

Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol.

Laura Cuervo¹, Jorge Luis Folch¹, Rosa Estela Quiroz^{1,2*}

¹*Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM.* ²*Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62209, México.*
reqc@ibt.unam.mx

RESUMEN

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía. El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la lignocelulosa. Se han desarrollado diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos. La finalidad del pretratamiento es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa. El propósito de esta revisión es mostrar un panorama de los métodos que se han desarrollado para hidrolizar la lignocelulosa.

Palabras clave: celulosa, hidrólisis, pretratamientos químicos y biológicos.

ABSTRACT

Lignocellulose, the main component of plant cell wall produced by photosynthesis is the most promising renewable carbon source to overcome the energy crisis. The central technological impediment to a more widespread utilization of this resource is the general absence of low-cost technology for overcoming the recalcitrance of lignocellulosic biomass. Several methods have been developed to improve lignocellulosic material hydrolysis, such as physicochemical and biological pretreatments. The goal of both pretreatments is to remove lignin and hemicellulose, as well as reducing cellulose crystallinity in order to release glucose units that can be used as a carbon source for fermentation processes to obtain biofuels. The aim of this revision is to show a general view of the methods developed to hydrolyze cellulosic material.

Key words: cellulose, hydrolysis, chemical and biological pretreatments.

INTRODUCCIÓN

La bioenergía es una de las fuentes de energía renovables que puede reemplazar en parte el uso de los combustibles fósiles. Contribuye a la diversificación de la energía de los países y a la apropiación de tecnologías de energías emergentes, reduciendo las emisiones de gas invernadero, la generación de empleo en el área rural y la sustitución de la importación de combustibles (Islas *et al.*, 2006). La agencia internacional de energía (IEA, por sus siglas en inglés) sugiere que a partir de la biomasa se puede obtener cerca de un tercio de la energía necesaria en África, Asia y Latinoamérica (Somerville, 2007). El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa. Aunque existen métodos físicoquímicos que permiten utilizar la biomasa en la producción de biocombustibles, una alternativa prometedora son los métodos biológicos que utilizan organismos celulolíticos para obtener azúcares fermentables (Lynd *et al.*, 2002). Los sustratos más utilizados para producir biocombustibles son la caña de azúcar y el maíz, siendo Brasil el mayor productor de bioetanol a partir de caña de azúcar y Estados Unidos que emplea el maíz; las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera, residuos de cosechas (bagazos), hierbas,

aserrín y desechos sólidos de animales (Gray *et al.*, 2006).

COMPOSICIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries, 1994). La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando & Waliszewski, 2005; Béguin & Aubert, 1994). La celulosa es sintetizada, en menores proporciones, por bacterias del género *Acetobacter* y los

Artículos

tunicados (Czaja *et al.*, 2007; Sasakura *et al.*, 2005). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez, *et al.*, 2002). La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los

polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro *et al.*, 2005) (Fig.1). Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez *et al.*, 2002). En los residuos lignocelulósicos existe una variación en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina como se muestra en la Tabla 1.

