la paja de cebada con el fin de y obtener un material con los carbohidratos más accesibles a la acción de las enzimas. Durante este pretratamiento, la biomasa lignocelulósica se somete a elevada presión y temperatura en presencia de vapor saturado, produciéndose la liberación de los grupos acetilos que forman parte de la hemicelulosa y que dan lugar a la formación del ácido acético, con lo que disminuye el pH produciéndose una autohidrólisis ácida, que afecta a los enlaces glicosídicos de las hemicelulosas y a los enlaces éster con la lignina. Como consecuencia de ello, además de la solubilización de la hemicelulosa, se produce una redistribución y solubilización parcial de la lignina. El resultado final de este tipo de pretratamiento es la alteración del empaquetamiento microfibrilar dentro de la pared celular y la rotura de las fibras que provocan un aumento de la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas a la celulosa.

En el presente trabajo el pretratamiento se llevó a cabo a 180 °C en la Unidad piloto (reactor 10 L) de las instalaciones del CIEMAT, utilizando un rango de tiempo de residencia entre 15-35 min.

Tras el pretratamiento se obtiene un material pretratado (“slurry”), que mediante filtración a vacío se separa en una fracción sólida denominada residuo sólido insoluble (RSI) y una fracción líquida. El RSI está compuesto fundamentalmente de celulosa y lignina acompañado de la fracción de hemicelulosa no solubilizada durante el pretratamiento. La fracción sólida, una vez seleccionadas las condiciones de pretratamiento, se utilizó para la realización de los ensayos de producción de etanol.

La fracción líquida es donde queda recogida la hemicelulosa soluble. La hemicelulosa soluble está formada por azúcares con diferente grado de polimerización. La fracción líquida de paja de cebada pretratada fue la materia de partida para la obtención de los xilooligosacáridos.

El criterio de selección para determinar las condiciones óptimas de pretratamiento en esta Tesis ha sido recuperar la mayor cantidad posible de celulosa en la fracción sólida y de hemicelulosa soluble en la fracción líquida.

En el pretratamiento de explosión por vapor, una mayor severidad de las condiciones de operación provoca una mayor solubilización de la hemicelulosa y mejora la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Sin embargo, si estas condiciones son más extremas, pueden provocar la formación de productos de degradación de los azúcares, lo que supondría una pérdida de los carbohidratos utilizables para la formación de los productos deseados. En la tabla 4.1 se recoge la composición de la paja de cebada pretratada en las distintas condiciones. En todas las condiciones de PEV ensayadas se produjo una solubilización parcial de la fracción de hemicelulosa, por lo que, si se compara con la composición de la materia prima, aumentó la proporción de celulosa y lignina en el RSI. El contenido inicial en celulosa en la paja de cebada fue del 32,9%, mientras que el RSI el contenido varió entre 48,2 y 63,1%, incrementándose con el aumento del tiempo de residencia durante el pretratamiento. El contenido en lignina ácido insoluble en el RSI varió entre 25,6 y el 32,1%.

La fracción líquida resultante de pretratar la paja de cebada contiene fundamentalmente los azúcares derivados de la fracción de hemicelulosa, estando éstos mayoritariamente en forma oligomérica. Además de los azúcares solubles, se ha detectado la presencia de ácido acético y ácido fórmico. El ácido acético se genera a partir de la hidrólisis de los grupos acetilos presentes en la fracción de hemicelulosa de la paja de cebada. Además de ácidos se ha detectado la presencia de furanos (furfural e HMF), estos compuestos proceden de la degradación de azúcares pentosas y hexosas respectivamente. El furfural y el HMF pueden continuar degradándose y producir ácido fórmico, que se encontró en una concentración (expresado como g/100 g de materia prima) en un rango entre 0,3 y 0,6. Asimismo, aunque no se muestran los resultados en la tabla 4.1, se detectaron en la fracción

líquida pequeñas cantidades de productos de degradación derivados de la lignina (vainillina, ácido cumárico y siringaldehído) en cantidades inferiores a 0,03 g/100 g paja de cebada.

**Tabla 4.1.** Composición de la paja de cebada pretratada mediante explosión por vapor

	Condiciones pretratamiento							
	180 °C-15 min	180 °C-25 min	180 °C-30 min	180 °C-35 min				
RSI (g/100 g paja cebada pretratada)								
Glucano (Celulosa)	48,2 ± 0,8	51,4 ± 0,4	54,9 ± 1,4	63,1 ± 0,8				
Hemicelulosa	18,5 ± 0,3	11,6 ± 0,2	10,0 ± 0,8	9,1 ± 0,1				
Xilano	16,7 ± 0,4	10,5 ± 0,1	9,2 ± 0,5	8,5 ± 0,1				
Arabinano	1,1 ± 0,03	0,5 ± 0,01	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0				
Galactano	0,4 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,4	0,1 ± 0,0				
Manano	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,2				
Lignina ácido insoluble	25,6 ± 0,3	30,3 ± 1,0	30,2 ± 0,7	32,1 ± 0,7				
Fracción líquida (g/100 g paja cebada pretratada)								
	180 °C-15 min	180 °C-25 min	180 °C-30 min	180 °C-35 min				
Azúcares								
	Forma Monomérica	Forma Oligomérica	Forma Monomérica	Forma Oligomérica	Forma Monomérica	Forma Oligomérica	Forma Monomérica	Forma Oligomérica
Glucosa	0,1	2,8	0,2	3,2	0,5	3,0	0,5	3,5
Xilosa	0,2	9,7	0,8	13,2	1,6	13,2	1,8	13,6
Arabinosa	0,9	0	0,9	1,1	1,1	0,8	1,1	0,7
Galactosa	0,05	1,0	0,1	1,2	0,3	0,9	0,3	1,1
Manosa	-	2,0	-	0,2	0,03	0,2	0,04	0,3
Productos de degradación								
	180 °C-15 min	180 °C-25 min	180 °C-30 min	180 °C-35 min				
Furfural	0,09	0,3	0,3	0,6				
HMF	0,02	0,04	0,2	0,08				
Ácido acético	0,6	0,9	1,0	1,2				
Ácido fórmico	0,3	0,4	0,5	0,6				

En la tabla 4.2 se recogen los resultados de recuperación de celulosa y hemicelulosa (expresada como la suma de xilano, galactano, manano y arabinano) en las diversas condiciones de pretratamiento realizadas, tanto en la fracción sólida como la líquida. En ella se observa, como a tiempos cortos (15 min) de pretratamiento, la recuperación de hemicelulosa en la fracción líquida es baja (45,4 %). En cambio, a tiempos más largos, se consiguen mayores porcentajes de recuperación en la fracción líquida, hecho que se justifica por el efecto del tiempo de residencia en la acción hidrolítica conjunta del agua y de los ácidos orgánicos formados durante el pretratamiento, solubilizándose mayor cantidad de hemicelulosa, logrando recuperaciones cercanas al 60%.

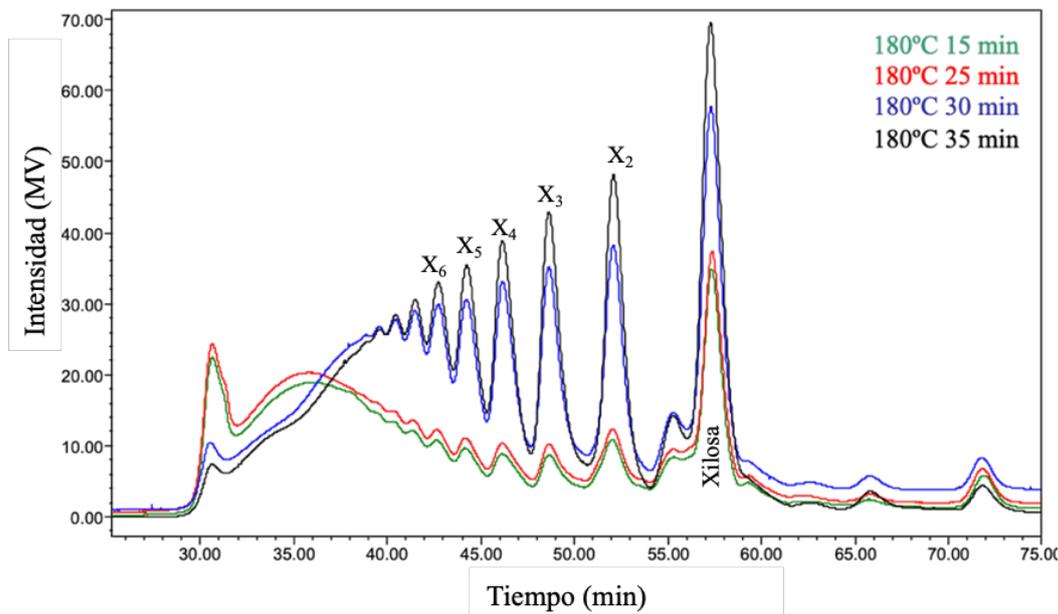
**Tabla 4.2.** Recuperación de hemicelulosa y celulosa en las distintas condiciones de pretratamiento

	Recuperación de hemicelulosa (%)				Recuperación de celulosa (%)			
	15 min	25 min	30 min	35 min	15 min	25 min	30 min	35 min
<b>Sólido</b>	42,1	23,3	19,5	16,7	89,9	84,7	89,4	86,1
<b>Líquido</b>	45,4	57,4	59,6	61,6	7,7	9,2	9,4	10,8
<b>Total</b>	87,5	80,7	79,1	78,4	97,8	93,9	98,8	96,9

En la figura 4.1 se muestran los cromatogramas de las fracciones líquidas obtenidos en las diferentes condiciones de pretratamiento analizadas por cromatografía de exclusión molecular HPSEC. En ella se aprecia como a 180 °C y tiempos menores de pretratamiento (15 y 25 min) la despolimerización es menor, por lo que el pretratamiento ha formado menor cantidad de XOS (DP2-DP6) que a tiempos más largos (30 y 35 min). Por este motivo descartamos estas dos condiciones de pretratamiento. De entre las condiciones con un tiempo de residencia más largo (30 y 35 min), se seleccionan las de 30 min ya que se produce menor concentración de xilosa monomérica.

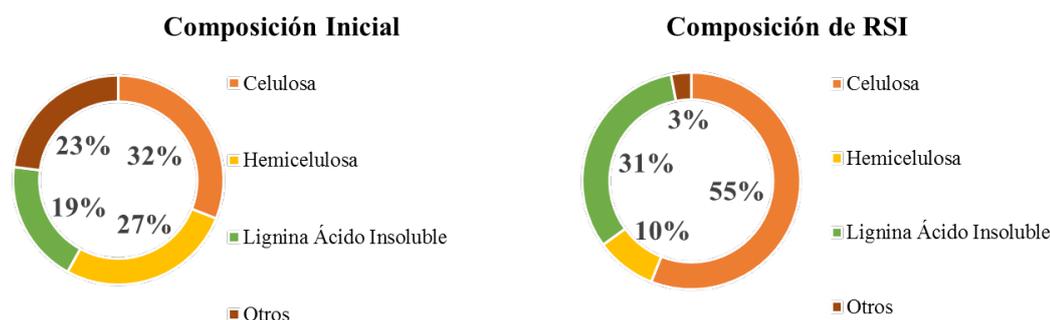
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las condiciones de pretratamiento seleccionadas para llevar a cabo la experimentación de esta Tesis han sido de 180 °C y 30 min para la paja de cebada. Estas condiciones representan un compromiso para la

recuperación de la mayor cantidad posible de celulosa en la fracción sólida (89,4%) y hemicelulosa soluble en la fracción líquida (59,6%).



**Figura 4.1.** Cromatogramas HPSEC de las diferentes fracciones líquidas tras ser sometidas a las distintas condiciones de pretratamiento de explosión por vapor.

Una vez seleccionadas las condiciones de operación (180°C y 30 min) se procedió nuevamente al pretratamiento y determinación de la composición de las fracciones sólida (RSI) y de la fracción líquida (FL), con el fin de generar material suficiente para su utilización en el presente trabajo. A modo de comparación, en la figura 4.2., se muestra la composición de la materia prima y del RSI obtenido tras el PEV. El análisis de RSI muestra que el contenido en celulosa (54,9%) y lignina (30,2%) fueron superiores al de la paja sin tratar. Este efecto está relacionado con la solubilización parcial de la fracción de hemicelulosa y de los extractivos contenidos en la paja de cebada. Los valores en composición en celulosa y hemicelulosa encontrados en el RSI fueron similares a los encontrados en la bibliografía al someter a la paja de cebada a un pretratamiento por explosión por vapor a 190 °C durante 10 minutos (García-Aparicio y col., 2007).



**Figura 4.2.** Composición de la materia prima y del RSI obtenido en el pretratamiento a 180 °C durante 30 minutos expresado en porcentaje en peso seco

En términos de rendimientos de recuperación del glucano (celulosa) en las fracciones sólida y líquida representan el 89,4% y el 9,4%, respectivamente. Mientras que los rendimientos de recuperación de xilano (componente principal de esta hemicelulosa) fueron 21,9% en RSI y 60,2% en la fracción líquida.

En la tabla 4.3 se muestran los resultados del análisis de composición de la fracción líquida obtenida durante el pretratamiento con EV de la paja de cebada a 180 °C y 30 min. Los oligosacáridos detectados se cuantificaron como la diferencia entre los azúcares medidos antes y después de una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 4% (p/p) durante 30 min a 120 °C. Los azúcares determinados se encontraban principalmente en forma oligomérica.

Los monosacáridos en la fracción líquida equivalen a un 17,6% de la concentración total de azúcares, siendo la xilosa el monosacárido mayoritario (45,6%). La proporción de monosacáridos en el prehidrolizado varió en función del tipo de azúcar, así la galactosa y la manosa se detectaron en una proporción del 8,8% y 1,1% respectivamente. La glucosa monomérica medida fue del 12,7%, proveniente tanto de la hemicelulosa como de cierta cantidad de almidón, como consecuencia de una contaminación de grano en la paja fundamentalmente. Los azúcares monoméricos más abundantes fueron, arabinosa y xilosa en una relación A/X de 0,7. Teniendo en cuenta que la relación de A/X en la materia prima fue 0,2, vemos que durante el pretratamiento se produjo una apreciable liberación de arabinosa.

**Tabla 4.3.** Composición del prehidrolizado de paja de cebada

FIPCP	Forma monomérica g/L	Forma oligomérica g/L
Glucosa	0,8 ± 0,06	5,2 ± 0,06
Xilosa	3,1 ± 0,17	25,3 ± 0,17
Galactosa	0,6 ± 0,13	1,6 ± 0,04
Arabinosa	2,1 ± 0,03	1,2 ± 0,13
Manosa	0,07 ± 0,00	0,4 ± 0,01

Productos de degradación g/L		Compuestos fenólicos mg/L	
Ácido Fórmico	0,8 ± 0,45	Vainillina	40 ± 3
Ácido Acético	1,7 ± 0,21	Siringaldehído	13,5 ± 0,7
Furfural	1,0 ± 0,001	Ácido <i>p</i> -Cumárico	30 ± 2
HMF	0,1 ± 0,009	Ácido Ferúlico	34,5 ± 0,7
		4-Hidroxibenzaldehído	≤ Límite cuantificación

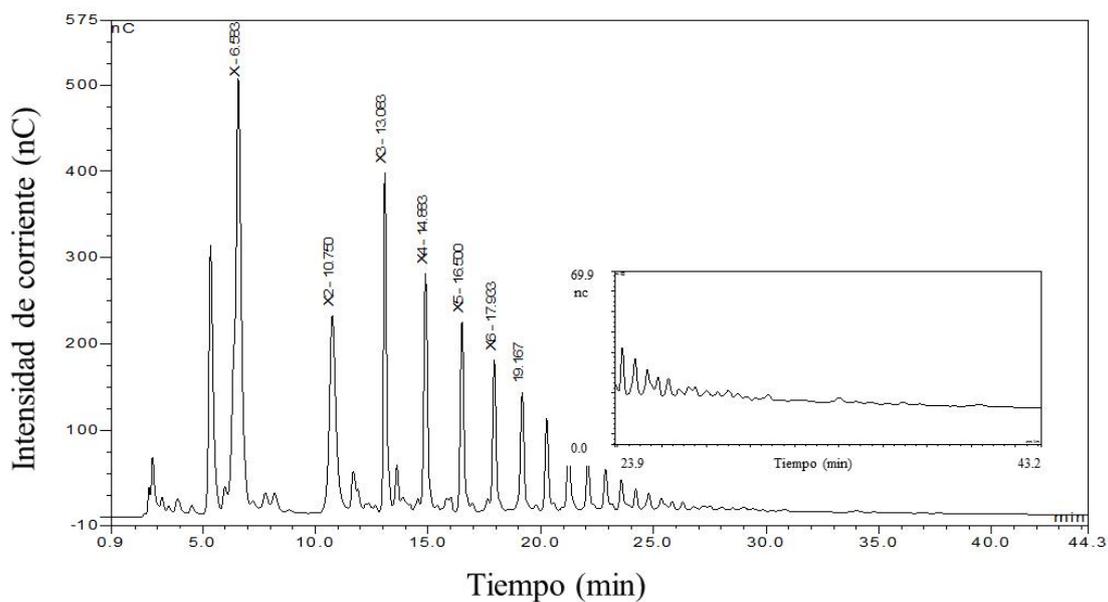
Durante el pretratamiento además de solubilizarse los azúcares, también se liberaron grupos acetilos procedentes de la hemicelulosa en forma de ácido acético (1,7 g/L) y una pequeña concentración de compuestos derivados de la lignina como vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (40,5 mg/L) procedente de la liberación de las unidades guayacilpropano o el ácido ferúlico (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil-2-enoico), compuesto que forma parte del grupo de los ácidos hidroxicinámicos con una concentración de 34,5 mg/L.

Compuestos como furfural (1,0 g/L) e HMF (0,1 g/L) fueron también cuantificados, como ya se ha comentado anteriormente, estos compuestos proceden de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y de las hexosas (glucosa, galactosa y manosa), respectivamente. También se detectó ácido fórmico (0,8 g/L), producto generado como consecuencia de la degradación de los furanos.

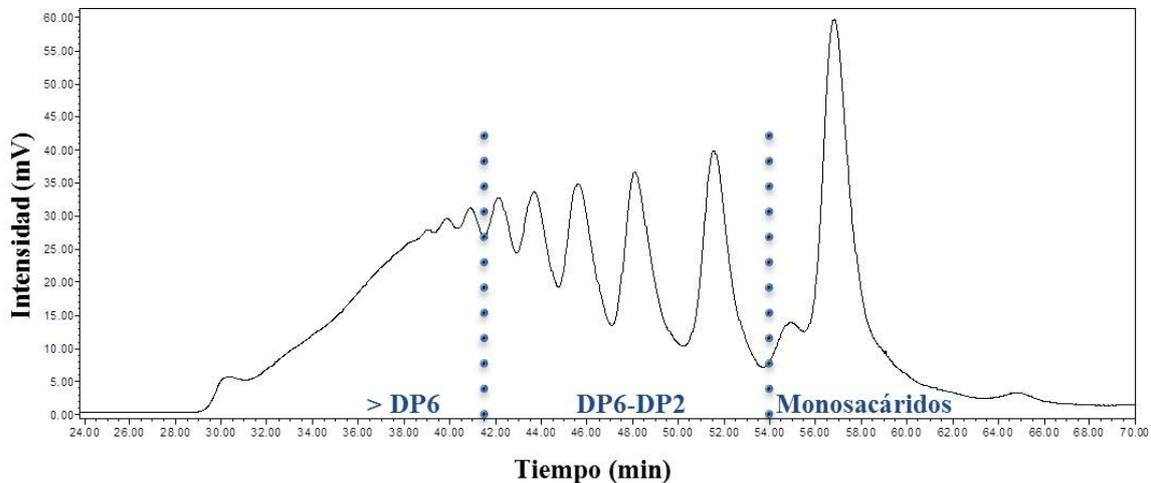
El análisis de la composición del prehidrolizado mostró un contenido en oligosacáridos del 82,4% apreciándose una amplia distribución de xilooligosacáridos. El prehidrolizado fue analizado mediante la técnica cromatográfica HPAEC-PAD. El cromatograma (Fig. 4.3) muestra una amplia distribución de azúcares desde monosacáridos al comienzo de la elución hasta oligosacáridos en el 32 min de elución (aumentando gradualmente de tamaño), a partir del cual se aprecian pequeñas concentraciones de oligómeros de alto grado de polimerización (zona ampliada en la figura 4.3).

La cuantificación de los xilooligosacáridos liberados durante el PEV se llevó a cabo utilizando una calibración externa con estándares comerciales ( $X_2$ - $X_6$ ). Las concentraciones medidas fueron  $X_2$  (2,8 g/L),  $X_3$  (2,5 g/L),  $X_4$  (2,8 g/L),  $X_5$  (2,7 g/L) y  $X_6$  (2,4 g/L). Aplicando el factor de corrección (para expresarlo como xilosa) se obtiene un valor de XOS DP2-DP6 de 14,4 g/L. A parte de la serie de XOS mostrados en la figura 4.3, se detectaron picos no identificados de baja intensidad.

La cromatografía de exclusión molecular (SEC) fue utilizada con el fin de estimar la distribución de XOS presentes en la fracción líquida. Para ello, se empleó un sistema de tres columnas conectadas en serie con distinto tamaño de corte. El perfil cromatográfico obtenido mostró la existencia de un 40% de oligosacáridos entre DP2-DP6, un 37% de oligómeros de peso molecular superior a DP6 y el resto está formado por monosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular producidos durante el pretratamiento (Fig. 4.4).



**Figura 4.3.** Cromatograma de HPAEC-PAD de los xilooligómeros obtenidos en la fracción líquida de paja de cebada tratada por explosión de vapor a 180 °C durante 30 min

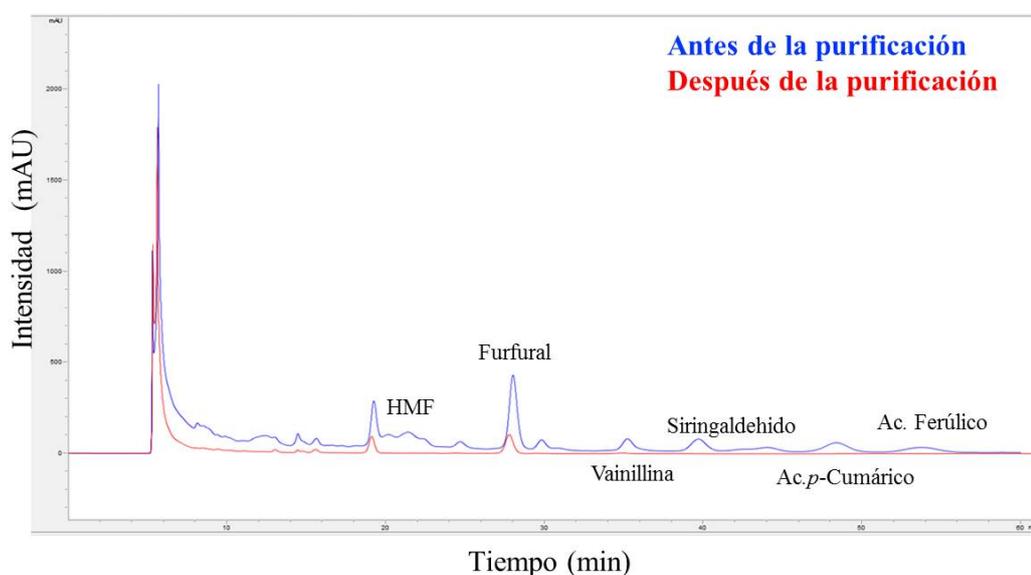


**Figura 4.4.** Perfil cromatográfico de HPSEC de la fracción líquida de paja de cebada pretratada con EV a 180 °C 30 min

La FL obtenida tras el pretratamiento presenta una concentración de OS de 31,7 g/L, de los cuales 25,3 g/L son XOS<sup>1</sup>. Estos valores referidos a materia prima equivalen a 17,5 g OS/100 g paja de cebada y a 13,9 g XOS/100 g paja de cebada. En concreto, la cantidad de xilooligosacáridos con DP2-DP6 es de 7,9 g/100 g paja cebada.

#### 4.3. Purificación previa de la fracción soluble obtenida en el pretratamiento de EV

La fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor tal y como se ha comentado en el apartado anterior, presenta en su composición compuestos procedentes de la degradación de azúcares y lignina, que pueden resultar tóxicos o inhibidores en etapas posteriores de transformación (ver tabla 4.3). Por este motivo, se procedió a someter la muestra a una etapa de purificación previa a su utilización como sustrato en la hidrólisis enzimática para la obtención de XOS.



**Figura 4.5.** Cromatogramas HPLC/UV de la fracción líquida obtenida tras el PEV antes y después del tratamiento con la resina

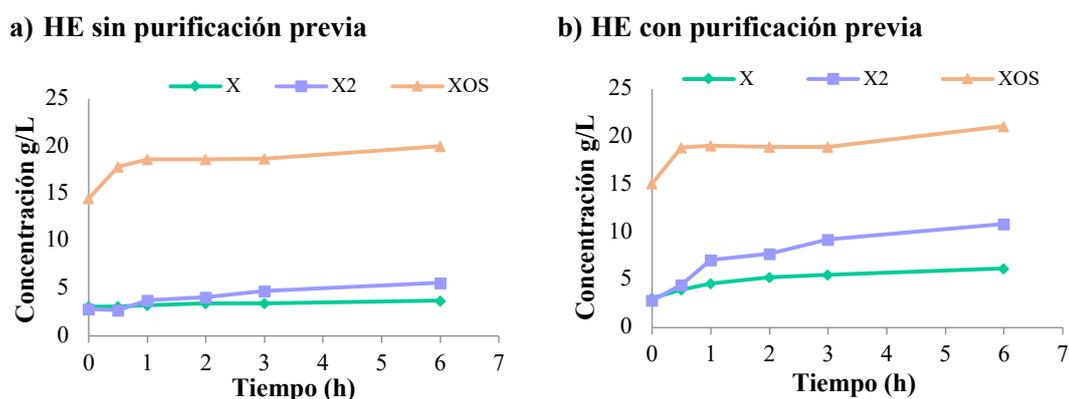
La purificación se realizó utilizando una resina de intercambio iónico de lecho mixto, logrando reducir totalmente el contenido en ácidos carboxílicos, mientras que los furanos (HMF y furfural) se redujeron en torno al 75%. En la figura 4.5 se muestra los

<sup>1</sup> Determinado como monómero

cromatogramas HPLC/UV de la fracción líquida obtenida tras el PEV antes y después del tratamiento con resina. Los compuestos fenólicos liberados en el pretratamiento también fueron retenidos en la resina, sin embargo, aquellos compuestos fenólicos unidos a la cadena de xilano no se vieron retenidos. Con este tipo de resinas se consigue principalmente la eliminación de compuestos fenólicos, debido a la formación de fuertes enlaces entre los grupos amonio cuaternario de la resina (cargados positivamente) y los fenoles (cargados negativamente). También se ve afectada la concentración de los furanos, debido en este caso a las interacciones hidrofóbicas (Oliva, 2003). El empleo de resinas de intercambio iónico es un método muy eficaz en la eliminación de compuestos que no pertenecen a los carbohidratos. No obstante, presenta como desventaja el elevado coste (Wang Z. y col., 2015).

Para comprobar la eficacia de etapa de purificación y como la presencia de estos compuestos de degradación (furanos, ácidos alifáticos de cadena corta y fenoles) afecta a la producción de XOS, se llevó a cabo el estudio utilizando la enzima *XlnJa*, que es endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, perteneciente a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10). Para ello se realizaron dos ensayos de HE de prehidrolizado simultáneamente con y sin la etapa de purificación. En la figura 4.6, se muestran las cinéticas de producción de xilosa, xilobiosa y XOS (DP2 a DP6).

En ausencia de etapa de purificación, la xilobiosa alcanzó una concentración final de 5,6 g/L y de XOS 20 g/L (Fig.4.6a). Cuando la HE se llevó a cabo utilizando una etapa previa de purificación, se apreció un aumento considerable en la concentración de xilobiosa (8,0 g/L) y XOS (21,1 g/L), después de 6 horas de hidrólisis. La utilización de una etapa de purificación permite incrementar la producción de xilobiosa en 1,9 veces frente a la no utilización de etapa de purificación previo al proceso de HE, favoreciendo la eliminación de productos potencialmente inhibitorios. La utilización de la etapa de purificación permite, además, incrementar en un 20% la producción de XOS. La mejora observada se asocia a la eliminación de compuestos fenólicos durante la etapa de purificación. Se ha descrito en la bibliografía la inhibición de las endoxilanasas por la presencia de compuestos fenólicos (Boukari y col., 2011; Duarte y col., 2012; Moreira y col., 2013).



**Figura 4.6.** Efecto de la etapa de purificación previa de la fracción líquida en la hidrólisis enzimática: (a) HE sin purificación previa y (b) HE con etapa de purificación

A la vista de los datos obtenidos, se seleccionó esta etapa de purificación para los ensayos posteriores, y la fracción líquida resultante después de esta etapa, que denominamos FIPCP (fracción líquida de paja de cebada pretratada), es el sustrato con el que se trabajará a lo largo de este trabajo.

#### 4.4. Producción de XOS vía enzimática

Para evaluar la producción de xilooligosacáridos de bajo grado de polimerización a partir de la FIPCP se ha utilizado la estrategia de someter este material a una serie de ensayos de hidrólisis enzimática utilizando enzimas endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas pertenecientes a distintas familias, tanto de forma individual como en combinación con otras enzimas accesorias. Como hemos comentado anteriormente, la estructura recalcitrante y compleja de la biomasa lignocelulosa es el principal obstáculo para lograr un proceso de bioconversión enzimática eficiente y económicamente rentable (Li y col., 2016).

##### 4.4.1. Hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas pertenecientes a las familias GH10

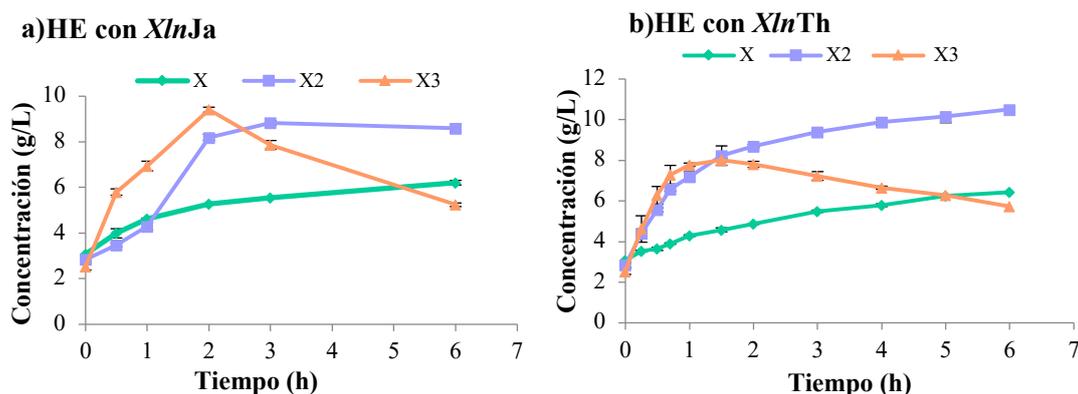
Las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas utilizadas para la obtención de XOS de bajo grado de polimerización fueron las que pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas 10 denominadas *XlnJa* y *XlnTh*.

Las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH10 son capaces de romper los enlaces glicosídicos de la cadena principal de xilano hacia el extremo reductor de una sustitución simple o doble de la xilosa cercanos a puntos de ramificación (Motta y col., 2013). Para poder ser activa, la enzima requiere un espacio de al menos dos residuos de xilopiranosil no sustituidos. Por este motivo, pueden actuar en un amplio rango de sustratos.

Los ensayos de hidrólisis se llevaron a cabo a una temperatura de 50 °C, utilizando un tampón citrato 0,05 M y pH 4,5. Se realizó el muestreo del proceso a diferentes tiempos 0, 0,5; 1; 2; 3 y 6 h. Las dosis de enzima añadidas fueron 1,5 U/mL de FIPCP en la HE con *XlnJa* y 5,6 U/ mL en la HE con *XlnTh*.

La figura 4.7 muestra la evolución de la producción de xilosa a lo largo de las hidrólisis enzimáticas del FIPCP utilizando *XlnJa* y *XlnTh*, llegando a concentraciones de 6,2 y 6,4 g/L de xilosa respectivamente a las 6 h de hidrólisis. Tanto en la hidrólisis con *XlnJa* como con *XlnTh* se produjo una elevada liberación de xilosa, afectando negativamente a la producción de XOS de bajo grado de polimerización.

Los XOS mayoritarios producidos en las HE con las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas tanto con la *XlnJa* como con la *XlnTh* han sido xilobiosa y xilotriosa. Este hecho era esperado, ya que este tipo endo- $\beta$ -1,4-xilanasas producen XOS de bajo grado de polimerización. En la figura 4.7, se muestra el aumento de concentración a lo largo del tiempo de X<sub>2</sub> (8,6 y 10,5 g/L) y X<sub>3</sub> (5,2 y 5,7 g/L) en las HE llevadas a cabo con las enzimas *XlnJa* y *XlnTh*, respectivamente. A partir de 2 h, el aumento en la producción de xilobiosa actuó en detrimento de la producción de xilotriosa y de los XOS (DP4-DP6) (datos no mostrados en la figura 4.7).



**Figura 4.7.** Perfiles de producción de xilosa, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> durante las HE con las enzimas XlnJa y XlnTh

En ambos ensayos se observa como la producción de xilotriosa a partir de las 2 h de hidrólisis comienza a disminuir. La formación de xilobiosa alcanza valores superiores en el ensayo que se utiliza la endo- $\beta$ -1,4-xilanasa XlnTh, siendo la concentración de XOS DP2-DP3 a 6 h de hidrólisis superior en este ensayo. En cuanto a la producción de xilosa liberada por ambas enzimas es bastante similar en ambos ensayos.

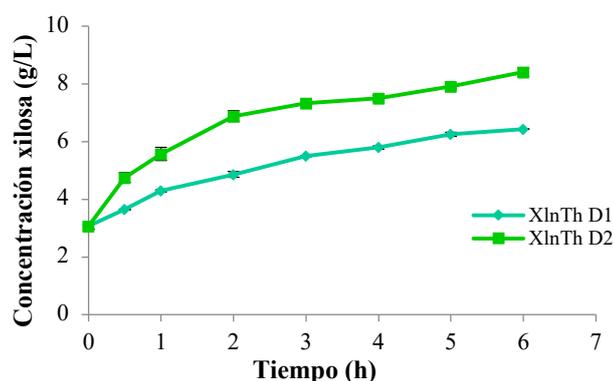
En cuanto a la cantidad de XOS con DP4-DP6, al principio de la hidrólisis se produce un aumento de estos compuestos, pero enseguida son hidrolizados a compuestos de menor grado de polimerización, como era de esperar al tratarse de unas enzimas pertenecientes a la familia GH10.

Como la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa XlnTh es la que mayor cantidad de X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> produce es esta enzima la seleccionada para llevar a cabo un estudio de hidrólisis utilizando dos dosis con el fin de aumentar la formación de XOS.

#### 4.4.1.1. Efecto de la dosis de enzima la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa XlnTh en la hidrólisis de la FIPCP

En este apartado se estudia el comportamiento de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa XlnTh a dos dosis diferentes D1 (5,6 U/mL) y D2 (22,5 U/mL). El conocimiento de utilización de la dosis adecuada es uno de los parámetros más importantes para lograr la degradación de la biomasa (Cuyvers y col., 2011). En estos ensayos se monitorizó la concentración alcanzada de monosacáridos y la formación de XOS de bajo peso molecular (DP2-DP6). Como era de

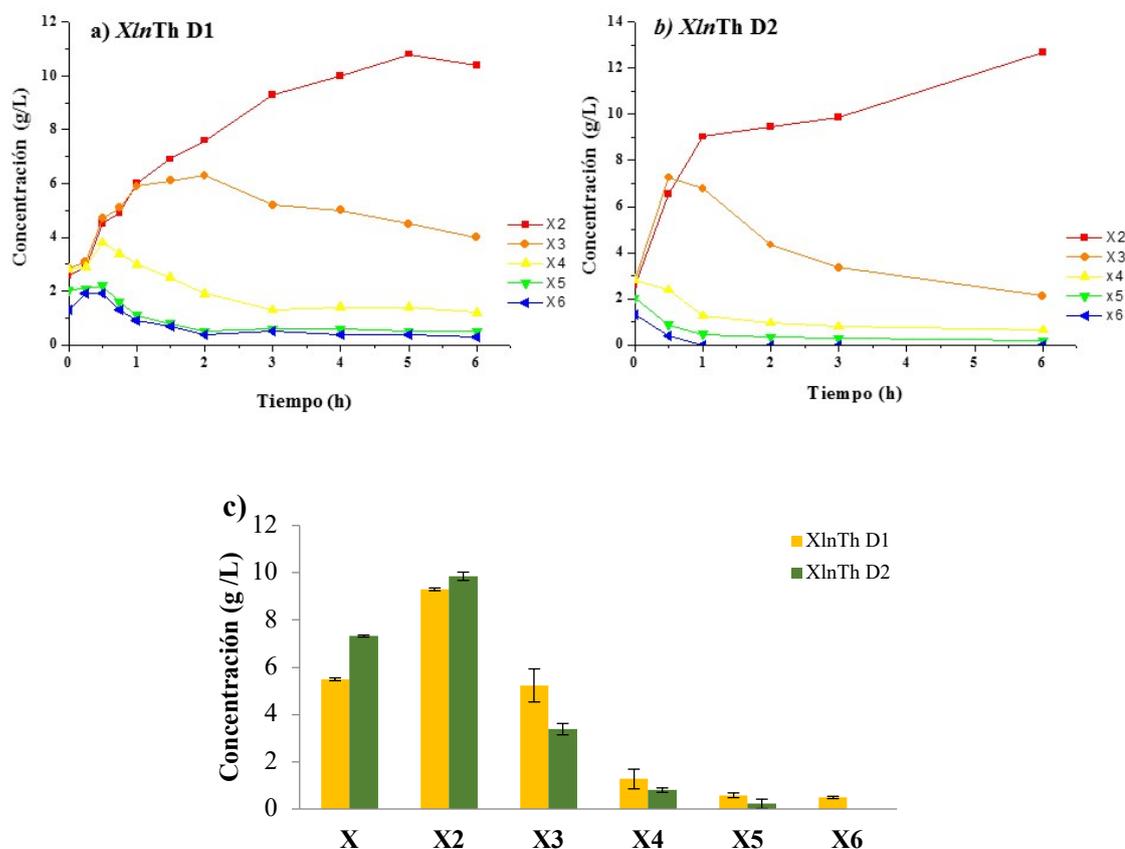
esperar, siguiendo el comportamiento de las GH10, la concentración de xilosa alcanzó un valor de 8,4 g/L con la dosis D2 frente a los 6,4 g/L que se obtuvieron con la dosis menor a las 6 h de hidrólisis (Fig. 4.8), lo que en porcentaje se traduce en 21,0% frente al 13,2% en la producción de xilosa monomérica respecto a la xilosa potencial. Estos valores de xilosa monomérica son bastante elevados, por lo que en principio esta enzima no sería buena para nuestro objetivo de obtener la mayor cantidad de XOS de DP2-DP6.



**Figura 4.8.** Perfil de producción de xilosa durante la HE con *XlnTh* con las dosis D1 y D2

Al estudiar el comportamiento de la *XlnTh* sobre la fracción líquida purificada procedente de la paja de cebada pretratada para la formación de XOS se utilizó HPAEC/PAD para su determinación analítica, viéndose que la máxima concentración de XOS con la dosis D1 se produjo a las 3 h de hidrólisis (Fig. 4.9a), mientras que con la dosis alta (D2), fue suficiente 1 h de hidrólisis para alcanzar el valor máximo (Figura 4.9b). En ambos casos, los componentes mayoritarios fueron la xilobiosa y xilotriosa.

En la figura 4.9c, se ha representado la concentración de cada xilooligosacáridos (DP2-DP6) existente en el medio de hidrólisis con *XlnTh* a 3 h con las dos dosis. En ella se observa como con la dosis D1, se determinó una concentración de 9,3 g/L de xilobiosa y 5,2 g/L de xilotriosa mientras que para la D2 los valores obtenidos fueron 9,8 y 3,4 g/L de xilobiosa y xilotriosa respectivamente.



**Figura 4.9.** Cinéticas de producción de XOS con *XlnTh* D1 (a) y D2 (b). Distribución de xilosa y XOS en la HE con *XlnTh* a las 3 h (c)

Al continuar la evolución de la reacción de hidrólisis hasta las 6 h con la dosis D1, las concentraciones de xilosa y xilobiosa (6,4 y 12,8 g/L respectivamente) aumentaron a expensas de hidrolizar el resto de xilooligosacáridos (DP3-DP6).

En la experiencia con la dosis de enzima superior (D2), la máxima concentración de XOS se obtuvo a 1 h de hidrólisis, obteniendo valores de 9,0 g/L de xilobiosa y 6,8 g/L de xilotriosa. La cantidad de xilosa monomérica liberada a 1 h fue de 5,6 g/L (Fig. 4.8). Transcurrido este tiempo de hidrólisis, la cantidad de xilosa monomérica y de xilobiosa fue aumentando hasta los 8,4 g/L y 12,7 g/L respectivamente a 6 h de reacción, mientras que la concentración de los otros XOS fue decreciendo.

La utilización de mayor dosis de enzima permite acortar el tiempo al que la producción de XOS es máxima. No obstante, las concentraciones de XOS fueron similares a los obtenidos con una menor dosis y tiempos más largo, de modo que no es necesario incrementar la dosis ya que 3 h de hidrólisis no es un tiempo largo. La utilización de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasasa *XlnTh* a baja dosis permite obtener 9,9 g XOS (DP2-DP6) (expresados como xilosa)/100 g de materia prima equivalente al 71,3% de rendimiento de producción XOS (DP2-DP6).

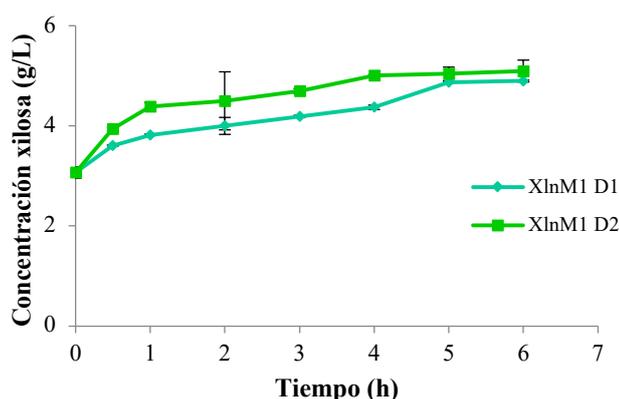
#### **4.4.2. Hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasasa perteneciente a la familia GH11**

La endo- $\beta$ -1,4-xilanasasa perteneciente a la familia 11 de las hidrolasas glicosídicas utilizada para la producción de XOS de bajo grado de polimerización fue la enzima *XlnM1*. Las enzimas de la familia GH1, a diferencia de las GH10, requieren al menos tres residuos consecutivos no sustituidos para poder actuar (produciendo XOS de mayor grado de polimerización que los generados por las endo- $\beta$ -1,4-xilanasasa perteneciente a la familia 10 (GH10) (Pollet y col., 2010).

Se ha estudiado el comportamiento de esta endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasasa como en la experiencia anterior con dos dosis de enzima *XlnM1*, 5,1 y 20,4 U por mL de FIPCP (denominadas D1 y D2 respectivamente). Las condiciones de hidrólisis para la producción de XOS de cadena corta fueron de 50 °C, utilizando un tampón citrato 0,05 M y pH 4,8, tomando muestra del proceso a diferentes tiempos durante 6 h.