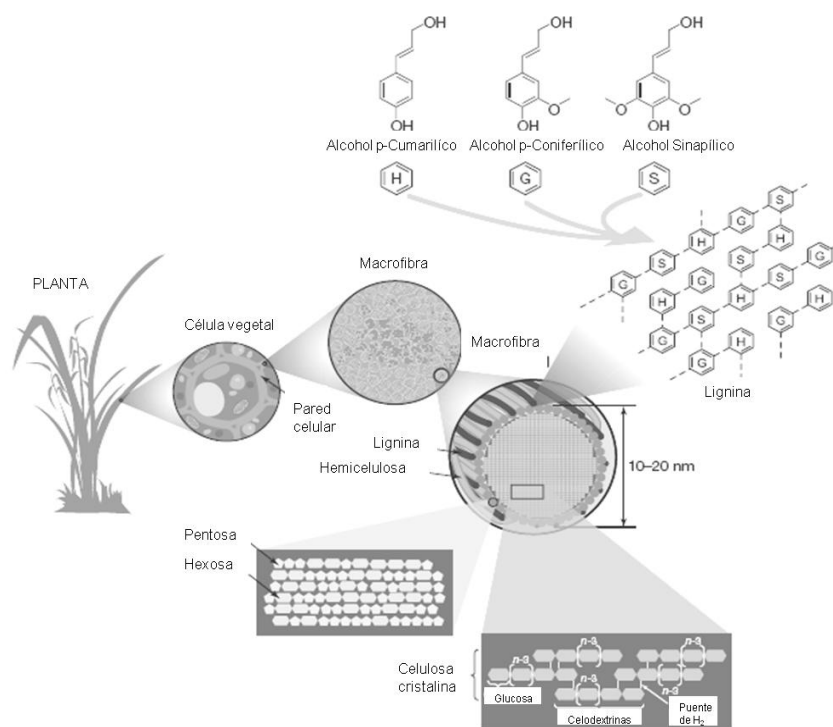


Fig.1. Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Tomada de Rubin, 2008).

Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos^a

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND ^b	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND ^b
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

^aSung & Chen, 2002, ^bND-No disponible

DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

Organismos degradadores de la celulosa

Los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de **celulasas extracelulares** (Lynd *et al.*, 2002). Entre este grupo se encuentran las bacterias del género *Cellulomonas* (Elberson *et al.*, 2000) y *Streptomyces* (Alani *et al.*, 2008), así como los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian & Valaskova, 2008), que son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas y actualmente dominan las aplicaciones industriales. Entre estos

últimos se encuentran *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Volvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta*, y algunos ascomicetos como *Trichoderma reesei*, y especies de *Aspergillus*, y *Penicillium* (Sternberg, 1976; Duff & Murray, 1996; Ding *et al.*, 2006; Quiroz-Castañeda *et al.*, 2009). Los hongos y bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de **celulosomas**, habitan en aguas residuales y en el rumen y el tracto intestinal de los animales herbívoros e insectos como escarabajos y termitas (Cazemier *et al.*, 2003; Warnecke *et al.*, 2003). Bacterias pertenecientes a este grupo son *Clostridium*

y *Ruminococcus* y los hongos *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllamyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces sp.* y *Piromyces sp.* (Doi, 2008; Teunissen & Op den Camp, 1993).

Los microorganismos aerobios producen celulasas con diferentes especificidades y modos de acción, actuando en sinergismo para hidrolizar la celulosa (Henrissat, 1991). Hay tres tipos de celulasas (Fig.2): las **endoglucanasas** (EGs) (EC 3.2.1.4), que

cortan azarosamente en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, esto causa la disminución en el largo de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores; las **exoglucanasas** o **celobiohidrolasas** (CBHs) (EC 3.2.1.74), que actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa y las **β -glucosidasas** (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa (Lynd *et al.*, 2002).