En la figura 4.10, se representan las cinéticas de producción de xilosa, observándose como la enzima *XlnM1* se alcanza una concentración final de xilosa muy semejante en ambos ensayos (valores en torno a los 5 g/L), lo que significa que en este ensayo se ha producido alrededor de 2 g/L. Este valor expresado en porcentaje de liberación de xilosa fue del 7,2% para D1 y 7,9% por la D2. El interés en monitorizar la xilosa monomérica tiene por objeto conocer como avanza la reacción, ya que cuanto más xilosa monomérica se forme, menos cantidad de xilano oligomérico está disponible para formar los compuestos deseados.

Se monitorizó la formación de XOS durante el tiempo de hidrólisis con ambas dosis, y los resultados obtenidos se recogen en la figura 4.11. En los gráficos de esta figura se muestra, además, la distribución de xilooligómeros formados en la hidrólisis con las dos dosis a 3 h.



**Figura 4.10.** Perfil de producción de xilosa durante la HE con *XlnM1* con las dosis D1 y D2

Al determinar analíticamente por HPAEC-PAD la concentración de XOS, se observó que el incremento de dosis de enzima no supuso un aumento en la concentración de los XOS determinados con respecto a la dosis menor. En la bibliografía se encuentran varias hipótesis para justificar este hecho, pudiendo deberse a que la capacidad hidrolítica de las enzimas disminuye con el tiempo, por inhibición o por desactivación térmica. Otra hipótesis es que exista una competencia por los puntos de unión de los enlaces entre las enzimas por lo que un aumento en la dosis reduce la tasa global (Banerjee y col., 2010). Con ambas dosis, el compuesto mayoritario cuantificado fue la xilobiosa, alcanzándose valores de 10,9 g/L y 11,8 g/L para D1 y D2 respectivamente después de 3 h de reacción.

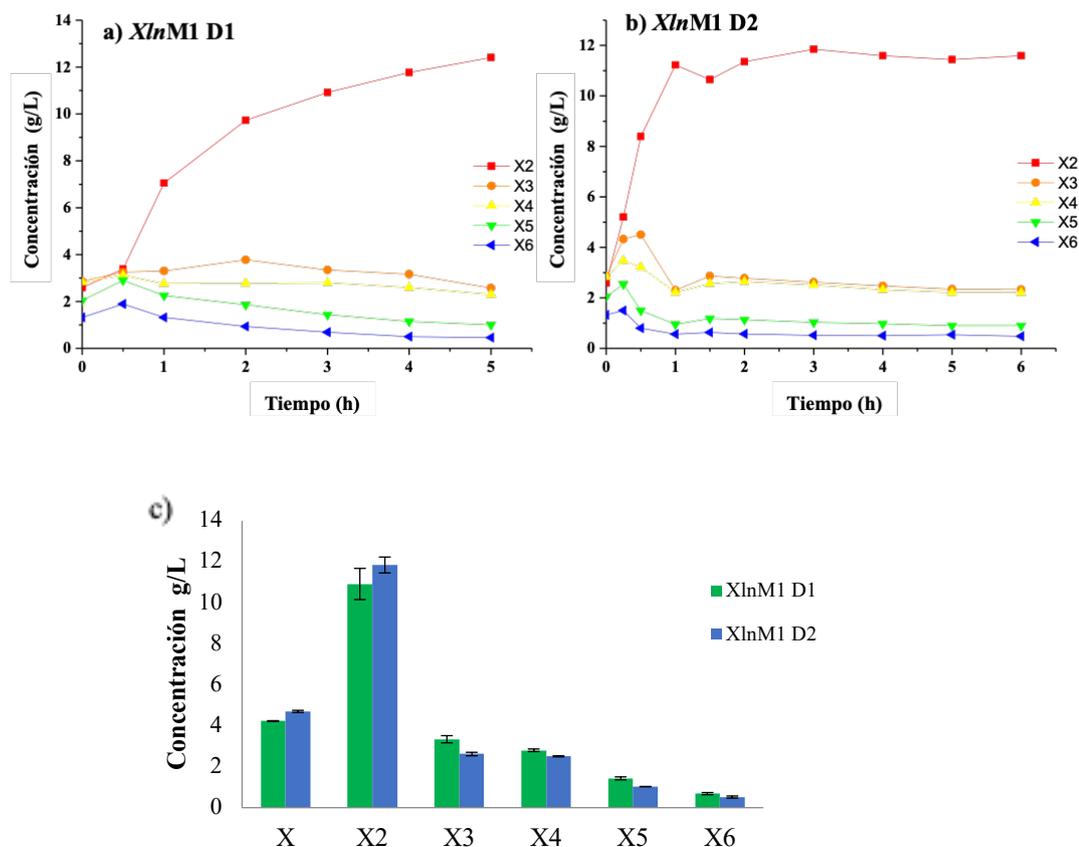
La máxima cantidad de producción de XOS con la enzima *XlnM1* utilizando la menor dosis (D1), expresado con relación a la xilosa presente en la materia prima fue de 11,3 g de XOS (DP2-DP6) por 100 g de materia prima, lo que supone un 81,3% de rendimiento de producción de XOS. Estos valores son superiores a los logrados con la enzima endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH10 del apartado anterior.

Después de las 3 h de hidrólisis, se produjo un incremento de xilosa monomérica, alcanzándose valores de 4,2 g/L, debido a la hidrólisis de los XOS (DP2-DP6) formados. Este comportamiento de la enzima comercial de hidrolizar los compuestos entre DP4 y DP6 para formar xilobiosa y xilosa por otros autores utilizando la cascarilla de avena como sustrato (Cuyvers y col., 2011).

En relación con la concentración del resto de monosacáridos (glucosa, galactosa, arabinosa y manosa), prácticamente no presentaron ningún cambio significativo durante las diferentes hidrólisis llevadas a cabo en las experiencias anteriores al utilizar enzimas puras. La galactosa varió en un rango entre 0,6/ 1,0 g/L; arabinosa y manosa entre 2,2/ 2,6 g/L.

Respecto a la concentración de glucosa medida en la fracción líquida tampoco varió su concentración durante la HE realizadas (entre 0,8/ 1,1 g/L), ya que la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH11, no actúa sobre los derivados de celulosa (Valenzuela, 2012).

Dada la alta concentración de glucosa oligomérica determinada en la composición del prehidrolizado (5,2 g/L) se procedió a estudiar la procedencia de dicha glucosa utilizando dos enzimas con diferente modo de actuación como son las preparaciones enzimáticas *NS22035* y *Novozym 188*. La enzima *NS22035* es una glucoamilasa que actúa sobre los enlaces  $\alpha$  (1-4) y (1-6) liberando glucosa, mientras que la *Novozym 188* es una preparación enzimática a base de celobiasas ( $\beta$ -1,4-glucosidasa) cuya acción consiste en hidrolizar celobiosa y oligómeros de glucosa (GOS) con enlace  $\beta$ -(1,4) para producir glucosa. Tal y como se ha comentado en el apartado 4.2 (pág. 114), la FIPCP presenta en su composición oligosacáridos de glucosa, sobre los que podría actuar esta enzima. Para ello se realizaron hidrólisis con cada una de estas enzimas complementarias a la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1*. Las condiciones del ensayo se recogen en el apartado correspondiente a Materiales y Métodos.



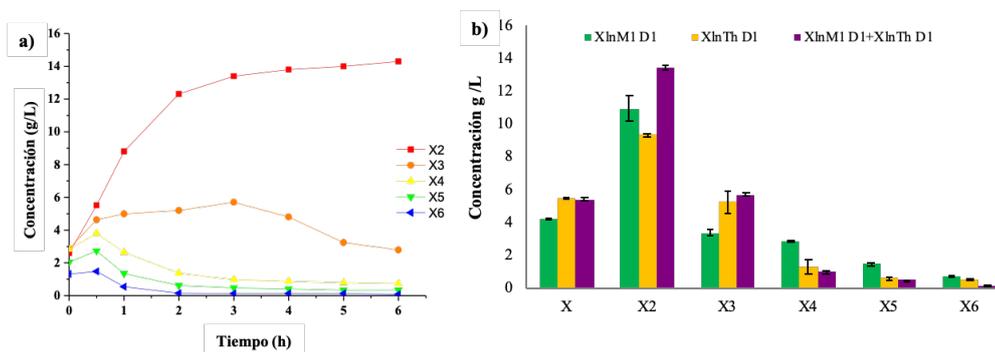
**Figura 4.11.** Cinéticas de producción de XOS con *XlnM1* D1 (a) y D2 (b). Distribución de xilosa y XOS en la HE con *XlnM1* a las 3 h (c)

La glucoamilasa liberó 2,1 g/L de glucosa cuya presencia puede deberse a compuestos derivados del almidón procedente de contaminación con grano, mientras que la  $\beta$ -glucosidasa produjo la liberación de 3,8 g/L de glucosa procedente de oligosacáridos de glucosa o de  $\beta$ -glucanos presentes en la muestra, con lo que se comprobó que no toda la glucosa presente en la FIPCP está unida a la cadena de xilano formando parte de la hemicelulosa. La presencia de estos compuestos demuestra que junto a las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas se debe añadir enzimas complementarias o adicionales para incrementar la descomposición de los xilanos solubles (Cuyvers y col., 2011, Biely y col., 2016).

#### 4.4.3. Hidrólisis enzimática de FIPCP con mezcla de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH10 y GH11

Dado el diferente modo de actuación de las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas pertenecientes a las familias GH10 y GH11, se estudió el posible efecto sinérgico utilizando de forma simultánea las dos endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, *XlnTh* (GH10) y *XlnM1* (GH11) con el objetivo de aumentar la producción de XOS sin aumentar la concentración de xilosa monomérica. La dosis utilizada para llevar a cabo esta experiencia con ambas enzimas fue la dosis D1 del apartado anterior. Las cinéticas de producción de XOS de bajo grado de polimerización se muestran en la figura 4.12a. En ella se observa como a tiempos cortos se producen XOS (DP2-DP6), que rápidamente se hidrolizan para formar compuestos de menor grado de polimerización.

En la figura 4.12b se representan las concentraciones de xilosa y de los XOS producidos a las 3 h a partir de la FIPCP en la HE con mezcla de enzimas *XlnTh* y *XlnM1* e individualmente. La concentración de xilosa monomérica con la mezcla de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas (5,4 g/L) fue similar a la obtenida con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnTh* (5,5 g/L) individualmente, pero mayor que la liberada por la *XlnM1* (4,2 g/L) a 3 h de hidrólisis. Este hecho puede deberse a que la *XlnTh* (GH10) es capaz de hidrolizar a XOS de menor peso molecular favoreciendo la formación de xilosa monomérica a diferencia de la actuación de la *XlnM1* (Falck y col., 2015).



**Figura 4.12** a) Cinética de producción de XOS con la mezcla de *XlnTh* y *XlnM1* (1:1 D1) b) Distribución de los XOS y xilosa determinados en la HE con *XlnTh* (D1) y *XlnM1* (D1) y mezcla de las dos enzimas a las 3 h

El compuesto mayoritario producido fue de nuevo la xilobiosa con una concentración de 13,4 g/L seguido de la xilotriosa con 5,7 g/L. Las concentraciones de estos compuestos fueron superiores a las encontradas en los ensayos llevados a cabo de manera individual, pero no fue así para el resto de XOS ( $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_6$ ) que se obtuvieron en menor concentración como puede apreciarse en la figura 4.12b. Este hecho puede ser atribuido a que la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* (GH11) produce xilooligómeros de 4, 5 y 6 residuos de pentosas mientras que la *XlnTh* (GH10) rompe esos XOS para formar fundamentalmente xilobiosa y xilotriosa. Expresando estos resultados con respecto a la cantidad de materia prima, se obtuvieron 12,1 g de XOS (DP2-DP6) (expresado como xilosa) por 100 g de materia prima. Este valor es superior en comparación al obtenido en los ensayos de manera individual con las enzimas *XlnTh* y *XlnM1* (9,9 y 10,6 g de XOS (DP2-DP6) por 100 g de materia prima respectivamente).

La principal diferencia entre estas enzimas es que los productos resultantes de la acción de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnTh* (GH10) fueron de menor tamaño que los producidos por la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* (GH11), lo que indica una mayor proporción de sitios de escisión para la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH10. Al obtener también menor cantidad de XOS con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* (GH11) puede indicar que nuestro sustrato presenta ramificaciones en posiciones que dificulta la actuación de la enzima. En el análisis realizado por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) de la FIPCP, cuyos resultados se recogen en el apartado 4.6.1 (pág. 171), permiten confirmar que los oligosacáridos presentes en esta fracción están ramificados, posiblemente con residuos de arabinosa. Aunque para conocer la posición del enlace se debería realizar la técnica de resonancia magnética nuclear o cromatografía de gases.

#### ***4.4.4. Comportamiento de las $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas Arf51 (GH51) y Arf43 (GH43) en la HE con XlnM1 de dos arabinoxilanos comerciales de baja (LOW) y media (MEDIUM) viscosidad***

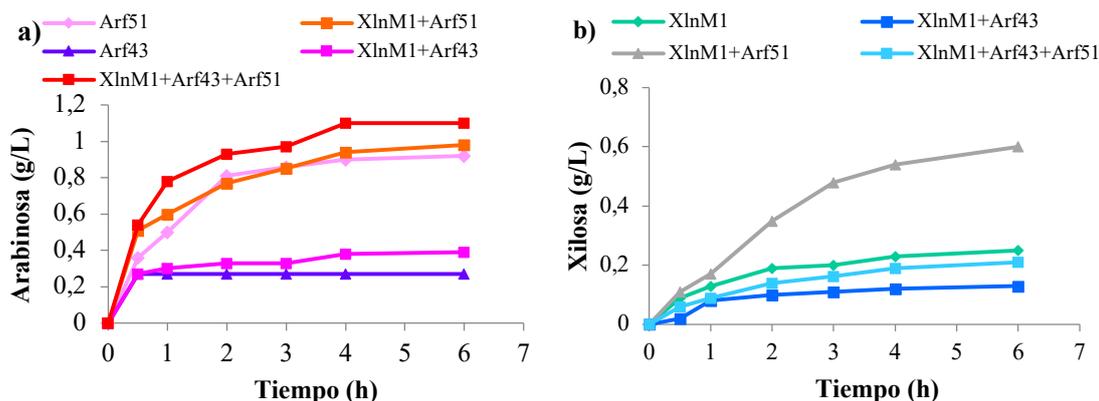
Como ya se ha comentado, la composición inicial de la FIPCP se ha determinado la presencia de arabinosa, tanto en forma monomérica como oligomérica (ver tabla 4.3). La arabinosa se encuentra como sustituyente en la cadena de xilano, pudiendo actuar como

barrera para la despolimerización enzimática dificultando el ataque de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas. La susceptibilidad a la degradación enzimática depende del grado de sustitución, del tipo de enlace glicosídico y de la posición a lo largo de la cadena de xilano.

Antes de estudiar el modo de actuación sobre FIPCP de las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (*Arf51* y *Arf43*) y el posible efecto sinérgico entre ellas, junto a la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, se han utilizado dos sustratos comerciales de arabinoxilanos de trigo (de pureza, 95%) de baja y media viscosidad (10,2 y 31,4 cSt) respectivamente, para estudiar el efecto de estas enzimas sobre el sustrato. Los arabinoxilanos comerciales se han denominado *LOW* de baja viscosidad que presenta una relación molar arabinosa/xilosa de 0,4 y el llamado *MEDIUM* de media viscosidad, cuya relación molar A/X es de 0,6. Se ha estudiado el comportamiento de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas de la familia 11 (*XlnM1*) procedente de *T. viride* tanto individualmente como en presencia de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (*Arf51* y *Arf43*). La enzima *Arf51* (GH51) procedente de *A. niger*, libera la arabinosa unida a la cadena de xilanopiranosil monosustituida de las posiciones (1 $\rightarrow$ 2) y (1 $\rightarrow$ 3). En cambio, la *Arf43* (GH43) procedente de *Bifidobacterium* sp., actúa sobre los residuos de xilanopiranosil di sustituidos por la arabinosa en la posición (1 $\rightarrow$ 3) (Borsenberger y col., 2014).

Las HE se han realizado utilizando como sustrato arabinoxilano comercial en una concentración de 10 g/L. Durante la hidrólisis enzimática se midió la liberación de xilosa, arabinosa y la formación de XOS a 0, 0,5; 1; 2; 3; 4 y 6 h, evaluando el posible efecto sinérgico producido por estas dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas.

En la figura 4.13, se muestra el efecto de la combinación de la enzima *XlnM1* con las enzimas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (*Arf51* o *Arf43*) en la producción de arabinosa y xilosa utilizando arabinoxilano *LOW* como sustrato. Como se ilustra en la figura 4.13a, cuando *Arf51* está presente en el medio de hidrólisis, en 6 h se liberó 50% de la arabinosa presente en el sustrato, mientras que con la enzima *Arf43* la liberación de arabinosa fue menor (0,3 g/L). Este resultado indica que la mayoría de las arabinosas en el sustrato utilizado están unidas a la cadena de xilano por enlaces (1 $\rightarrow$ 2) y/o (1 $\rightarrow$ 3) en xilosas monosustituidas y una proporción menor de arabinosa están unidas a xilosas disustituidas.



**Figura 4.13.** Producción de arabinosa (a) y de xilosa (b) en la HE de un arabinoxilano comercial (LOW) utilizando diferentes enzimas

El ensayo llevado a cabo de una endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* sobre el sustrato *LOW* en combinación con la enzima *Arf43* mostró un ligero aumento en la liberación de arabinosa alcanzándose una concentración de 0,4 g/L. En cambio, la adición de *Arf51* a la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* liberó una concentración de arabinosa similar a la producida por la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa sola. La mayor liberación la encontramos en el ensayo llevado a cabo con la mezcla ternaria de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas y las dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, logrando obtener una concentración final de 1,1 g/L.

Con relación a la producción de xilosa, la mayor liberación del monosacárido (0,6 g/L) se obtiene al con el ensayo de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* junto a la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf51*. Este resultado es superior al obtenido con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* sola (0,2 g/L), por lo que se observa una sinergia entre estas dos enzimas para la liberación de la xilosa. En cambio, en los ensayos que incluyen la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf43* junto a las otras enzimas, la liberación de la xilosa es incluso menor a la liberada por la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* individualmente. Una explicación a este comportamiento podría ser que la actuación de la enzima *Arf43* impide el reconocimiento de los sitios de unión de las otras enzimas por lo que su modo de actuación se ve afectado.

En la figura 4.14 se muestran los cromatogramas obtenidos con el equipo de HPLC de exclusión molecular (HPSEC/IR), en ella se ve la despolimerización del arabinoxilano *LOW*

por acción de las diversas enzimas *XlnM1*, *Arf51*, *Arf43* y la combinación entre ellas. Tal y como se observa en esta figura, la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* actúa sobre el polímero *LOW* formando entre otros, compuestos intermedios semejantes a los arabinoxilooligómeros estándares ramificados denominados XA3XX (3<sup>3</sup>- $\alpha$ -L-arabinofuranosil-xilotetraosa) y A2XX (2<sup>3</sup>  $\alpha$ -L-arabinofuranosil-xilotriosa). En los ensayos en los que la enzima *Arf51* está presente, estos compuestos intermedios son hidrolizados para dar lugar a otros oligómeros de menor tamaño molecular, no produciendo el mismo efecto la suplementación con *Arf43*. De acuerdo con su mecanismo de acción, la *Arf43* actúa sobre las posiciones (1 $\rightarrow$ 3) de xilosas disustituidas (Mechelke y col., 2017).

En la tabla 4.4 se recogen los porcentajes de xilosa y arabinosa liberada, así como los xilooligómeros formados durante la HE del arabinoxilano *LOW*. La cuantificación mostró que un 14,8% de arabinosa está unido a residuos de xilosa disustituidas y un 49,4% a residuos de xilosa monosustituida presentes en el polímero *LOW*. La HE con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* en combinación con la enzima con *Arf43*, liberó un 21,4% de la arabinosa potencial, mientras que cuando se combinó con la enzima *Arf51* se obtuvo alrededor del 52%.

La mayor liberación de arabinosa (60,4%) se logró al utilizar la combinación de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* junto con las dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas *Arf43* y *Arf51*. En el caso de la xilosa (12,9%), se produjo al utilizar la combinación enzimática *XlnM1+Arf51*. La adición de *Arf43+Arf51* a la HE con *XlnM1* favoreció la liberación de arabinosa como se ha comentado anteriormente, con una pequeña hidrólisis a xilosa (4,5%) y una liberación de XOS del 62,1%. En el cromatograma registrado en HPAEC-PAD se detectaron pequeños picos cromatográficos a tiempos altos de elución que pueden corresponder a oligómeros de alto peso molecular y/o ramificados.

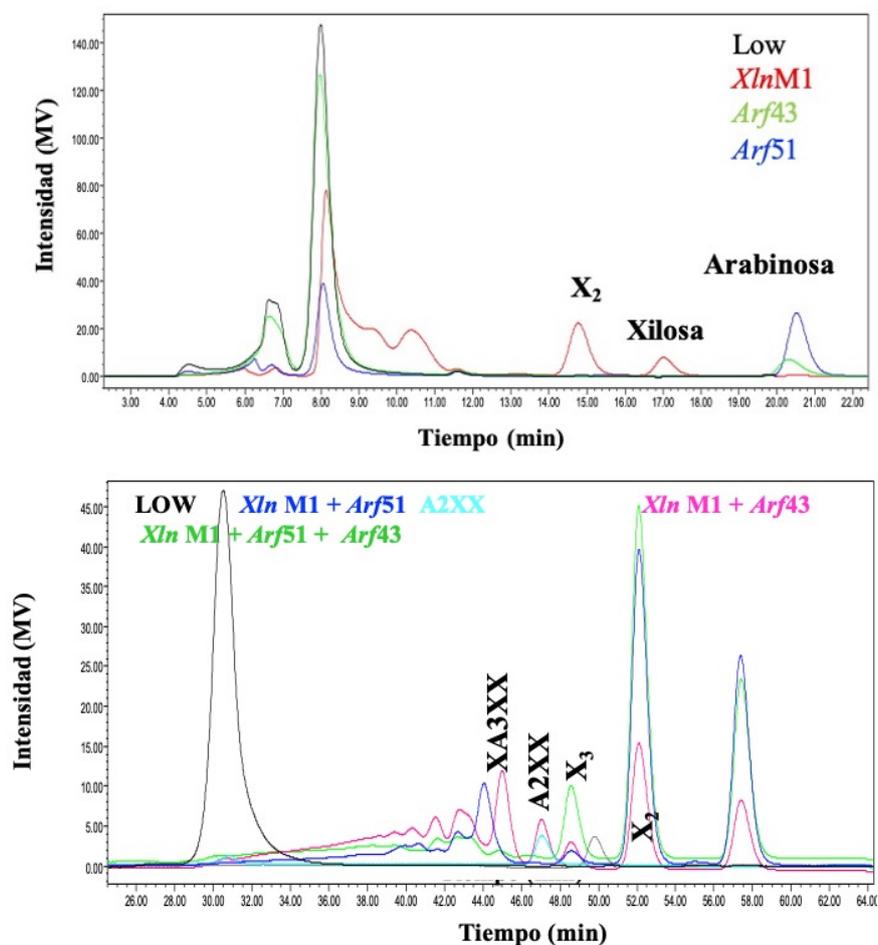
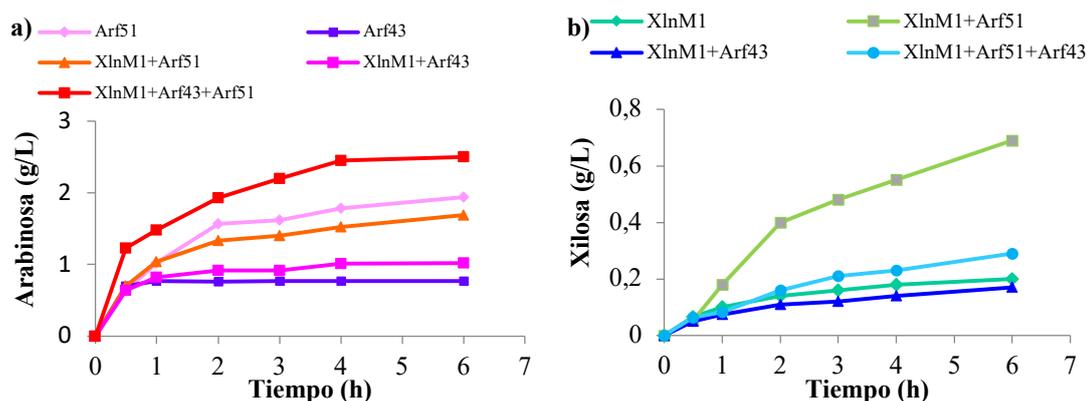


Figura 4.14. Cromatograma de HPSEC/IR de la hidrólisis enzimática a 6 h de arabinoxilano *LOW* con distintas enzimas (*XlnM1*; *Arf51*; *Arf43*; *XlnM1+Arf51*; *XlnM1+Arf43* y *XlnM1+Arf51+Arf43*)

Tabla 4.4. Porcentaje de liberación de xilosa, arabinosa y X<sub>2</sub>-X<sub>4</sub> sobre el arabinoxilano *LOW*

Test	X <sub>2</sub> -X <sub>4</sub> (%)	Xilosa (%)	Arabinosa (%)
<i>Arf51</i>	-	-	49,4
<i>Arf43</i>	-	-	14,8
<i>XlnM1</i>	18,1	5,4	-
<i>XlnM1+Arf51</i>	45,8	12,9	51,6
<i>XlnM1+Arf43</i>	23,4	2,8	21,4
<i>XlnM1+Arf43+Arf51</i>	62,1	4,5	60,4

Del mismo modo, se ha estudiado el comportamiento de las enzimas mencionadas anteriormente con el sustrato *MEDIUM* en las mismas condiciones. Se ha realizado el seguimiento de la evolución de la xilosa, arabinosa y XOS formados. Los resultados de producción de arabinosa y xilosa se muestran en la figura 4.15.



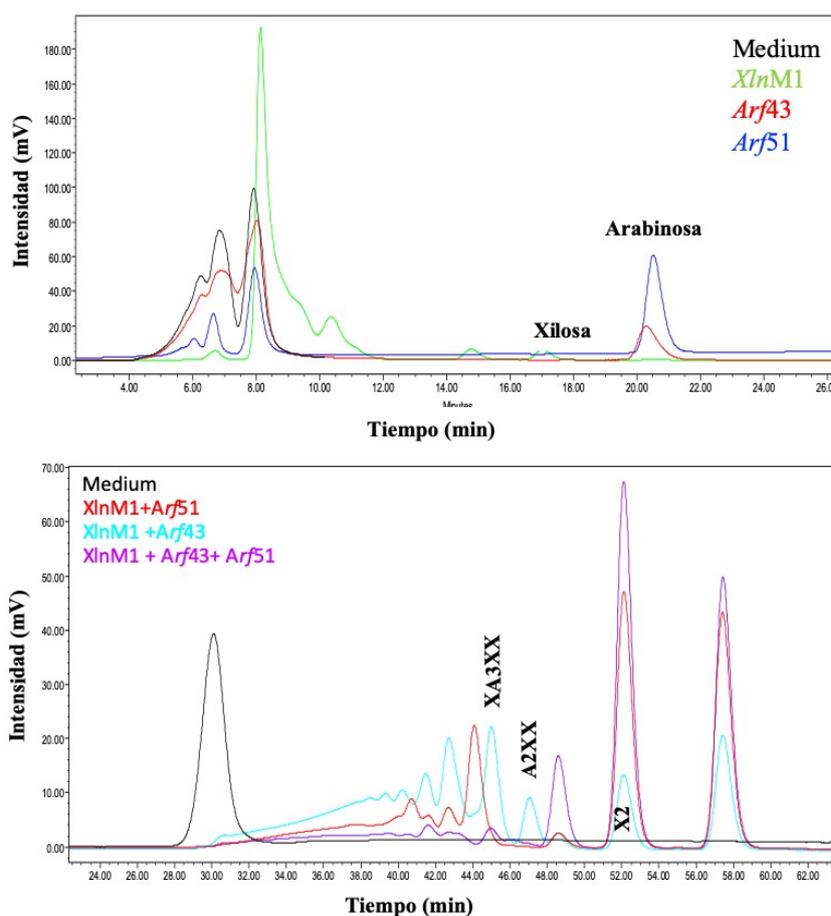
**Figura 4.15.** Producción de arabinosa (a) y de xilosa (b) en la HE de un arabinoxilano comercial (*MEDIUM*) utilizando diferentes enzimas

En la figura 4.15a, se representa la liberación de la arabinosa. En ella se observa, que las menores concentraciones son liberadas por los ensayos que contiene la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf43*, debido a que este sustrato contiene una cantidad limitada de xilosas disustituidas. Se liberaron 0,8 y 1,0 g/L de arabinosa en la experiencia con *Arf43* individualmente y junto a la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* respectivamente. En cambio, las experiencias que contienen a la *Arf51*, se observa una liberación mayor (1,9 g/L). Como en los ensayos de hidrólisis utilizando con el sustrato arabinoxilano *LOW*, la mayor liberación de arabinosa se produjo con *XlnM1* en combinación con las dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (*Arf51* y *Arf43*), con un valor de 2,5 g/L.

La liberación de xilosa monomérica por la acción de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* fue de 0,2 g/L. Este valor fue muy superior cuando la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf51* fue adicionada a la *XlnM1* logrando obtener valores de 0,7 g/L (Fig. 4.15b). Como en la experiencia anterior, se observa como la presencia de la arabinofuranosidasa *Arf43*, no se produce la liberación debido a que esta enzima no reconoce el sustrato.

Con lo que, estas enzimas tienen un comportamiento similar frente a sustratos en los que la proporción molar A/X fue diferente.

En la figura 4.16 se muestran los cromatogramas obtenidos por HPSEC/IR durante las hidrólisis enzimáticas con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* actuando sobre el polímero *MEDIUM* y utilizando dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas *Arf51* y *Arf43* solas y en combinación entre ellas.



**Figura 4.16.** Cromatogramas de HPSEC/IR de la hidrólisis enzimática del sustrato arabinoxilano *MEDIUM* con distintas enzimas (*XlnM1*; *Arf51*; *Arf43*; *XlnM1*+*Arf51*; *XlnM1*+*Arf43* y *XlnM1*+*Arf51*+*Arf43*)

La endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* actúa sobre el polímero *MEDIUM* formando entre otros, compuestos ramificados como XA3XX y A2XX. En la figura 4.16b se ve como la suplementación con *Arf51*, hidrolizó estos compuestos intermedios para dar lugar a otros

oligómeros como xilobiosa y xilotriosa. La suplementación con *Arf43* no alteró los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos XA3XX y A2XX. Este comportamiento está de acuerdo con el mecanismo de acción de la *Arf43* que actúa sobre las posiciones (1-3) disustituidas del polímero.

En la tabla 4.5 se recogen los porcentajes de xilosa y arabinosa, así como los xilooligómeros de hasta DP4 formados durante la HE del arabinoxilano *MEDIUM*. La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf51*, fue capaz de liberar unidades de arabinosa del *MEDIUM* sustituidos individualmente en un 53,7%, mientras que la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf43* liberó alrededor de 21,3% de la arabinosa. En cuanto a la liberación de la xilosa, la máxima (10,4%) se produjo con la mezcla enzimática *XlnM1* y *Arf51*.

**Tabla 4.5.** Porcentaje de liberación de xilosa, arabinosa y X<sub>2</sub>-X<sub>4</sub> sobre el arabinoxilano *MEDIUM*

Test	X <sub>2</sub> -X <sub>4</sub> (%)	Xilosa (%)	Arabinosa (%)
<i>Arf51</i>	-	-	53,7
<i>Arf43</i>	-	-	21,3
<i>XlnM1</i>	3,3 (X <sub>2</sub> )	3,0	-
<i>XlnM1+Arf51</i>	36,0	10,4	46,8
<i>XlnM1+Arf43</i>	13,3 (X <sub>2</sub> -X <sub>3</sub> )	2,6	28,3
<i>XlnM1+Arf43+Arf51</i>	65,4	4,4	69,2

La actuación de las dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas junto con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* logró liberar del 69,2% de la arabinosa potencial del polímero y producir un 65,4% de XOS de bajo grado de polimerización.

En general, comparando los resultados sobre los dos sustratos comerciales, se observa que el porcentaje de liberación de arabinosa es similar en todos los ensayos, excepto en los ensayos con el sustrato arabinoxilano *MEDIUM* y la enzima *Arf43*, en los que la liberación de arabinosa fue mayor. Es lógico encontrar una mayor liberación de arabinosa dado que la relación de sustituyentes es mayor en este sustrato y, por tanto, pueden encontrarse en xilasas disustituidas. En cambio, la liberación de xilosa no se vio afectada por el tipo de sustrato,

obteniéndose valores similares en ambos casos y ensayos. Las mayores diferencias se encuentran en la producción de XOS, ya que en el sustrato *MEDIUM* se han determinado XOS de menor grado de polimerización al compararlos con los obtenidos en el sustrato *LOW*.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede esperar que el coctel enzimático formado por las dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas junto a la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas sea idóneo para lograr un alto porcentaje de compuestos con grado de polimerización entre  $X_2$ - $X_4$ . El incremento en la producción de DP2-DP4 se debe a que se produce una desramificación que conlleva una liberación de arabinosa, debido a la hidrólisis del enlace, lo que favorece la acción de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas. Además, el porcentaje de xilosa determinado es bajo, lo que supone un dato interesante ya que así hay disponible una alta cantidad de xilooligosacáridos que pueden ser transformados al tamaño deseado y no a xilosa monomérica.

#### **4.4.5. Hidrólisis enzimática de la *FIPCP* con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* (GH11) y $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas *Arf51* y *Arf43***

Una vez que se ha estudiado el modo de actuación de las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas enzimas sobre sustratos sintéticos, el siguiente paso planteado fue estudiar el comportamiento de estas enzimas en nuestro medio real (*FIPCP*). Por lo que se llevó a cabo la hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* individualmente y a la que se adicionó  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas de las dos familias GH51 y GH43 conjuntamente estudiadas anteriormente.

La hidrólisis enzimática se realizó en un medio tamponado (0.05 M de citrato sódico) a pH 5.5, temperatura de 40 °C y 150 rpm. Estas condiciones fueron elegidas estableciendo un compromiso entre las condiciones óptimas de temperatura y pH para las diversas enzimas utilizadas. Las dosis de enzimas fueron las mismas que las utilizadas en la experiencia con los arabinoxilanos comerciales (5,1; 6,3 y 10,2 UI/mL) de *XlnM1*; *Arf51*; *Arf43* respectivamente.

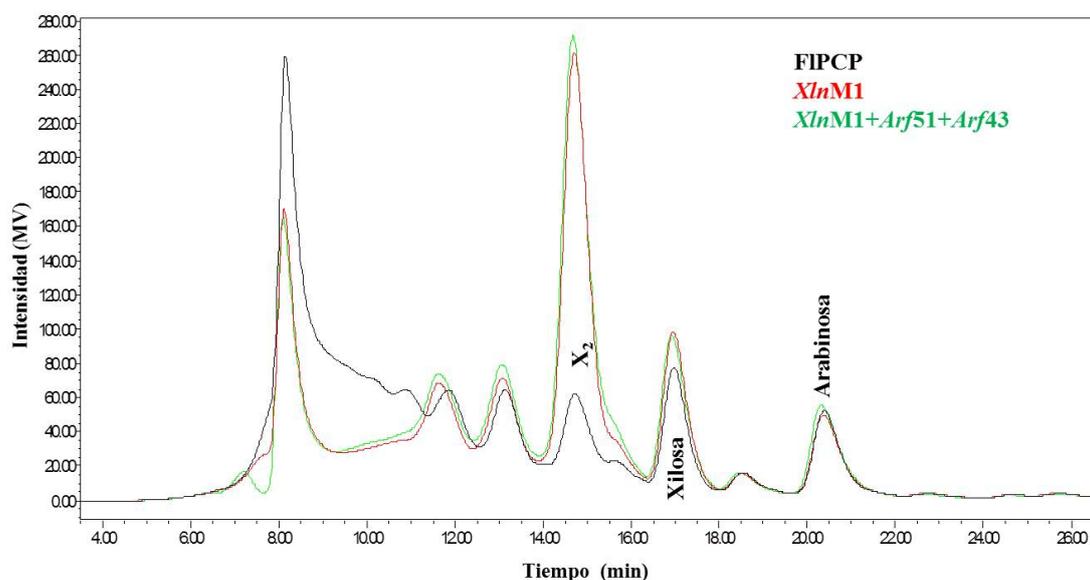
Las muestras se analizaron cromatográficamente siguiendo la misma metodología que en apartados anteriores, cuantificando la liberación de arabinosa, xilosa y la formación de XOS como en el caso de la utilización de los dos sustratos arabinoxilanos comerciales.

La combinación de la enzima *Arf51* con *XlnM1* utilizando como sustrato FIPCP, produjo un pequeño aumento en la concentración arabinosa determinada de hasta 2,3 g/L, lo que supone una liberación del 16,6% de la arabinosa unida a la cadena de xilano. En cuanto a la xilosa monomérica, la concentración aumentó en un 5,3%. La xilosa liberada en el ensayo utilizando individualmente la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* supuso un 3,5% de xilosa potencial presente en FIPCP. En este caso, la acción de la *Arf51* favoreció a la formación de xilosa.

La utilización del coctel enzimático formado por la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* y las dos  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (*Arf43* y *Arf51*) en la HE de FIPCP no produjo un aumento en la liberación de arabinosa en comparación al ensayo de endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf51* como se muestra en la figura 4.17. El hecho de no liberar más arabinosa puede ser debido a que este sustrato no contenga xilosas disustituidas con arabinosas, por lo que la enzima *Arf43* no tendría sustrato sobre el que actuar.

En esta figura 4.17, se observa claramente como la acción de las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas no ha supuesto una mejora la producción de XOS con DP2-DP4.

Teniendo en cuenta que este aumento no ha sido el esperado en cuanto a la liberación de las arabinosas, se plantea la hipótesis de que las arabinosas sustituidas a la cadena de xilano, estén también unidas en la posición (1 $\rightarrow$ 5) mediante enlaces éster a compuestos como el ácido ferúlico o próximo a grupos acetilos, los cuales pueden impedir la actuación de estas enzimas (Biely y col., 2016). Esta hipótesis, queda confirmada en el apartado 4.6 (pág. 171) ya que en los espectros de los análisis de MALDI-TOF-MS obtenidos, se asignaron señales correspondientes a oligosacáridos acetilados y a derivados feruloílicos unidos a residuos de pentosas.



**Figura 4.17.** Efecto de la suplementación de *Arf43* y *Arf51* a la HE de FIPCP con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1*

Por tanto, la estrategia seguida para lograr la mayor despolimerización del sustrato fue añadir otras enzimas complementarias a las anteriores como son la feruloil esterasa (*Fe\_E*) que liberan los grupos ferúlicos unidos a la cadena carbohidrato y la enzima acetilxilano esterasa (*AcX\_E*), que liberaría acético a partir de los grupos acetilo presentes.

#### 4.4.6. Efecto de la adición de las enzimas estererasas en los ensayos de hidrólisis enzimática

Siguiendo con el objetivo de lograr la máxima despolimerización de la fracción soluble hemicelulósica de paja de cebada obtenida tras el PEV a 180 °C y 30 min, se procedió a añadir un coctel enzimático formado por la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas y enzimas que eliminan los sustituyentes que pueden obstaculizar la actuación de las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas.

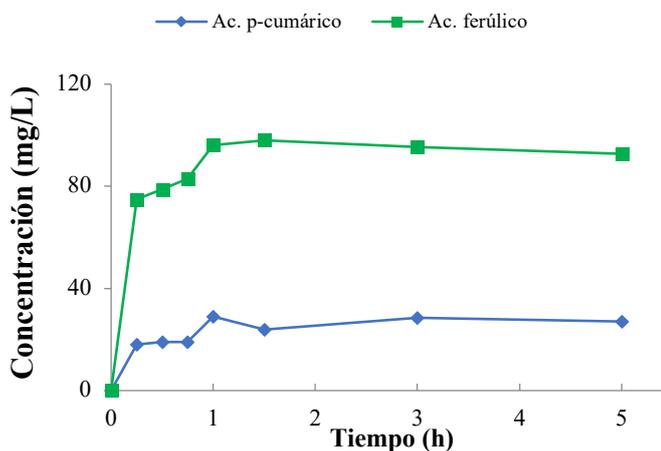
La presencia de grupos acetilo se considera uno de los obstáculos más importantes a la hora de hidrolizar este sustrato, por lo tanto y a la vista de los resultados anteriores se diseñaron dos experiencias de HE, una llevada a cabo con una mezcla enzimática denominada en esta Tesis como *Maf* formada por endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas (*XlnM1*),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa *Arf51* y feruloil esterasa (*Fe\_E*) y otro segundo coctel enzimático que

contiene además de las enzimas anteriores, la enzima acetilxilano esterasa (*AcX\_E*). Esta segunda combinación enzimática la denominamos *Complex*.

#### 4.4.6.1. Ensayo de hidrólisis enzimática de la *FIPCP* con *endo-β-(1,4)-D-xilanas* *XlnM1*, *α-L-arabinofuranosidasa* y *feruloil esterasa*

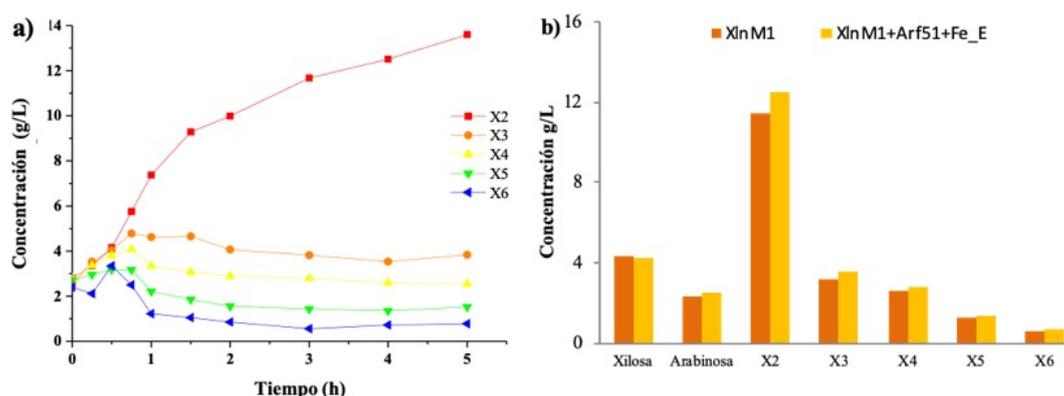
Las condiciones de este ensayo de hidrólisis enzimática fueron semejantes a las anteriormente descritas (pH 4,8; 50 °C y 150 rpm). Para la hidrólisis enzimática de la fracción líquida realizada con el preparado enzimático *Maf* se utilizaron las siguientes dosis 5,1; 6,3; 0,05 U/mL para *XlnM1*, *Arf51* y *Fe\_E* respectivamente. Se determinaron las concentraciones de xilosa, arabinosa y la formación de XOS. Estas fueron analizadas cromatográficamente a diversos tiempos de muestreo: 0, 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3 y 5 h.

Se hizo un seguimiento de la reacción en cuanto a la ruptura de los enlaces éster, analizándose la liberación de ácidos *p*-cumárico y ferúlico, cuyos resultados se muestran en la figura 4.18. En ella podemos apreciar una liberación de ácido *p*-cumárico de 27 mg/L y de ácido ferúlico de 93 mg/L. Esta liberación ocurre a tiempos cortos de hidrólisis, a partir de una hora no se produce prácticamente liberación de ácidos cinámicos.



**Figura 4.18.** Liberación de ácidos *p*-cumárico y ferúlico durante la hidrólisis enzimática de la *FIPCP* con las enzimas *XlnM1* y *Arf51* en combinación con *Fe\_E* (Mezcla enzimática *Maf*)

En la figura 4.19a se representan los perfiles de producción de XOS con la mezcla enzimática *Maf*. En ella se aprecia como la hidrólisis de los xilooligosacáridos monitorizados es bastante gradual, acompañado de una formación pronunciada de xilobiosa. El XOS mayoritario fue la xilobiosa con un valor máximo de 13,6 g/L a 5 h. Esta concentración supone el 48,8% de la xilosa potencial presente como oligosacáridos en la FIPCP. En la figura 4.19b se muestra la distribución de XOS producidos a 4 h de hidrólisis, tiempo al que se obtuvo la máxima concentración de XOS. En esta figura se incluyen también, a modo de comparación, los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática empleando únicamente la enzima *XlnM1*. Los valores de concentración determinados en las HE *Maf* y *XlnM1* fueron; X<sub>2</sub> (12,5; 11,4 g/L) X<sub>3</sub> (3,5; 3,3 g/L), X<sub>4</sub> (2,6; 2,6 g/L), X<sub>5</sub> (1,4; 1,2 g/L) y X<sub>6</sub> (0,7; 0,6 g/L), respectivamente. Suponiendo un pequeño aumento (1,6 g/L) en la concentración de XOS en los ensayos llevados a cabo con el coctel enzimático *Maf*.



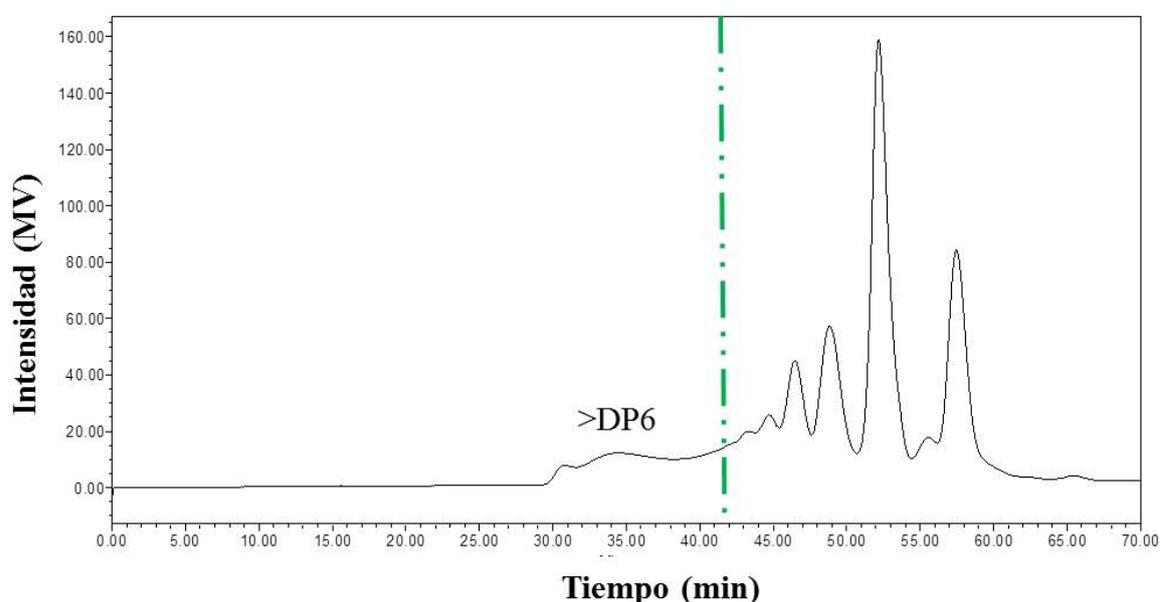
**Figura 4.19.** a) Cinéticas de producción de XOS en la HE de la FIPCP utilizando la mezcla enzimática *Maf*; b) Comparación de la producción de XOS y monosacáridos en la HE de la FIPCP con *XlnM1* y la mezcla enzimática *Maf* (*XlnM1*+*Arf51*+*Fe\_E*)

En la figura 4.19b, se ve que la xilosa liberada con el complejo *Maf* ha sido prácticamente igual a la producida con la endo- $\beta$ -1,4-xilanasa *XlnM1* sola. Asimismo, se produjo un pequeño aumento en la concentración de arabinosa liberada (0,4 g/L) como consecuencia de la acción de las enzimas *Arf51* y *Fe\_E*, al romper los enlaces éster dejando libre parte de la arabinosa. A pesar de ello, permanece aún un 65,8% de arabinosa unida. Está incompleta liberación de arabinosa puede deberse también a la existencia de otros grupos

sustituyentes como grupos acetilos existentes en estas hemicelulosas que dificultan la acción de las enzimas.

En este ensayo, se obtuvieron 12,3 g de XOS con un grado de polimerización entre DP2-DP6 (expresados como xilosa) por cada 100 g de paja de cebada. El rendimiento máximo de producción de XOS alcanzado, empleando la combinación enzimática *Maf*, fue del 88,4%, lo que supone una mejora frente al ensayo *XlnM1* donde se obtuvo un rendimiento de producción del 81,3%.

El análisis cromatográfico de HPSEC (Fig. 4.20) mostró que en el medio de reacción de hidrólisis seguían quedando compuestos con un grado de polimerización superior a DP6, difíciles de hidrolizar (<10%), a la que se denominó fracción recalcitrante. Aunque no todos los compuestos con grado de polimerización superior a DP6 son XOS, para intentar completar la hidrólisis, la fracción recalcitrante se sometió a una separación utilizando cromatografía de exclusión molecular, con el fin de lograr obtener la fracción de polisacáridos y someterlo a una nueva hidrólisis enzimática para lograr obtener XOS con (DP2-DP6). Los resultados de estos ensayos se incluyen en el apartado 4.5.1.2 (pág. 165).



**Figura 4.20.** Cromatograma HPSEC/IR de la hidrólisis *Maf* a 4 h

#### 4.4.6.2. Ensayo de hidrólisis enzimática con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* con la adición de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (*Arf51*), feruloil esterasa (*Fe\_E*) y acetilxilano esterasa (*AcX\_E*)

La presencia de grupos acetilos en la estructura de la hemicelulosa de paja de cereal, confirmada por la técnica MALDI-TOF-MS (apartado 4.7 pág. 185), nos lleva a pensar que una parte importante de los grupos acetilos no fueron liberados durante el PEV.

Los grupos acetilos en las cadenas de xilano crean un impedimento estérico que obstaculiza la acción de las enzimas, limitando el grado de hidrólisis logrado con algunas enzimas como son las endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas (Biely y col., 2013). La presencia de grupos acetilos en los carbohidratos presentes en la FIPCP, se comprobó realizando una hidrólisis con ácido sulfúrico. Los resultados obtenidos confirmaron que en torno a 46,3 % de grupos acetilos presentes en la materia prima, continuaban unidos a la cadena de hemicelulosa después del PEV.

Por ello, se llevó a cabo una experiencia de hidrólisis enzimática de la FIPCP con la combinación enzimática *Complex* que incluía una enzima acetilxilano esterasa (*AcX\_E*) además de otras enzimas (*XlnM1*, *Arf51*, *Fe\_E*).

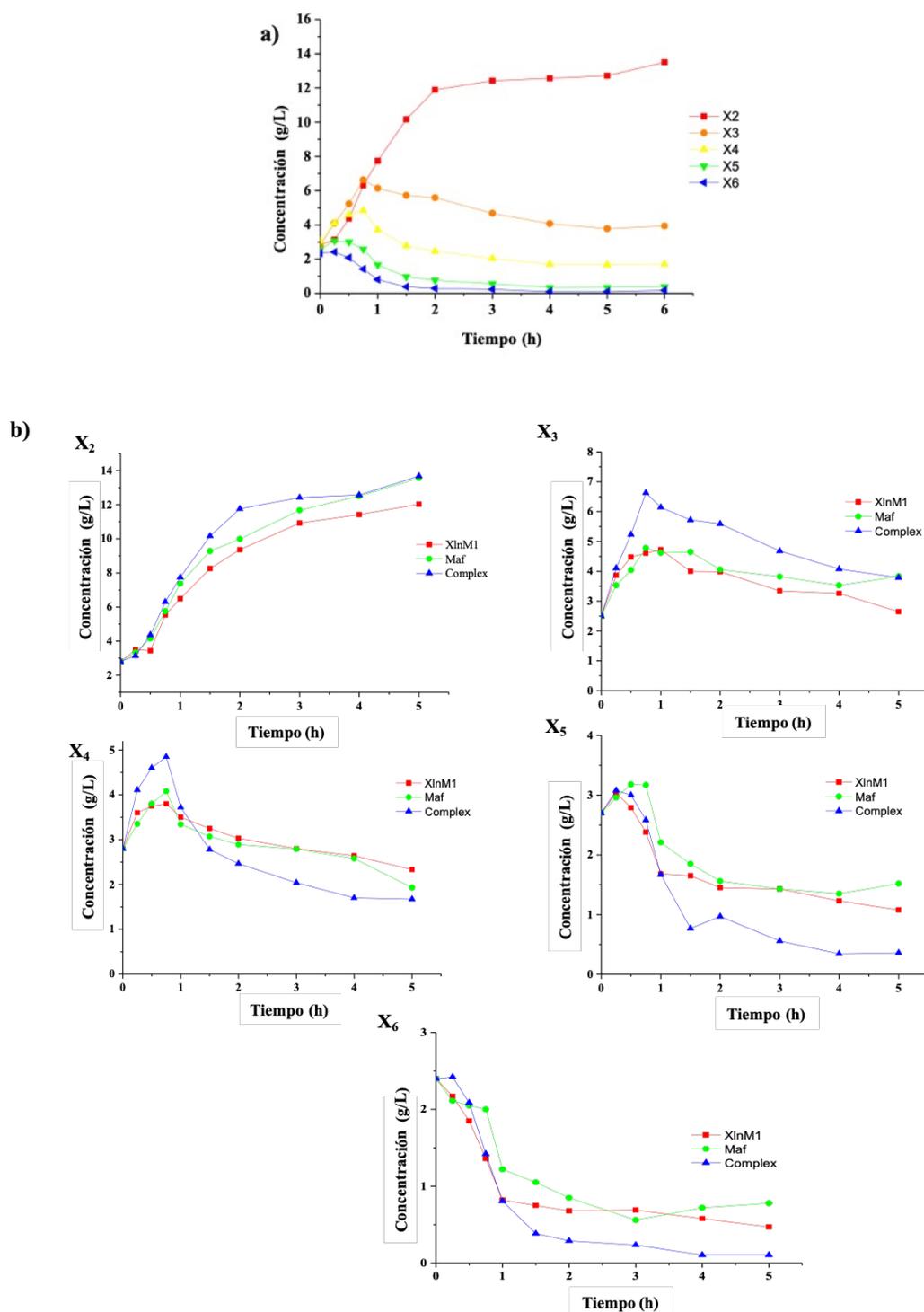
En este ensayo, el comportamiento en la liberación de ácido ferúlico y *p*-cumárico por parte de las enzimas ha sido muy similar al analizado en el ensayo con la mezcla enzimática *Maf* del apartado anterior. En ambos casos se ha producido el máximo de liberación de los ácidos cinámicos a tiempos cortos de reacción (1 h). Con la combinación enzimática *Complex*, la liberación ha sido algo menor obteniendo como máximo valores de 88 y 22 mg/L de ácido ferúlico y *p*-cumárico respectivamente, pudiendo ser atribuido este hecho al impedimento que pudiera producirse por la presencia de las cuatro enzimas. Wu y col. (2017) observaron una limitada acción de la feruloil esterasa al aumentar la concentración de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, debido a que los sustituyentes del xilano impiden la hidrólisis.

A pesar de la incorporación de la enzima acetilxilano esterasa, los rendimientos de producción de ácido acético fueron relativamente bajos (33,7%), originándose una desacetilación incompleta. Esta baja desacetilación de los xilooligosacáridos acetilados,

puede deberse a la baja cantidad de enzima añadida en este ensayo. Otra posible explicación es que el ensayo no se ha llevado a cabo en las condiciones óptimas de pH para esta enzima (pH 7), puesto, que se eligieron unas condiciones de compromiso para todas las enzimas presentes en el ensayo (endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y feruloil esterasa) cuyo pH óptimo de actuación está en el rango 4.5-5, eligiéndose un pH de 4,8 como condiciones de compromiso entre ellas. Otra hipótesis para justificar la baja desacetilación se debe al impedimento producido por sustituyentes en unidades de D-xilanopiranosil próximos. No obstante, en bibliografía se describe la existencia de los oligosacáridos que contienen grupos acetilados resistentes, por lo que la desacetilación total no se produce (Biely y col., 2013).

En la figura 4.21a se representa la evolución de la producción de XOS ( $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_6$ ) con la combinación enzimática *Complex*. Las figuras 4.21b muestran los perfiles de producción de los distintos XOS comparándolo con los resultados obtenidos con la mezcla enzimática *Maf* y con aquellos obtenidos con la enzima *XlnM1*. Durante la HE con la combinación enzimática *Complex*, la mayor concentración de XOS de (DP2-DP6) se produjo a tiempos muy cortos de reacción (45 minutos), a partir del cual la concentración de xilosa y xilobiosa fueron aumentando hasta un valor de 4,5 y 13,7 g/L (tiempo, 5 h), respectivamente. Este aumento se produjo a costa de una disminución de los XOS de DP (3, 4, 5, 6) existentes como ocurre en los otros ensayos de hidrólisis. Esto se debe a que eliminación de los grupos acetilos incrementa las zonas en las que la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa puede actuar, liberando XOS de bajo grado de polimerización (Zhang y col., 2011).

En primer lugar, vemos como la concentración de xilobiosa va aumentando progresivamente a lo largo de la HE en los tres ensayos representados (*XlnM1*, *Maf* y *Complex*), aunque lo valores obtenidos en el ensayo de *Complex*, en general, son ligeramente superiores a los obtenidos con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa *XlnM1* y con la mezcla enzimática *Maf*. La concentración de xilotriosa va aumentando hasta un valor de 6,6 g/L a los 45 min de hidrólisis, a partir de los cuales disminuye hasta un valor de 3,8 g/L.

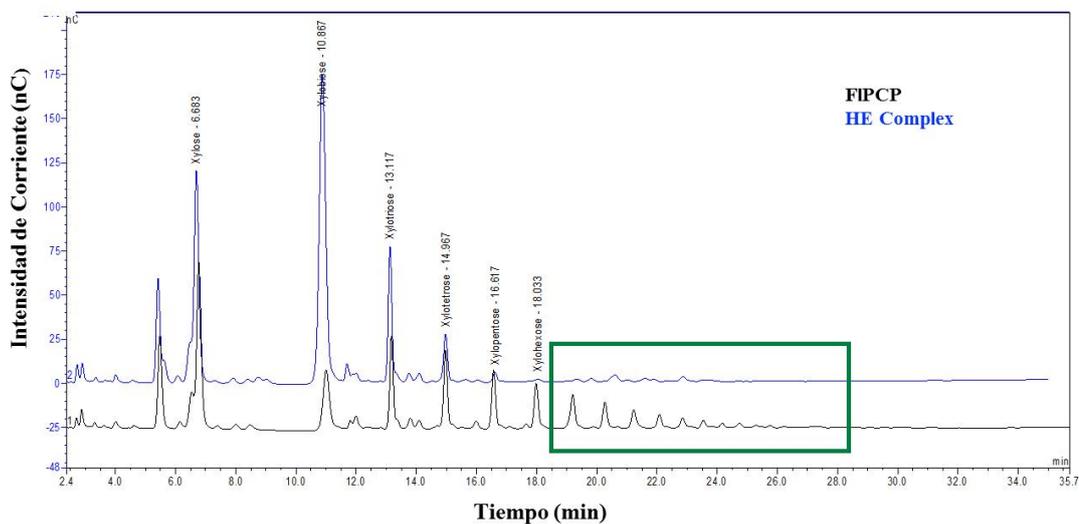


**Figura 4.21.** a) Perfil de producción de los XOS con la combinación enzimática *Complex*. b) Evolución de XOS (X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6</sub>) en la HE con *XlnM1*, mezcla enzimática *Maf* y la combinación enzimática *Complex*

La xilotetrosa alcanzó un valor de 4,8 g/L a 45 min, a partir de los cuales fue disminuyendo a favor de los XOS más pequeños. La xilopentosa presenta un comportamiento similar en los tres ensayos, a 30 min empieza a ser hidrolizado a favor de la formación de XOS de menor grado de polimerización. Así, en el ensayo con la combinación enzimática *Complex*, la concentración de X<sub>5</sub> a 30 min (3 g/L) fue disminuyendo hasta 0,4 g/L a lo largo de la hidrólisis. El xilohexano fue hidrolizado desde el inicio de la reacción hasta valores de 0,1 g/L.

En estas gráficas se observa como los XOS lineales de entre DP4-DP6 son fácilmente hidrolizables por la enzima endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas, ya que, al no estar unidos a ramificaciones, no existe impedimento para su actuación. Lográndose obtener 13,0 g de XOS (expresados en forma de xilosa) con DP2-DP6 por 100g de materia prima.

En el cromatograma de la figura 4.22 se aprecia como los XOS mayores de DP6 presentes en la FIPCP son hidrolizados a compuestos con un grado de polimerización inferior objetivo de esta Tesis.



**Figura 4.22.** Cromatograma de HPAEC/PAD de la HE con la combinación enzimática *Complex* en comparación con la FIPCP sin hidrolizar

#### 4.4.7. Hidrólisis enzimática de la FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas NS50030

Dado que la suplementación con enzimas accesorias a la hidrólisis con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas comerciales puras ha favorecido la despolimerización del prehidrolizado a favor del aumento de la formación de XOS, se han realizado experiencias de HE con una enzima comercial NS50030 formada por varias endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas. Además, esta enzima presenta diversas actividades  $\beta$ -xilosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, endo-glucanasa entre otras (Martínez-Alcalá y col., 2012). Se han realizados ensayos de HE de esta enzima junto con otras enzimas accesorias como son, *Novozym 188* ( $\beta$ -glucosidasa), NS22035 (glucoamilasa), *Arf51*, *AcX\_E* y *Fe\_E*.

##### 4.4.7.1. Hidrólisis enzimática de FIPCP con endo- $\beta$ -1,4-xilanasas NS50030

La acción de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas NS50030 sobre la fracción líquida de la paja de cebada pretratada, produjo la máxima cantidad de oligosacáridos de DP2 a DP6 a las 5 h de hidrólisis, equivalente a un rendimiento de producción del 88,0%. Este rendimiento es similar al obtenido en el ensayo de *Maf* (88,4%), en parte puede deberse a que la enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanasas NS50030 también presenta actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,

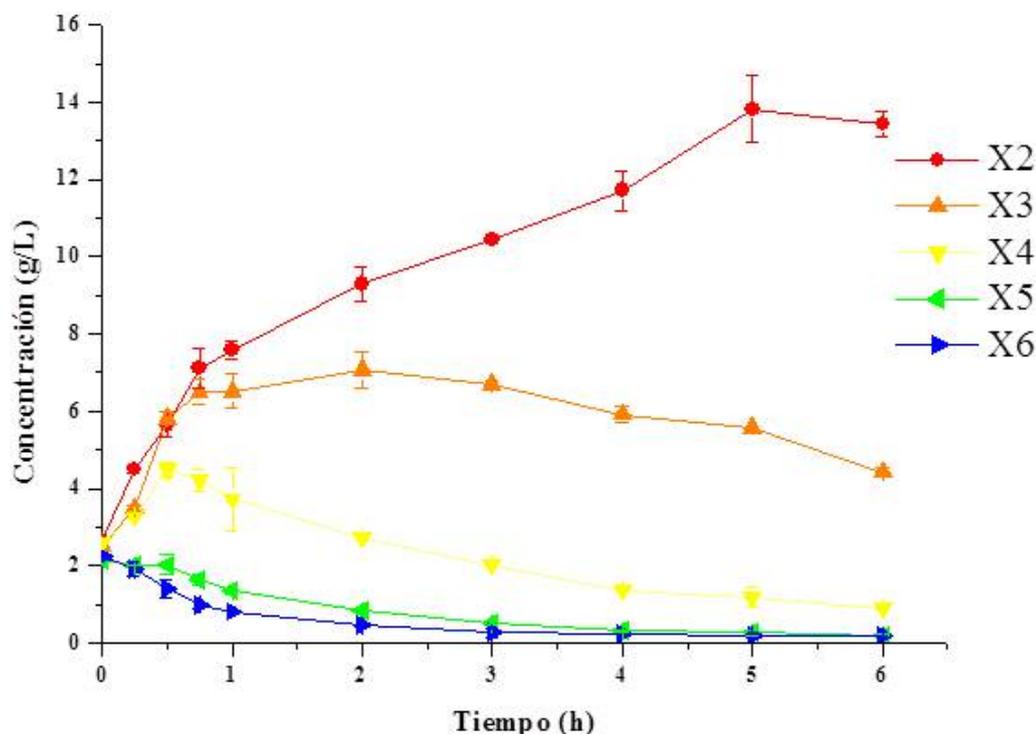
Como en el caso de la utilización de enzimas puras, la xilobiosa y la xilotriosa fueron los XOS mayoritarios generados tras la hidrólisis. A lo largo de la HE la concentración de X<sub>2</sub> fue aumentando hasta alcanzar una concentración máxima de 13,8 g/L, mientras que las concentraciones de X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6</sub> fueron disminuyendo a lo largo de la hidrólisis como se aprecia en la figura 4.23. En dicha figura, también se observa el incremento de producción de X<sub>3</sub> durante las primeras dos horas de la HE, transcurrido este tiempo, la X<sub>3</sub> comienza a descender la concentración, aumentando la concentración de xilobiosa. Estos resultados apoyan la teoría de que la preparación enzimática NS50030 pertenece a la familia de las GH10, ya que tiene un comportamiento similar a las endo-xilanasas de dicha familia.

La máxima cantidad de XOS lograda fue de 12,3 g (expresado como xilosa) /100 g de materia prima o lo que es lo mismo 22,0 g/L de XOS DP2-DP6 expresado como xilosa, los cuales se lograron a las 5 h de hidrólisis. Esta misma dosis de enzima (7,2 U/mL) fue utilizada sobre paja de trigo pretratada (Álvarez y col., 2017) alcanzándose un valor de 22,6

g/L de XOS DP2-DP6 (expresados como xilosa) a 8 h de hidrólisis. Aunque la concentración es similar, los rendimientos de producción de XOS con respecto a materia prima, en este último caso fueron menores (8,9 g XOS/100 g paja trigo). El menor rendimiento obtenido en el caso de la paja de trigo se asocia fundamentalmente a degradación parcial de la fracción de hemicelulosa, debido a las elevadas temperaturas utilizadas en el pretratamiento para la paja de trigo.

En relación con la liberación de xilosa, glucosa y de arabinosa, las cantidades obtenidas suponen un 5,6%, 25,4% y un 76,9% respectivamente de los potencialmente presentes, debido a la actuación de las actividades accesorias que presenta la preparación enzimática *NS50030*.

A pesar del incremento obtenido en la concentración de glucosa cuando se utiliza la preparación enzimática, todavía se encuentra mucha cantidad de glucosa en forma oligomérica. Como se ha comentado anteriormente esta glucosa puede proceder de cierta contaminación que exista con polvo de grano, debido a la presencia de  $\beta$ -glucanos y / o a los oligómeros de glucosa (GOS). La presencia de este tipo de compuestos ha sido confirmada con el análisis estructural de MALDI-TOF-MS, donde se asignaron compuestos formados exclusivamente por hexosas. Por otra parte, se realizó una hidrólisis de la FIPCP con *NS50030* junto con la enzima *Novozym 188* ( $\beta$ -glucosidasa), que hidroliza los enlaces  $\beta$  (1-4), donde se alcanzó un porcentaje de conversión a glucosa del 84%. Además, se comprobó que existe una parte de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ . Para este confirmar este hecho se realizó un ensayo la HE de *NS50030* con glucoamilasa *NS22035*, en cuya hidrólisis se produjo un 41,2 % de la glucosa potencial. A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar, que existe glucosa oligomérica presente en la FIPCP que no forma parte de la hemicelulosa.



**Figura 4.23.** Perfil de producción de XOS durante la HE de la FIPCP con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa comercial NS50030

#### 4.4.7.2. Hidrólisis enzimática de FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa NS50030 junto con las enzimas accesorias (*Arf51*, *AcX\_E* y *Fe\_E*)

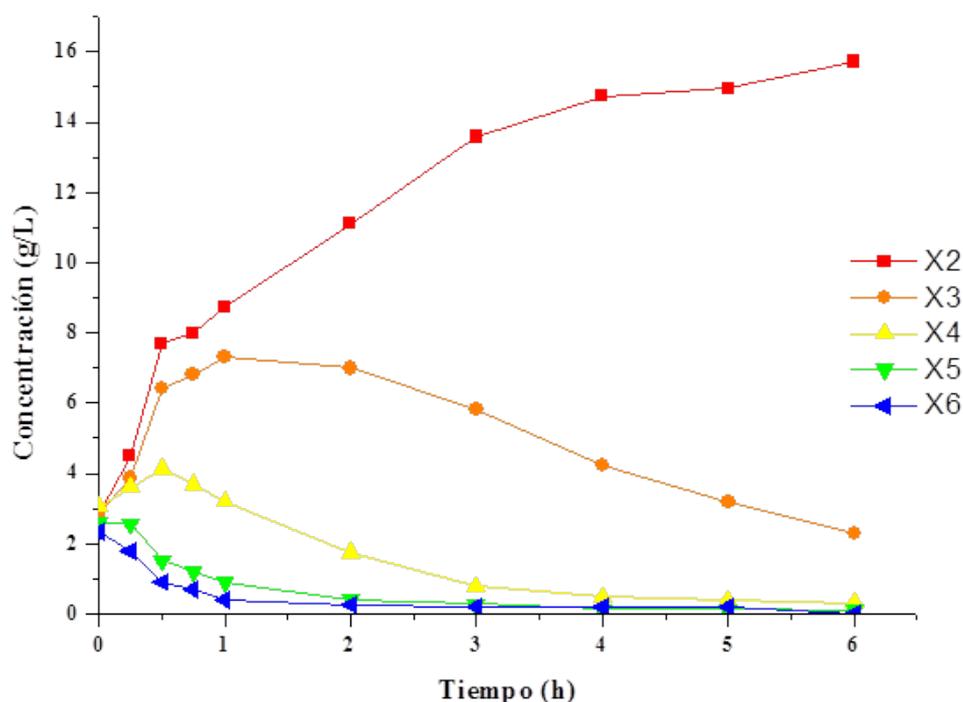
En este ensayo se pretende estudiar el comportamiento de las enzimas complementarias ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, acetilxilano esterasa y feruloil esterasa) con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa comercial, en las mismas condiciones en las que se ha llevado a cabo el ensayo anterior.

La acción de la enzima acetilxilano esterasa liberó una concentración de grupos acetilos procedentes de los oligosacáridos acetilados, medidos como ácido acético de 0,6 g/L, lo que equivale a un 41,2% del ácido acético potencial (referido al valor medido después de una hidrólisis ácida suave con ácido sulfúrico del FIPCP). Este valor es inferior al esperado, este hecho es debido a las condiciones de hidrólisis no fueron las óptimas para la enzima acetilxilano esterasa en cuanto a las condiciones de pH. Los ensayos de hidrólisis en las

condiciones cercanas al pH óptimo para la enzima acetilxilano esterasa supuso un rendimiento de más del 85% de liberación de los grupos acetilos.

El efecto producido por la incorporación de la enzima feruloil esterasa en el medio de hidrólisis con *NS50030* fue de una liberación progresiva de ácidos *p*-cumárico y ferúlico a lo largo del tiempo de hidrólisis. Como en el caso anterior, se produce una liberación paulatina hasta alcanzar una concentración de 30 mg/L de *p*-cumárico y 100 mg/L de ácido ferúlico. La liberación de estos derivados de lignina no ha supuesto un aumento apreciable de arabinosa a la que están enlazados por uniones (1→5).

La xilobiosa fue el XOS mayoritario producido a lo largo de la HE endo-β-(1,4)-D-xilanasas comercial junto a las enzimas accesorias (Fig. 4.24). La xilobiosa fue aumentando hasta una concentración de 15,7 g/L a 6 h. La concentración de xilotriosa aumentó hasta 1 h de hidrólisis con un valor de 7,3 g/L a partir del cual fue disminuyendo hasta valores de 2,3 g/L a 6 h. El resto de los XOS de X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6</sub> fueron hidrolizándose y transformándose en xilobiosa. A pesar del aumento de la xilobiosa a 6 h, la mayor concentración de XOS (DP2-DP6) se produjo a las 3 h de hidrólisis logrando obtener 20,6 g/L de XOS (DP 2-DP6) existentes en la FIPCP. Este valor corresponde a una producción de 12,1 g de XOS (DP 2-DP6) expresados en forma de xilosa /100 g de paja de cebada. Valor muy similar al obtenido en el ensayo de la *NS50030* individualmente, con lo que se puede concluir que las enzimas complementarias *Arf51*, *AcX\_E* y *Fe\_E* no ayudan al complejo enzimático *NS50030* en la liberación de XOS con (DP2-DP6).



**Figura 4.24.** XOS liberados en la HE de FIPCP con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *NS50030*, suplementada con enzimas accesorias (*Arf51*, *AcX\_E* + *Fe\_E*)

Con todo este estudio realizado sobre la FIPCP, a lo largo de los ensayos llevados a cabo con las distintas preparaciones enzimáticas, se han conseguido logrado mejorar los rendimientos de producción de XOS con DP2-DP6 respecto a los iniciales presentes en la FIPCP producidos por el pretratamiento de explosión a vapor. Así se obtiene una mejora del 25,9% utilizando la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH10 y del 43,4% al utilizar la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas GH11. Un incremento del 53,6 % fue logrado al utilizar las enzimas *XlnM1* y *XlnTh*. Con la utilización de la mezcla enzimática *Maf* el incremento fue 56%. Los mejores resultados se lograron utilizando la mezcla *Complex*, que permite incrementar la producción de XOS con DP2-DP6 en un 64,1%. Finalmente, con el ensayo de *NS50030* y *NS50030* con accesorias los incrementos fueron de un 55,4% y 53,1% respectivamente.

El siguiente avance en la investigación es la purificación de los estos xilooligosacáridos obtenidos en la hidrólisis enzimática.

#### **4.5. Estrategia de purificación para la obtención de XOS**

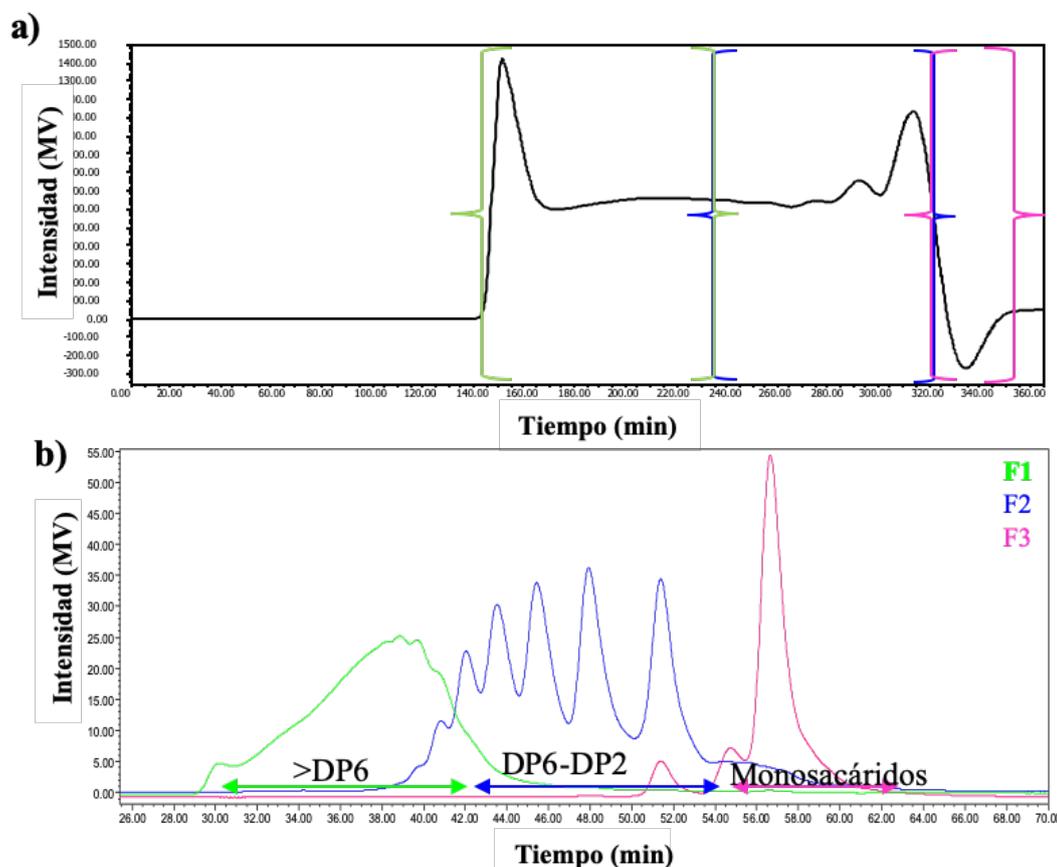
El siguiente reto planteado en la Tesis, es la purificación de los XOS (DP2-DP6) obtenidos a partir de la FIPCP para poder estudiar sus propiedades prebióticas. Esta purificación se ha llevado a cabo utilizando distintos métodos que incluyen la cromatografía de exclusión molecular mediante la utilización de una columna semipreparativa y técnicas de ultrafiltración.

##### **4.5.1. Purificación de la FIPCP mediante cromatografía de exclusión molecular**

El fraccionamiento se llevo a cabo mediante cromatografía SEC como se explica en el apartado.3.6.1 (pág. 96). La elución se fue registrando en un equipo cromatográfico HPLC con un detector de índice de refracción y el perfil de elución se muestra en la figura 4.25a.

Con el fin de obtener una fracción que contiene los compuestos con DP2-DP6, se optimizó el proceso de fraccionamiento utilizando las técnicas de HPSEC y HPAEC-PAD hasta lograr establecer una buena separación con los criterios deseados de los polisacáridos y monosacáridos.

La fracción líquida del paja de cebada pretratada se separó en tres fracciones en función de su tamaño molecular: una primera fracción F1 colectada desde 140 hasta 230 min que contiene los compuestos de mayor peso molecular >DP6, una segunda fracción F2 recogida desde 230 a 315 min conteniendo los compuestos con grado de polimerización entre DP2-DP6 y una tercera fracción F3 que contiene los monosacáridos y otras moléculas pequeñas producidas durante el pretratamiento que no han sido eliminadas con la resina de lecho mixto como se indica en el apartado 4.3 (pág. 123), como puede ser la presencia de furfural o HMF, ya que todavía permanece el 25% de estos compuestos presentes en la materia original. Esta fracción se recolecta desde 315 a 350 min, como se muestra en el perfil de elución mediante la columna semipreparativa (Fig. 4.25a).



**Figura 4.25.** Perfil de elución de FIPCP a) en la columna semipreparativa HPSEC Bio-Gel P2; b) Distribución de los XOS analizados por HPSEC-IR en cada una de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular

Las tres fracciones separadas, después de ser liofilizadas, fueron analizadas por cromatografía de HPSEC estableciéndose el rango de pesos moleculares de cada una de ellas.

El rango de pesos moleculares de las fracciones se estimó utilizando la cromatografía de HPSEC con tres columnas de diferente tamaño de corte (10000 Da, 5000 Da, 3000 Da) conectadas en serie y comparando con estándares de diversos pesos moleculares como son los dextransos (>12, 5 y 1 KDa); pullulan (6000, 1300, 340 Da) y X<sub>2</sub>-X<sub>6</sub>. En la figura 4.25b se puede observar la distribución por peso molecular de los oligosacáridos (compuestos mayores de DP6, compuestos entre DP2-DP6 y compuestos de bajo grado de polimerización o monosacáridos) contenidos en cada una de las tres fracciones analizadas mediante cromatografía HPSEC.

La fracción F1 contiene los compuestos cuyos pesos moleculares son >1000 Da siendo estos más del 90% de los compuestos contenidos en la muestra. En la fracción F2 están incluidos los compuestos en el rango 1000-300 Da. El porcentaje de compuestos con un grado de polimerización entre DP2-DP6 es del 92% en esta fracción y, la fracción F3 contiene los compuestos con pesos moleculares inferiores a 300 Da siendo los monosacáridos los compuestos mayoritarios en esta fracción (86%).

Además, el contenido en azúcares en cada una de las fracciones se determinó cuantitativamente por hidrólisis total con ácido sulfúrico. En la tabla 4.6 se recoge la composición de los carbohidratos presentes en cada una de las fracciones obtenidas por la separación de la FIPCP utilizando la columna Bio-Gel P2.

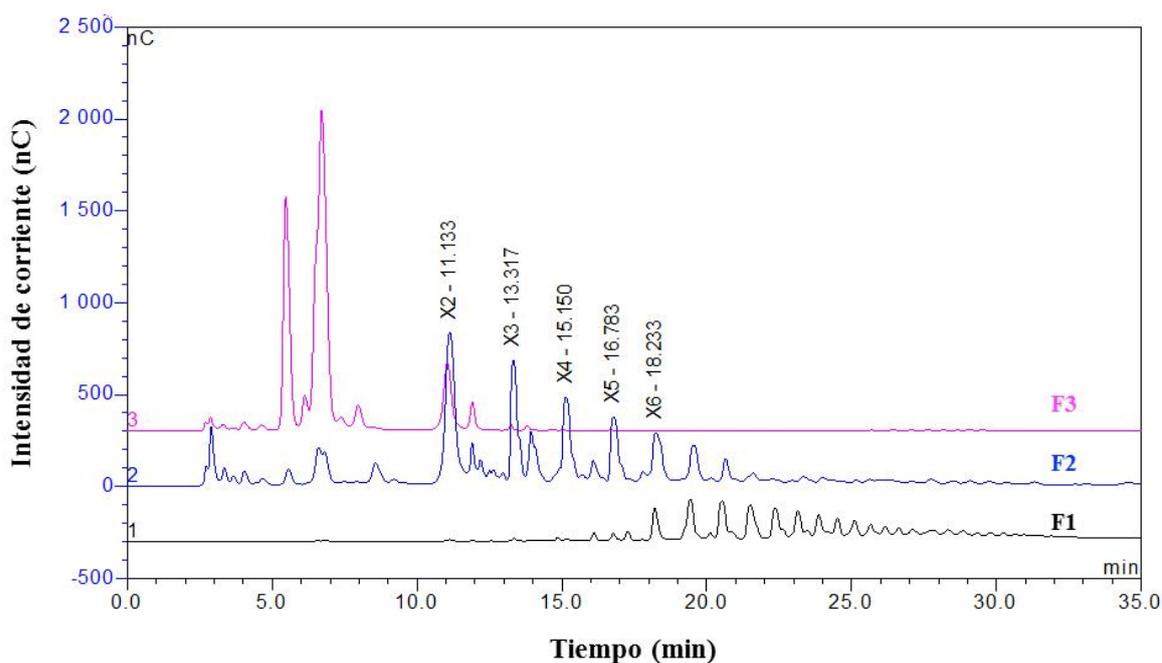
En la fracción F1 se encuentra la mayor concentración de glucosa, en forma de glucooligosacáridos o unida a algún xilooligosacáridos de alto peso molecular. En la muestra FIPCP, con la técnica de MALDI-TOF-MS (resultados recogidos en el apartado 4.6.1 pág. 171) se confirma la presencia de GOS hasta DP8 que al tener un tamaño superior a 1000 Da, han quedado recogidos en la fracción 1 (F1). Los derivados de xilosa se encuentran mayoritariamente en la fracción F2, como era de esperar, ya que la separación se realizó con el objetivo de obtener la mayor cantidad posible de xilooligosacáridos de bajo grado de polimerización. Y en la tercera fracción se encuentran los monosacáridos mayoritariamente. Para obtener esta información, se ha utilizado las técnicas de HPLC/IR y HPAEC-PAD. La cuantificación de los xilooligosacáridos se ha llevado a cabo con esta última técnica.

**Tabla 4.6.** Composición en forma oligomérica y monomérica (g/L) de las fracciones recogidas mediante cromatografía de exclusión molecular

Fracción	Oligosacáridos			Monosacáridos		
	GOS	XOS	AOS	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
F1	4,8	8,8	1,0	-	-	-
F2	0,1	10,9	0,4	0,8	0,4	0,2
F3	-	0,16	0,2	0,3	3,0	2,0

En la figura 4.26, se muestran los cromatogramas de cada una de las fracciones y la distribución de los XOS contenidos en cada una de ellas. La fracción F3 corresponde a la elución de los monosacáridos y se observa un pico cromatográfico correspondiente a la xilobiosa (0,5 g/L). El cromatograma de la fracción F2 muestra la siguiente composición de xilooligosacáridos: 2,3 g/L X<sub>2</sub>; 2,1 g/L X<sub>3</sub>; 2,4 g/L X<sub>4</sub>; 2,3 g/L X<sub>5</sub> y 2,0 g/L X<sub>6</sub> (no podemos cuantificar X<sub>7</sub> y X<sub>8</sub> ya que no existe patrón comercial). Estos resultados también pueden expresarse como 6,6 g de XOS con DP2-DP6 (expresados como xilosa) por 100 g de materia prima. F1 corresponde con los compuestos mayores de DP6, de los cuales no se puede realizar la cuantificación mediante esta técnica por no disponer de estándares comerciales.

En la figura también se aprecian picos cromatográficos que pueden corresponder con otros oligosacáridos sustituidos que irán reduciéndose a lo largo de las hidrólisis enzimáticas realizadas en el apartado 4.5.1.1 (pág. 163).



**Figura 4.26.** Distribución de los XOS analizados por HPAEC-PAD en cada una de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular

La utilización de esta técnica de cromatografía de exclusión molecular ha sido estudiada en la bibliografía como método de fraccionamiento y purificación de XOS en otro

tipo de biomásas. Así, Moniz y col. (2014) la utilizaron para el fraccionamiento de XOS de paja de arroz en fracciones que contiene pequeños polisacáridos y oligosacáridos (DP >23), oligosacáridos de grado de polimerización entre 23 y 3 y finalmente en disacáridos, monosacáridos y bioproductos (como furanos, ácido acético, etc.). Este fraccionamiento permitió obtener muestras para ser usadas en diferentes aplicaciones, como por ejemplo, los polisacáridos se utilizaron para producir hidrogeles (Li y Pan, 2010; Palm y Zacchi, 2004). A partir de poda de olivar pretratado mediante procesos de autohidrólisis Cara y col. (2012) lograron separar oligosacáridos con DP entre 7-25.

La purificación de la FIPCP mediante cromatografía de exclusión molecular ha permitido separar una fracción (muestra F2) con un grado de pureza en XOS superior al 92%. Este grado de pureza es suficiente para ser usados como prebiótico comercial (75-95%) (Moure y col., 2006). por lo que se llevaron a cabo los ensayos de actividad prebiótica utilizando este sustrato como fuente de carbono.

Este resultado es superior a los obtenidos por Cara y col. (2012), que publicaron valores de pureza entre 82 y el 90%, cuando se aplicó esta metodología a la fracción líquida obtenida de residuo de poda pretratado mediante pretratamientos hidrotérmicos (pretratamiento con agua caliente en fase líquida). La utilización de técnicas cromatográficas mediante exclusión molecular supone una ventaja respecto al empleo de la purificación con membrana, ya que permite separar los XOS en base a su DP y no en un rango concreto como ocurre con la purificación con membranas.

En base a todos los resultados obtenidos, se ha seleccionado la muestra F2 como la fracción ideal para ser sometida a la evaluación del efecto prebiótico (resultados recogidos en el apartado 4.7, pág. 185) y su correspondiente caracterización estructural (apartado 4.6, pág. 171).

Por otra parte, la fracción F1 se sometió a hidrólisis enzimática con el objetivo de obtener mayor cantidad de XOS con DP2-DP6 lo que supondría una mejoría el proceso global de la utilización del residuo agrícola. Los resultados obtenidos se describen en el apartado siguiente.

#### 4.5.1.1. Hidrólisis enzimática de la F1

La fracción F1 obtenida a partir del fraccionamiento de la muestra F1PCP utilizando la columna semipreparativa Bio-Gel P2 se sometió a una hidrólisis enzimática con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasasa comercial *NS50030*, junto con las siguientes enzimas complementarias:  $\beta$ -glucosidasa (*Novozym 188*), acetilxilano esterasa (*AcX\_E*) y feruloil esterasa (*Fe\_E*). Las condiciones en las que se llevó a cabo la hidrólisis fueron similares a los ensayos descritos anteriormente. Este ensayo de hidrólisis enzimática es similar al del apartado 4.4.7.2, pero se ha sustituido la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa por la actividad glucosidasa, ya que la F1 contiene mucha cantidad de oligosacáridos de glucosa. Se ha incluido la utilización de la enzima feruloil esterasa, debido a la presencia de restos feruloílicos, detectado en los estudios anteriores.

Gracias a la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa se ha logrado liberar el 57,4% de la glucosa presente en esta fracción, ya que se hidrolizan los GOS presentes en la F1.

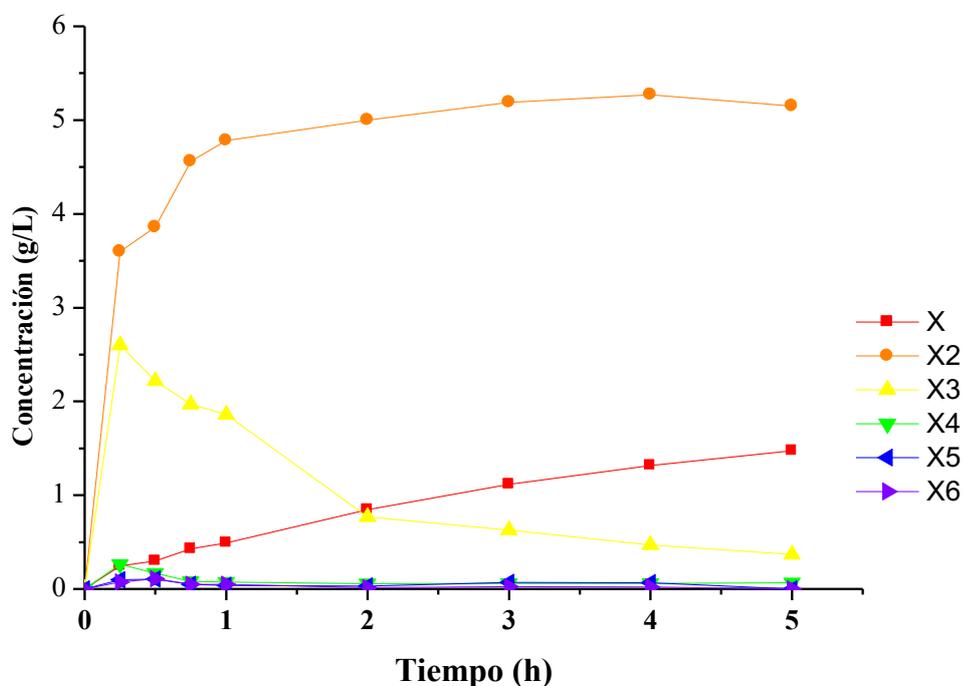
Durante el proceso de hidrólisis enzimática, la arabinosa también fue cuantificada logrando alcanzar una concentración de 0,2 g/L, que equivale al 20,6% de la arabinosa potencial presente en la fracción F1. La presencia de arabinosa monomérica después de la hidrólisis enzimática se debe a la acción de la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa presente como actividad accesoria en la *NS50030*.

En relación con la producción de ácidos cinámicos, también se observó la ruptura de los enlaces ésteres debido a la acción de la enzima feruloil esterasa alcanzando una concentración de 5,2 mg/L de ácido cumárico y 16,2 mg/L de ácido ferúlico.

La fracción F1 contiene el 49,7% de los grupos acetilos presentes en la fracción líquida (F1PCP), la acetilxilano esterasa logra la ruptura del enlace alcanzando una concentración de acético 0,4 g/L en el medio de la hidrólisis, lo que supone una desacetilación del 66,7%.

La despolimerización de la F1 bajo la acción combinada de las enzimas añadidas produjo la formación de XOS de grado de polimerización de DP2 a DP6 a tiempos cortos de

hidrólisis. A una hora de hidrólisis se logró la mayor cantidad de XOS de DP2-DP6, de los cuales el 72,4% correspondía a XOS (DP2-DP3). En la figura 4.27 se puede apreciar como a medida que aumenta la formación de xilobiosa y xilosa, disminuye la concentración de xilotriosa. A tiempos cortos de hidrólisis se produce una ligera formación de compuestos de X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6</sub>, que comienza a hidrolizarse progresivamente produciendo un pequeño aumento de la concentración de xilobiosa llegando a una concentración de 5,6 g/L y 1,3 g/L de xilosa monomérica a 4 h. A partir de este tiempo no se aprecia un cambio en la concentración de los compuestos.



**Figura 4.27.** Perfil de producción de xilosa y XOS en la HE de la fracción F1 con endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas (*NS50030*) y las enzimas accesorias *Novozym 188*, *AcX\_E* y *Fe\_E*

En este ensayo se ha producido un rendimiento de producción de XOS del 72%, lo que supone una cantidad equivalente de 3,9 g de XOS (expresado como xilosa) con respecto a 100 g de materia prima. Con esta estrategia propuesta, las fracciones F1 y F2 permiten obtener una producción total de XOS (DP2-DP6) de 10,5 g (expresado como xilosa) con respecto a 100 g de materia prima. El fraccionamiento propuesto utilizando la cromatografía

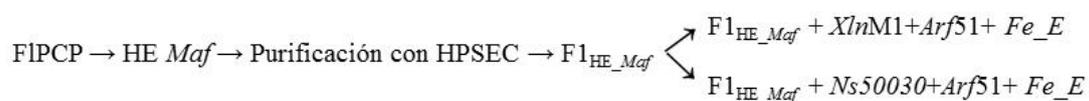
de exclusión molecular no permite mejorar los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática directa (en una única etapa) de la FIPCP con el coctel enzimático **Complex**, que podríamos considerar que contiene enzimas equivalentes, en el que se obtenía 12,9 g XOS (expresado como xilosa) con respecto a 100 g de materia prima. El menor rendimiento se asocia a una hidrólisis incompleta de la F1.

#### 4.5.1.2. Purificación de los polisacáridos no hidrolizable durante la HE de la FIPCP con *XlnM1+Arf51+Fe\_E*

En todos los casos de hidrólisis enzimáticas realizadas utilizando la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasasa *XlnM1* se han obtenido unos rendimientos de producción de xilooligosacáridos superiores al 80%, pero no se ha logrado hidrolizar por completo la hemicelulosa soluble, ya que existe una fracción recalcitrante. Para lograr conseguir hidrolizar esta fracción se plantea la siguiente estrategia: separar los polisacáridos no hidrolizados al final de la hidrólisis de los compuestos que tienen un grado de polimerización entre DP2-DP6.

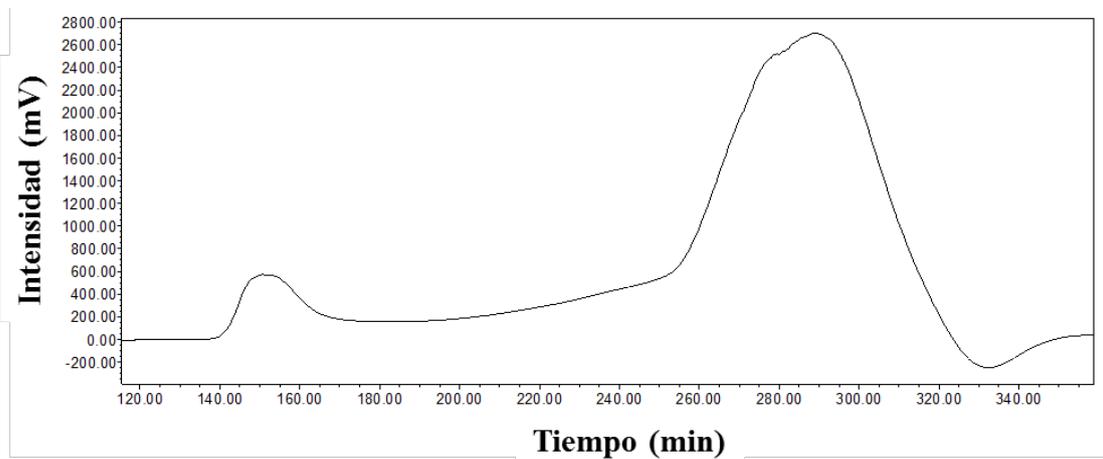
Después de realizar la hidrólisis enzimática con la mezcla enzimática *Maf*, se realiza la etapa de purificación con la cromatografía de exclusión molecular Bio-Gel P2 siguiendo la metodología de trabajo descrita en el apartado 4.5.1 (pág. 158) con la finalidad de evitar la hidrólisis de los XOS y por tanto la disminución de los XOS con DP2-DP6 producidos durante la HE.

El esquema de la estrategia utilizada fue el siguiente:



La elución se registró, como en el caso anterior, con un detector de índice de refracción cuyo perfil está representado en la figura 4.28. Los tiempos de elución colectados fueron los mismos que en la experiencia de fraccionamiento de la FIPCP para obtener la F1, F2 y F3. En este ensayo la fracción que contiene los carbohidratos de mayor peso molecular

(entre DP4-DP10) procedente de la hidrólisis enzimática de la FIPCP con la mezcla enzimática *Maf* se ha denominado F1<sub>HE\_Maf</sub>.

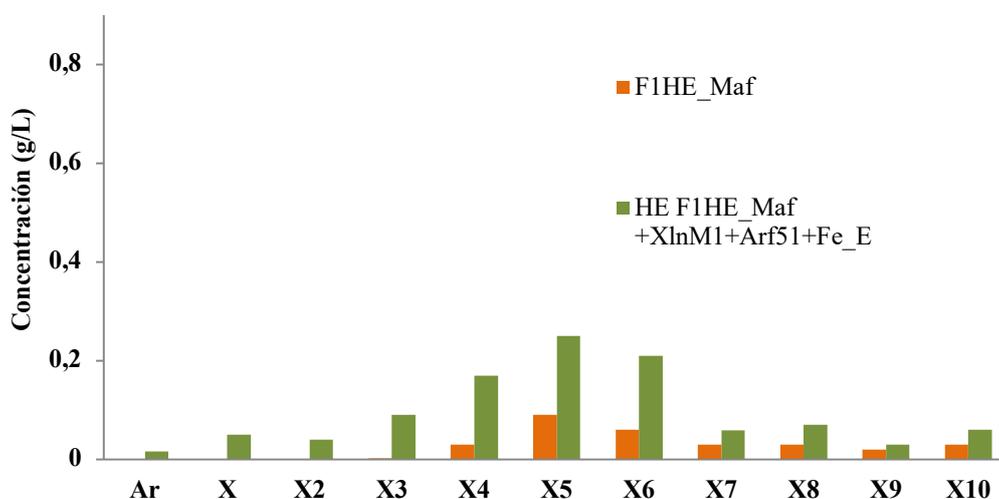


**Figura 4.28.** Perfil cromatográfico HPSEC de FIPCP hidrolizado enzimáticamente con el ensayo *Maf*

La fracción F1<sub>HE\_Maf</sub> obtenida se sometió a una segunda etapa de hidrólisis enzimática. Esta segunda hidrólisis se realizó con dos ensayos en paralelo, utilizando dos endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas uno con *XlnM1* y el otro ensayo con *NS50030*. Ambas endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas fueron complementadas con las enzimas accesorias *Arf51* y *Fe\_E*.

En la hidrólisis enzimática de la fracción F1<sub>HE\_Maf</sub> con la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* (Fig. 4.29) se observó un pequeño aumento en la concentración de glucosa de 40 mg/L. La concentración de arabinosa alcanzada fue de 16 mg/L. Las concentraciones de ácidos *p*-cumárico y ferúlico fueron 1,9 y 7,8 mg/L, respectivamente. También se apreció una amplia distribución de grado de polimerización en los xilooligosacáridos producidos en este ensayo, desde monosacáridos hasta XOS de DP10.

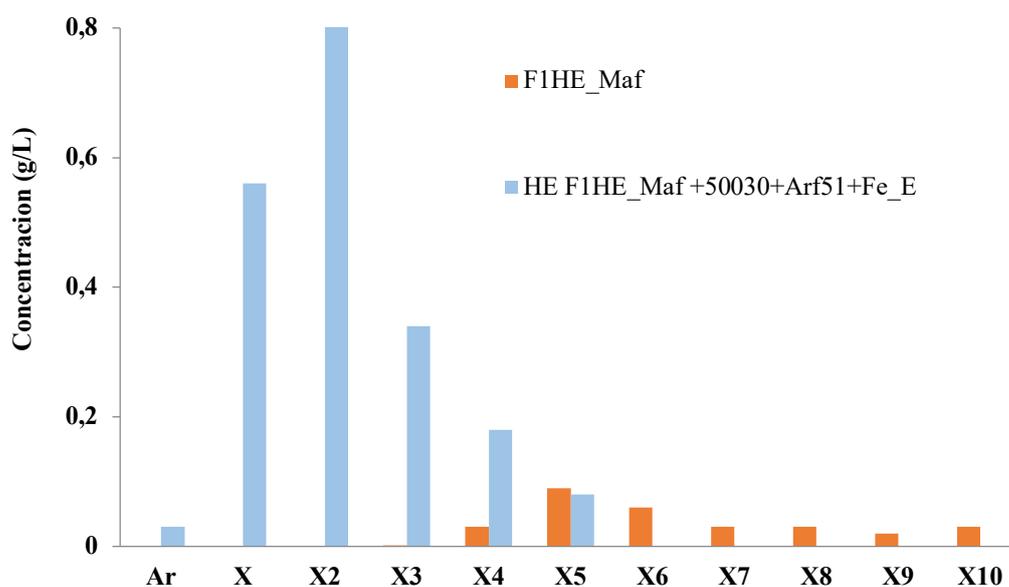
Por otra parte, con el ensayo utilizando la *NS50030* se alcanzaron valores de concentraciones de glucosa, xilosa y arabinosa de 0,3 g/L, 0,6 g/L y 30 mg/L respectivamente. La alta concentración de xilosa liberada se debe a que esta enzima presenta actividad xilosidasa (Martínez-Alcalá 2012).



**Figura 4.29.** Distribución de monosacáridos y XOS contenidos en la fracción F1<sub>HE\_Maf</sub> y los producidos en la HE de la F1<sub>HE\_Maf</sub> con *XlnM1* suplementado con *Arf51* y *Fe\_E*

En la figura 4.30 se observa la conversión de los XOS de grado de polimerización entre 5 y 10 en xilobiosa y xilotriosa alcanzándose una concentración de 0,8 y 0,3 g/L respectivamente. La formación de XOS de bajo grado de polimerización se asocia a enzimas de la familia GH10. No obstante, en el caso de la *NS50030* hay que tener en cuenta que esta preparación enzimática presenta cierta actividad xilosidasa, que podría explicar el hecho de la formación de XOS de bajo grado de polimerización.

La separación de la fracción recalcitrante y posterior hidrólisis permiten un incremento de 0,4 g y 0,8 g de XOS (expresados como xilosa) por cada 100 g de materia prima seca para el caso de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas *XlnM1* y *NS50030*, respectivamente. En ambos ensayos se alcanza unos rendimientos de hidrólisis superiores al 91%.



**Figura 4.30.** Distribución de monosacáridos y XOS contenidos en la fracción  $F1_{HE\_Maf}$  y los producidos en la HE de la  $F1_{HE\_Maf}$  con  $NS50030$  junto con  $Arf51$  y  $Fe\_E$

En base a los resultados obtenidos, se puede establecer que la HE de la FIPCP seguida de la separación de la fracción recalcitrante mediante cromatografía de exclusión molecular y posterior HE permite obtener 12,7 g XOS (DP2-DP6) (expresados como xilosa)/100 g de materia prima cuando se utilizó como endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas  $XlnM1$  y de 13,1 g XOS (DP2-DP6) (expresados como xilosa)/100 g de materia prima con la  $NS50030$  complementadas ambas con las enzimas accesorias  $Arf51$  y  $Fe\_E$ .

En este caso, los resultados obtenidos con esta estrategia son bastante similares a los obtenidos con el coctel enzimático **Complex** (12,9 g XOS (expresado como xilosa) con respecto a 100 g de materia prima) utilizando como sustrato la FIPCP (apartado 4.4.6.2, pág. 149). En cambio, son mejores que los obtenidos en el apartado 4.5.1.1 (hidrólisis de la F1), por lo que se puede concluir que la prehidrólisis es necesaria.

#### 4.5.2. Obtención de XOS mediante purificación por membranas

Otra estrategia empleada para la purificación de XOS, fue la utilización de membranas de filtración (ultrafiltración y nanofiltración). Para ello se utilizaron, membranas

con distinto tamaño de corte (5000 y 1000 Da) con el objetivo de obtener xilooligosacáridos de bajo peso molecular a partir de la hemicelulosa solubilizada en el pretratamiento EV.

La fracción soluble del pretratamiento (sin poner en contacto con la resina de intercambio mixto) contiene compuestos de un peso muy superiores a 5000 y 1000 Da. Estos compuestos podrían ser o bien restos de lignina unida a la hemicelulosa o polisacáridos solubles que se solubilizaran durante el pretratamiento de EV. Mediante la utilización de métodos de filtración (ultrafiltración) se obtuvieron unas corrientes denominadas retenidos 1 y 2 (Fig. 3.6) formadas por compuestos cuyo peso molecular es superior al corte molecular de la membrana utilizada y un permeado que contiene compuestos con un peso molecular teórico de alrededor o inferior a 1000 Da que sería la fracción de XOS que se ha denominado XOS3 (después de exponerla al contacto de la resina de lecho mixto y liofilizarla) (Fig. 3.6).

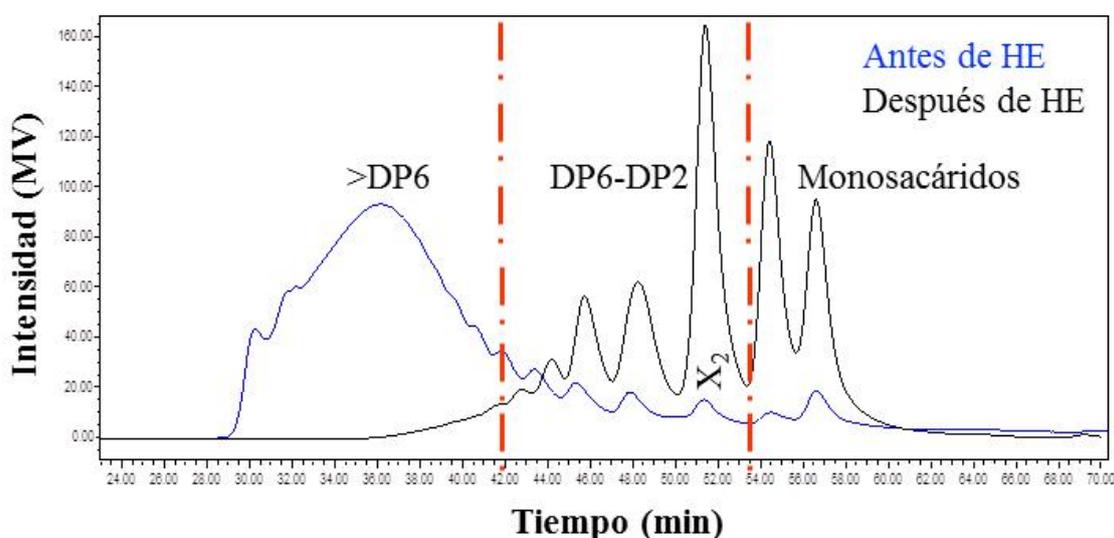
Ambos retenidos 1 y 2 son juntados ya que contienen mayoritariamente polisacáridos solubles y oligosacáridos de alto grado de polimerización (perfil cromatográfico recogido en la figura 4.31) que no han podido atravesar las membranas. Así mismo, están presentes compuestos de menor tamaño no esperados en esta fracción. Una explicación puede deberse al hecho de que los sistemas de filtración de membranas sufren un ensuciamiento o *fouling* de la membrana debido a la deposición de sustancias disueltas sobre su superficie externa y/o poros, disminuyendo el flujo del permeado lo que conlleva a una reducción en el rendimiento de la separación (Córdova y col., 2016, 2019). Estos retenidos se sometieron a una hidrólisis enzimática para transformar los polisacáridos y oligosacáridos en los compuestos deseados (DP2-DP6).

La hidrólisis se llevó a cabo utilizando una mezcla enzimática que incluía la enzima *XlnM1* con actividad endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas y la preparación enzimática *Novozym 188* (actividad mayoritaria  $\beta$ -glucosidasa). La selección de la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasas se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, mientras que el preparado enzimático *Novozym 188* se utilizó debido a la presencia de compuestos de GOS o  $\beta$ -glucanos presentes en los retenidos.

En los cromatogramas de la figura 4.31, se aprecia como la muestra formada por los retenidos recogidos antes de la hidrólisis contiene un alto porcentaje (77,9%) de compuestos

con grado de polimerización superior a DP6 y después de la hidrólisis este valor se reduce considerablemente.

La muestra obtenida tras la HE, se sometió a un nuevo proceso de filtración, mediante la utilización de nanomembrana (1000 Da), con el fin de separar los compuestos que continúan teniendo un grado de polimerización mayor de DP6. Así, el análisis del nuevo permeado mostró un contenido en compuestos con un DP > a 6 del 4,0%, mientras que más del 60% de los compuestos analizados presentaban un grado de polimerización entre DP2-DP6. El porcentaje de monosacáridos y compuestos de bajo peso molecular también ha aumentado hasta 35,9%. La fracción en la que se encuentran xilooligosacáridos con grado de polimerización entre DP2-DP6 fueron purificados posteriormente mediante la utilización de resina de lecho mixto previamente a ser liofilizados, dando lugar al producto denominado XOS2.

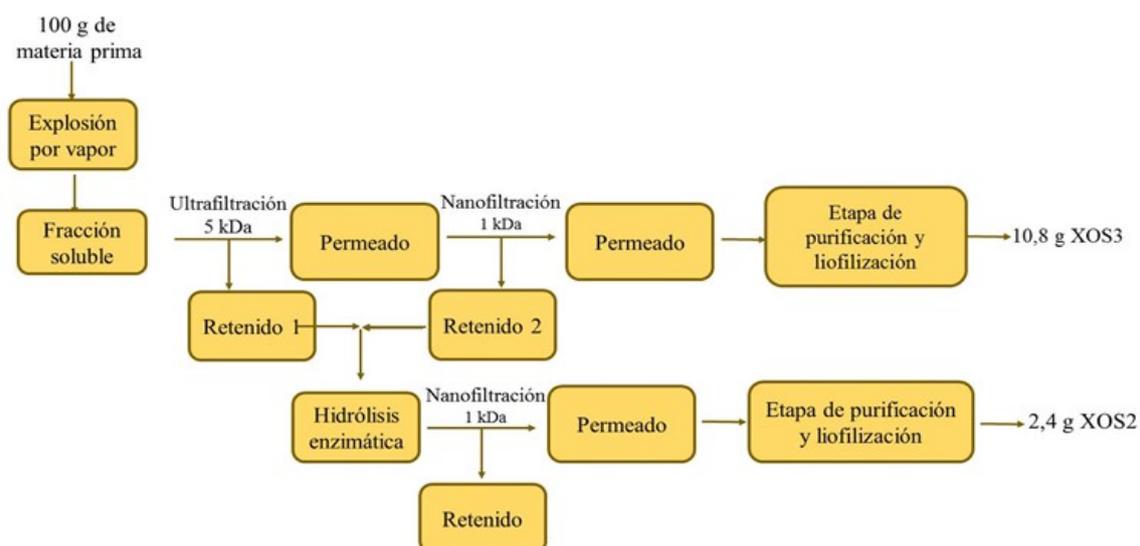


**Figura 4.31.** Cromatograma de HPSEC/IR antes y después de la hidrólisis enzimática de la muestra que contiene a los compuestos retenidos en el proceso de ultra/nanofiltración

Se analizaron la composición del material de partida y de los compuestos obtenidos tras la hidrólisis enzimática y con estos datos se calculó el balance másico de esta estrategia. Un esquema del proceso seguido se muestra en la figura 4.32. A partir de 100 g de materia

prima se obtuvieron 10,8 g de sólido XOS3 con una pureza en carbohidratos del 91% y 2,4 g de sólido XOS2 cuya pureza en carbohidratos es del 83%.

Estos productos (XOS2 y XOS3) se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de actividad prebiótica, así como su caracterización estructural.



**Figura 4.32.** Balance del proceso de purificación de membrana

#### 4.6. Caracterización estructural de los xilooligosacáridos

La estructura de los oligosacáridos (grado de polimerización, tipo de enlace, monómeros, etc.) se relaciona con el efecto que produce sobre la flora intestinal (Rastall y col., 2005). El conocimiento de la caracterización estructural del material es esencial para poder conocer tanto el grado de polimerización como la estructura de los XOS de interés (Yang y col., 2011). Para llevar a cabo este estudio se han utilizado las técnicas analíticas de MALDI-TOF-MS y FTIR.

##### 4.6.1. Análisis mediante MALDI-TOF-MS

Esta técnica fue utilizada con el fin de conocer detalles tanto de la longitud de la cadena como de la naturaleza de las ramificaciones de los xilooligosacáridos presentes en cada sustrato. En la tabla 4.7, se muestra una atribución estructural de señales m/z en espectros MALDI-TOF-MS para los productos seleccionados, F2 (Fig. 3.5 pág. 97) y XOS1,

XOS2, XOS3 (Fig. 3.6, pág. 99). Los iones moleculares de oligómeros lineales y sustituidos se identificaron como aductos de sodio y potasio. El espectro de MALDI-TOF-MS de cada sustrato se muestra en la figura 4.33.

En el análisis del producto XOS1 se han identificado una gran variedad de compuestos. Se han asignado las señales a compuestos con distintos sustituyentes y diferente grado de sustitución, así como el tipo de carbohidrato presente en la cadena. Esto se puede explicar basándose en el hecho de que estos OS proceden directamente del pretratamiento, es decir, la explosión por vapor solubiliza a la hemicelulosa gracias al proceso de autohidrólisis que se produce al liberarse el ácido acético que forma parte de este tipo de hemicelulosa lo que provoca una disminución en el pH facilitando la ruptura de los enlaces entre las unidades de la hemicelulosa. Así en la FIPCP, se han detectado compuestos que pueden asignarse con compuestos formados exclusivamente por pentosas, compuestos que tienen sustituyentes de acetilo, compuestos formados por hexosas etc.

Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con los encontrados en la bibliografía para los oligosacáridos generados por el tratamiento hidrotérmico de varios subproductos ricos en hemicelulosas (Dávila y col., 2019; Ho y col., 2018; Rasmussen y col., 2017; Ruiz y col., 2017).

Los datos de MALDI-TOF-MS detectan la presencia de xilooligosacáridos lineales no sustituidas con DP en el rango de 4-10. Estos compuestos se habían observado en el análisis realizado con HPAEC/PAD, tal como se muestra en la figura 4.3 (pág. 122). Otros xilooligosacáridos con un grado de polimerización entre 4-15 presentan uniones con grupos acetilo cuya asignación estructural corresponde, por ejemplo, a  $P_{11}AcNa$ ;  $P_{11}Ac_2Na$ ;  $P_{11}Ac_3Na$ .

De acuerdo con la composición de la FIPCP, la mayoría de los oligómeros son fragmentos de arabinoxilano, pero también se detectó una presencia notable de compuestos formados por oligómeros de hexosas (asumiendo que son GOS) en la muestra XOS1. Estos oligosacáridos fueron identificados por la asignación de las señales que corresponden con compuestos con diferente grado de polimerización ( $H_6Na$ ;  $H_7Na$ ;  $H_8Na$ ). La presencia de hexosas en un rango de DP 5 a 14, en la paja de cebada pretratada con explosión a vapor

impregnada en agua, fue también detectada por algunos autores como (Rosgaard y col., 2007). La presencia de estos GOS puede ser atribuida a una contaminación por grano en la paja.

Como se muestra en la tabla 4.7 (pág. 179), los oligómeros en el producto XOS1 tienen un mayor grado de polimerización que aquellos en el producto XOS2. Este producto ha sido obtenido mediante HE y se detectan compuestos de hasta 1400 m/z. Esta hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando enzimas con actividades de endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y  $\beta$ -glucosidasas, lo que explicaría el tamaño y naturaleza de los compuestos encontrados.

El espectro de MALDI-TOF-MS del producto XOS2, muestra predominantemente, señales m/z de oligómeros acetilados con un DP que varía de 4 a 9. La presencia de compuestos acetilados con un DP superior a 6 es debido a que se ha utilizado una endo- $\beta$ -1,4-xilanasas de la familia de la GH11, ya que Arai y col. (2019) observaron que la utilización de la enzima endo- $\beta$ -1,4-xilanasas GH10 hidrolizaba los oligosacáridos acetilados con un grado de polimerización igual o superior a 6.

Además, se han detectado señales correspondientes a los oligosacáridos no sustituidos con DP4 y DP5. Estos últimos compuestos son xilotetrosa y xilopentosa ya que se ha confirmado por los análisis realizados mediante cromatografía HPAEC/PAD. XOS lineales con un grado de polimerización superior a 5 no se ha detectado debido a la acción de la endo- $\beta$ -1,4-xilanasas, que actúa sobre residuos no sustituidos en cadenas de sacáridos, detectándose xilooligosacáridos sustituidos.

Por otra parte, en el producto XOS2, no se detecta la presencia de compuestos formados únicamente por hexosas (glucoligosacáridos) debido a la actuación de la  $\beta$  glucosidasa que ha hidrolizado dichos compuestos a glucosa monomérica, tal y como se ha comentado anteriormente.

La detección de señales con valores de 745, 877, 1009 y 1141 m/z corresponde a una secuencia de oligosacáridos, que contienen una unidad de ácido ferúlico unida a la cadena pentosa (DP4, DP5, DP6, DP7). La presencia de ácido ferúlico en esta biomasa se había confirmado con los ensayos del apartado 4.4.6.1 (pág. 146), donde la incorporación de la

enzima feruloil esterasa liberaba más de 90 mg/L en una hora de hidrólisis. Arai y col. (2019) también detectaron compuestos ramificados con ácido ferúlico en la mazorca de maíz tras someterla a un proceso hidrotérmico. Estas ramificaciones laterales podrían estar relacionadas con la estabilidad de la cadena de xilano mediante la formación de un pseudo sistema conjugado a través del grupo carbonilo del ácido.

El ácido ferúlico se une por enlace éster a la arabinosa, por lo que la estructura más probable para el compuesto P<sub>4</sub>FaNa, será la unión de tres unidades D-xilopiranosas junto a una unidad de arabinosa que en la posición C-5 presenta el resto feruloil.

En el espectro de masas de la muestra XOS3 (pureza 91%), se detectan compuestos cuya relación m/z es superior a la esperada, encontrando compuestos de hasta 1900 m/z. En esta muestra se han asignado señales (Fig. 4.33c) para XOS lineales desde DP4 hasta DP13 y compuestos formados por hexosas con grado de polimerización 7 y 8. También se ha detectado la presencia de la serie de XOS ramificados con grupos acetilos.

A la muestra F2 obtenida por purificación mediante cromatografía de exclusión molecular (columna de Bio-Gel P2) también se le realiza un espectro de MALDI-TOF-MS para confirmar la presencia de xilooligosacáridos de bajo grado de polimerización. En la figura 4.33d se aprecia como se ha realizado un correcto fraccionamiento de la muestra encontrando compuestos con un grado de polimerización comprendido entre DP2-DP6, que era el objetivo deseado, aunque también se detecta la presencia de XOS lineales de hasta DP8. En el espectro de masas, también se ha identificado las señales atribuidas a una serie de compuestos formados por los XOS acetilados con uno y con dos grupos acetilos de entre DP4-DP7.

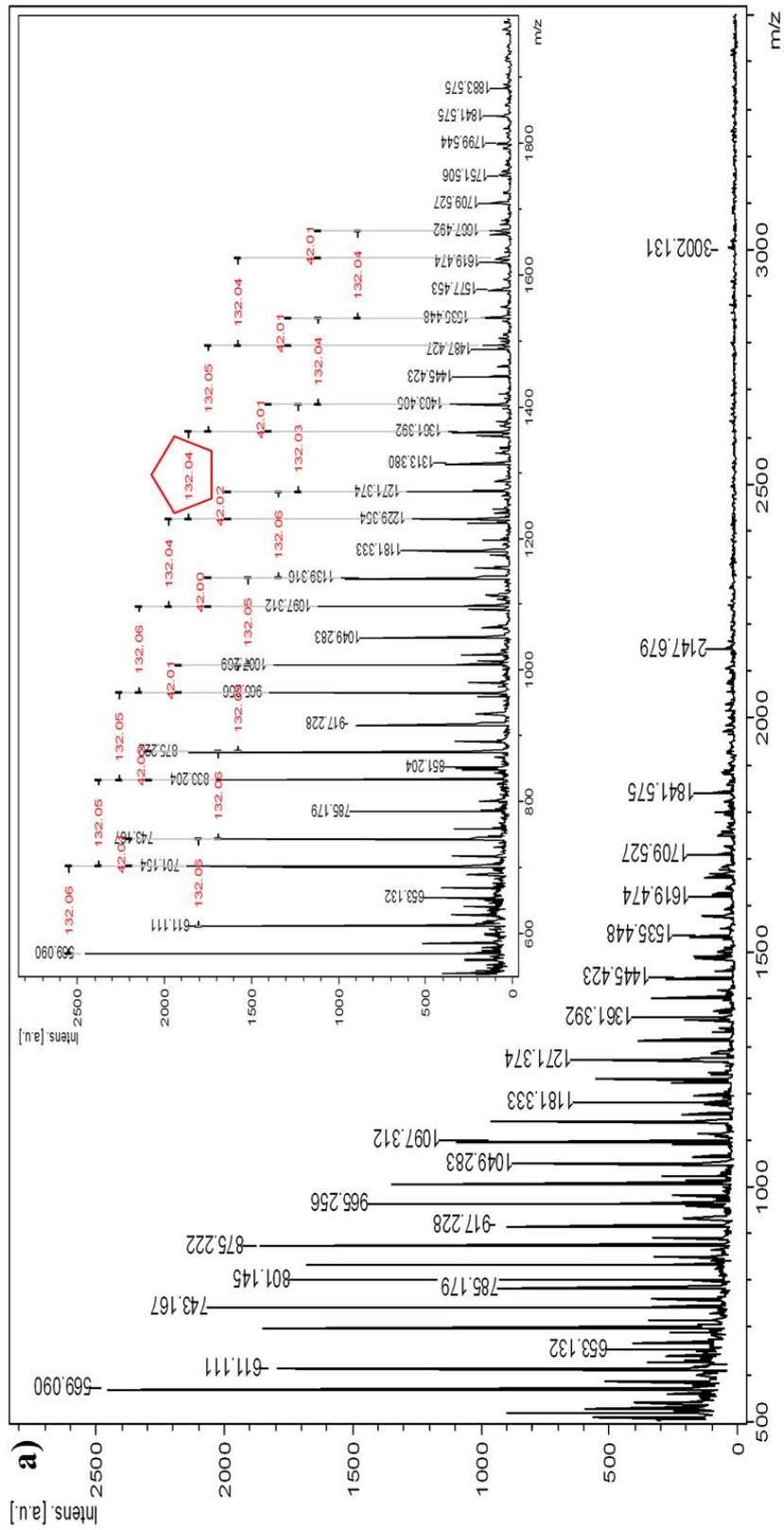


Figura 4.33. Espectro de MALDI-TOF-MS de a) XOS1; b) XOS2 c) XOS3 y d) F2

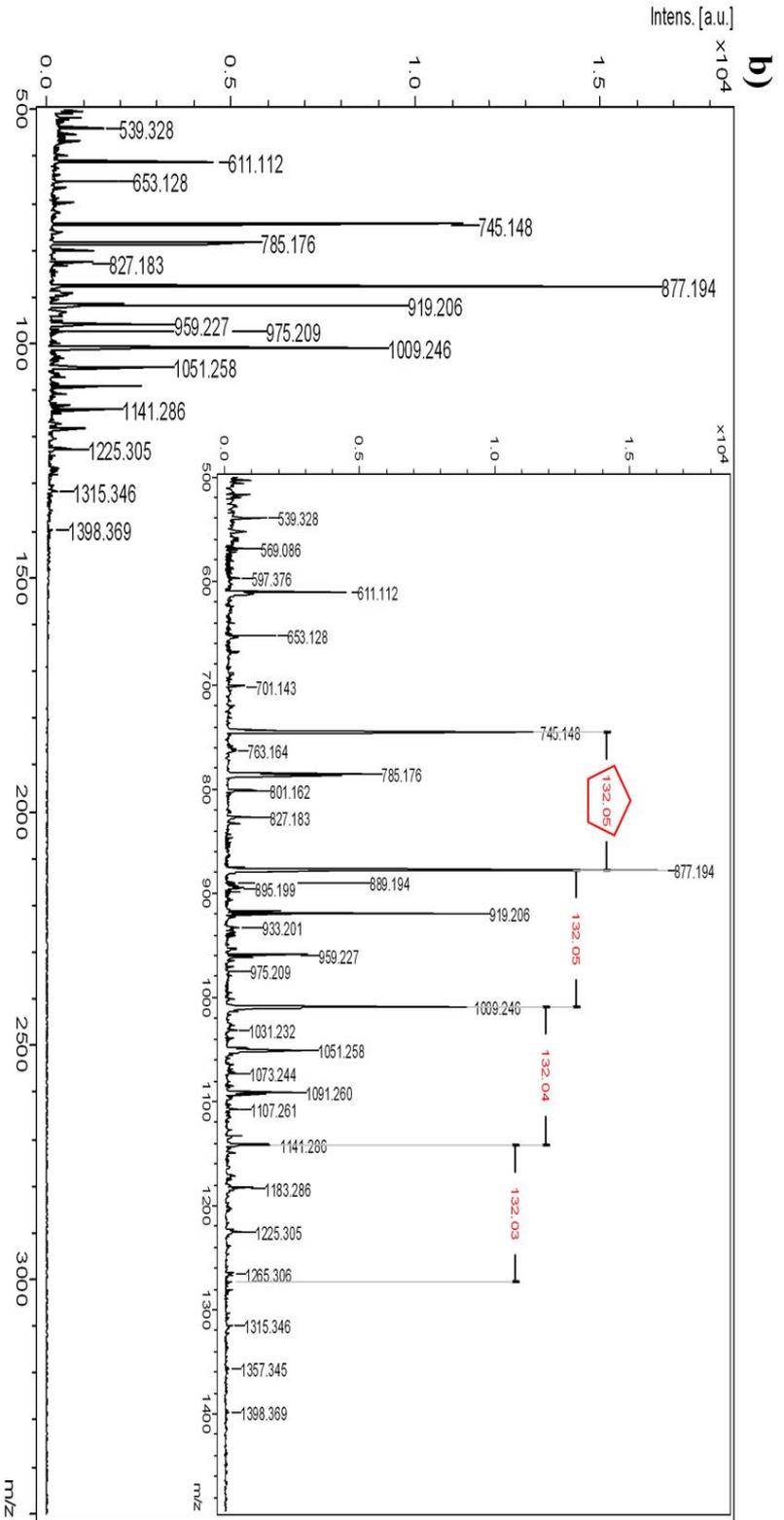
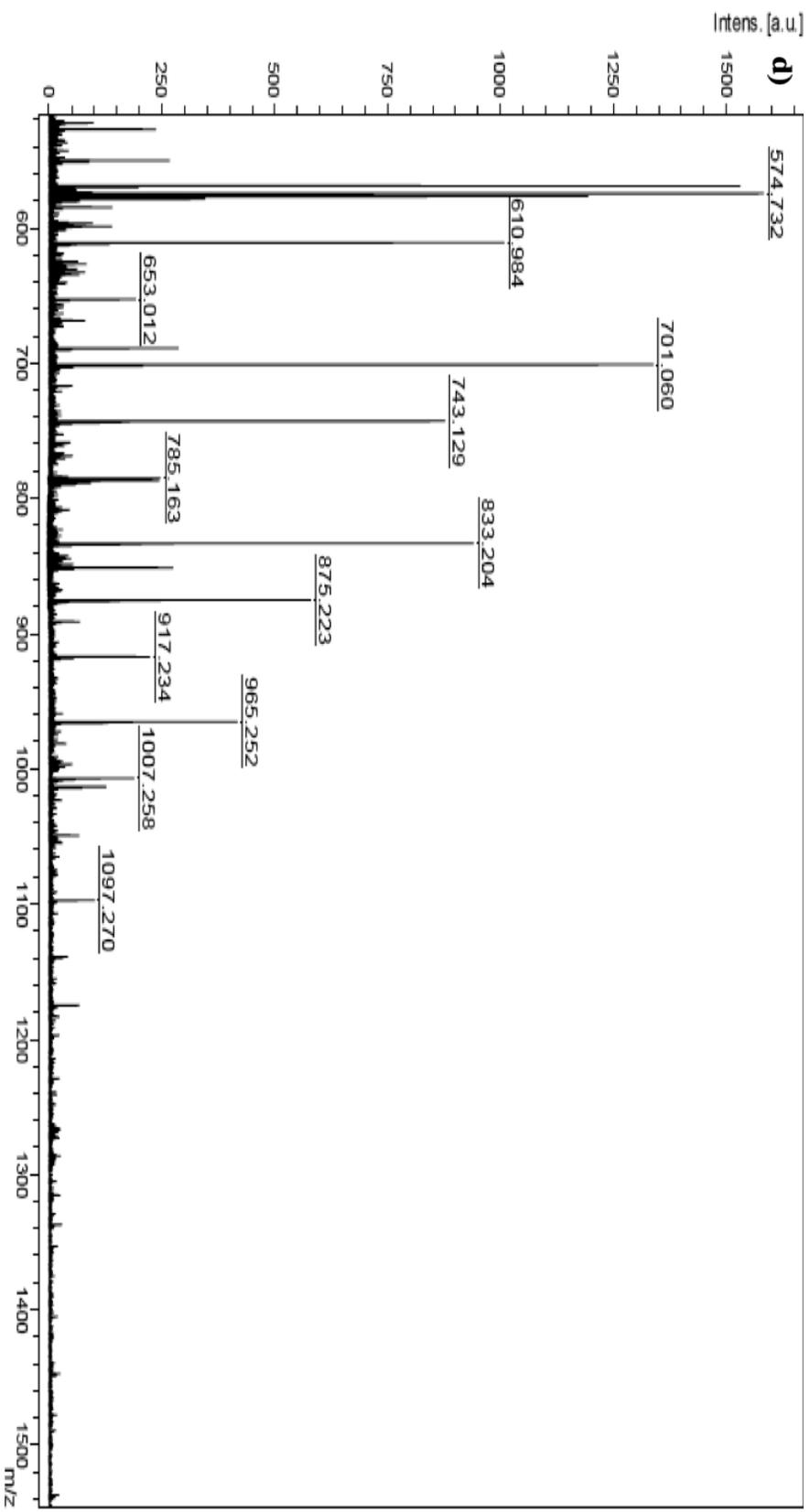


Figura 4.33. Espectro de MALDI-TOF-MS de a) XOS1; b) XOS2 c) XOS3 y d) F2 (Continuación)





**Figura 4.33.** Espectro de MALDI-TOF-MS de a) XOS1; b) XOS2 c) XOS3 y d) F2 (Continuación)

**Tabla 4.7.** Asignación estructural de las señales de las masas obtenidas mediante MALDI-TOF-MS de las muestras XOS1, XOS2, XOS3 y F2

<b>XOS1</b>						<b>XOS2</b>			
<b>m/z</b>	<b>Estructura</b>	<b>m/z</b>	<b>Estructura</b>	<b>m/z</b>	<b>Estructura</b>	<b>m/z</b>	<b>Estructura</b>	<b>m/z</b>	<b>Estructura</b>
569	[P <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>	1007	[P <sub>7</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1403	[P <sub>10</sub> AcNa] <sup>+</sup>	539	[H <sub>2</sub> PAcNa] <sup>+</sup>	919	[P <sub>5</sub> FaAcNa] <sup>+</sup>
611	[P <sub>4</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1013	[H <sub>6</sub> Na] <sup>+</sup>	1445	[P <sub>10</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	569	[P <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>	959	[P <sub>6</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>
653	[P <sub>4</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1049	[P <sub>7</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1487	[P <sub>10</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>	611	[P <sub>4</sub> AcNa] <sup>+</sup>	975	[P <sub>6</sub> Ac <sub>3</sub> K] <sup>+</sup>
701	[P <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>	1097	[P <sub>8</sub> Na] <sup>+</sup>	1535	[P <sub>11</sub> AcNa] <sup>+</sup>	653	[P <sub>4</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1009	[P <sub>6</sub> FaNa] <sup>+</sup>
743	[P <sub>5</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1139	[P <sub>8</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1577	[P <sub>11</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	701	[P <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>	1051	[P <sub>6</sub> FaAcNa] <sup>+</sup>
785	[P <sub>5</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1175	[H <sub>7</sub> Na] <sup>+</sup>	1619	[P <sub>11</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>	743	[P <sub>5</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1091	[P <sub>7</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>
801	[H <sub>3</sub> PAc <sub>3</sub> K] <sup>+</sup>	1181	[P <sub>8</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1661	[H <sub>10</sub> Na] <sup>+</sup>	745	[P <sub>4</sub> FaNa] <sup>+</sup>	1141	[P <sub>7</sub> FaNa] <sup>+</sup>
833	[P <sub>6</sub> Na] <sup>+</sup>	1229	[P <sub>9</sub> Na] <sup>+</sup>	1709	[P <sub>12</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	785	[P <sub>5</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1183	[P <sub>7</sub> FaAcNa] <sup>+</sup>
851	[H <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>	1271	[P <sub>9</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1799	[P <sub>13</sub> AcNa] <sup>+</sup>	787	[P <sub>4</sub> FaAcNa] <sup>+</sup>	1225	[P <sub>8</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>
875	[P <sub>6</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1313	[P <sub>9</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1841	[P <sub>13</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	827	[P <sub>5</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>	1265	[P <sub>8</sub> Ac <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>
917	[P <sub>6</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1337	[H <sub>8</sub> Na] <sup>+</sup>	1883	[P <sub>13</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>	877	[P <sub>5</sub> FaNa] <sup>+</sup>	1315	[P <sub>8</sub> FaAcNa] <sup>+</sup>
965	[P <sub>7</sub> Na] <sup>+</sup>	1361	[P <sub>10</sub> Na] <sup>+</sup>	2147	[P <sub>15</sub> Ac <sub>3</sub> Na] <sup>+</sup>	917	[P <sub>6</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1398	[P <sub>9</sub> Ac <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>

**Tabla 4.7.** Asignación estructural de las señales de las masas obtenidas mediante MALDI-TOF-MS de las muestras XOS1, XOS2, XOS3 y F2  
(Continuación)

XOS3				F2	
m/z	Estructura	m/z	Estructura	m/z	Estructura
539	[H <sub>2</sub> PAcNa] <sup>+</sup>	1097	[P <sub>8</sub> Na] <sup>+</sup>	569	[P <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>
569	[P <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup>	1139	[P <sub>8</sub> AcNa] <sup>+</sup>	611	[P <sub>4</sub> AcNa] <sup>+</sup>
611	[P <sub>4</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1175	[H <sub>7</sub> Na] <sup>+</sup>	653	[P <sub>4</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>
701	[P <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>	1181	[P <sub>8</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	701	[P <sub>5</sub> Na] <sup>+</sup>
743	[P <sub>5</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1229	[P <sub>9</sub> Na] <sup>+</sup>	743	[P <sub>5</sub> AcNa] <sup>+</sup>
785	[P <sub>5</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1271	[P <sub>9</sub> AcNa] <sup>+</sup>	785	[P <sub>5</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>
833	[P <sub>6</sub> Na] <sup>+</sup>	1313	[P <sub>9</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	833	[P <sub>6</sub> Na] <sup>+</sup>
875	[P <sub>6</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1337	[H <sub>8</sub> Na] <sup>+</sup>	875	[P <sub>6</sub> AcNa] <sup>+</sup>
917	[P <sub>6</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1361	[P <sub>10</sub> Na] <sup>+</sup>	917	[P <sub>6</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>
965	[P <sub>7</sub> Na] <sup>+</sup>	1403	[P <sub>10</sub> AcNa] <sup>+</sup>	965	[P <sub>7</sub> Na] <sup>+</sup>
1007	[P <sub>7</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1445	[P <sub>10</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1007	[P <sub>7</sub> AcNa] <sup>+</sup>
1049	[P <sub>7</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>	1535	[P <sub>11</sub> AcNa] <sup>+</sup>	1097	[P <sub>8</sub> Na] <sup>+</sup>
				1799	[P <sub>13</sub> AcNa] <sup>+</sup>
				1757	[P <sub>13</sub> Na] <sup>+</sup>
				1667	[P <sub>12</sub> AcNa] <sup>+</sup>
				1625	[P <sub>12</sub> Na] <sup>+</sup>
				1577	[P <sub>11</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>
				1841	[P <sub>13</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>
				1973	[P <sub>14</sub> Ac <sub>2</sub> Na] <sup>+</sup>

(P=pentosa; H=hexosa; Ac= grupo acetil; Fa= ácido ferúlico)

La adquisición del espectro se registra a partir de la relación  $m/z$  superior a 400, por lo que por esta técnica no se confirma la presencia de xilobiosa, detectada con anterioridad por HPLC.

Mediante el análisis de MALDI-TOF-MS se comprueba que los grupos acetilos están distribuidos de manera uniforme en los oligosacáridos.

Con esta técnica se puede extraer la información estructural y ver las diferencias entre los productos seleccionados. Recapitulando, el producto XOS1 contiene tanto compuestos lineales de pentosas y hexosas de entre DP4-DP9 y DP5-DP10 respectivamente, como compuestos ramificados con grupos acetilos, existiendo compuestos hasta triacetilados. En el producto XOS2 se detectan mayoritariamente compuestos que presentan ramificaciones con grupos acetilos y feruloílicos y algunos compuestos lineales, pero en ambos casos son compuestos con un grado de polimerización menor que los encontrados en XOS1. El producto XOS3 es similar a XOS1, encontrando compuestos lineales de hasta DP13 y ramificados, aunque se diferencian en que en este producto no se detectaron compuestos triacetilos. Finalmente, F2 contiene XOS con DP entre 4 y 8 con una estructura lineal, aunque también se detectan compuestos diacetilados.

#### **4.6.2. Análisis mediante FTIR**

El análisis mediante FTIR ha demostrado ser una herramienta útil y rápida para identificar la presencia de diferentes grupos funcionales en el análisis de la pared celular de las plantas (Kačuráková y col., 2000). Es importante realizar una buena caracterización estructural, ya que las sustituciones que presentan los OS pueden afectar al comportamiento en la fermentación y por tanto modificar el potencial prebiótico (Kabel y col., 2002b). En la bibliografía se describe como los oligosacáridos ramificados con grupos acetilos son los compuestos que más lentamente se consume en la fermentación al compararlos con los oligosacáridos lineales no sustituidos.

En la figura 4.34, se muestra los espectros FTIR correspondientes a los productos XOS1, XOS2, XOS3 y F2 procedentes de las diferentes etapas del proceso. El producto XOS2 es el que ha sufrido más transformaciones por lo que su espectro presenta más

diferencias al compararlo con los otros productos (XOS1, XOS3 y F2). Este producto procede de los polisacáridos retenidos en el proceso de purificación por membrana, los cuales han sido sometidos a hidrólisis enzimática. En todos los espectros, se observan bandas muy similares excepto en la región comprendida entre 1700-1200  $\text{cm}^{-1}$ . Esta región en bibliografía se asocia con los grupos acetilos.

En la tabla 4.8 se recogen las asignaciones de las bandas más comunes que encontramos en los diferentes espectros.

Las señales en torno a 1720, 1365 (enlaces C-H en hemicelulosas) y 1250  $\text{cm}^{-1}$  se asignaron a la presencia de grupos acetilos. La banda de 1720  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de tensión debida los enlaces carbonilo de los grupos acetilos de los xilanos en hemicelulosas (Moniz y col., 2013) o grupos carboxilos de enlaces éster en ácidos cinámicos como el ferúlico (típicos de herbáceas). La banda que aparece a 1577  $\text{cm}^{-1}$  podría corresponder a impurezas de lignina (Banerjee y col. 2019). Estos restos de lignina se solamente se detectan en el producto XOS2, por lo que, estas bandas se deben a la presencia del ácido ferúlico, concordando con el espectro de masas del apartado anterior (pág. 176/179). La banda alrededor de 1430  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento C-O y a la flexión de C-H y/o O-H en las hemicelulosas (Sun F. y col., 1998). Alrededor de 1250  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra la banda de vibración de estiramiento de C-O de enlace sencillo relacionada con los grupos acetilos presente en las hemicelulosas. La intensidad de esta banda se relaciona a la escisión y/o alteración de los grupos acetilos (Sun y col., 2005; Moniz y col., 2013). El hombro de baja intensidad que aparece a 1130  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a los oligosacáridos que contienen arabinosas, ya que es muy característica de estas cadenas (Kačuráková y col., 1994; Zhang y col., 2015).

Las bandas comprendidas entre 1156 y 920  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la región típica de los xilanos. La banda observada a 1030  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento de C-C, C-O o a la flexión de C-OH del enlace glicosídico (COC) (Sun y col., 2011) lo que indica el predominio de los oligosacáridos de xilano (Fang y col., 2000). Esto significa que el esqueleto de baja ramificación está presente en la corriente de oligosacáridos.

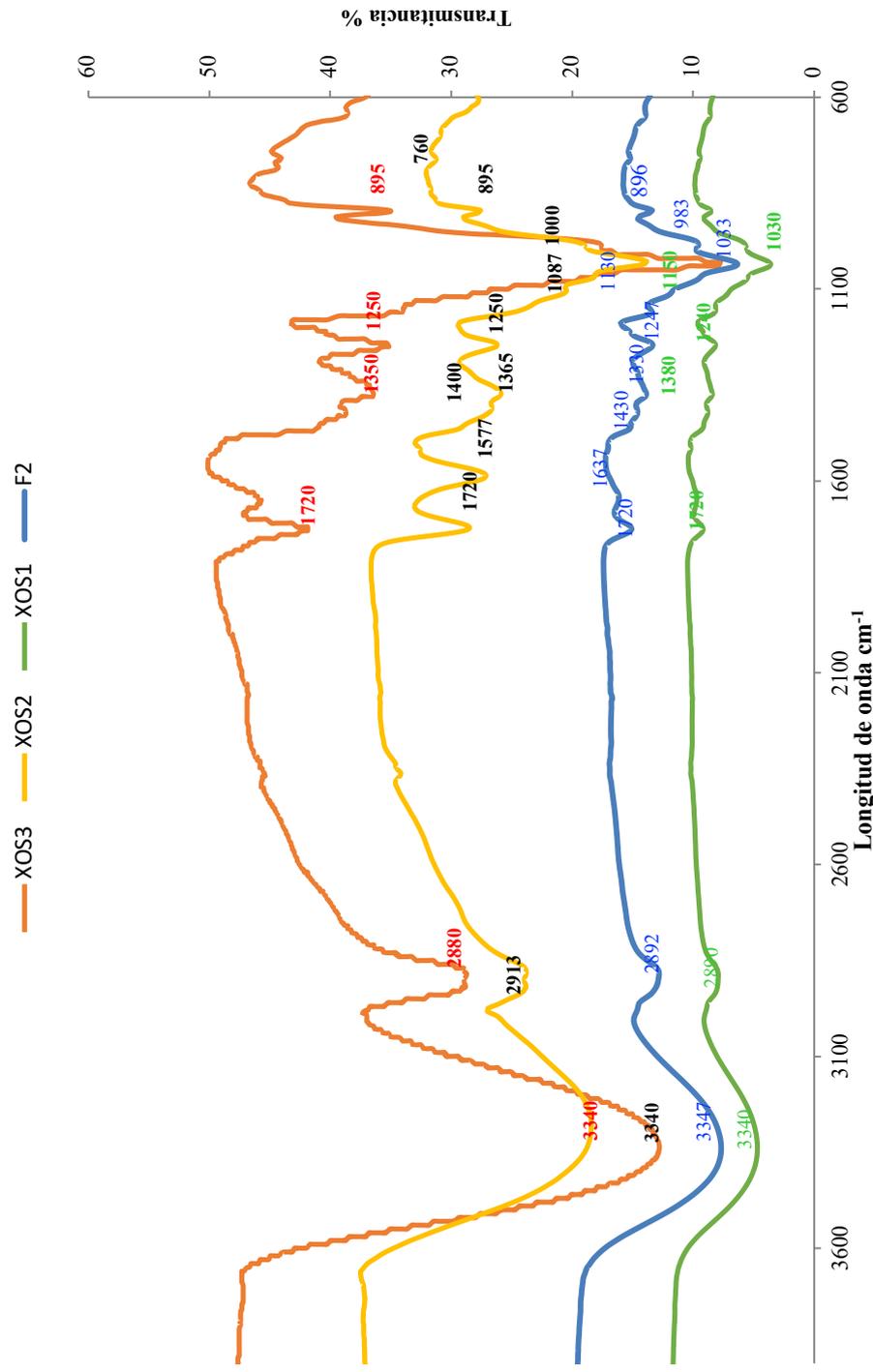


Figura 4.34. Espectros de FTIR de las muestras XOS1, XOS2, XOS3 y F2

La presencia de las cadenas laterales de arabinoxilano se identifican por dos colas débiles a 1150 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ . En concreto, la banda a 1000  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a las vibraciones de las cadenas laterales de arabinoxilano, siendo sensible a la ubicación del sustituyente (Kačuráková y col., 1994). En el espectro del producto de XOS2 se observa como esta banda es un hombro y no llega a estar muy definida. En la región de 950/700  $\text{cm}^{-1}$ , la pequeña banda afilada a 895  $\text{cm}^{-1}$  es indicativa de la configuración de los enlaces  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos entre las unidades de xilopiranosas en las cadenas de xilano (Bian y col., 2012).

**Tabla 4.8.** Asignación de bandas en el espectro de FTIR de las diferentes muestras

Banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
3340	Vibración de tensión del grupo hidroxilo del xilano
2890	Banda de combinación de los enlaces C-H
1720	Tensión del C=O de los grupos acetilos
1577	Vibración anillo aromático y tensión del C=O
1400	Vibraciones del anillo aromático
1380	Flexión simétrica de $\text{CH}_3$ / Deformación C-H
1250	Vibraciones de tensión de C-O relacionas con los grupos acetilos
1160	Vibración de la flexión antisimétrica C-O-C asimétrico
1140	Tensión de C-O en grupos esteres
1030	Contribuciones del enlace C-O-C del enlace glicosídico de las cadenas de xilano Deformación C-H aromático en el plano ( $G > S$ )
1000	Vibraciones C-C, C-OH, C-H del anillo y grupos laterales
913-929	Deformación C-H aromático fuera del plano
895	Tensión del enlace glicosídico
833-834	Deformación C-H aromático fuera del plano en unidades S

Con todo este estudio estructural llevado a cabo en el apartado 4.6 (pág. 171), se ha obtenido información tanto de la longitud de la cadena de xilooligosacáridos, como de los sustituyentes presentes en la estructura. También se ha obtenido información del tipo de carbohidratos que la forman. Con todo ello, se concluye que todos los productos presentan xilooligosacáridos lineales y ramificados con grupos acetilos, siendo el producto XOS2 el que presenta más diferencias, ya que presenta estructuras ramificadas, entre las que se incluye sustituyentes de restos feruloílicos.

#### **4.7. Evaluación de la actividad prebiótica**

En este apartado se muestran los resultados obtenidos sobre la actividad prebiótica de los xilooligosacáridos obtenidos en los apartados anteriores a partir de la paja de cebada pretratada mediante EV. Los resultados son comparados con una muestra de FOS utilizado como control positivo.

Se seleccionaron diferentes muestras que contiene a los xilooligosacáridos purificados mediante la utilización de diferentes métodos a partir de la FIPCP: la muestra denominada **XOS1** fue obtenida mediante purificación con la resina de intercambio iónico. Una combinación de hidrólisis enzimática y una purificación posterior mediante nanofiltración (**XOS2**) y finalmente una purificación de la FIPCP mediante ultrafiltración y nanofiltración (**XOS3**). La muestra **F2** fue obtenida por purificación con cromatografía de exclusión molecular Bio-Gel P2 (apartado 3.6.2, pág. 97) Todas las muestras, previamente liofilizadas, se utilizaron como fuente de carbono utilizando microbiota intestinal utilizando una concentración aproximada de 10 g/L de oligosacáridos (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9.** Composición de las muestras al inicio del ensayo de fermentación

g/L	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	GOS	XOS	AOS
XOS1	0,3	0,9	0,6	1,9	7,7	0,5
XOS2	2,1	1,7	0,5	0,6	8,4	0,7
XOS3	0,3	1,7	1,5	0,8	8,6	0,5
F2	0,4	0,2	0,1	0,4	5,4	0,3

La evaluación prebiótica se determinó mediante la formación de ácidos grasos de cadena corta, el consumo del sustrato, y el efecto en la población microbiana de *Bifidobacterias*. La actividad prebiótica se evaluó comparativamente frente a la utilización como fuente de carbono de FOS como prebiótico comercial.

**a) Análisis de los ácidos orgánicos generados durante la fermentación**

La fermentación se llevó a cabo como se describe en el apartado 3.7.2 (pág. 100), con microbiota fecal procedente de tres donantes libres de enfermedades gastrointestinales y que no habían consumido antibiótico en los tres meses anteriores al ensayo. La composición de la microbiota humana de estos tres donantes voluntarios puede verse modificada por diferentes factores como pueden ser la zona geográfica, el abuso de sustancias como el alcohol, el tabaco, una vida sedentaria o la dieta. Otros factores que pueden interferir son las condiciones de higiene, la presencia de mascotas en el hogar, etc. (Lozupone y col., 2012; Schwartz y Rusch, 2016).

En la tabla 4.10 se recogen las variaciones de pH a lo largo de la fermentación. Durante la fermentación, el pH de las muestras FOS, XOS1, XOS2 y XOS3 desciende desde 6,9 hasta 4,9; 4,9, 4,9 y 4,1 respectivamente. En cambio, en el producto F2 el pH varía desde 7,6 hasta 5,9. Esta acidificación tiene un efecto positivo en el intestino ya que dificulta la proliferación de algunos microorganismos patógenos y de bacterias putrefactas como *Clostridium*, evitando la acumulación de compuestos tóxicos como el amoníaco o aminos biogénicas (Yoo y col., 2012). En la evolución del pH a lo largo de la fermentación se distingue dos etapas, una primera etapa donde este descenso es significativo (primeras 10 h) debido al crecimiento y/o actividad metabólica de bacterias intestinales, para luego mantenerse bastante constante hasta el final de los experimentos como se observa en la tabla 4.10. El menor pH observado cuando se utiliza como fuente de carbono XOS3, se asocia a la acumulación de ácido láctico.

En el medio de fermentación, se generó una mezcla de ácidos grasos de cadena corta principalmente ácido acético, butírico y propiónico, los cuales pueden tener propiedades beneficiosas en el organismo. La producción de AGCC contribuye a producir alrededor del 10% de la energía diaria metabolizable del huésped, aunque esta proporción depende altamente del donante y de la disponibilidad de los sustratos de fermentación (Carlson y col., 2017). La concentración de AGCC producidos durante la fermentación se muestra en la tabla 4.11.

**Tabla 4.10.** Variación del pH durante el ensayo de fermentación de los diferentes xilooligosacáridos

Tiempo (h)	Control	FOS	XOS1	XOS2	XOS3	F2
0	6,9 ± 0,04	6,9 ± 0,04	6,9 ± 0,04	6,9 ± 0,04	6,9 ± 0,04	7,6 ± 0,03
4	6,9 ± 0,05	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,07	6,5 ± 0,3	6,7 ± 0,06	7,4 ± 0,03
7	7,1 ± 0,07	6,1 ± 1,0	6,3 ± 0,7	5,2 ± 0,4	6,1 ± 0,6	6,5 ± 0,2
10	7,2 ± 0,2	5,1 ± 0,8	5,5 ± 1,2	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,2	5,8 ± 0,1
24	7,1 ± 0,7	5,0 ± 0,3	4,9 ± 0,08	4,7 ± 0,1	4,4 ± 0,2	6,0 ± 0,08
30	6,7 ± 0,08	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,06	4,9 ± 0,06	4,1 ± 0,12	5,9 ± 0,1

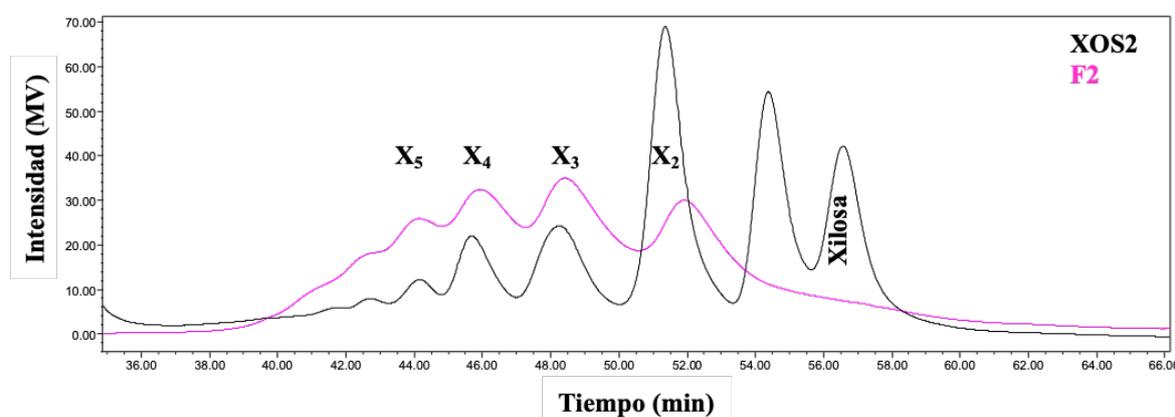
En la concentración total de AGCC generados durante la fermentación de XOS (XOS1, XOS2, XOS3 y F2) y FOS se observaron diferencias. En la muestra denominada control (sin fuente de carbono) se produce una pequeña cantidad de AGCC como consecuencia de la fermentación de las proteínas o aminoácidos por parte de las bacterias putrefactas fenómeno que ha sido observado por otros autores (Gullón y col., 2015).

Después de 24 h de incubación, las concentraciones totales de AGCC alcanzadas en los medios de fermentación fueron 102,7; 117,2; 89,1 y 87,5 mM para las muestras de XOS1, XOS2, XOS3 y F2 respectivamente. Estos valores fueron significativamente más altos ( $p \leq 0.05$ ) que los obtenidos cuando se utilizó FOS como sustrato (72,5 mM). Los resultados obtenidos en este ensayo fueron similares a los obtenidos por Moniz y col. (2016), teniendo en cuenta el contenido inicial de carbohidratos en los ensayos de fermentación obtenidos a partir de paja de maíz.

Los resultados de concentración de AGCC obtenidos con la fracción F2 fueron muy similares a los obtenidos por XOS3, a pesar de que la concentración de compuestos de ambas muestras es diferente como muestra la tabla 4.9. Un motivo puede ser que estos compuestos proceden de la fracción soluble sometida a distintos procesos de purificación bien por

membranas (en el caso de XOS3) o bien por cromatografía de exclusión molecular (F2). No obstante, las concentraciones fueron superiores a las obtenidas respecto al control positivo (utilizando FOS como fuente de carbono).

Una explicación al hecho de que la fermentación de XOS2 sea más rápida puede deberse al hecho de que la concentración de X<sub>2</sub> es mayor en este sustrato como se observa en la figura 4.35, ya que se sabe que la concentración de xilobiosa proporciona valores cinéticos más altos que otros XOS (Uçkun Kiran y col., 2013). No obstante, la presencia de monosacáridos presentes en el medio podría acelerar el proceso, ya que son fácilmente metabolizables.



**Figura 4.35.** Cromatograma de HPSEC/IR de XOS2 y F2

En la fermentación de todos los sustratos estudiados se observó la producción de ácido láctico. El ácido láctico fue generado fundamentalmente durante las primeras 10 h de fermentación, a partir de este tiempo, la concentración disminuyó incluso hasta desaparecer completamente para el sustrato XOS1 y F2. Este hecho se justifica porque algunas bacterias, como las heterolácticas, que pueden consumirlo para generar otros metabolitos como acetato o propionato (Duncan y col., 2004; Hernández-Hernández y col., 2011). La producción de este ácido va ligada a la presencia de bifidobacterias y lactobacilos en el inóculo. La mayor concentración de ácido láctico se obtuvo para XOS3, algunos autores asocian la mayor producción de ácido láctico cuando se utiliza XOS poco sustituidos o con baja ramificación (Kabel y col., 2002a). La composición de XOS3 parece presentar una estructura más lineal

que el resto de los XOS estudiados, tal y como se ha discutido en el apartado 4.6.1 (pág. 171), de los resultados relacionados con la estructura química.

El ácido orgánico más abundante producido durante la fermentación fue el ácido acético independientemente de la fuente de carbono utilizada. Este compuesto representa el 63,8%, 69,5%, 76,1%, 72,1% y 56% del total de AGCC para XOS1, XOS2, XOS3, F2 y FOS, respectivamente. Las concentraciones más altas de este ácido se lograron a las 24 h (65,5; 81,4; 67,8; 63,1 mM en las fermentaciones con fuente de carbono XOS1, XOS2, XOS3 y F2 respectivamente), mostrando diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con FOS al mismo tiempo de fermentación (40,4 mM). La formación predominante de ácido acético fue similar a la encontrada en bibliografía por otros autores cuando se utilizaron otros oligosacáridos derivados de la biomasa lignocelulósica (Dávila, y col., 2019; Ruiz y col., 2017; Míguez, y col., 2018).

El ácido acético tiene un papel importante en la regulación de la división celular epitelial. También algunos estudios lo vinculan con diferentes funciones intestinales como el aumento del flujo sanguíneo colónico (Sharma y Shukla, 2016; Zeng, 2014).

El ácido butírico fue el segundo producto metabólico relevante encontrado en los medios de fermentación. Después de 24 h de incubación, se detectaron concentraciones similares en un rango de entre 12,0-23,8 mM, independientemente de la fuente de carbono empleada ( $P > 0,05$ ). La producción de este ácido no se observó hasta las 7 h de fermentación cuando se utilizaron las muestras XOS1, XOS3 y F2. Para la muestra XOS2 a las 4 h se empezaba a acumular ligeramente. Este hecho también fue observado utilizando como sustrato oligosacáridos procedentes sarmiento de vid (Dávila y col., 2019). Los valores obtenidos en este estudio fueron superiores a los producidos a partir de los oligosacáridos de bagazo de maíz (Buruiana y col., 2014).

El ácido butírico es considerado uno de los metabolitos del colon más importantes ya que tiene múltiples funciones positivas. Por ejemplo, se ha descrito que induce la diferenciación y la apoptosis en las células huésped, es usado como fuente de energía para los colonocitos (Zeng, 2014). También tiene propiedades antiinflamatorias (Fernández y col., 2016; Sharma y Shukla, 2016) y se ha demostrado que la administración rectal puede aliviar

los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal (Roberfroid y col., 2010). La producción de ácido butírico en heces humanas puede asociarse a *Eubacterium rectale*, *Roseburia intestinalis* y *Faecalibacterium prausnitzii* (Gibson y col., 2000), aunque la atribución de un producto de fermentación a un grupo bacteriano específico en un cultivo mixto es bastante complicada.

El ácido propiónico es otro de los compuestos con efectos positivos para la salud. Es utilizado por el hígado, ya que reduce la gluconeogénesis hepática e inhibe la formación de urea en el hígado y existe una estrecha relación entre el ácido propiónico y la inhibición de la síntesis de lípidos y colesterol (Van den Abbeele y col., 2018). Aunque no está muy claro el mecanismo de actuación, se está estudiando el papel de este ácido en la ayuda de control de peso para personas con problemas de peso (Chambers y col., 2015). Por otra parte, es conocido que el ácido butírico y el propiónico estimulan la producción de mucinas, que son glicoproteínas requeridas para el mantenimiento de la capa mucosa que protege el tejido epitelial intestinal (Roberfroid y col., 2010). La menor producción de ácido propiónico en las fermentaciones en la que se utilizó XOS3 como fuente de carbono, puede deberse a la acumulación de ácido láctico.

Las proporciones de ácido propiónico alcanzadas después de 24 h de fermentación cuando se utilizaron como sustrato XOS1, XOS2, XOS3, F2 y FOS fueron de 15,1, 12,0, 9,2, 11,9 y 13,7 mM, respectivamente. Estas concentraciones de ácido orgánico son similares a las encontradas en bibliografía, al utilizar XOS, obtenidos a partir de *Eucalyptus globulus*, como fuentes de carbono (Míguez y col., 2018) o al utilizar arabinoxilooligosacáridos del salvado de trigo (7,7-14,9 mM) (Gullón y col., 2014) y muy inferiores (26,2 mM) al compararlos con los obtenidos a partir de residuos de vid (Dávila y col., 2019).

A partir de los datos mostrados en la tabla 4.11, se puede apreciar como el ratio entre los ácidos acético y propiónico (A/P) en XOS1 (4,4), XOS2 (6,8), XOS3 (7,3) y F2 (5,2) es superior al alcanzado por FOS (3,0) a las 24 h de fermentación. Este factor se asocia a la reducción de lípidos en el hígado y/o a la síntesis del colesterol (Den Besten y col., 2013). Por lo que estos sustratos podrían no contribuir al efecto hipolipidémico (Salazar y col., 2008).

En relación con la producción de ácido fórmico, la mayor cantidad que se produjo fue utilizando como fuente de carbono el FOS a las 24 h (14,6 mM). Este comportamiento también lo observaron otros autores que utilizaron AXOS comerciales (Buruiana y col., 2017).

Para finalizar, otro parámetro que se monitorizó, para evaluar el efecto bifidogénico, fue el consumo de XOS durante la fermentación. La velocidad de fermentación y los perfiles de AGCC varían en función de los sustituyentes, siendo los XOS lineales y los sustituidos con arabinosa los más rápidos en comparación con los acetilados (Kabel y col., 2002b). A las primeras 10 h del ensayo ya se había metabolizado el 70% de XOS1 y XOS2 por la microbiota, permaneciendo únicamente el 8% después de 24 h de fermentación. A las 24 h con los XOS1 se observa cómo se han consumido los XOS de alto grado de polimerización quedando algo de xilosa por consumir, en cambio en la muestra con XOS2 se han fermentado los XOS (DP4-DP6) y parte de la xilosa, xilobiosa y xilotriosa. En la figura 4.36, a modo de comparación, se muestra el cromatograma con el consumo de xilooligosacáridos a 4 y 24 h para las muestras XOS1 y XOS2.

En el caso de la muestra XOS3, el patrón de consumo de los carbohidratos se comportó diferente, permaneciendo cerca del 20% de los carbohidratos a las 24 h de fermentación. En cambio, el producto F2 se consumió más del 95% de la fuente de carbono presente durante las primeras 10 h.

**Tabla 4.11.** Concentraciones de AGCC (mM) durante la fermentación de los xilooligosacáridos a partir de paja de cebada

Compuesto	Tiempo (h)	Control	FOS	XOS1	XOS2	XOS3	F2
<b>Ácido</b>	0	0,3 ± 0,52	0,4 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,0 ± 1,5	1,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	1,0 ± 1,5	1,00 ± 1,5
	4	0,04 ± 0,08	0,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,4 ± 1,0	1,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,8	1,0 ± 0,3
	7	0,00 ± 0,00	8,3 ± 6,5 <sup>a</sup>	5,5 ± 4,0 <sup>a</sup>	6,9 ± 3,6 <sup>a</sup>	7,9 ± 5,7	3,1 ± 1,6
<b>Láctico</b>	10	0,00 ± 0,00	6,7 ± 7,3 <sup>a</sup>	8,9 ± 6,5 <sup>ab</sup>	17,4 ± 6,9 <sup>b</sup>	20,4 ± 6,5	2,5 ± 2,6
	24	0,00 ± 0,00	5,6 ± 9,4 <sup>a</sup>	3,3 ± 2,8 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,8 <sup>a</sup>	38,7 ± 24,4	0,0 ± 0,0
	30	0,00 ± 0,00	4,4 ± 7,6 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,5 ± 7,1 <sup>a</sup>	28,1 ± 22,3	0,0 ± 0,0
<b>Ácido</b>	0	2,0 ± 0,8	3,4 ± 2,2 <sup>a</sup>	3,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	5,9 ± 2,2 <sup>a</sup>	3,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 2,1 <sup>a</sup>
	4	2,5 ± 0,6	4,3 ± 2,0 <sup>a</sup>	6,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	8,3 ± 4,5 <sup>a</sup>	5,4 ± 2,1 <sup>a</sup>	6,1 ± 2,3 <sup>a</sup>
	7	5,7 ± 2,5	23,2 ± 12,0 <sup>a</sup>	26,8 ± 18,7 <sup>ab</sup>	42,0 ± 12,5 <sup>b</sup>	26,8 ± 11,9 <sup>ab</sup>	29,7 ± 12,9 <sup>ab</sup>
<b>Acético</b>	10	8,5 ± 3,3	33,5 ± 5,5 <sup>a</sup>	42,9 ± 7,4 <sup>ab</sup>	57,4 ± 17,1 <sup>b</sup>	43,1 ± 3,4 <sup>ab</sup>	51,5 ± 1,4 <sup>b</sup>
	24	18,8 ± 1,2	40,4 ± 3,0 <sup>a</sup>	65,5 ± 5,9 <sup>b,c</sup>	81,4 ± 9,4 <sup>b</sup>	67,8 ± 16,5 <sup>b,c</sup>	63,1 ± 3,8 <sup>c</sup>
	30	17,3 ± 1,8	38,3 ± 4,5 <sup>a</sup>	57,7 ± 4,8 <sup>b</sup>	78,8 ± 6,6 <sup>c</sup>	52,9 ± 7,8 <sup>ab</sup>	65,2 ± 5,2 <sup>b,c</sup>
<b>Ácido</b>	0	1,6 ± 0,7	1,77 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,8 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,7 <sup>a</sup>
	4	0,5 ± 0,8	2,64 ± 2,1 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,9 <sup>a</sup>
	7	0,2 ± 0,3	10,17 ± 5,2 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,7 <sup>b,c</sup>	5,3 ± 1,1 <sup>b,c</sup>	7,1 ± 3,1 <sup>ac</sup>	1,8 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>Fórmico</b>	10	0,0 ± 0,00	12,50 ± 4,6 <sup>ab</sup>	8,3 ± 3,3 <sup>ac</sup>	7,6 ± 8,1 <sup>c</sup>	15,1 ± 2,7 <sup>b</sup>	4,1 ± 1,2 <sup>c</sup>
	24	0,0 ± 0,0	14,59 ± 2,3 <sup>a</sup>	7,9 ± 4,7 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,7 <sup>c</sup>	8,1 ± 1,7 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,5 <sup>c</sup>
	30	0,2 ± 0,3	9,46 ± 2,4 <sup>a</sup>	6,7 ± 4,7 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	5,4 ± 1,9 <sup>ac</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>

Los datos se presentan como la media de tres donantes diferentes ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para el mismo ácido y al mismo tiempo.

**Tabla 4.11.** Concentraciones de AGCC (mM) durante la fermentación de los xilooligosacáridos a partir de paja de cebada  
(Continuación)

Compuesto	Tiempo (h)	Control	FOS	XOS1	XOS2	XOS3	F2
<b>Ácido Propiónico</b>	0	2,3 ± 0,14	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
	4	2,5 ± 0,36	2,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,4 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,8 <sup>a</sup>
	7	3,5 ± 0,38	5,6 ± 2,7 <sup>a</sup>	6,2 ± 3,5 <sup>a</sup>	5,9 ± 3,2 <sup>a</sup>	5,7 ± 2,8 <sup>a</sup>	6,6 ± 2,6 <sup>a</sup>
	10	4,3 ± 0,42	9,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	7,9 ± 4,3 <sup>a</sup>	8,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	8,9 ± 5,0 <sup>a</sup>	10,6 ± 1,3 <sup>a</sup>
	24	6,6 ± 0,27	13,7 ± 5,6 <sup>ab</sup>	15,1 ± 6,0 <sup>a</sup>	12,0 ± 5,1 <sup>a,b</sup>	9,2 ± 4,1 <sup>b</sup>	11,9 ± 3,0 <sup>ab</sup>
	30	5,5 ± 1,10	9,7 ± 4,9 <sup>ab</sup>	13,5 ± 5,1 <sup>a</sup>	14,1 ± 7,5 <sup>a</sup>	7,5 ± 2,3 <sup>b</sup>	12,2 ± 2,5 <sup>ab</sup>
<b>Ácido Butírico</b>	0	0,4 ± 0,41	1,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,3 <sup>a</sup>
	4	0,3 ± 0,27	2,5 ± 2,7 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,4 <sup>a</sup>
	7	1,0 ± 0,69	6,2 ± 4,1 <sup>a</sup>	4,5 ± 3,9 <sup>a</sup>	6,1 ± 2,9 <sup>a</sup>	4,3 ± 2,6 <sup>a</sup>	3,85 ± 2,6 <sup>a</sup>
	10	1,6 ± 1,05	11,6 ± 3,1	10,5 ± 8,4 <sup>a</sup>	10,1 ± 2,8 <sup>a</sup>	10,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	8,25 ± 3,5 <sup>a</sup>
	24	5,3 ± 0,64	18,4 ± 3,3 <sup>a</sup>	22,1 ± 10,2 <sup>a</sup>	23,8 ± 4,9 <sup>a</sup>	12,0 ± 2,3 <sup>b</sup>	12,54 ± 2,3 <sup>b</sup>
	30	4,7 ± 0,41	15,0 ± 5,4 <sup>ab</sup>	21,5 ± 9,1 <sup>a</sup>	21,5 ± 11,5 <sup>a</sup>	12,0 ± 3,2 <sup>b</sup>	12,68 ± 3,2 <sup>ab</sup>
<b>Total AGCC</b>	0	4,7 ± 1,1	7,2 ± 3,72 <sup>a</sup>	5,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	9,8 ± 3,3 <sup>a</sup>	5,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	5,9 ± 2,3 <sup>a</sup>
	4	5,4 ± 1,3	9,7 ± 0,75 <sup>a</sup>	9,9 ± 4,3 <sup>a</sup>	14,0 ± 8,9 <sup>a</sup>	8,6 ± 3,2 <sup>a</sup>	9,6 ± 3,2 <sup>a</sup>
	7	10,3 ± 3,5	35,0 ± 17,0 <sup>a</sup>	37,5 ± 25,5 <sup>a</sup>	54,0 ± 17,9 <sup>a</sup>	36,9 ± 17,4 <sup>a</sup>	40,2 ± 17,4 <sup>a</sup>
	10	14,4 ± 3,9	54,4 ± 7,7 <sup>a</sup>	61,3 ± 39,3 <sup>a</sup>	75,8 ± 19,4 <sup>a</sup>	62,4 ± 4,2 <sup>a</sup>	70,3 ± 4,2 <sup>a</sup>
	24	30,8 ± 1,3	72,5 ± 6,8 <sup>a</sup>	102,7 ± 4,8 <sup>b,c</sup>	117,2 ± 7,6 <sup>b</sup>	89,1 ± 3,1 <sup>a,c</sup>	87,5 ± 3,1 <sup>a,c</sup>
	30	27,6 ± 3,2	63,0 ± 13,3 <sup>a</sup>	92,5 ± 3,7 <sup>b</sup>	114,4 ± 6,2 <sup>c</sup>	72,5 ± 2,3 <sup>a,b</sup>	90,1 ± 2,3 <sup>b</sup>

Los datos se presentan como la media de tres donantes diferentes ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para el mismo ácido y al mismo tiempo.

Esta diferencia de fermentabilidad se puede deber a muchos factores como puede ser el grado de polimerización, el grado y tipo de sustitución, etc. En la bibliografía se encuentra descrito que el consumo incompleto de los carbohidratos puede deberse a la presencia de compuestos lineales con un DP elevado (Buruiana y col., 2017), que puede justificar el comportamiento del producto XOS3, ya que este compuesto contiene XOS compatibles con cadenas de hasta 13 pentosas (Fig. 4.33, pág. 175).

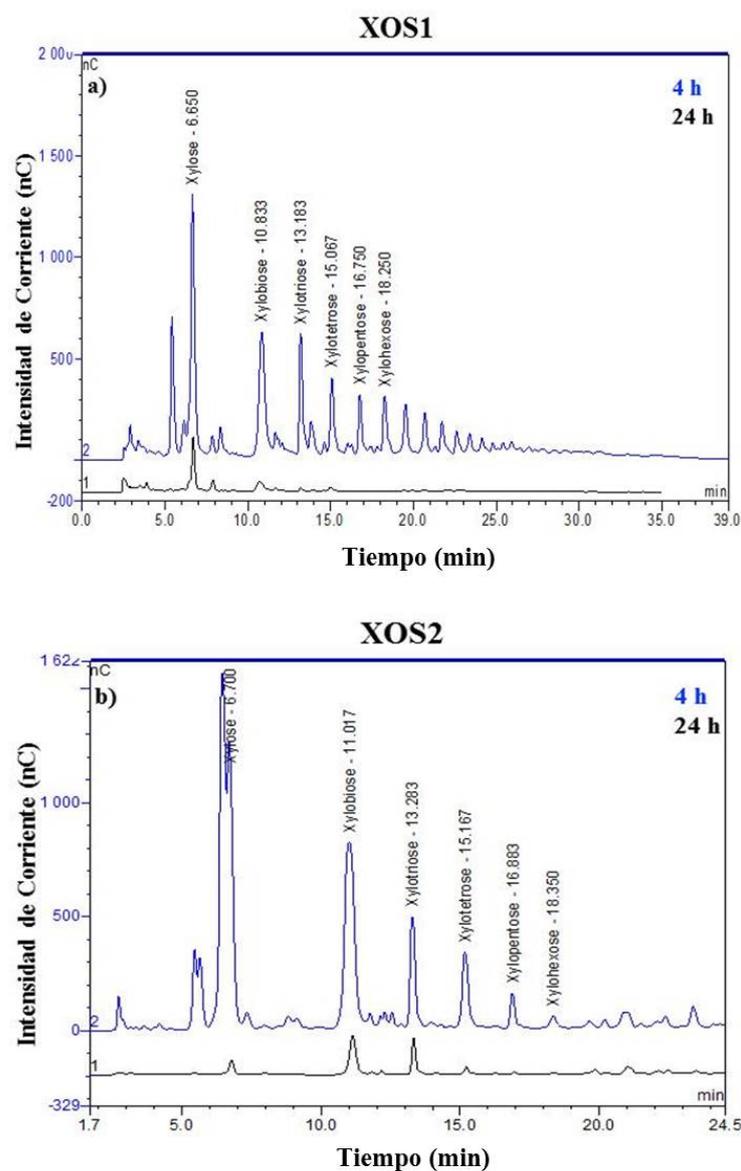
No obstante, aunque se ha descrito que el grado de grado de sustitución de los OS puede influir en la velocidad de fermentación (Bedford y Cowieson 2012), en la literatura científica existen estudios contradictorios. Así, por ejemplo, Pollet y col. (2012) encuentran una disminución en el consumo de oligosacáridos y su transformación en AGCC cuando se utiliza como sustrato arabinosanos altamente sustituido por arabinosa, mientras que otros estudios demuestran valores similares de fermentabilidad en sustratos con diferentes valores de sustitución (Kabel y col, 2002b).

La relación arabinosa y xilosa en los oligosacáridos (mol/mol) tienen un valor de 0,06 para XOS1, XOS3 y F2 y 0,08 para XOS2. Estos valores de ratio son similares a los obtenidos a partir de paja de maíz por Moniz y col. (2016). Este ratio tiene sentido que no cambie en las muestras procedentes de la fracción líquida inicial y las sometida a diferentes técnicas de purificación, y sí lo haga en el producto obtenido tras una etapa de hidrólisis enzimática.

La sustitución con grupos acetilos, también ha sido calculada con el fin de conocer las ramificaciones que presenta estos productos. Se ha realizado una estimación del grado de sustitución teniendo en cuenta la fracción másica del ácido acético, (determinado mediante hidrólisis total con ácido sulfúrico al 4%) y el contenido en oligosacáridos lineales de DP2-DP6 en cada producto obtenido. La fracción másica fue de 0,033, 0,026, 0,021 y 0,035 expresada como g de ácido acético/ g de producto para el producto XOS1, XOS2, XOS3 y F2 respectivamente. El contenido en X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> y X<sub>6</sub> se determinó mediante la técnica HPAEC/PAD.

La relación molar xilosa/grupos acetilos para el producto XOS1 fue de en torno a 3, lo que justificaría la presencia de compuestos di y triacetilados, observada en los análisis

MALDI-TOF. En el caso de los productos XOS2 y XOS3 el grado de acetilación estimado fue menor (relación xilosa/grupos acetilo alrededor de 2), lo que indica que por cada dos xilosa hay un grupo acetilo. Finalmente, el producto F2 presentó un mayor grado de acetilación ya que por cada xilooligosacárido habría un grupo acetilo, aunque en el análisis estructural con MALDI-TOF no lo confirma, con lo que se debe realizar un estudio más profundo.



**Figura 4.36.** Perfil de degradación en la fermentación *in vitro* de XOS1 (a) y XOS2 (b) después de 4 y 24 h mediante HPAEC-PAD

### ***b) Efecto de la población de Bifidobacterias***

La determinación de las comunidades microbianas es otro parámetro necesario que se debe analizar en los estudios de evaluación de la actividad prebiótica, mediante métodos fiables. En la actualidad, esta tarea es más precisa debido al desarrollo de las técnicas de biología molecular. La técnica *FISH*, como ya se ha comentado anteriormente, permite la visualización de poblaciones bacterianas presentes en la muestra. Para ello, se utilizan sondas coloreadas de ácidos nucleicos marcadas con grupos fluorescentes (específica para cada especie bacteriana) para detectar las regiones 16S del ARN del interior de las células, combinando así la información visual con la precisión molecular. Los compuestos XOS1 y XOS2, fueron seleccionadas para el estudio del efecto de la población de *Bifidobacterias* y se evaluó comparativamente la actividad prebiótica frente a FOS (prebiótico comercial)

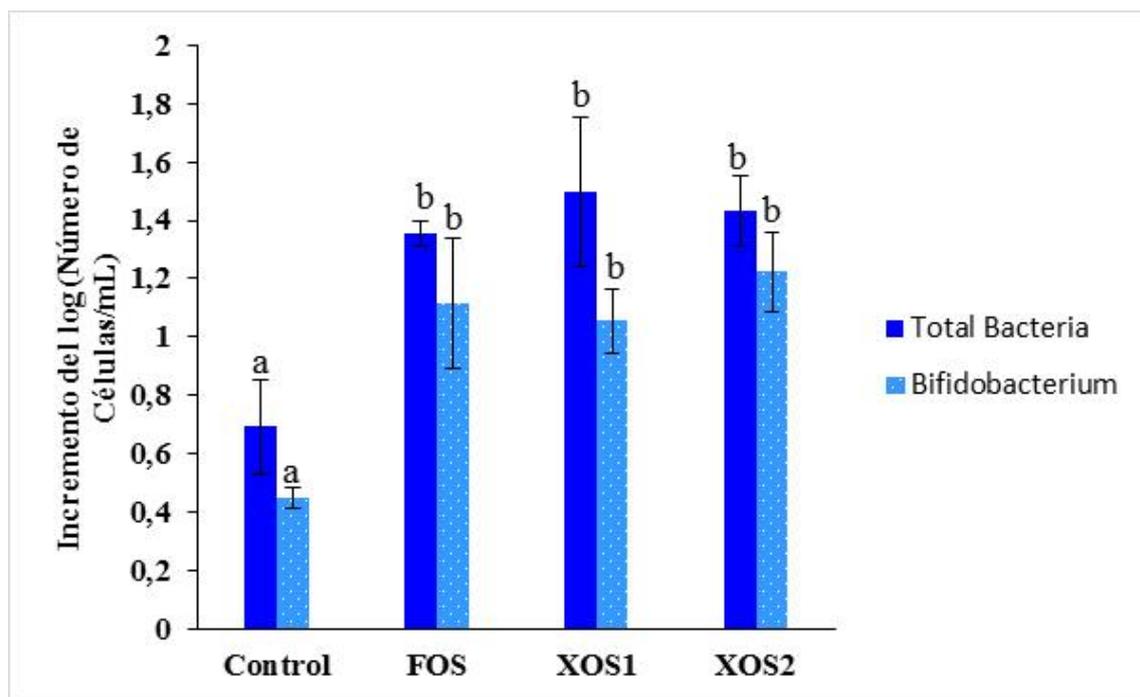
El género de *Bifidobacterium* es uno del más beneficioso de la microbiota intestinal humana. Su número está asociado a una variedad de efectos positivos que incluyen la producción de ácido acético y ácido láctico a partir de oligosacáridos y polisacáridos, la generación de vitaminas y la eliminación de carcinógenos (Binns, 2013). Además, se observaron menos cantidad de estas bifidobacterias, por ejemplo, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal microbiota cuando se comparan con personas sanas (Roberfroid y col., 2010).

La figura 4.37 muestra los resultados del incremento en el número total de bacterias y bifidobacterias observadas para los xilooligosacáridos seleccionados (XOS1 y XOS2) en comparación con el control (fermentación sin fuente de carbono) y FOS, donde se aprecia un aumento similar en el recuento de bifidobacterias, no encontrándose diferencias significativas en la población de bifidobacterias cuando se utilizaron XOS1, XOS2 o FOS como fuentes de carbono.

Después de 24 h de fermentación, se logró un aumento significativo de las bacterias totales (cuantificado mediante el uso de la tinción DAPI) independientemente de los xilooligosacáridos empleados. Además, se observó un incremento de log número de células/mL de 1,5 y 1,4 para los medios que contenían XOS1 y XOS2 respectivamente. Estos resultados confirman la idoneidad de estos sustratos como fuentes de carbono para

aumentar las poblaciones totales de bacterias y bifidobacterias.

Con estos ensayos podemos confirmar que los xilooligosacáridos estudiados obtenidos a partir de la paja de cebada pretratada presentan una actividad prebiótica y se debería seguir haciendo ensayos con ellos para poder comercializarlos.



**Figura 4.37.** Incremento (con respecto al tiempo 0 h) del recuento total de bacterias y *Bifidobacterium* a las 24 h determinado por la técnica FISH en cultivos fecales que utilizan FOS, XOS1 y XOS2 como fuente de carbono y la muestra control (sin fuente de carbono), <sup>a,b</sup> indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Las barras de error indican la desviación estándar

#### 4.8. Bioetanol a partir de RSI

El RSI obtenido en el pretratamiento de EV (180 °C-30 min) fue sometido a hidrólisis enzimática y posterior fermentación para obtener etanol. Este residuo presenta un contenido en carbohidratos del 66,1% (55,9% celulosa y 10,3% hemicelulosa) que puede ser aprovechado para su transformación a etanol. La composición completa del RSI se muestra en la figura 4.2 (pág.119). En un proceso de conversión de materiales lignocelulósicos a etanol, interesa que la concentración de éste en el medio de

fermentación sea la más alta posible. La obtención de concentraciones de etanol superiores al 4% contribuyen a disminuir la demanda energética en la etapa de destilación, contribuyendo a la viabilidad económica del proceso de conversión de materiales lignocelulósicos a etanol (Wingren y col., 2003). La concentración de etanol alcanzada en el proceso de fermentación va a depender en gran medida de la concentración de azúcares que se produzcan en la etapa previa de hidrólisis enzimática. Pero para alcanzar esta concentración de etanol es necesario, por tanto, utilizar alta carga de sólidos (concentración de sustrato) cuando se utilizan materiales lignocelulósicos (Koppram y col., 2014).

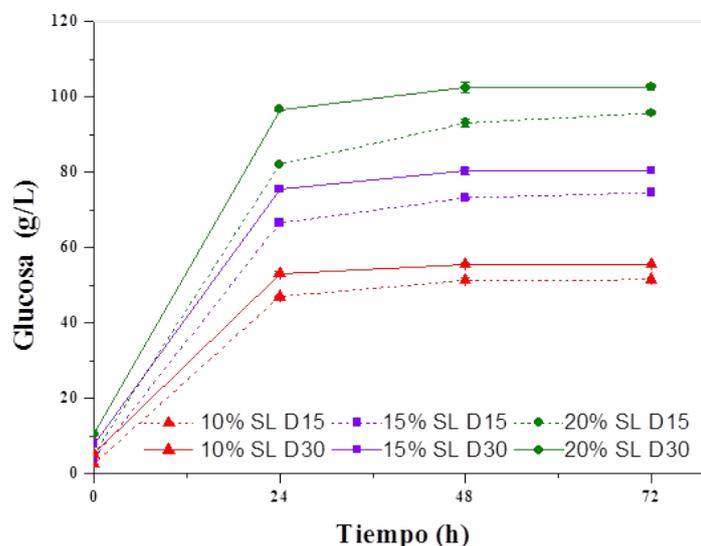
El RSI, como ya se ha comentado anteriormente fue el sustrato utilizado en la hidrólisis enzimática con una carga de sólidos de 10, 15 y 20% (p/v). La enzima utilizada fue la preparación enzimática Cellic CTec2, estudiándose dos dosis (denominadas D15 y D30). Los detalles de las condiciones de los ensayos se recogen en el apartado 3.8 (pág. 102).

En la figura 4.38 presenta las cinéticas de producción de glucosa (g/L) durante 72 h de proceso de hidrólisis enzimática, utilizando distintas concentraciones de sustrato [10, 15 y 20% (p/v)] y distintas dosis de enzima (15 y 30 FPU/g sustrato). El perfil de producción de glucosa siguió un patrón normal en la HE, con una rápida liberación de glucosa al inicio (24 h), seguida de una bajada en la velocidad de producción de glucosa. Como era de esperar, la concentración de glucosa aumentó con la carga de sólidos, alcanzándose a las 72 h producciones de glucosa de 50-51, 72-74 y 92-93 g/L a concentraciones de sustrato de 10, 15 y 20%, respectivamente.

Como se observa en la figura 4.38, la mayor producción de glucosa (85% de la glucosa final liberada después de 72 h) tuvo lugar en las primeras 24 h. No se produjo un incremento significativo de glucosa entre el intervalo de 48 a 72 h de HE ( $< 3$  g/L).

La dosis de enzima no mejoró significativamente la liberación de glucosa al final de la hidrólisis (concentración de glucosa  $< 2$ g/L) durante 72 h con todas las dosis estudiadas. Sin embargo, a las 24 h y con una alta carga de sólidos (20%, p/v) se observó un efecto

positivo con la dosis de enzima, produciéndose una concentración de glucosa  $> 90$  g/L utilizando la mayor dosis de enzima (D30).



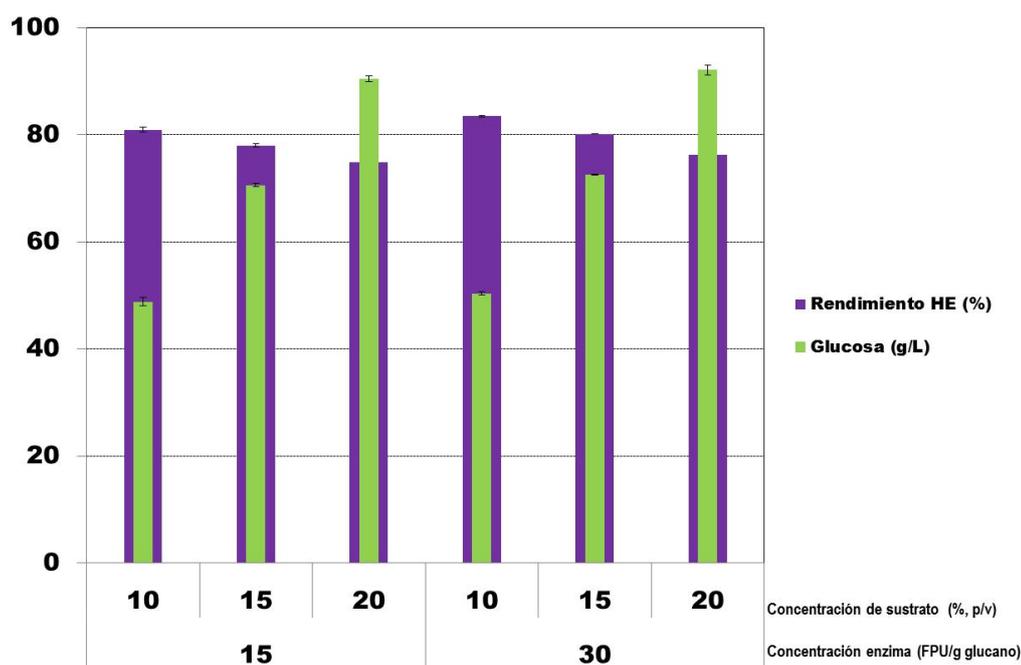
**Figura 4.38.** Cinéticas de producción de glucosa (g/L) durante la hidrólisis enzimática del RSI de paja de cebada pretratada a 180 °C y 30 min utilizando distintas concentraciones de sustrato y dosis de enzima

Reseñar que, a la hora de seleccionar la concentración de sustrato, se debe tener que realizar un balance entre la concentración de azúcares fermentables en el medio de HE y el rendimiento de hidrólisis enzimática, así como el tiempo de residencia y la dosis de enzima utilizada. En la figura 4.39 se recogen la concentración de glucosa producida durante la hidrólisis y los porcentajes de rendimiento de hidrólisis, frente a las diferentes concentraciones de sustrato y dosis de enzima ensayadas.

Los rendimientos de HE disminuyeron del 81 al 75% y del 83 al 76% al aumentar la concentración de sustrato del 10 a 20% con las dosis de enzima D15 y D30, respectivamente. Este hecho se asocia a problemas de la transferencia de masa cuando se trabaja a alta consistencia de sólidos (20%) (Hodge y col., 2008).

Por otra parte, el rendimiento de HE no difirió significativamente entre la dosis de enzimas, obteniéndose rendimientos del 81 y 83%, 78 y 80% y 75 y 76% cuando se utilizó

en el medio de reacción concentraciones de sólidos del 10, 15 y 20%, respectivamente. Las mayores diferencias entre las dosis de enzima aplicada se observan a las 24 h y alta carga de sólido. Es destacable reseñar que la utilización de 20% de carga de sólidos dio como resultado una concentración de glucosa suficiente (superiores a 90 g/L) para obtener el etanol necesario para una destilación eficiente, sin comprometer excesivamente el rendimiento de hidrólisis enzimática (75%).



**Figura 4.39.** Rendimientos de hidrólisis enzimática y concentración de glucosa (g/L) obtenidos a 72 h con diferentes concentraciones de sustrato y dosis de enzima

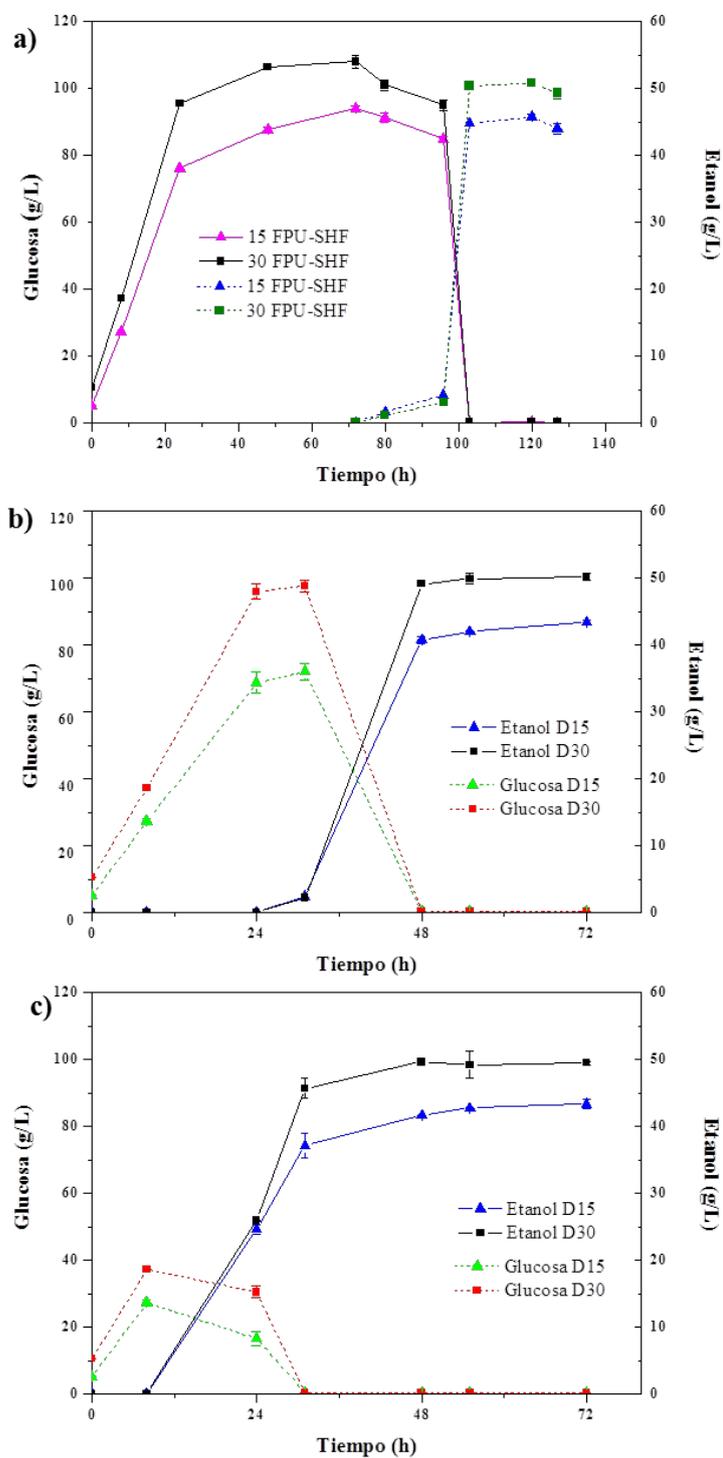
Puesto que la utilización de tiempos superiores a 24 h no supone un incremento sustancial en la producción de glucosa y, por tanto, en los rendimientos de hidrólisis enzimática, se estudiaron diferentes estrategias de proceso de producción de etanol utilizando la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red como microorganismo fermentador. Dada la elevada concentración de sólidos (20 %, p/v) necesaria para obtener concentraciones de azúcar, que una vez fermentada alcancen concentraciones de etanol superiores al 4%, se estudió el efecto del tiempo de presacarificación (8 y 24 horas), así como, el efecto de la dosis de enzima (15 y 30 FPU/g glucano) en la producción de etanol. En la figura 4.40 se muestran las cinéticas de

producción de etanol y consumos de glucosa en los procesos PSFS, así como el proceso HFS para su comparación.

En el proceso de HFS, la mayor concentración de glucosa (108 g/L) se obtuvo utilizando la dosis alta de enzima (D30), frente a los 94 g/L obtenidos con la dosis baja (D15). La concentración máxima de etanol alcanzada fue de 46 y 51 g/L, a las 105 h de proceso total, para las dosis enzima D15 y D30, respectivamente. Como se puede observar en la figura 4.40a, no se detectó glucosa al final de HFS indicando un buen comportamiento en el proceso fermentativo.

No obstante, se observó cierto retraso al principio de la fermentación, a las 24 h después de la inoculación, la concentración de etanol alcanzada fue menor de 5 g/L (Fig. 4.40a). Esto se debe probablemente a que durante la hidrólisis enzimática se generan otros productos (azúcares, fenoles, etc.), distintos a glucosa, y que junto con la baja concentración de inóculo (0,2 g/L) utilizada pueden afectar a la fermentación, retrasando la producción de etanol.

En el caso de la utilización de una etapa previa de sacarificación de 8 h o 24 h a la SFS ( $P_{8h}SFS$  y  $P_{24h}SFS$ ), no se incrementaron las producciones de etanol (Fig. 4.40b y 4.40c), alcanzándose concentraciones de etanol en torno a 43 y a 50 g/L con las dosis de enzima de 15 y 30 FPU/g glucano, respectivamente. No obstante, cabe reseñar que una etapa de presacarificación de 8 h a 50 ° C es suficiente para disminuir la viscosidad del medio en el inicio de la fermentación, reduciéndose el tiempo total del proceso. Es destacable, además, que la disminución de la dosis de enzima a la mitad se reduce únicamente un 14% la concentración de etanol. Las concentraciones de etanol obtenidas fueron superiores a las obtenidas por otros autores utilizando paja de cebada pretratada mediante extrusión utilizando la misma levadura y concentración de sólidos 20%. Duque y col. (2014b) en su estudio reportan concentraciones de etanol inferiores a 30 g/L y rendimientos sobre el teórico del 53%.



**Figura 4.40.** Cinéticas de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando diferentes esquemas de producción de etanol. a): HFS; b). P<sub>8h</sub>SFS y c) P<sub>24h</sub>SFS

En la tabla 4.12, se recogen los datos de rendimiento de producción etanol expresados como g/g glucosa y como porcentaje sobre el teórico (0,51 g de etanol/g glucosa). Los rendimientos fueron, en todos los casos superiores a 0,34 g etanol/g glucosa. Estos rendimientos, fueron superiores a los obtenidos por García-Aparicio y col. (2011) con levaduras termotolerantes. Estos autores obtuvieron rendimientos de 0,24 g etanol/g glucosa a partir del RSI obtenido de paja de cebada pretratada con EV (190 °C-10 min), realizando los ensayos al 15% de carga de sólido.

Las productividades volumétricas se incluyen también en la tabla 4.12. En los procesos de HFS éstas fueron 0,4 y 0,5 g/L.h con dosis de enzimas de D15 y D30, respectivamente. Las productividades volumétricas fueron superiores los procesos de PSFS. El mejor resultado (1,0 g/L.h) fue obtenido con P<sub>8h</sub>SFS y dosis de enzima de 30 FPU/g (D30). En estas condiciones, se necesitaron menos de 48 h de fermentación para obtener la máxima concentración de etanol.

**Tabla 4.12.** Concentración de etanol y rendimiento de fermentación con diferentes configuraciones de proceso

Configuración	Dosis de enzima (FPU/ g glucano)	Concentración de Etanol (g/L)	Rendimiento (Y <sub>E/G</sub> )		
			g etanol/g glucosa	(%) <sup>a</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup> (g/L.h)
HFS	15	45,8 ± 0,3	0,36 ± 0,04	71,3	0,4
	30	50,8 ± 0,5	0,39 ± 0,08	76,0	0,5
P <sub>8h</sub> SFS	15	43,3 ± 0,5	0,34 ± 0,05	67,4	0,9
	30	49,6 ± 0,2	0,38 ± 0,02	74,2	1,0
P <sub>24h</sub> SFS	15	43,4 ± 0,1	0,34 ± 0,02	65,7	0,8
	30	49,9 ± 0,6	0,38 ± 0,08	75,1	0,9

<sup>a</sup>: porcentaje sobre el teórico <sup>b</sup>: productividad volumétrica

En el mejor de los casos, el rendimiento en etanol obtenido fue de 22,3 g etanol/100 g paja cebada pretratada con dosis de enzima de 30 FPU/g. Como resultado reseñable es que se reduce escasamente (menos del 9%) el rendimiento si la dos dosis de enzima se

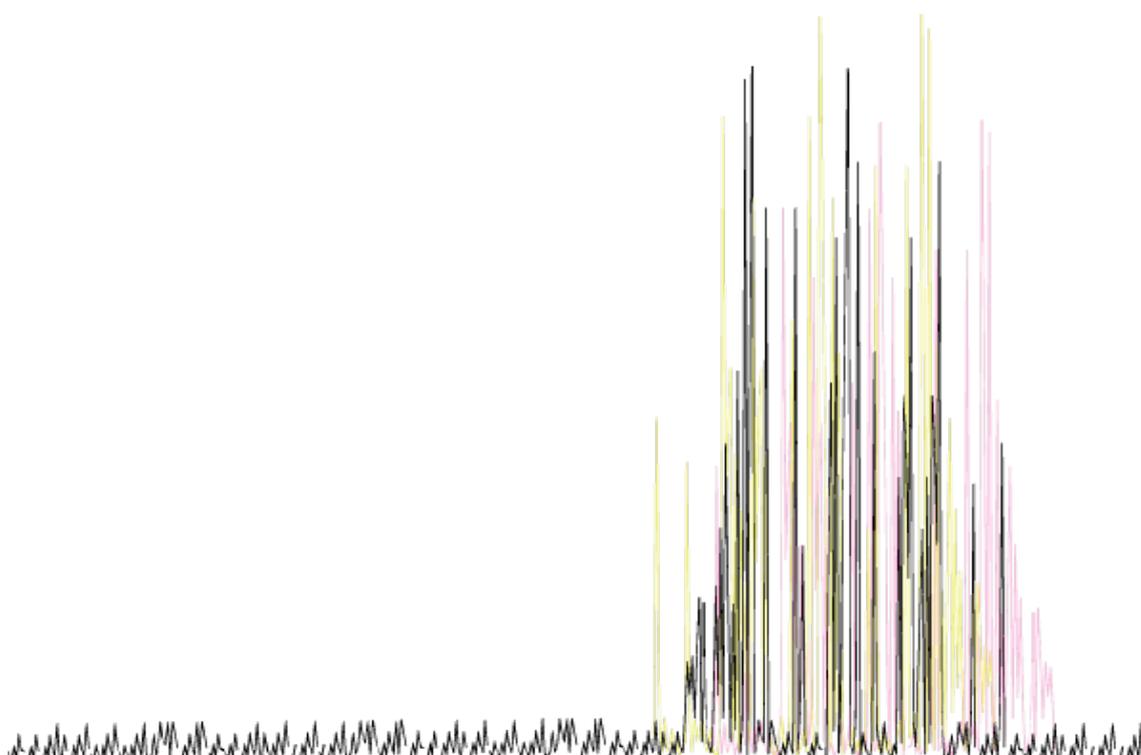
reduce a la mitad. Rendimientos de obtención de etanol similares fueron obtenidos por Lara-Serrano y col. (2018), en paja cebada pretratada con líquidos iónicos (22,9 g/100 g paja pretratada), aunque en este caso y dado el tipo de pretratamiento, no se ha producido la separación de la fracción de hemicelulosa para la obtención de xilooligosacáridos.

*S. cerevisiae* Ethanol Red, la levadura utilizada, exclusivamente fermenta las hexosas a etanol, por lo que toda la xilosa producida en la etapa de hidrólisis enzimática no puede ser fermentada a etanol, quedando al final del proceso una concentración final en el medio de fermentación en torno a 4-6 g/L de xilosa. Esta xilosa podría ser fermentada conjuntamente con la glucosa si se emplease una estrategia de co-fermentación utilizando microorganismos capaces de fermentar ambos azúcares, aumentando ligeramente el rendimiento final de etanol del proceso.

El rendimiento global de producción etanol en este trabajo fue de 126 g etanol/1000 g de paja de cebada, valor superior al obtenido por Duque y col (2014b), que reportaron valores de rendimiento global de 110 g etanol/1000 g de paja de cebada utilizando paja de cebada y un pretratamiento combinado álcali y extrusión.

Estos resultados muestran como el empleo de la paja de cebada es una materia prima apropiada para ser utilizada en una biorrefinería. El pretratamiento de explosión por vapor al que se somete la biomasa nos proporciona una fracción líquida a partir de la cual podemos obtener 129,7 g de XOS (DP2-DP6) mediante un cóctel enzimático. Partiendo del residuo sólido insoluble, es posible obtener 126 g de bioetanol. Ambos resultados son obtenidos a partir de 1 kg de paja de cebada.

## 5. CONCLUSIONES





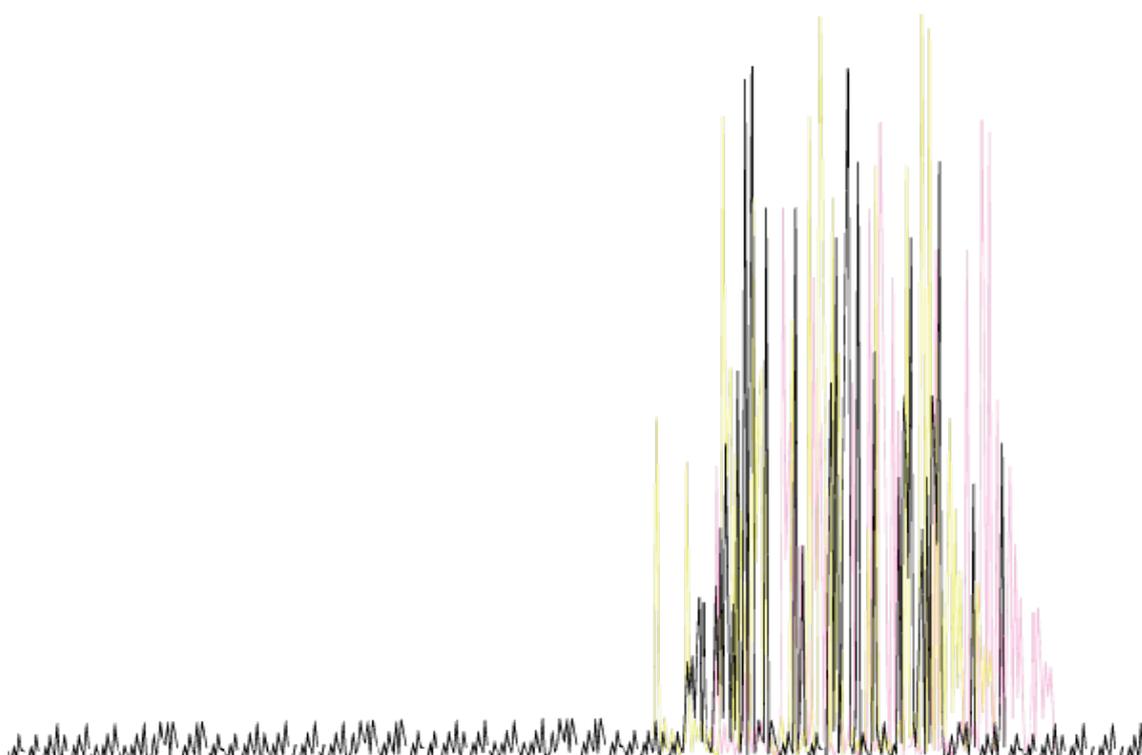
El estudio planteado en este trabajo permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La explosión por vapor es un método de pretratamiento, basado en la autohidrólisis, efectivo para alterar la estructura de la paja de cebada. Bajo unas condiciones de cierta severidad (180°C y 30 min), se obtiene una fracción líquida que contiene la hemicelulosa solubilizada y un residuo sólido insoluble rico (RSI) en celulosa y lignina. En estas condiciones de pretratamiento, no se consigue desacetilar por completo la materia prima.
2. En la hemicelulosa solubilizada con estas condiciones de pretratamiento se encuentran los xilooligosacáridos (XOS) con diferentes grados de polimerización que se pueden agrupar en dos categorías: superiores a DP6 y entre DP2-DP6. No obstante, se observa la presencia de monosacáridos.
3. Los rendimientos de hidrólisis enzimática se ven mejorados cuando el sustrato es sometido a una etapa previa de purificación con una resina de intercambio de lecho mixto.
4. La utilización de la enzima endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa de la familia GH11 permite mejorar en un 43,4%, la producción de XOS con DP2-DP6 a partir de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento.
5. Se ha confirmado que la utilización de las enzimas accesorias ( $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, feruloil esterasa y acetilxilano esterasa) junto a la endo- $\beta$ -(1,4)-D-xilanasa supone una considerable mejora en la producción de XOS con DP2-DP6 como consecuencia de la hidrólisis de las cadenas laterales.
6. Los métodos de cromatografía de exclusión molecular permiten alcanzar productos con mayor grado de pureza que los métodos de ultrafiltración. El producto F2 obtenido mediante cromatografía de exclusión molecular presenta una pureza superior al 92% lo que permitiría su utilización como prebiótico comercial.
7. La caracterización estructural de los xilooligosacáridos (grado de polimerización, distribución de los sustituyentes, etc.) llevada a cabo con las técnicas de MALDI-

TOF-MS y FTIR, proporcionan una información valiosa ya que las características estructurales influyen en su potencial prebiótico. Todos los productos contienen compuestos tanto lineales como ramificados con grupos acetilos. El producto XOS2 además contiene compuestos con sustituyente con grupos feruloílicos.

8. Las concentraciones de AGCC confirmaron las propiedades bifidogénicas de las muestras (XOS1, XOS2, XOS3 y F2) sometidas a la evaluación prebiótica en los ensayos *in vitro*, ya que los niveles alcanzados fueron iguales o superiores a los logrados por los oligosacáridos comerciales. No obstante, la población de *Bifidobacterium* en los sustratos no mostraron cambios significativos con respecto a la muestra control.
9. La utilización del RSI en el proceso de presacarificación y fermentación simultánea no incrementó la producción de etanol respecto a la configuración de hidrólisis y fermentación separada utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red. No obstante, esta configuración sí redujo el tiempo del proceso.
10. A partir de 1 kg de paja de cebada se ha logrado producir 129,7 g de XOS (DP2-DP6) y 126 g de bioetanol. Estos resultados permiten concluir que la paja de cebada es un sustrato adecuado para su utilización en una biorrefinería.

## 6. BIBLIOGRAFÍA





- Adapa, P.K., Tabil, L., Schoenau, G., Canam, T., Dumonceaux, T., 2011. Quantitative analysis of lignocellulosic components of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw using fourier transform infrared spectroscopy. *J. Agric. Sci. Technol.* 177-188.
- Alizadeh, A., Akbaril, P., Difilippo, E., Schols, H.A., Ulfman, L.H., Schoterman, M.H.C., Garssen, J., Fink-Gremmels, J., Braber, S. 2016. The piglet as a model for studying dietary components in infant diets: effects of galacto-oligosaccharides on intestinal functions. *Brit. J. Nutr.* 115, 605–618.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114515004997>
- Al Manasrah, M., Kallioinen, M., Ilvesniemi, H., Mänttari, M., 2012. Recovery of galactoglucomannan from wood hydrolysate using regenerated cellulose ultrafiltration membranes. *Bioresour. Technol.* 114, 375-381.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.014>
- Álvarez, C., González, A., Negro, M.J., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Sáez, F., 2017. Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Ind. Crops Prod.* 99, 41-48.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.034>
- Alvira, P., Negro, M.J., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M., 2016. Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. *Bioethanol* 2, 66-75.  
<https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0003>
- Amorim, C., Silvério, S.C., Prather, K.L.J., Rodrigues, L.R., 2019a. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* 0-1.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>
- Amorim, C., Silvério, S.C., Rodrigues, L.R., 2019b. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma* species. *Food Chem.* 270, 86-94.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.080>
- Arai, T., Biely, P., Uhliariková, I., Sato, N., Makishima, S., Mizuno, M., Nozaki, K., Kaneko, S., Amano, Y., 2019. Structural characterization of hemicellulose released from corn cob in continuous flow type hydrothermal reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 127, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.016>
- Aristizábal-Marulanda, V., Cardona Alzate, C.A., 2019. Methods for designing and assessing biorefineries: Review. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 13, 789-808.

- <https://doi.org/10.1002/bbb.1961>
- Arkell, A., Krawczyk, H., Jönsson, A.S., 2013. Influence of heat pretreatment on ultrafiltration of a solution containing hemicelluloses extracted from wheat bran. *Sep. Purif. Technol.* 119, 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.09.001>
- Arrieta, M.C., Stiemsma, L.T., Dimitriu, P.A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Kuzeljevic, B., Gold, M.J., Britton, H.M., Lefebvre, D.L., Subbarao, P., Mandhane, P., Becker, A., McNagny, K.M., Sears, M.R., Kollmann, T., Mohn, W.W., Turvey, S.E., Brett Finlay, B., Finlay, B.B., 2015. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* 7, 307ra152. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271>
- Arslan, Y., Eken-Saraçoğlu, N., 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol. *Bioresour. Technol.* 101, 8664-70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.085>
- Badie, M., Asim, N., Jahim, J.M., Sopian, K., 2014. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *APCBEE Procedia* 9, 170-174. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.030>
- Bajury, D.M., Nashri, S.M., King Jie Hung, P., Sarbini, S.R., 2018. Evaluation of potential prebiotics: a review. *Food Rev. Int.* 34, 639-664. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1373287>
- Bali, G., Meng, X., Deneff, J.I., Sun, Q., Ragauskas, A.J., 2015. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. *ChemSusChem* 8, 275-279. <https://doi.org/10.1002/cssc.201402752>
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J.S., Borrusch, M.S., Bongers, M., Walton, J.D., 2010. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 9097-9105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.028>
- Banerjee, S., Patti, A.F., Ranganathan, V., Arora, A., 2019. Hemicellulose based biorefinery from pineapple peel waste: Xylan extraction and its conversion into xylooligosaccharides. *Food Bioprod. Process.* 117, 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.012>
- Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., 2015. Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the Gastrointestinal tract SIMGI. *LWT Food Sci. Technol.* 61, 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.014>

- Bedford, M.R., Cowieso, A.J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Anim Feed Sci. Tech.* 173, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.018>
- Bensah, E.C., Mensah, M., 2013. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and Innovations. *Int. J. Chem. Eng.* 1-21. <https://doi.org/10.1155/2013/719607>
- Bertin, L., Frascari, D., Domínguez, H., Falqué, E., Riera Rodriguez, F.A., Blanco, S.A., 2015. Conventional purification and isolation. En: *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. Charis M. Galanakis (Ed.) Academic Press, 149-172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0.00007-9>
- Bian, J., Peng, F., Peng, X.P., Xu, F., Sun, R.C., Kennedy, J.F., 2012. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. *Carbohydr. Polym.* 88, 638-645. <https://doi.org/10.1016/j.carbopol.2012.01.010>
- Biely, P., Ciszárová, M., Uhliaríková, I., Agger, J.W., Li, X.L., Eijsink, V.G.H., Westereng, B., 2013. Mode of action of acetylxyylan esterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 5075-5086. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.018>
- Biely, P., Singh, S., Puchart, V., 2016. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnol. Adv.* 34, 1260-1274. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.09.001>
- Biernat, K., Grzelak, P.L., 2015. Biorefinery systems as an element of sustainable development. En: *Biofuels- Status and Perspective*. Biernat K (ed). Croatia, InTechpp, pp. 427-458. <https://doi.org/10.5772/60448>
- Binns, N., 2013. Probiotics, Prebiotics and the gut microbiota, ILSI (Europe International Life Sciences Institute). Brussels, Belgium.
- Binod, P., Gnansounou, E., Sindhu, R., Pandey, A., 2018. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. *Bioresour. Technol. Reports* 5, 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.005>
- Borsenberger, V., Dornez, E., Desrousseaux, M.-L., Massou, S., Tenkanen, M., Courtin, C.M., Dumon, C., O'Donohue, M.J., Fauré, R., 2014. A <sup>1</sup>H NMR study of the specificity of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases on natural and unnatural substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 180, 3106-3114.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.07.001>
- Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C., Chabbert, B., 2011. Probing a family GH11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.010>
- Bowman, M.J., Dien, B.S., Vermillion, K.E., Mertens, J.A., 2014. Structural characterization of (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -xylose-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -arabinose-containing oligosaccharide products of extracted switchgrass (*Panicum virgatum*, L.) xylan after exhaustive enzymatic treatment with  $\alpha$ -arabinofuranosidase and  $\beta$ -endo-xylanase. *Carbohydr. Res.* 398, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.08.006>
- Bozell, J.J., Petersen, G.R., 2010. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates - The US Department of Energy's «top 10» revisited. *Green Chem.* 12, 539-554. <https://doi.org/10.1039/b922014c>
- Brienzo, M., 2016. Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. In: *Food Waste: Practices, Management and Challenges*. G.L. Riley (Ed.), Nova Science Publishers, New York, pp. 155-188
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S., 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Res.* ID:787532. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Broekaert, W.F., Courtin, C.M., Verbeke, K., van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J.A., 2011. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 178-194. <https://doi.org/10.1080/10408390903044768>
- Brosse, N., Dufour, A., Meng, X., Qining, S., Ragauskas, A., 2012. Miscanthus: A fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6, 580-598. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Brown, R.M., 2004. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 42, 487-495. <https://doi.org/10.1002/pola.10877>
- Buddington, K.K., Donahoo, J.B., Buddington, R., 2002. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *J. Nutr.* 132, 472-477. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.472>
- Buruiana, C.T., Gómez, B., Vizireanu, C., Garrote, G., 2017. Manufacture and

- evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. *LWT - Food Sci. Technol.* 77, 449-459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.083>
- Buruiana, C.T., Vizireanu, C., Garrote, G., Parajó, J.C., 2014. Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 54, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.003>
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., Gírio, F., 2012. Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 40, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.017>
- Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Collins, M., Kolida, S., Rastall, R.A., 2012. *In vitro* fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2024-2032. <https://doi.org/10.1021/jf203622d>
- Carlson, J.L., Erickson, J.M., Hess, J.M., Gould, T.J., Slavin, J.L., 2017. Prebiotic dietary fiber and gut health: Comparing the *in vitro* fermentations of beta-glucan, inulin and xylooligosaccharide. *Nutrients* 9, 1361-1378. <https://doi.org/10.3390/nu9121361>
- Carvalho, A.F.A., Marcondes, W.F., de Oliva Neto, P., Pastore, G.M., Saddler, J.N., Arantes, V., 2018. The potential of tailoring the conditions of steam explosion to produce xylo-oligosaccharides from sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 250, 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.041>
- Carvalho, A.F.A., Neto, P. de O., Zaghetto de Almeida, P., Bueno da Silva, J., Escaramboni, B., Pastore, G.M., 2015. Screening of xylanolytic *Aspergillus fumigatus* for prebiotic xylooligosaccharide production using bagasse. *Food Technol. Biotechnol.* 53, 428-435. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.04.15.4160>
- Chambers, E.S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D.J., Murphy, K.G., Zac-Varghese, S.E.K., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G.S., Blundell, J.E., Bell, J.D., Thomas, E.L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G.R., Kolida, S., Dhillon, W.S., Bloom, S.R., Morley, W., Clegg, S., Frost, G., 2015. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64, 1744-1754. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307913>

- Chapla, D., Pandit, P., Shah, A., 2012. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresour. Technol.* 115, 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>
- Chemin, M., Wirotius, A.L., Ham-Pichavant, F., Chollet, G., Da Silva Perez, D., Petit-Conil, M., Cramail, H., Grelier, S., 2015. Well-defined oligosaccharides by mild acidic hydrolysis of hemicelluloses. *Eur. Polym. J.* 66, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.02.008>
- Chen, H., Ji, L.Y., Shu, G.W., Li, C.N., 2011. Effect of galaeto-oligosaccharide and isomalto-oligosaccharide on growth of selected probiotics. *Adv. Mater. Res.* 382, 450-453. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.382.450>
- Chen, M.H., Bowman, M.J., Cotta, M.A., Dien, B.S., Iten, L.B., Whitehead, T.R., Rausch, K.D., Tumbleson, M.E., Singh, V., 2016. *Miscanthus* × *giganteus* xylooligosaccharides: purification and fermentation. *Carbohydr. Polym.* 140, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.052>
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412-1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., de Jong, E., 2009. Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 3, 534-546. <https://doi.org/10.1002/bbb.172>
- Choi, S., Song, C.W., Shin, J.H., Lee, S.Y., 2015. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab. Eng.* 28, 223-239. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.12.007>
- Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S., 2014. Conversion of biomass platform molecules into fuel additives and liquid hydrocarbon fuels. *Green Chem.* 16, 516-547 <https://doi.org/10.1039/c3gc41492b>
- Collins, M.D., Gibson, G.R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1052s-1057s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1052s>
- Comisión Europea 2014. *Towards a circular economy: A zero waste programme for Europe*. Brussels
- Comisión Europea 2017. [https://ec.europa.eu/clima/policies/strategies\\_en](https://ec.europa.eu/clima/policies/strategies_en) (Último acceso Abril 2020)
- Cook, S.I., Sellin, J.H., 1998. Review article: short chain fatty acids in health and

- disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12, 499-507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036-1998.00337.x>
- Córdova, A., Astudillo, C., Illanes, A., 2019. Membrane technology for the purification of enzymatically produced oligosaccharides. En: *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane technology*. C. M. Galanakis (Ed.). Academic Press, pp. 113-153 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815056-6.00004-8>
- Córdova, A., Astudillo, C., Vera, C., Guerrero, C., Illanes, A., 2016. Performance of an ultrafiltration membrane bioreactor (UF-MBR) as a processing strategy for the synthesis of galacto-oligosaccharides at high substrate concentrations. *J. Biotechnol.* 223, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.028>
- Corradini, C., Lantano, C., Cavazza, A., 2013. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4591-4605. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6731-6>
- Corzo, N., Alonso, J.L., Azpiroz, F., Calvo, M.A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F.J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M.L., Clemente, A., 2015. Prebióticos: concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr. Hosp.* 31, 99-118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Cuyvers, S., Dornez, E., Moers, K., Pollet, A., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2011. Evaluation of the xylan breakdown potential of eight mesophilic endoxylanases. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.05.005>
- Da Silva, A.R.G., Torres Ortega, C.E., Rong, B.G., 2016. Techno-economic analysis of different pretreatment processes for lignocellulosic-based bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 218, 561-570. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.007>
- Dai, D., Fan, M., 2011. Investigation of the dislocation of natural fibres by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 55, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.12.009>
- Dávila, I., Gullón, B., Alonso, J.L., Labidi, J., Gullón, P., 2019. Vine shoots as new source for the manufacture of prebiotic oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 207, 34-43. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.11.065>
- De Figueiredo, F.C., Carvalho, A.F.A., Brienzo, M., Campioni, T.S., de Oliva-Neto, P., 2017. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. *Bioresour. Technol.* 228, 164-170.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.097>
- De Jong, E., Gosselink, R.J.A., 2014. Capítulo 17. Lignocellulose-based chemical products. En *Bioenergy Research: Advances and Applications*. pp. 277-313  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00017-6>
- De Jong, E., Jungmeier, G., 2015. Capítulo 1. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. En: *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. pp. 3-33 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00001-X>
- Den Besten, G., Lange, K., Havinga, R., van Dijk, T.H., Gerding, S., van Eunen, K., Müller, M., Groen, A.K., Hooiveld, G.J., Bakker, B.M., Rejngoud, D.J., 2013. Gut derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305 , G900-G910.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2013>
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., & Roberfroid, M.B., 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document PREFACE ILSI Europe's role. *Br. J. Nutr.* 81 (1), 1-27.  
<https://doi.org/10.1007/BF00888919>
- Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de abril de 2009 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE.* Diario Oficial de la Unión Europea, 5 de junio de 2009, núm. 140, p. 16-62.
- Domingues, R.M.A., Gomes, M.E., Reis, R.L., 2014. The potential of cellulose nanocrystals in tissue engineering strategies. *Biomacromolecules* 15, 2327-2346.  
<https://doi.org/10.1021/bm500524s>
- Dotsenko, G., Meyer, A.S., Canibe, N., Thygesen, A., Nielsen, M.K., Lange, L., 2018. Enzymatic production of wheat and ryegrass derived xylooligosaccharides and evaluation of their in vitro effect on pig gut microbiota. *Biomass Convers. Biorefinery* 8, 497-507. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0298-y>
- Duarte, G.C., Moreira, L.R.S., Jaramillo, P.M.D., Filho, E.X.F., 2012. Biomass-derived inhibitors of holocellulases. *Bioenergy Res.* 5, 768-777.  
<https://doi.org/10.1007/s12155-012-9182-6>
- Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2004. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5810-5817. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004>

- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., Ballesteros, M., 2014a. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresour. Technol.* 158, 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.041>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saéz, F., Ballesteros, M., 2014b. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel*. 134, 448-454. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.084>
- Dusselier, M., Sels, B.F., 2014. Selective catalysis for cellulose conversion to lactic acid and other  $\alpha$ -hydroxy acids. *Top. Curr. Chem.* 353, 85-125. [https://doi.org/10.1007/128\\_2014\\_540](https://doi.org/10.1007/128_2014_540)
- Dwivedi, M., Kumar, P., Laddha, N.C., Kemp, E.H., 2016. Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 15, 379-392. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.002>
- Ebersbach, T., Jørgensen, J.B., Heegaard, P.M., Lahtinen, S.J., Ouwehand, A.C., Poulsen, M., Frøkiær, H., Licht, T.R., 2010. Certain dietary carbohydrates promote *Listeria* infection in a guinea pig model, while others prevent it. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.030>
- Ebringerová, A., 2005. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol. Symp.* 232, 1-12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituents(s) and increasing numbers of gastro-intestinal microorganisms (ID 760, 761, 779, 780, 779, 1905), and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 760, 761, 779, 780, 779, 1905) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8, 1809.
- ECN: <https://www.ecn.nl/energy-research/index.html> (Último acceso Abril 2020)
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G.G., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Holle, A. Van, François, P., Vos, W.M. de, Delzenne, N.M., Schrenzel, J., Cani, P.D., Cani, P.D., 2011. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60, 2775-2786. <https://doi.org/10.2337/DB11-0227>
- Faber, T.A., Hopkins, A.C., Middelbos, I.S., Price, N.P., Fahey, G.C., 2011. Galactoglucomannan oligosaccharide supplementation affects nutrient

- digestibility, fermentation end-product production, and large bowel microbiota of the dog. *J. Anim. Sci.* 89, 103-112. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3028>
- Falck, P., Aronsson, A., Grey, C., Ståbrand, H., Nordberg Karlsson, E., Adlercreutz, P., 2015. Production of arabinoxylan-oligosaccharide mixtures of varying composition from rye bran by a combination of process conditions and type of xylanase. *Bioresour. Technol.* 174, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.139>
- Fang, J.M., Sun, R.C., Tomkinson, J., 2000. Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction. *Cellulose* 7, 87-107. <https://doi.org/10.1023/A:1009245100275>
- Faostat, 2018. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (último acceso abril 2020)
- Fengel, D., Wegener, G., 1984. Wood—chemistry, ultrastructure, reactions, Walter de Gruyter, Berlin and New York, 1984, 613. <https://doi.org/10.1002/pol.1985.130231112>
- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Gutiérrez-del Río, I., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F. 2016. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *J. Funct. Foods* 25, 511-522. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.032>
- Fernández, Y., Arenillas, A., Angel, J., 2011. Microwave heating applied to pyrolysis. *Advances in Induction Microwave Heat Mineral. Organic. Material. Capítulo 31. Editorial Intech* 723-752. <https://doi.org/10.5772/13548>
- Finegold, S.M., Li, Z., Summanen, P.H., Downes, J., Thames, G., Corbett, K., Dowd, S., Krak, M., Heber, D., 2014. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not *lactobacilli* in human gut microbiota. *Food Funct.* 5, 436-445. <https://doi.org/10.1039/c3fo60348b>
- Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P., 2015. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 74, 13-22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
- García-Aparicio, M.P. 2009. Biorrefinerías: situación actual y perspectivas de futuro: informe de vigilancia tecnológica. *Genoma España*.
- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129, 278-288. <https://doi.org/10.1385/ABAB:129:1:278>

- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., José Negro, M., 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw, en: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 137, 353-365. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9064-0>
- García-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2011. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90, 1624-1630. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.10.052>
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1410. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gibson, G. R., and Ottaway, R. A. 2000. Prebiotics: New developments in functional foods. *ChandosOxford*.
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775-4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gonçalves, G.A.L., Takasugi, Y., Jia, L., Mori, Y., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H., Kamiya, N., 2015. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* 72, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.01.007>
- Goncalves, G.K., Scalzo, S., Alves, A.P., Agero, U., Guatimosim, S., Reis, A.M., 2018. Neonatal cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin-1 is blocked by estradiol acting on GPER. *Am. J. Physiol. Physiol.* 314, C310-C322 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00060.2017>
- González-Muñoz, M.J., Rivas, S., Santos, V., Parajó, J.C., 2013. Fractionation of extracted hemicellulosic saccharides from *Pinus pinaster* wood by multistep membrane processing. *J. Memb. Sci.* 428, 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.021>

- Guerrero, A.B., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2018. The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. *Fuel* 213, 176-185. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2017.10.105>
- Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J.L., Parajó, J.C., 2011. Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 1687-1696. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.006>
- Gullón, B., Gullón, P., Tavaría, F., Alonso, J.L., Pintado, M., 2015. *In vitro* assessment of the prebiotic potential of *Aloe vera* mucilage and its impact on the human microbiota. *Food Funct.* 6, 525-531. <https://doi.org/10.1039/c4fo00857j>
- Gullón, B., Gullón, P., Tavaría, F., Pintado, M., Gomes, A.M., Alonso, J.L., Parajó, J.C., 2014. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxylooligosaccharides from wheat bran. *J. Funct. Foods* 6, 438-449. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.010>
- Gullón, P., González-Muñoz, M.J., van Gool, M.P., Schols, H.A., Hirsch, J., Ebringerová, A., Parajó, J.C., 2010. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3632-3641. <https://doi.org/10.1021/jf904508g>
- Gullón, P., Gullón, B., Moure, A., Alonso, J.L., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2009. Capítulo 14. Manufacture of prebiotics from biomass sources. En: *Prebiotics And Probiotics Science and Technology*. Springer New York, New York, NY, pp. 535-589. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-79058-9_14)
- Handelsman, J., 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669-85. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- Hayashi, T., 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 139-168. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001035>
- Hernández-Hernández, O., Côté, G.L., Kolida, S., Rastall, R.A., Sanz, M.L., 2011. *In vitro* fermentation of alternansucrase raffinose-derived oligosaccharides by human gut bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10901-10906. <https://doi.org/10.1021/jf202466s>
- Hijova, E., Chmelarova, A., 2007. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl. Lek List.* 108, 354-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01744.x>
- Ho, A.L., Kosik, O., Lovegrove, A., Charalampopoulos, D., Rastall, R.A., 2018. *In vitro*

- fermentability of xylo-oligosaccharide and xylo-polysaccharide fractions with different molecular weights by human faecal bacteria. *Carbohydr. Polym.* 179, 50-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.077>
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D., 2008. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 99, 8940-8948. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.015>
- Howlett, J., 2008. Functional foods: from science to health and claims. ILSI Europe. Concise Monograph Series
- Hu, F., Ragauskas, A., 2012. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenergy Res.* 5, 1043-1066. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>
- Huang, Chen, Lai, C., Wu, X., Huang, Y., He, J., Huang, Caoxing, Li, X., Yong, Q., 2017. An integrated process to produce bio-ethanol and xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriose from high ash content waste wheat straw. *Bioresour. Technol.* 241, 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.109>
- IEA, 2007. IEA bioenergy Task 42 on biorefineries: co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass. *Biomass and Bioenergy* 31, I-XI. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(07\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(07)00064-5)
- IEA, 2016. Recent Trends in the OECD: Energy and CO<sub>2</sub> Emissions, <http://www.iea.org/statistics> (Último acceso Abril 2020)
- IEA, 2017. CO<sub>2</sub> Emissions from Fuel Combustion 2017 - Highlights. International Energy Agency, 1, 1–162. [https://doi.org/10.1787/co2\\_fuel-2017-en](https://doi.org/10.1787/co2_fuel-2017-en)
- Iroba, K.L., Tabil, L.G., Sokhansanj, S., Dumonceaux, T., 2014. Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. *Biomass Bioenerg.* 66, 286-300. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2014.02.002>
- Izyan, N., Azelee, W., Jahim, J., Fauzi, A., Fatimah, S., Mohamad, Z., Rahman, R. a, Illias, R., 2016. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 81, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.038>
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 28, 33-48. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00077-1)
- Jagtap, S., Deshmukh, R.A., Menon, S., Das, S., 2017. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. *Bioresour. Technol.* 245, 283-288.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.174>
- Jönsson, L., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* 6, 6-16.
- Jorfi, M., Foster, E.J., 2015. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *J. Appl. Polym. Sci.* 132, 1-19. <https://doi.org/10.1002/app.41719>
- Jouzani, G.S., Taherzadeh, M.J., 2015. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Res. J.* 5, 152-195. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.4>
- Kabel, M.A., Carvalheiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J.C., Gírio, F.M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2002a. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 50, 47-56. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00045-0)
- Kabel, M.A., Kortenoeven, L., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. 2002b. In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *J. Agr. Food Chem.* 50, 6205-6210. <https://doi.org/10.1021/jf020220r>
- Kačuráková, M., Ebringerová, A., Hirsch, J., Hromádková, Z., 1994. Infrared study of arabinoxylans. *J. Sci. Food Agric.* 66, 423-427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660323>
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43, 195-203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 137-145. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 408-415. <https://doi.org/10.1016/j.enzimectec.2011.01.007>
- Koivula, E., Kallioinen, M., Preis, S., Testova, L., Sixta, H., Mänttari, M., 2011. Evaluation of various pretreatment methods to manage fouling in ultrafiltration of wood hydrolysates. *Sep. Purif. Technol.* 83, 50-56. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2011.09.006>
- Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C., Olsson, L., 2014. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends Biotechnol.* 32, 46-

53. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.003>
- Koutaniemi, S., van Gool, M.P., Juvonen, M., Jokela, J., Hinz, S.W., Schols, H.A., Tenkanen, M., 2013. Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. *J. Biotechnol.* 168, 684-692. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.009>
- Krishnan, C., Sousa, L. da C., Jin, M., Chang, L., Dale, B.E., Balan, V., 2010. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 441-450. <https://doi.org/10.1002/bit.22824>
- Lara-Serrano, M., Sáez Angulo, F., Negro, M.J., Morales-Delara, S., Campos-Martin, J.M., Fierro, J.L.G., 2018. second-generation bioethanol production combining simultaneous fermentation and saccharification of il-pretreated barley straw. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 7086-7095. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00953>
- Lee, J.-W., Jeffries, T.W., 2011. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresour. Technol.* 102, 5884-5890. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.048>
- Li, H., Xue, Y., Wu, J., Wu, H., Qin, G., Li, C., Ding, J., Liu, J., Gan, L., Long, M., 2016. Enzymatic hydrolysis of hemicelluloses from *Miscanthus* to monosaccharides or xylo-oligosaccharides by recombinant hemicellulases. *Ind. Crops Prod.* 79, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.021>
- Li, X., Pan, X., 2010. Hydrogels based on hemicellulose and lignin from lignocellulose biorefinery: A mini-review. *J. Biobased Mater. Bioenerg.* 4, 289-297. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2010.1107>
- Liu, C-F., Sun, R.C., 2010 Capítulo 5. Cellulose. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels En: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose pp. 131-167. Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books,. 9780444561893
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, 490-495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220-230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>

- Machado, G., Leon, S., Santos, F., Lourega, R., Dullius, J., Mollmann, M.E., Eichler, P., 2016. Literature review on furfural production from lignocellulosic biomass. *Nat. Resour.* 7, 115-129. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.73012>
- Manning, S.T., Gibson, G.R., And, P., 2004. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 287-298. <https://doi.org/10.1053/ybega.2004.445>
- Mano, M.C.R., Neri-Numa, I.A., da Silva, J.B., Paulino, B.N., Pessoa, M.G., Pastore, G.M., 2018. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 17-37. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>
- Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., García, J.C., Lopez, F., Villar, J.C., Diaz, M.J., 2012. Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Biomass Bioenerg.* 42, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.032>
- Martins de Oliveira, S., Moreno-Perez, S., Romero-Fernández, M., Fernández-Lorente, G., Rocha-Martin, J., Guisan, J.M., 2018. Immobilization and stabilization of commercial  $\beta$ -1,4-endoxylanase Depo<sup>TM</sup> 333MDP by multipoint covalent attachment for xylan hydrolysis: Production of prebiotics (xylo-oligosaccharides). *Biocatal. Biotransformation* 36, 141-150. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1308497>
- Martínez- Alcalá A. 2012. Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. CSIC.
- McCleary, B. V, Mckie, V.A., Draga, A., Rooney, E., Mangan, D., Larkin, J., 2015. arabinoxylan and arabino-xylo-oligosaccharides by  $\beta$ -xylanase,  $\alpha$ -L arabinofuranosidase and  $\beta$ -xylosidase. *Carbohydr. Res.* 407, 79-96. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.01.017>
- Mechelke, M., Koeck, D.E., Broecker, J., Roessler, B., Krabichler, F., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., Liebl, W., 2017. Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*—Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *J. Biotechnol.* 257, 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.023>
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522-550. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2012.02.002>

- Míguez, B., Gómez, B., Parajó, J.C., Alonso, J.L., 2018. Potential of fructooligosaccharides and xylooligosaccharides as substrates to counteract the undesirable effects of several antibiotics on elder fecal microbiota: a first in vitro approach. *J. Agric. Food Chem.* 66, 9426-9437. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02940>
- Mikkonen, K.S., Tenkanen, M., 2012. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends Food Sci. Technol.* 28, 90-102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.012>
- Milessi, T.S.S., Kopp, W., Rojas, M.J., Manrich, A., Baptista-Neto, A., Tardioli, P.W., Giordano, R.C., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M., Giordano, R.L.C., 2016. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. *Catal. Today* 259, 130-139. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2015.05.032>
- Mittal, A., Katahira, R., Himmel, M.E., Johnson, D.K., 2011. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: Changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 4, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-41>
- Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2012. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment--a review. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1430-42. <https://doi.org/10.1002/bit.24464>
- Mohamad, N.L., Mustapa Kamal, S.M., Mokhtar, M.N., 2015. Xylitol biological production: A review of recent studies. *Food Rev. Int.* 31, 74-89. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961077>
- Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S., Sahu, P.S., 2018. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Biosci.* 26, 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>
- Moniz, P., Ho, A.L., Duarte, L.C., Kolida, S., Rastall, R.A., Pereira, H., Carvalheiro, F., 2016. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. *Carbohydr. Polym.* 136, 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.046>
- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L.C., Carvalheiro, F., 2014. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Ind. Crop. Prod.* 62, 460-465. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.020>
- Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., Carvalheiro, F., 2013. Characterisation and

- hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Ind. Crops Prod.* 50, 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.037>
- Moraes, E. de J.C., Silva, D.D.V., Dussán, K.J., Tesche, L.Z., Silva, J.B. de A., Rai, M., Felipe, M. das G. de A., 2018. Xylitol-sweetener production from barley straw: optimization of acid hydrolysis condition with the energy consumption simulation. *Waste Biomass Valor.* 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0501-9>
- Moreira, L.R.S., de Carvalho Campos, M., de Siqueira, P.H.V.M., Silva, L.P., Ricart, C.A.O., Martins, P.A., Queiroz, R.M.L., Filho, E.X.F., 2013. Two  $\beta$ -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet. Biol.* 60, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.006>
- Moreno, A.D., Olsson, L., 2017. Capítulo 3. Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks, En: *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*. pp. 31-52. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_3)
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P., Santana, M.H.A., 2013. Capítulo 10. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications, En: *Sustainable Degradation of lignocellulosic Biomass Techniques Applications and Commercialization*. pp. 251-275. <https://doi.org/10.5772/53544>
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem.* 41, 1913-1923. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.011>
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Harris, P.J., Curzon, E.H., 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* 148, 71-85. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)80038-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)80038-6)
- Mussatto, S.I., Mancilha, I.M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* 68, 587-597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>
- Naidu, D.S., Hlangothi, S.P., John, M.J., 2018. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydr. Polym.* 179, 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>
- Negro, M.J., Álvarez, C., Ballesteros, I., Romero, I., Ballesteros, M., Castro, E., Manzanares, P., Moya, M., Oliva, J.M., 2014. Ethanol production from glucose

- and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresour. Technol.* 153, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.079>
- Neumüller, K.G., De Souza, A.C., Van Rijn, J.H.J., Streekstra, H., Gruppen, H., Schols, H.A., 2015. Positional preferences of acetyl esterases from different CE families towards acetylated 4-O-methyl glucuronic acid-substituted xylo-oligosaccharides. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0187-6>
- Nigam, P.S., Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37, 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- NREL: <https://www.nrel.gov/bioenergy/ibrf.html> (Último acceso Abril 2020)
- NREL 2010, <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html>
- Oliva, J.M., 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Chamorro, M.A., Sáez, F., Ballesteros, M., Moreno, A.D., 2017. A sequential steam explosion and reactive extrusion pretreatment for lignocellulosic biomass conversion within a fermentation-based biorefinery perspective. *Fermentation* 3, 15. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020015>
- Otieno, D.O., Ahring, B.K., 2012. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydr. Res.* 360, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017>
- Palm, M., Zacchi, G., 2004. Separation of hemicellulosic oligomers from steam-treated spruce wood using gel filtration. *Sep. Purif. Technol.* 36, 191-201. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(03\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(03)00215-6)
- Patel, S., Goyal, A., 2011. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1119-1128. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0558-5>
- Patel, S., Goyal, A., 2012. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech.* <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x>
- Payne, A.N., Zihler, A., Chassard, C., Lacroix, C., 2012. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* 30, 17-25.

- <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.011>
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R.C., 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.* 30, 879-903. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.01.018>
- Pollet, A., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 176-191. <https://doi.org/10.3109/07388551003645599>
- Pollet, A., Van Craeyveld, V., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2012. In Vitro Fermentation of Arabinoxylan Oligosaccharides and Low Molecular Mass Arabinoxylans with Different Structural Properties from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Bran and Psyllium (*Plantago ovata* Forsk) Seed Husk Annick. *J. Agri. Food Chem.* 60, 946-954. <https://doi.org/10.1021/jf203820j>
- Pronyk, C., Mazza, G., 2012. Fractionation of triticale, wheat, barley, oats, canola, and mustard straws for the production of carbohydrates and lignins. *Bioresour. Technol.* 106, 117-124. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.11.071>
- Qureshi, N., Saha, B.C., Dien, B., Hector, R.E., Cotta, M.A., 2010. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate. *Biomass Bioenerg.* 34, 559-565. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2009.12.024>
- Rabetafika, H.N., Bchir, B., Blecker, C., Paquot, M., Wathelet, B., 2014. Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. *Biomass Bioenerg.* 61, 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.022>
- Rafiqul, I.S.M., Sakinah, A.M.M., 2013. Processes for the production of xylitol-a review. *Food Rev. Int.* 29, 127-156. <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714434>
- Rao, L., Goli, J.K., Gentela, J., Koti, S., 2016. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresour. Technol.* 213, 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>
- Rasmussen, H., Tanner, D., Sørensen, H.R., Meyer, A.S., 2017. New degradation compounds from lignocellulosic biomass pretreatment: Routes for formation of potent oligophenolic enzyme inhibitors. *Green Chem.* 19, 464-473. <https://doi.org/10.1039/c6gc01809b>
- Rastall, R.A., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R., Sanders, M.E., 2005. Modulation of the microbial ecology of

- the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.003>
- Reddy, N., Yang, Y., 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 23, 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>
- Reichardt, N., Duncan, S.H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K.P., Flint, H.J., Louis, P., 2014. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 8, 1323-1335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>
- Reis, S.F., Gullón, B., Gullón, P., Ferreira, S., Maia, C.J., Alonso, J.L., Domingues, F.C., Abu-Ghannam, N., 2014. Evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9365-9373. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6009-8>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C.G., Salazar, N., 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* 7, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Rizwan, M., Lee, J.H., Gani, R., 2013. Optimal processing pathway for the production of biodiesel from microalgal biomass: A superstructure based approach. *Comput. Chem. Eng.* 58, 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2013.08.002>
- Roberfroid, M., 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.* 34., 105-110. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80176-1](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80176-1)
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *J. Nutr.* 137, 830S-837S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104, S1-S63. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Roberfroid, M., Slavin, J., 2000. Nondigestible Oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 461-480. <https://doi.org/10.1080/10408690091189239>
- Rodríguez, P.; García, J.; De Blas, C. 2004. Fibra soluble y su implicación en nutrición

- animal: Enzimas y prebióticos. XIV Curso de especialización avances en nutrición y alimentación animal, Barcelona.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Meyer, A.S., 2007. Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 284-296. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8001-6>
- Ruiz, E., Gullón, B., Moura, P., Carvalheiro, F., Eibes, G., Cara, C., Castro, E., 2017. Bifidobacterial growth stimulation by oligosaccharides generated from olive tree pruning biomass. *Carbohydr. Polym.* 169, 149-156. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.04.014>
- Sáez, F., Ballesteros, M., Ballesteros, I., Manzanares, P., Oliva, J.M., Negro, M.J., 2013. Enzymatic hydrolysis from carbohydrates of barley straw pretreated by ionic liquids. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 937-941. <https://doi.org/10.1002/jctb.3925>
- Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, M., González de los Reyes-Gavilán, C., 2008. *Bifidobacterium* exopolysaccharides fermented by human microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 4737-4745.
- Santucci, B.S., Maziero, P., Rabelo, S.C., Curvelo, A.A.S., Pimenta, M.T.B., 2015. Autohydrolysis of hemicelluloses from sugarcane bagasse during hydrothermal pretreatment: a kinetic assessment. *Bioenergy Res.* 8, 1778-1787. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9632-z>
- Sarbini, S.R., Rastall, R.A., 2011. Prebiotics: Metabolism, Structure, and Function. *Funct. Food Reviews* 3, 93-106 <https://doi.org/10.2310/6180.2011.00004>.
- Sato, N., Shinji, K., Mizuno, M., Nozaki, K., Suzuki, M., Makishima, S., Shiroishi, M., Onoda, T., Takahashi, F., Kanda, T., Amano, Y., 2010. Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from waste medium after mushroom cultivation by hydrothermal treatment with suitable pretreatment. *Bioresour. Technol.* 101, 6006-6011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.032>
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schrezenmeir, J., Vrese, M. De, 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 361s-364s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- Schwartz, A., Rusch, V., 2016. A Short Definition of Terms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 902, 1-3. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_1)

- Searle, S., Malins, C., 2013. Availability of cellulosic residues and wastes in the EU - International Council on Clean Transportation. Int. Counc. Clean Transp. White Pap.
- Shahid, E.M., Jamal, Y., 2011. Production of biodiesel: A technical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 4732-4745. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.079>
- Sharma, M., Shukla, G., 2016. Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. *Front. Microbiol.* 7, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01940>
- Shekiri Iii, J., Kuhn, E.M., Nagle, N.J., Tucker, M.P., Elander, R.T., Schell, D.J., 2014. Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover. *Biotechnol. Biofuels* 7, 23. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-23>
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., Taylor, M., 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.* 101, 1570-1580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresour. Technol.* 199, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M., 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 32, 713-728. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.01.051>
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A., 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite* 51, 456-467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>
- Sivieri, K., Morales, M.L.V., Saad, S.M.I., Adorno, M.A.T., Sakamoto, I.K., Rossi, E.A., 2014. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME<sup>®</sup> Model). *J. Med. Food* 17, 894-901. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0092>
- Slavin, J., 2013. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417-1435. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2011. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *J. Food Eng.* 105, 1-27. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.02.010>
- Sun, F., J.M., Goodwin, A., Lawther, J.M., Bolton, A.J., 1998. Isolation and

- characterization of polysaccharides from abaca fiber. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2817-2822. <https://doi.org/10.1021/jf9710894>
- Sun, R.C., J Fang, J.M., Rowlands, P., Bolton, J., 1998. Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2804-2809 <https://doi.org/10.1021/JF971078A>
- Sun, X.F., Jing, Z., Fowler, P., Wu, Y., Rajaratnam, M., 2011. Structural characterization and isolation of lignin and hemicelluloses from barley straw. *Ind. Crops Prod.* 33, 588-598. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.005>
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 60, 15–26.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 83, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Susmozas, A., Moreno, A.D., Romero-García, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2018. Designing an olive tree pruning biorefinery for the production of bioethanol, xylitol and antioxidants: a techno-economic assessment. *Holzforschung* 73, 15-23. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0099>
- Svärd, A., Brännvall, E., Edlund, U., 2015. Rapeseed straw as a renewable source of hemicelluloses: Extraction, characterization and film formation. *Carbohydr. Polym.* 133, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.023>
- Swennen, K., Courtin, C.M., Delcour, J.A., 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 459-471. <https://doi.org/10.1080/10408390500215746>
- Talebniya, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744-4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
- Tamargo, A., Gil-Sánchez, I., Miralles, B., Diana, M., Mónica, R.G.-R., Fornari, T., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Carolina, C., 2016. Simulador gastrointestinal dinámico (simgi®): una herramienta potencialmente útil en nutrición clínica. *Nutr. Hosp.* 33, 749-760. <https://doi.org/10.20960/nh.1207>
- Thulluri, C., Goluguri, B.R., Konakalla, R., Reddy Shetty, P., Addepally, U., 2013. The effect of assorted pretreatments on cellulose of selected vegetable waste and enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenerg.* 49, 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.022>

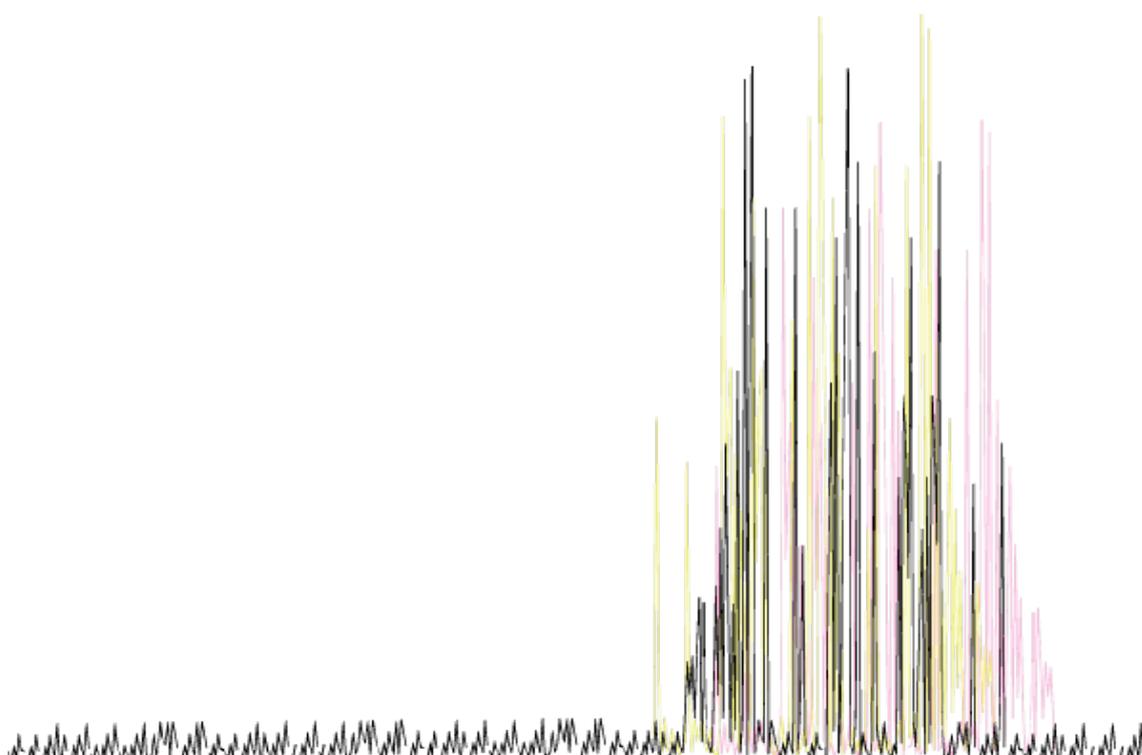
- Tungland, B.C., Meyer, D., 2002. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 90-109. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00009.x>
- Uçkun Kiran, E., Akpınar, O., Bakir, U., 2013. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. *Food Bioprod. Process.* 91, 565-574. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.12.002>
- Valenzuela, S., 2012. *Proteómica de xilanasas de Paenibacillus barcinonensis. Proyecciones biotecnológicas. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.*
- Valls, C., Gallardo, O., Vidal, T., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Roncero, M.B., 2010. Performance of new and commercial xylanases for ECF and TCF bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Wood Sci. Technol.* 45, 433-448. <https://doi.org/10.1007/s00226-010-0340-8>
- Van den Abbeele, P., Duysburgh, C., Jiang, T.A., Rebaza, M., Pinheiro, I., Marzorati, M., 2018. A combination of xylooligosaccharides and a polyphenol blend affect microbial composition and activity in the distal colon exerting immunomodulating properties on human cells. *J. Funct. Foods* 47, 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.053>
- Van Den Berg, J.P., Westerbeek, E.A.M., Bröring-Starre, T., Garssen, J., Van Elburg, R.M., 2016. Neurodevelopment of preterm infants at 24 months after neonatal supplementation of a prebiotic mix: A randomized trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 63, 270-276. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001148>
- Vernazza, C.L., Rabiú, B.A., Gibson, G.R., 2006. Capítulo 1. Human Colonic Microbiology and the Role of Dietary Intervention: Introduction to Prebiotics En: *Prebiotics: Development & Application.* pp. 1-28. <https://doi.org/10.1002/9780470023150.ch1>
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S., 2014. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *J. Environ. Chem. Eng.* 2, 573-584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>
- Waligora-Dupriet, A.-J., Campeotto, F., Nicolis, I., Bonet, A., Soulaines, P., Dupont, C., Butel, M.-J., 2007. Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.009>
- Walton, G.E., Lu, C., Trogh, I., Arnaut, F., Gibson, G.R., 2012. A randomised, double-

- blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan- oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutr. J.* 11, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-36>
- Wan, C., Zhou, Y., Li, Y., 2011. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresour. Technol.* 102, 6254-6259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.075>
- Wang, K., Chen, J., Sun, S.-N., Sun, R.-C., 2015. Capítulo 6: Steam Explosion, En: *Pretreatment of Biomass*. Elsevier, pp. 75-104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00006-2>
- Wang, W., Yan, R., Nocek, B.P., Vuong, T. V, Di Leo, R., Xu, X., Cui, H., Gatenholm, P., Toriz, G., Tenkanen, M., Savchenko, A., Master, E.R., 2016. Biochemical and structural characterization of a five-domain GH115  $\alpha$ -glucuronidase from the marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40T. *J. Biol. Chem.* 291, 14120-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702944>
- Wang, Z., Wang, X., Fu, Y., Yuan, Z., Qin, M., 2015. Saccharide separation from wood prehydrolysis liquor: Comparison of selectivity toward non-saccharide compounds with separate techniques. *RSC Adv.* 5, 28925-28931. <https://doi.org/10.1039/c4ra17017b>
- Waworuntu, R. V, Hain, H.S., Chang, Q., Thiede, L., Hanania, T., Berg, B.T., 2014. Dietary prebiotics improve memory and social interactions while reducing anxiety when provided early in life to normally developing rodents (637.5). *ASEB Journal* 28,1\_supplement
- Wende, G., Fry, S.C., 1997. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. *Phytochem.* 44, 1011-1018. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00648-6)
- Werpy, T., Petersen, G., 2004. *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. Golden, CO (United States). <https://doi.org/10.2172/15008859>
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 9, 1109-17. <https://doi.org/10.1021/bp0340180>
- Woodward, J., 1984. Xylanases: Functions, Properties and Applications. *Top Enzyme Ferment. Biotechnol.* 8, 9-30
- Wu, H., Li, H., Xue, Y., Luo, G., Gan, L., Liu, J., Mao, L., Long, M. 2017. High

- efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase. *Biochem. Eng. J.* 120, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.001>
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006>
- Yang, H., Wang, K., Song, X., Xu, F., 2011. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. *Bioresour. Technol.* 102, 7171-7176. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.03.110>
- Yoo, H.D., Kim, D., Paek, S.H., Oh, S.E., 2012. Plant cell wall polysaccharides as potential resources for the development of novel prebiotics. *Biomol. Ther.* 20, 371-379. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.4.371>
- Zeng, H., 2014. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World J. Gastrointest. Oncol.* 6, 41. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v6.i2.41>
- Zhang, J., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Viikari, L., 2011. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnol. Biofuels* 4, 60. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-60>
- Zhang, P., Dong, S.J., Ma, H.H., Zhang, B.X., Wang, Y.F., Hu, X.M., 2015. Fractionation of corn stover into cellulose, hemicellulose and lignin using a series of ionic liquids. *Ind. Crops Prod.* 76, 688-696. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.037>



# ANEXO





Cristina Álvarez, Felicia Sáez, Alberto González, Ignacio Ballesteros, José Miguel Oliva and María José Negro\*

# Production of xylooligosaccharides and cellulosic ethanol from steam-exploded barley straw

<https://doi.org/10.1515/hf-2018-0101>

Received April 30, 2018; accepted September 27, 2018; previously published online xx

**Abstract:** Agricultural residues, such as barley straw (BS), are attractive sources for the production of chemicals and fuels based on the biorefinery principle. In the present paper, BS was steam exploded at 180°C/30 min and then 90% of the cellulose and 60% of the hemicellulose were recovered in solid and liquid fractions respectively, which were used for ethanol and xylooligosaccharides (XOS) production. In the course of enzymatic hydrolysis (EH), different solid loading (SL) (10–20% w/v) and enzyme doses (15 and 30 FPU g<sup>-1</sup> glucan) were applied to optimize the yield of glucose concentrations, while 92 g l<sup>-1</sup> glucose was released at 20% SL and 30 FPU g<sup>-1</sup> glucan enzyme dosage. For ethanol production, two different process configurations were compared: separate hydrolysis and fermentation (SHF) or prehydrolysis with simultaneous saccharification and fermentation (PSSF). To transform the soluble hemicellulose into xylooligomers, two glycoside hydrolases (GH) families 10 and 11 endoxylanases were used. Reaction times, enzyme dose and several combinations of enzymes were optimized to maximize the conversion into XOS. Under the pretreatment conditions indicated above, 14 g of ethanol was obtained via the PSSF approach and 11.1 g of XOS (with DP2–DP6) was obtained per 100 g of raw material.

**Keywords:** barley straw, bioethanol, cellulolytic enzyme, endoxylanases, xylooligosaccharides

## Introduction

In 2015, around 25% of the gas emissions in the EU could be ascribed to the transport sector (European Environment Agency). To improve this situation, that emission rate should be reduced to around 14% by 2030 by using more renewable resources (Renewable Energy Directive 2016). Indeed, the utilization of lignocellulosic biomass for bioethanol production is a real and feasible alternative to fossil fuels for the transport sector (Kajaste 2014). The various biorefinery concepts may contribute a lot to achieve this goal (Cherubini 2010; Moncada et al. 2016), while agricultural residues, such as barley straw (BS), can serve as raw material. Barley is one of the most abundant biomass in the EU (58 M t production in 2016, Faostat 2016), from which one-third of straw remains in the fields and another third is used for other purposes such as livestock (Searle and Malins 2013). The current net availability of barley crop residues for bioenergy production is estimated to be 22.8 M t.

Ethanol production from lignocellulosic biomass includes the following steps: feedstock pretreatment, enzymatic saccharification, fermentation and distillation. A pretreatment step is essential to disrupt the polymer matrix of the cell wall and to increase its surface area accessible to hydrolytic enzymes (Alvira et al. 2010). Steam explosion (SE) pretreatment is one of the most thoroughly investigated pretreatments for various wood species (Duque et al. 2016; Deloule et al. 2017). In this context, Schütt et al. (2011) investigated poplar wood; Muzamal et al. (2015), spruce wood; Martín-Sampedro et al. (2012), *Eucalyptus* species; and Alvira et al. (2016), agricultural residues. SE is a combination of mechanical forces and chemical effects due to the hydrolysis of acetyl groups via autohydrolysis, which leads to a better accessibility and digestibility of cellulose (Duque et al. 2016). In integrated processes with SE pretreatment, the soluble hemicellulose (heteroxytan) can be converted to value-added compounds such as prebiotic xylooligosaccharides (XOS) and cellulosic fraction to produce ethanol. The final step of distillation is crucial for an economically viable process in view of the high steam energy consumption and the low ethanol yield.

\*Corresponding author: María José Negro, Biofuels Unit, Energy Department, CIEMAT, Avd. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain, e-mail: mariajose.negro@ciemat.es

Cristina Álvarez: Biofuels Unit, Energy Department, CIEMAT, 28040 Madrid, Spain; and Doctorate Program in Science of the International School of Doctorate, UNED, Madrid, Spain

Felicia Sáez, Alberto González, Ignacio Ballesteros and José Miguel Oliva: Biofuels Unit, Energy Department, CIEMAT, 28040 Madrid, Spain

For ethanol production on an industrial scale, ethanol concentration in the fermentation broth should be  $\geq 4\%$  (w/w) (Koppram et al. 2014), which implies that glucose production, after enzymatic hydrolysis (EH), must be at least  $80 \text{ g l}^{-1}$  (Modenbach and Nokes 2013). In order to reach this goal, high solid loadings (SLs) are needed during the hydrolysis step. EH and fermentation of pretreated biomass can be carried out as separate hydrolysis and the subsequent fermentation (SHF) with yeasts. On the other hand, in the simultaneous saccharification and fermentation (SSF), the hydrolysis and fermentation steps are carried out simultaneously in the same reactor. This approach can be combined with a prehydrolysis step (PSSF) for a short period of time, as it makes it easier to handle high SLs.

High value-added compounds can be obtained from hemicellulose, such as XOS, which are made up of xylose units linked by  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) bonds and have a low degree of polymerization (DP) between DP2 and DP6. XOS are considered as emerging prebiotics (Patel and Goyal 2012), which are “substrates that are selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit” (Gibson et al. 2017). These compounds are interesting for food and pharmaceutical industries (Aachary and Prapulla 2011). The beneficial effects are reducing cholesterol, maintaining gastrointestinal health, improving the biological availability of calcium and reducing the risk of colon cancer (Slavin 2013; Gibson et al. 2017). Arabinoxylan from cereal straw is a heteropolysaccharide composed of a backbone chain of (1 $\rightarrow$ 4) linked  $\beta$ -D-xylopyranosyl units, which are substituted at the C3 and/or C2 position with  $\alpha$ -L-arabinofuranose, 4-D-glucopyranosyl uronic acid, acetyl groups and feruloyl units. Xylan is the second major structural carbohydrate in the herbaceous biomass. XOS can be obtained from xylan by EH (Otiendo and Ahring 2012; Biely et al. 2016).

In recent years, there is an increasing interest to utilize hemicelluloses, such as straw, olive tree pruning (Cara et al. 2012) or eucalyptus wood (Gullón et al. 2014) among other biomasses. As pretreatment and hemicellulose separation, several methods are described such as autohydrolysis (Ruiz et al. 2017; Rico et al. 2018), alkaline extraction (Morgan et al. 2017) or SE (Deloule et al. 2017). Different enzymes are suitable to depolymerize the branched xylan, such as xylanases, acetylxylan esterase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\alpha$ -D-glucuronidase (Biely et al. 2016; Mechelke et al. 2017; Linares-Pastén et al. 2018). The combination of selected endoxylanases and debranching enzymes establish the nature of the produced XOS with prebiotic effects.

The present work describes the integration of bioethanol production from cellulose and the formation

of XOS by means of an EH approach based on steam-exploded BS. EH and different fermentation configurations were studied, based on different solid contents and enzyme dosages. Two glycoside hydrolases (GH10 and GH11) of the type endoxylanases were in focus for XOS production. Reaction times and enzyme dosages were optimized in terms of XOS yields. Accessory enzymes such as feruloyl esterase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase were also taken into consideration for an optimized XOS production. In Figure 1, a schematic diagram shows the experimental design used.

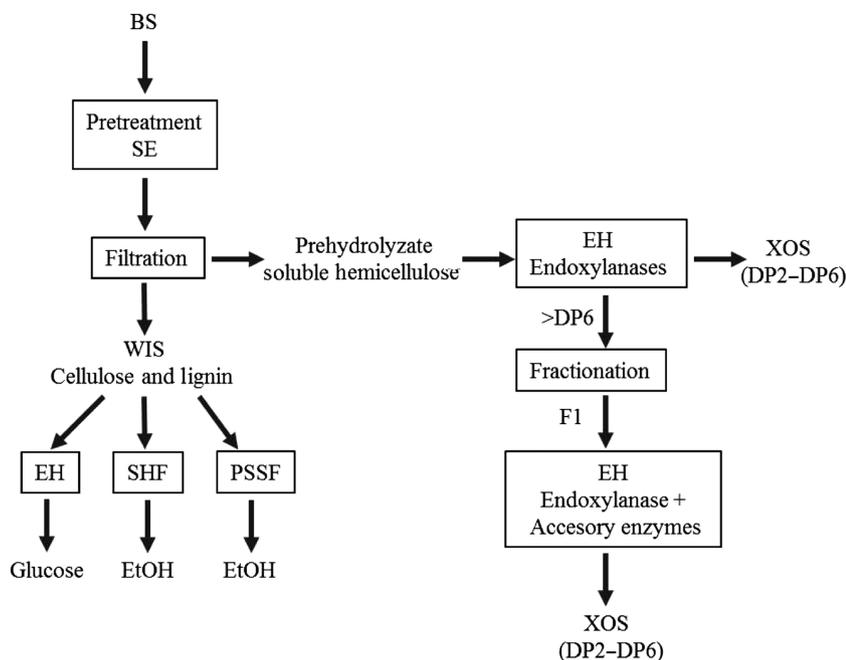
## Materials and methods

**Raw materials:** BS was supplied by CEDER-CIEMAT. The Standard Laboratory Analytical Procedures for lignocellulosic biomass analysis (Sluiter et al. 2010) served for the characterization (data in %, based on dry weight): glucan,  $32.9 \pm 1.2$ ; hemicellulose, 27.2 (xylan,  $22.06 \pm 0.47$ ; arabinan,  $3.6 \pm 0.03$ ; galactan,  $1.3 \pm 0.01$  and mannan,  $0.27 \pm 0.03$ ); acid insoluble lignin,  $16.8 \pm 1.1$ ; acid soluble lignin,  $2.1 \pm 0.03$ ; ash,  $3.9 \pm 0.05$ ; acetyl groups,  $1.72 \pm 0.02$ ; and extractives,  $13.4 \pm 0.5$ .

**Pretreatment:** BS was milled in a laboratory cutting mill (Cutting Mill Type SM2000; Retsch GmbH, Haan, Germany) to obtain chip sizes between 6 and 10 mm. SE pretreatment was carried out in a 10-l reactor at  $180^\circ\text{C}$  for 30 min (CIEMAT laboratory conditions). The slurry obtained was filtered to separate the solid fraction and the liquid fraction (prehydrolyzate), which were subjected separately to enzymatic processes.

**Enzymatic hydrolysis of the prehydrolyzate:** To obtain low molecular weight XOS (DP2–DP6) from SE-BS prehydrolyzate, two GH of the families GH10 and GH11 endoxylanases, denominated as Xyl10 and Xyl11, were used both individually and in combination. Two enzyme loading D5 ( $5 \text{ U ml}^{-1}$ ) and D20 ( $20 \text{ U ml}^{-1}$ ) were tested for each endo- $\beta$ -1,4-xylanase. Details: 50 mM sodium citrate buffer at pH 4.8 was applied at  $50^\circ\text{C}$  in an incubation shaker (Infors HT Minitron, Bottmingen, Switzerland) at 150 rpm. Samples were withdrawn after 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h reaction time. The enzyme mixture (Xyl10 + Xyl11) in a ratio of 1:1 was also tested. Finally, a supplement of  $6.3 \text{ U ml}^{-1}$  of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $2 \text{ U ml}^{-1}$  of feruloyl-esterase was applied to maximize the results in combination with Xyl11. The enzymatic activity was stopped by boiling at  $100^\circ\text{C}$  for 5 min.

**EH of water-insoluble solids:** Water-insoluble solids (WIS) were treated in 100 ml Erlenmeyer flasks with 10, 15 and 20% SL (w/v), and a final volume reaction of 30 ml (50 mM sodium citrate buffer, pH 4.8). The cellulolytic enzymes employed were Cellic Ctec2 (Novozymes, Bagsværd, Denmark). Hydrolysis media was prepared and the enzyme loadings were D15 ( $15 \text{ FPU g}^{-1}$  glucan) and D30 ( $30 \text{ FPU g}^{-1}$  glucan). All reactions were performed in triplicate at  $50^\circ\text{C}$  in a rotary shaker at 150 rpm (Infors AG, Bottmingen, Switzerland). Samples were taken at 24, 48 and 72 h and centrifuged ( $10\,000 \text{ g}$  for 5 min).



**Figure 1:** Experimental design.

Finally, the supernatant was collected to quantify the released sugars via high-performance liquid chromatography (HPLC).

**Microorganism:** *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Red, Fermentis, France) was used for fermentation in the SHF and PSSF assays. The inoculum was prepared by growing the microorganism on a rotary shaker at 150 rpm (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) and 35°C for 16 h, in a synthetic media containing ( $\text{g l}^{-1}$ ): yeast extract 5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4$  7  $\text{H}_2\text{O}$  0.3 and glucose 30. For all experiments, 0.25  $\text{g l}^{-1}$  yeast inoculum was used.

**Separate hydrolysis and fermentation:** Separate hydrolysis and fermentation (SHF) tests were carried out in 100 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of media after EH at 20% (w/v) substrate concentration for 72 h at 50°C and 150 rpm, and the liquid fraction was submitted to fermentation at 35°C for 48 h. Fermentation experiments were started by the inoculation of a cell suspension resulting in an initial cell mass concentration of 0.25  $\text{g l}^{-1}$ . The nutrient concentrations in the medium were as described above for the inoculum cultivation except glucose. Samples were taken periodically and analyzed for sugars and ethanol.

**Prehydrolysis and SSF:** Prehydrolysis and SSF (PSSF) was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks with 20% SL (w/v) and a final reaction volume of 50 ml. Enzyme loadings of D15 and D30 were tested. A prehydrolysis step was carried out at 50°C for 8 h or 24 h at 150 rpm. After that, the temperature was decreased to 35°C and the media was inoculated with *S. cerevisiae* grown overnight (0.25  $\text{g l}^{-1}$ ). Samples were taken periodically and analyzed for sugars and ethanol.

**Chemicals:** XOS standards [xylobiose ( $X_2$ ), xylotriose ( $X_3$ ), xylotetraose ( $X_4$ ), xylopentose ( $X_5$ ), xylohexose ( $X_6$ )] were purchased from Megazyme International (Ireland). Analytical reagent-grade NaOH (50%, w/w) was obtained from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Other chemicals were purchased from Merck KGaA, Darmstadt (Germany).

**Enzymes:** Endoxylanases from *Thermotoga maritima* (Xyl10) (E-XYLATM) and *Trichoderma viride* (Xyl11) (E-XYTRI),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Abf51) (GH51) from *Aspergillus niger* (E-AFASE) and feruloyl-esterase from *Clostridium thermocellum* (E-FAEZCT) (CE1) were purchased at Megazyme International (Bray, Ireland). Cellic Ctec2 was provided by Novozymes (Bagsværd, Denmark).

**Analytical methods:** Monomeric sugars were determined using a Waters Alliance HPLC system (Model 2695, Waters Corporation, Milford, MA, USA) and a refractive index detector (RID) (Waters 2414), using a column [CARBOsep CHO782 Carbohydrate & Biomass Analysis (300×7.8 mm)] coupled with a CARBOsep-CHO-782/C guard column (Transgenomic, Omaha, NE, USA). To determine oligomeric sugars in the prehydrolyzate by HPLC, acid hydrolysis with 4% (w/w)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  for 30 min at 120°C was carried out. The oligosaccharides content is based on the difference between the sugars measured before and after the acid hydrolysis. Milli-Q-water (Millipore, MA, USA) was used as the mobile phase (0.5  $\text{ml min}^{-1}$ ) at 70°C.

Sugar-degradation compounds such as furfural (F), hydroxymethylfurfural (HMF) and phenolic compounds were analyzed on a Transgenomic IC Sep ICE-COREGel 87H3 (300×7.8 mm) analytical column combined with an IC Sep-ICE-COREGEL 87H3 guard column (Transgenomic, Omaha, NE, USA) (Agilent Technologies 1100 series HPLC equipped with an Agilent 1200 series Diode-Array detector) (Agilent Technologies, CA, USA). The mobile phase was 89% 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and 11% acetonitrile (0.7  $\text{ml min}^{-1}$ ). Acetic and formic acids were quantified on an IC Sep ICE-COREGel 87H3 (300×7.8 mm) column at 65°C and with 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  acid as the mobile phase (0.6  $\text{ml min}^{-1}$ ), using a RID (Waters 2414). The XOS was analyzed on a high-performance anion exchange chromatography/pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) system (ICS2500, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). A Dionex CarboPac PA100 analytical column (250×4 mm) and PA100 guard-column (50×4 mm) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) were used. A linear gradient program from 100% A (NaOH 100 mM) to 30% B (NaOAc 500 mM/NaOH 100 mM) with a

flow rate of 0.6 ml min<sup>-1</sup> at 35°C was applied. The pulse potentials and duration on the PAD were provided by Dionex (Technical Note 20). Ethanol concentration was measured using an Agilent 7890A GC System equipped with a flame ionization detector and a Carbowax 20 M column (85°C) (Teknokroma, Barcelona, Spain) (see Oliva et al. 2017).

**High-performance size-exclusion chromatography (HPSEC):** The instrument of Waters (Milford, MA, USA) equipped with a 2414 RID was applied for molecular weight distribution determination of oligosaccharides. Three gel-filtration columns in series Shodex KS-802 (10 000 Da) (Showa Denko, K.K., Japan), Ultrahydrogel 120 (5000 Da) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and TSK-gel (G-Oligo-PW) (3000 Da) (Tosoh Bioscience GMBH, Stuttgart, Germany) served for the separation (for details see Álvarez et al. 2017).

**Gel permeation chromatography (GPC):** Polyacrylamide served for the solid phase fractionation technique. Bio-Gel P2 (Bio-Rad, Hercules CA, USA) was used in the fine particle size range; hydrated beads 45–90 µm (fractionation range of 100–1800 Da) were applied.

## Results and discussion

### SE-pretreated barley straw

Table 1 shows the composition of both WIS and the prehydrolyzate obtained after SE<sub>180°C,30min</sub>. Obviously, the hemicellulose and extractives were solubilized and WIS

**Table 1:** Composition of pretreated BS at 180°C and 30 min (WIS and prehydrolyzate).

Compounds in the WIS fraction		(%)*	
Cellulose		55.8 ± 1.6	
Hemicellulose		10.3 ± 0.2	
Xylan		9.6 ± 0.2	
Arabinan		0.3 ± 0.04	
Others structural CHs		0.3 ± 0.02	
Lignin		30.7 ± 0.5	
Sugars in prehydrolyzate			
Sugars in prehydrolyzate	Monomeric (g l <sup>-1</sup> )	Oligomeric (g l <sup>-1</sup> )	
Glucose	0.88 ± 0.01	5.22 ± 0.01	
Xylose	3.07 ± 0.02	23.13 ± 0.3	
Arabinose	2.10 ± 0.1	1.20 ± 0.05	
Galactose	0.59 ± 0.2	2.21 ± 0.06	
Mannose	0.07 ± 0.01	0.40 ± 0.01	
Compound	(g l <sup>-1</sup> )	Compound	(mg l <sup>-1</sup> )
Other compounds in prehydrolyzate			
Formic acid	0.77 ± 0.03	Vanillin	40.5 ± 1.7
Acetic acid	1.71 ± 0.08	Syringaldehyde	14 ± 0.4
Furfural	0.91 ± 0.09	<i>p</i> -Coumaric acid	19 ± 0.7
HMF	0.14 ± 0.01	Ferulic acid	34 ± 0.6

\*Percentages are based on dry weight.

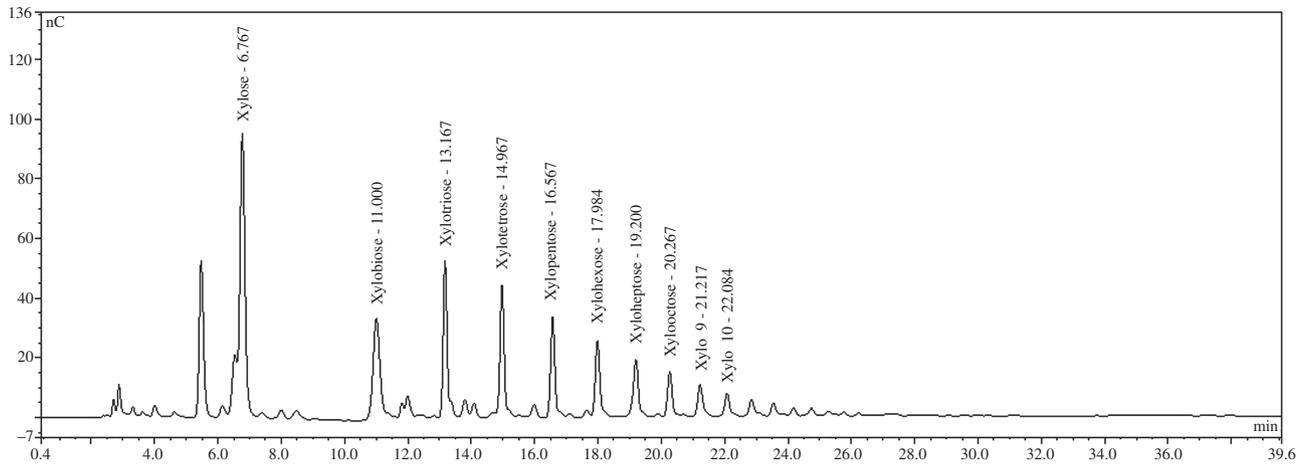
was enriched with cellulose (55.8%) and lignin (30.7%). Moreover, 10.3% of hemicelluloses were left in WIS. The recovery yields of cellulose in the solid and liquid fractions accounted for 89.4% and 9.4%, respectively. The xylan recovery yields were 21.9% in WIS and 60.2% in liquid fractions. The total recovery rate was about 99% cellulose and 82% hemicellulose. Compounds derived from lignin and carbohydrates are also presented in Table 1, including the monomeric sugars emerged. Furfural (0.91 g l<sup>-1</sup>) and HMF (0.14 g l<sup>-1</sup>) were detected as a consequence of pentose and hexose degradation, respectively. Formic acid (FA, 0.77 g l<sup>-1</sup>) results from furan degradation, and acetic acid (AA, 1.7 g l<sup>-1</sup>) results from the release of acetyl groups of hemicellulose, while the yields are in the order: AA > F > FA. The lignin degradation products vanillin, *p*-coumaric acid and ferulic acid (FeA) were also detected in low concentrations. García-Aparicio et al. (2011) found similar results.

The soluble xylans consist of mono- and oligosaccharides with different molar masses. The oligomers are preponderant (82.4%) consisting mainly of XOS. The arabinose/xylose molar ratio was very low (0.05) in the oligomeric fraction, while this ratio was 0.16 in the hemicelluloses fraction of the raw material. Thirty percent of the XOS showed a low DP between DP2 and DP6, while 45% of the fraction had higher DPs than DP6, and 25% were monosaccharides. Figure 2 shows the DP profile indicating a wide distribution range from monosaccharides to oligomers of DP10. Nevertheless, a significant proportion of oligosaccharides had a molecular size higher than DP10.

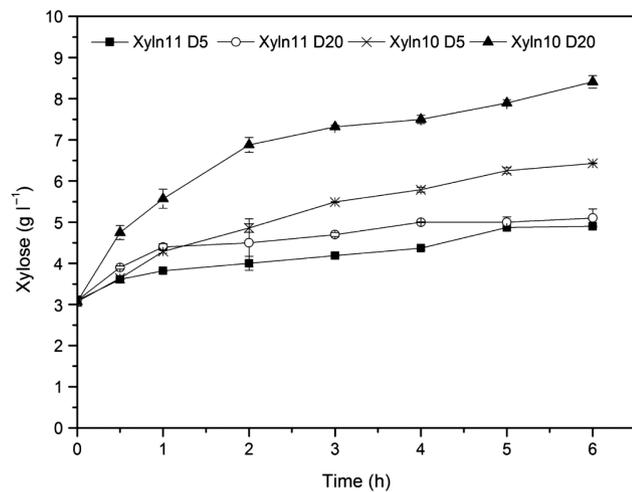
### Enzymatic hydrolysis of prehydrolyzate

EH was carried out with the endo-β-1,4-xylanases Xyln10 and Xyln11 at the loading levels of D5 and D20. The hydrolysis process for short-chain XOS production was measured over 6 h. The Xyln10 enzyme family favors the formation of low-DP XOS and increases the liberation of monomeric xylose; Xyln11 β-endoxyylanase, on the other hand, produces XOS with DP2–DP6 and monomeric xylose (Figure 3).

Incubations with Xyln10 from *T. maritima* resulted in a higher degree of hydrolysis of xylan and thus larger proportions of low-DP XOS were produced. Yields of 14.5% and 23.1% were released at D5 and D20 dosage levels. Unlike Xyln11 from *T. viride*, which generated larger proportions of low-DP XOS and xylose, 7.9% and 8.8% (D5 and D20) were liberated. As expected, the concentration of glucose, arabinose, galactose and mannose remained practically unchanged throughout the hydrolysis in all the assays; whole values are shown in the Supplementary Information. Xyln10 produced xylobiose and xylotriose in high amounts

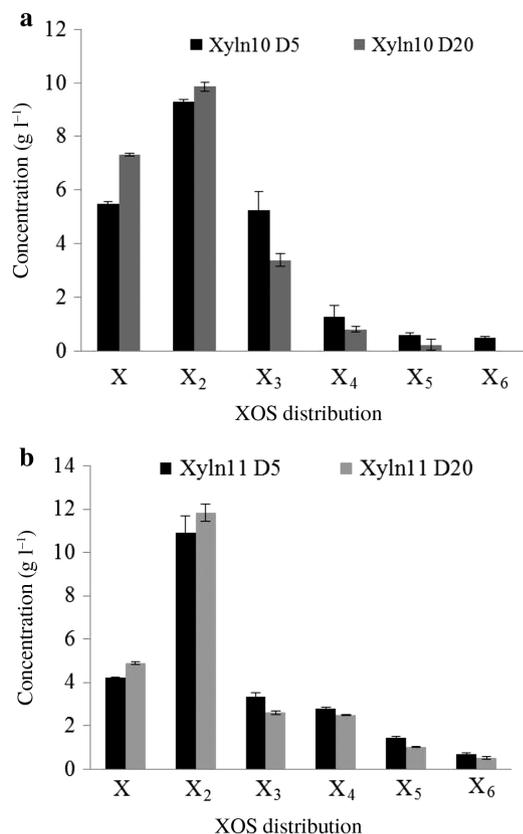


**Figure 2:** HPAEC-PAD chromatogram of xylooligosaccharides contained in the prehydrolyzate from steam-exploded barley straw at 180°C for 30 min.



**Figure 3:** Xylose released throughout the hydrolysis of pretreated barley straw with Xyln10 and Xyln11 over 6 h with two doses D5 (5 U ml<sup>-1</sup>) and D20 (20 U ml<sup>-1</sup>).

after 3 h hydrolysis time (D5 conditions) as illustrated in Figure 4a. Accordingly, 9.3 and 9.8 g l<sup>-1</sup> of xylobiose and 5.2 and 3.4 g l<sup>-1</sup> of xylotriose were formed under D5 and D20 conditions, respectively. The xylose yield was of 5.5 g l<sup>-1</sup> (D5) and 7.3 g l<sup>-1</sup> (D20). Below 3 h, XOS production under D5 conditions was better and later on, the yields decreased. On the other hand, the maximum XOS concentration was obtained with 1 h hydrolysis time with Xyln10 (D20). Under these conditions, the following yields were obtained: X<sub>2</sub> (9.03 g l<sup>-1</sup>), X<sub>3</sub> (6.8 g l<sup>-1</sup>) and xylose (5.6 g l<sup>-1</sup>). After 1 h of hydrolysis, the xylose yield increased (Figure 3) at the expense of decreasing XOS yields. With increasing incubation times up to 6 h (D20), the xylobiose yield increased up to 12.7 g l<sup>-1</sup> as a result of X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> and X<sub>6</sub> cleavages, and up to 8.4 g l<sup>-1</sup> of xylose was liberated at the expense of XOS yields. Higher



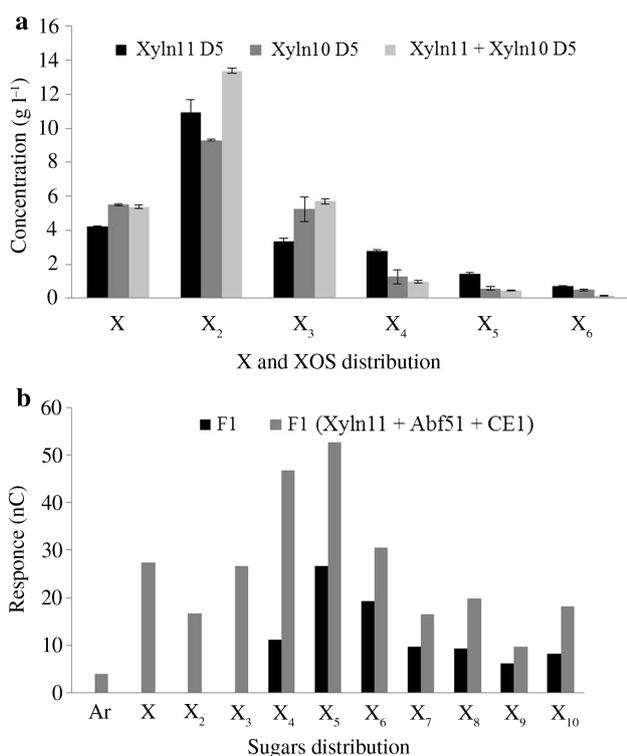
**Figure 4:** Distribution of xylose and XOS formed in EH of BS prehydrolyzate with endoxylanases. (a) Xyln10, (b) Xyln11 at 3 h. EH conditions 50 mM sodium citrate buffer, pH 4.8 at 50°C at two doses D5 (5 U ml<sup>-1</sup>) and D20 (20 U ml<sup>-1</sup>).

loading of the enzyme Xyln11 was not helpful for XOS yield increment (Figure 4b). The XOS production potential was 82% with D5 and a higher enzyme dosage lowered the yield. At 3 h of EH, Xyln11 resulted in a xylobiose production

of 10.9 g l<sup>-1</sup> (D5) and 11.9 g l<sup>-1</sup> (D20), while the XOS yield was reduced to 1.6 g l<sup>-1</sup>. Likely, Xyln11 needs three unsubstituted xylose units to cleave the glycosidic linkage. It is also possible that the active bonds cannot be occupied by the enzyme (Van Dyk and Pletschke 2012).

The maximum XOS yield was equivalent to 10.6 g per 100 g of BS. After 3 h EH with Xyln11 (D5), the sample was submitted to high-performance size exclusion chromatography analysis and 15.9% of XOS (DP > 6) remained in the medium. The D5 dosage conditions were used for the combined EH with Xyln11 and Xyln10 because of the lower xylose production (Figure 5a). The main products xylobiose (13.4 g l<sup>-1</sup>) and xylotriose (5.7 g l<sup>-1</sup>) were obtained from the mixture of Xyln10 and Xyln11. At 3 h, the xylose yield (5.4 g l<sup>-1</sup>) was lower than that in case of Xyln10 alone, probably because of inhibition problems between the two enzymes (Morgan et al. 2017). The mixture resulted in a greater xylobiose and xylotriose production than that individually and X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub> and X<sub>6</sub> products were hydrolyzed more slowly and the XOS yield was slightly increased to 11.1 g per 100 g BS. The higher xylose concentration was detrimental for further improvement of XOS yields. EH with Xyln11 (D5) resulted

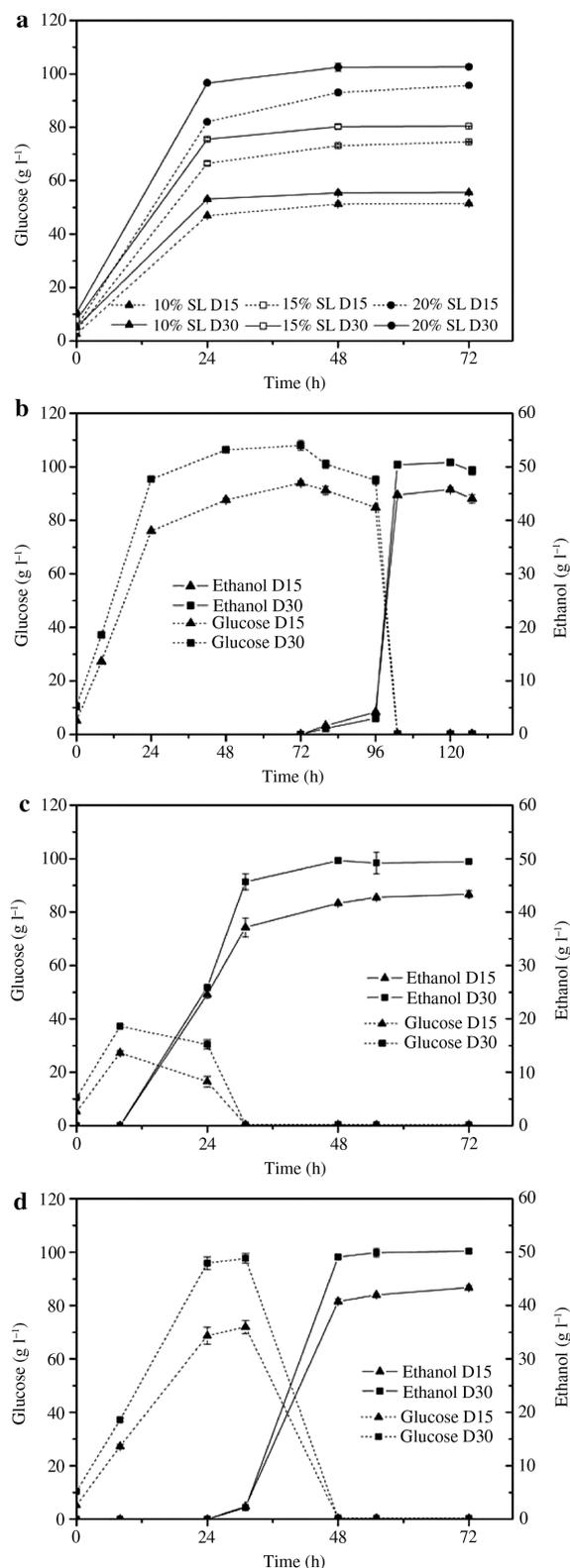
in similar XOS and lower xylose yields compared to the results in Xlyn11 + Xlyn10 assays. To enhance the low DP of XOS production, fractionation via the Bio-Gel P2 column was carried out, which leads to the removal of monomeric compounds. Three fractions were collected: fraction 1 (F1) contained the oligosaccharides with >DP6, F2 contained the oligomers in the DP2–DP6 range and F3 contained the monosaccharides and byproducts. EH of F1 was performed using Xyln11 (D5) as described above and gave rise to the best results. Because to the presence of substituents in the xylan chain (ester linkages of  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl units with phenolic acids), the addition of accessory enzymes produced an improvement of 3.7% of XOS yield in F1. A little increase in arabinose (16 mg l<sup>-1</sup>) and FeA (7.8  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) yield was also observed. The arabinosidase activity was low and left behind a small amount of arabinose without altering. At this reaction time, 33 mg l<sup>-1</sup> of xylose was seen and the increment of the XOS fraction DP2 to DP10 was also observed (Figure 5b). The total XOS produced after the two EH steps [Xyln11 plus  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Abf51) plus feruloyl esterase (CE1)] accounted for 11.0 g XOS per 100 g BS (corresponding to 6.0 g 100 g<sup>-1</sup> BS and 1.8 g 100 g<sup>-1</sup> xylobiose and xylotriose, respectively). XOS yields were higher than that reported for other cereal straw, i.e. 3.1 g 100 g<sup>-1</sup> wheat straw xylobiose and 1.1 g 100 g<sup>-1</sup> xylotriose production via hot water pretreatment (Huang et al. 2017).



**Figure 5:** Effect of the addition of enzymes to produce XOS from prehydrolyzate of BS. (a) Xyln11 (D5), Xyln10 (D5) and mixture of Xyln11 + Xyln10 (1:1, D5) at 3h; (b) F1 and F1 hydrolyzed with Xyln11 (D5) in combination with 6.3 U ml<sup>-1</sup> Abf51 and 2 U ml<sup>-1</sup> feruloyl-esterase (CE1).

## Enzymatic hydrolysis of WIS

A high SL for lignocellulosic material is needed to produce 4% alcohol concentration as required for an economic production (Koppram et al. 2014). Pretreated BS was the substrate for EH test with 10, 15 and 20% (w/v) SLs. Enzyme dosages D15 and D30 were applied. Figure 6a shows the time course of glucose concentration obtained as a function of various parameters. The initial glucose concentration (t=0) was 2.6 and 5.2 g l<sup>-1</sup> at 10% SL, 3.9 and 7.8 g l<sup>-1</sup> at 15% SL, and 5.2 and 10.5 g l<sup>-1</sup> at 20% SL at the D15 and D30 enzyme dosages, respectively. The glucose concentration profile followed the normal EH pattern with a rapid glucose release at the beginning, followed by the lowering of the production rate. As expected, the glucose concentration increased with the SL, and concentrations of 50, 70 and 92 g l<sup>-1</sup> were obtained after 72 h hydrolysis time at 10, 15 and 20% SLs, respectively. The highest glucose concentration was 92 g l<sup>-1</sup> (initial glucose was subtracted) at 20% SL at the D30 dosage level. This glucose concentration would allow to obtain an ethanol concentration adequate to an efficient distillation process. As seen in Figure 6a, the highest glucose release (85% of the final glucose released after 72 h)



**Figure 6:** Time course for glucose and ethanol concentration in SHF and P<sub>8h</sub> SSF and P<sub>24h</sub> SSF. (a) Effect of enzyme loading D15 (dashed lines) and D30 (continuous lines) on glucose concentrations at different solids content; Time course of ethanol (continuous lines) and glucose (dashed lines) concentrations at different enzyme loadings in: (b) SHF experiment; (c) P<sub>8h</sub> SSF and (d) P<sub>24h</sub> SSF experiments.

took place in the first 24 h. No significant glucose increment was observed from 48 to 72 h of EH (less than 3 g l<sup>-1</sup>) similar to the observations by López-Linares et al. (2015) in the EH of sulfuric acid-pretreated rapeseed straw.

Enzyme dosage did not significantly improve the glucose release at the end of hydrolysis (glucose <2 g l<sup>-1</sup> during 72 h at all enzyme dosages). However, at 24 h and at the highest SL level, a positive effect of the enzyme dosage was observed, leading to a glucose concentration >9 g l<sup>-1</sup> at D30. The EH efficiency decreased from 81 to 75% and 83 to 76% as the SL increased from 10 to 20% at D15 and D30, respectively (Table 2), probably due to mass transfer limitation at 20% SL (Hodge et al. 2008). In the present study, EH yield did not differ significantly between the two enzyme dosages at 72 h hydrolysis time (i.e. 81 and 83%, 78 and 80% and 75 and 76% at 10, 15 and 20% SLs), respectively. At 24 h hydrolysis time and the highest SL, however, a positive effect of the enzyme dose was observed and the saccharification efficiency was increased by 10%. Accordingly, 20% SL resulted in a sufficient glucose concentration (>90 g l<sup>-1</sup>) to obtain the ethanol needed for an efficient distillation and satisfactory EH yields (75%). An inoculation time longer than 24 h in PSSF processes is not necessary.

## SHF reaction conditions

Fermentation tests were carried out on materials obtained via 72 h reaction time, 20% SL, and at the D15 and D30 dosages (Figure 6b). Higher glucose concentration was obtained at D30, which ranged from 94 to 108 g l<sup>-1</sup> for D15 and D30, respectively. The best ethanol concentrations were 46 and 51 g l<sup>-1</sup> (105 h) for the D15 and D30 dosage levels, respectively. No glucose was detected at the end of SHF.

In Table 2, ethanol yields are expressed in % based on the theoretically maximum glucose potential (0.51 g ethanol g<sup>-1</sup> glucose). Yields of 0.36 and 0.39 g g<sup>-1</sup> (71% and 76% of the theoretical) at D15 and D30 were reached, respectively. García-Aparicio et al. (2011) obtained less ethanol from SE-pretreated BS at 15% (w/v) SL (0.24 g g<sup>-1</sup> glucose). The yield increased at the D30 level. The fermentation stage was not affected by the EH conditions (D15 and D30) and the microorganism had a good performance. Only a delay at the beginning of the fermentation was observed (24 h), maybe due to the high concentration of products released during EH (sugars, phenols, etc.) and the low inoculum loading (0.25 g l<sup>-1</sup>). Altogether in EH plus fermentation, ca. 100 h hydrolysis time is required to obtain the maximum ethanol concentration in an SHF process. Volumetric productivities (Table 3) were 0.44 and 0.49 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> at enzyme dosages of D15 and D30 levels, respectively.

**Table 2:** Enzymatic hydrolysis yields at different solid contents, enzyme dosages after 24, 48 and 72 h hydrolysis time.

Solid content (%)	Enzyme dosage (FPU g <sup>-1</sup> glucan)	Hydrolysis yield (%)		
		24 h	48 h	72 h
10	15	73.4±0.08	80.6±1.62	81.0±0.75
	30	79.4±1.0	83.3±1.02	83.5±0.27
15	15	69.1±1.17	76.4±0.58	78.0±0.32
	30	74.8±0.79	80.0±1.38	80.2±0.04
20	15	63.6±0.05	72.7±1.08	74.9±0.55
	30	71.3±0.64	76.2±1.79	76.3±0.96

**Table 3:** Ethanol (EtOH) concentration and fermentation yields in the process configurations indicated.

Configuration	Enzyme dosage (FPU g <sup>-1</sup> glucan)	EtOH (g l <sup>-1</sup> )	Yield (Y <sub>E/G</sub> )		Q <sub>E</sub> <sup>b</sup> (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
			Ratio	(%) <sup>a</sup>	
SHF	15	45.8±0.3	0.36±0.04	71.3	0.44
	30	50.8±0.5	0.39±0.08	76.0	0.49
P <sub>8h</sub> SSF	15	43.3±0.5	0.34±0.05	67.4	0.90
	30	49.6±0.2	0.38±0.02	74.2	1.03
P <sub>24h</sub> SSF	15	43.4±0.1	0.34±0.02	65.7	0.80
	30	49.9±0.6	0.38±0.08	75.1	0.92

<sup>a</sup>Percentage of theoretical; <sup>b</sup>volumetric productivity.

## PSSF reaction conditions

The effect of a prehydrolysis step (8 or 24 h) at 50°C was evaluated (20% SL and D15 and D30 dosages). The profiles of ethanol and glucose concentrations are shown in Figure 6c. The prehydrolysis did not improve the final ethanol concentration. The best ethanol concentrations were 43 and 50 g l<sup>-1</sup> at 15 and 30 FPU g<sup>-1</sup> dosages, respectively in P<sub>8h</sub>SSF. Application of D30 led to 12% more ethanol production. As seen in Figure 6d, the highest ethanol production rate was obtained in the first 24 h of fermentation (86% of the ethanol was obtained in all cases). At 24 h from the start of fermentation, 92 and 98% of ethanol were obtained at the D30 enzyme level in P<sub>8h</sub>SSF (48 h) and P<sub>24h</sub>SSF (54 h), respectively. After 24 h, no significant ethanol increase was observed. The volumetric productivities were different for the SHF and PSSF configurations. The best result (1.0 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was seen with P<sub>8h</sub>SSF and D30. Under these conditions, less than 48 h fermentation time was needed to get the maximum ethanol concentration.

## Conclusions

SE pretreatment at 180°C for 30 min is adequate to obtain good carbohydrate recovery (99% cellulose and 82% hemicelluloses). Solid and liquid fractions obtained

after pretreatment are well suited for ethanol and XOS production, respectively. A high ethanol titer of around 50 g l<sup>-1</sup> can be obtained in SHF and PSSF at 20% (w/v) substrate loading level. However, the highest ethanol productivity (1.0 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was achieved with the PSSF8 and 30 FPU g<sup>-1</sup> enzyme dose. Around 11 g of XOS per 100 g BS was obtained from the prehydrolyzate of SE pretreatment, when endoxylanases mixture and Xyl11 in combination with accessory enzymes were applied.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge the financial support of the Comunidad de Madrid-CM (Spain) (Project RESTOENE-2-CM, S2013/MAE-2882).

**Author contributions:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

## References

- Aachary, A.A., Prapulla, S.G. (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10:2–16.

- Álvarez, C., González, A., Negro, M.J., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Saéz, F. (2017) Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. *Ind. Crops Prod.* 99:41–48.
- 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.* 101:4851–4861.
- Alvira, P., Negro, M.J., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M. (2016) Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. *Bioethanol* 2:66–75.
- Biely, P., Singh, S., Puchart, V. (2016) Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnol. Adv.* 34:1260–1274.
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., Gírio, F. (2012) Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 40:225–231.
- Cherubini, F. (2010) The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energ. Convers. Manage.* 51:1412–1421.
- Delouie, V., Chirat, C., Boisset, C., Toussaint, B., Chroboczck, J. (2017) Production of hemicellulose oligomers from softwood chips using autohydrolysis followed by an enzymatic post-hydrolysis. *Holzforschung* 71:575–581.
- Dionex Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) (2000) Technical Note 20.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2016) Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Ed. Mussatto, S.I. Elsevier, Amsterdam. pp. 349–368.
- European Environment Agency ([www.eea.europa.eu/](http://www.eea.europa.eu/)). Greenhouse gas emissions from transport (last modified 09 25 2018).
- FAOSTAT (2016) <http://faostat3.fao.org/> (last accessed 4.29.2018).
- García-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J. (2011) Second generation ethanol production from exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90:1624–1630.
- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. (2017) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14:491–502.
- Gullón, P., Gullón, B., Cardelle-Cobas, A., Alonso, J.L., Pintado, M., Gomes, A. (2014) Effects of hemicellulose-derived saccharides on behavior of *Lactobacilli* under simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* 64:880–888.
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D. (2008) Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 99:8940–8948.
- Huang, C., Chenhuan, L., Xinxing, W., Yang, H., He, J., Huang, C., Li, X., Yong, Q. (2017) An integrated process to produce bio-ethanol and xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriose from high ash content waste wheat straw. *Bioresour. Technol.* 241:228–235.
- Kajaste, R. (2014) Chemicals from biomass – managing greenhouse gas emissions in biorefinery production chains – a review. *J. Clean. Prod.* 75:1–10.
- Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C., Olsson, L. (2014) Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends Biotechnol.* 32:46–53.
- Linares-Pastén, J.A., Aronsson, A., Karlsson, E.N. (2018) Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. *Curr. Protein Pept. Sci.* 19:49–67.
- López-Linares, J.C., Ballesteros, I., Tourán, J., Cara, C., Castro, E., Ballesteros, M., Romero, I. (2015) Optimization of uncatalyzed steam explosion pretreatment of rapeseed straw for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 190:97–105.
- Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., García, J.C., López, F., Villar, J.C., Díaz, M.J. (2012) Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Biomass Bioenerg.* 42:97–106.
- Mechelke, M., Koecka, D.E., Broekera, J., Roesslera, B., Krabichlera, F., Schwarza, W.H., Zverlova, V.V., Liebla, W. (2017) Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica* – six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *J. Biotechnol.* 257:122–130.
- Modenbach, A.A., Nokes, S.E. (2013) Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – a review. *Biomass Bioenerg.* 56:526–544.
- Moncada, J., Aristizábal, V., Cardona, C.A. (2016) Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochem. Eng. J.* 116:122–134.
- Morgan, N.K., Wallace, A., Bedford, M., Choct, M. (2017) Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylooligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydr. Polym.* 167:290–296.
- Muzamal, M., Jedvert, K., Theliander, H., Rasmuson, A. (2015) Structural changes in spruce wood during different steps of steam explosion pretreatment. *Holzforschung* 69:61–66.
- Oliva, J., Negro, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., Chamorro, M., Saéz, F., Ballesteros, M., Moreno, A. (2017) A sequential steam explosion and reactive extrusion pretreatment for lignocellulosic biomass conversion within a fermentation-based biorefinery perspective. *Fermentation* 3:15.
- Otiendo, D.O., Ahring, B.K. (2012) The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydr. Res.* 360:84–92.
- Patel, S., Goyal, A. (2012) The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech* 2:115–125.
- Renewable Energy Directive (2016) Proposal for a Directive of the European Parliament and the Council on the promotion of the use of energy from renewable source. COM (2016) 0767.
- Rico, X., Gullón, B., Alonso, J.L., Parajó, J.C., Yañez, R. (2018) Valorization of peanut shells: manufacture of bioactive oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 183:21–28.
- Ruiz, E., Gullón, B., Moura, P., Carvalheiro, F., Eibes, G., Cara, C., Castro, E. (2017) Bifidobacterial growth stimulation by oligosaccharides generated from olive tree pruning biomass. *Carbohydr. Polym.* 169:149–156.

- Schütt, F., Puls, J., Saake, B. (2011) Optimization of steam pretreatment conditions for enzymatic hydrolysis of poplar wood. *Holzforschung* 65:453–459.
- Searle, S., Malins, C. (2013) Availability of cellulosic residues and wastes in the EU. International Council on Clean Transportation, White paper.
- Slavin, J. (2013) Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5:1417–1435.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W. (2010) Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J. Agric. Food Chem.* 58:9043–9053.
- 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.* 30:1458–1480.

---

**Supplementary Material:** The online version of this article offers supplementary material (<https://doi.org/10.1515/hf-2018-0101>).



Producción de xilooligosacáridos y  
bioetanol a partir de paja de cebada  
mediante procesos enzimáticos.

Estudio de su actividad prebiótica

Cristina Álvarez Vaquerizo

MAYO 2020