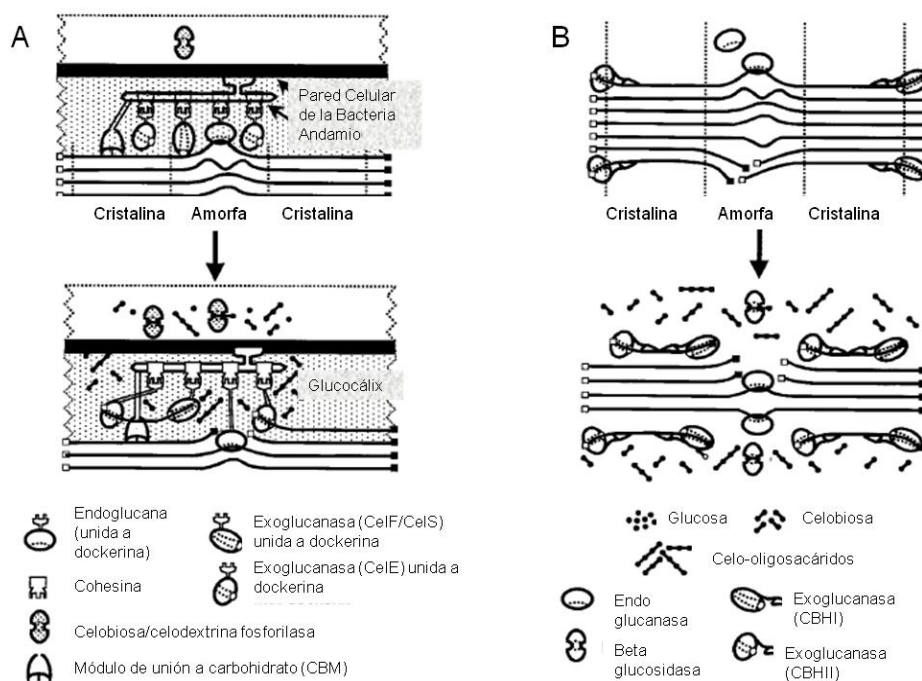


Fig. 2. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B) (Modificado de Lynd *et al.*, 2002).

Degradación del material lignocelulósico:

Pretratamientos.

Existen tres pasos principales en el proceso de conversión de la lignocelulosa:

1) Pretratamiento: mejora el acceso de las enzimas a la celulosa.

2) Sacarificación enzimática: uso de celulasas y ocasionalmente hemicelulasas.

3) Fermentación: de los azúcares liberados.

La finalidad del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de azúcares y evitando la degradación o pérdida de carbohidratos así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación. Existen diversos procesos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos (Sun & Cheng, 2002).

MÉTODOS FÍSICOS

Fragmentación mecánica y pirólisis

El material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido (hasta 0.2–2 mm) para aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión (Millet *et al.*, 1976). En la pirólisis la lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300°C (Kilzer & Broido, 1965). Aunque es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico tiene un costo elevado en comparación con otros métodos.

MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

Explosión por vapor

Es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves (Clark & Mackie, 1987). La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160–260°C (0.69–4.83 MPa)

durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles. La adición de H₂SO₄ mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. Los factores que afectan el proceso son el tiempo del tratamiento, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad (Duff & Murray, 1996). Las ventajas de este método son un requerimiento bajo de energía comparado con los métodos físicos convencionales que requieren 70% más energía para alcanzar el mismo tamaño de reducción de las partículas (Holtzapple *et al.*, 1989). Las limitantes del proceso son la destrucción parcial del xilano y la separación incompleta de la lignina y los carbohidratos, así como la generación de compuestos inhibitorios para los microorganismos utilizados en procesos de fermentación (Mackie *et al.*, 1985).

Explosión de fibra de amoníaco (AFEX)

Este pretratamiento mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos (Mes-Hartree *et al.*, 1988; Vlasenko *et al.*, 1997; Reshamwala *et al.*, 1995) los cuales son tratados con amoníaco a alta temperatura y presión. Es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90% de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (Holtzapple *et al.*, 1991) y no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulósico sea triturado. Para reducir los costos y proteger el ambiente, el amoníaco se recicla después del

reducir los costos y proteger el ambiente, el amoníaco se recicla después del pretratamiento (Dale *et al.*, 1984). El efecto de los métodos físicoquímicos varía de acuerdo al material lignocelulósico, como se observa en la Tabla 2.

MÉTODOS QUÍMICOS

Ozonólisis

El ozono degrada la lignina y la hemicelulosa de sustratos como la paja de trigo y de algodón, el bagazo de caña y el aserrín de pino y álamo (Ben-Ghedalia &

Tabla 2. Solubilización de los componentes lignocelulósicos después de pretratamientos físicoquímicos^a

Proceso	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Explosión de vapor	Despolimerización	80-100% de	Poca o nula
Hidrólisis ácida	Despolimerización	Solubilización a	Poca o nula
Solventes orgánicos		Solubilización	Solubilización
Termólisis	Poca	80-100% de	
AFEX	Descristalización	0-60% de	Solubilización
Hidrólisis alcalina	Relajamiento	>50% de	Solubilización

^aLynd *et al.*, 2002

Miron, 1981). Las reacciones ocurren a presión y temperatura ambiente, se remueve la lignina hasta en un 8% y el rendimiento aumenta en un 57%, no produce residuos tóxicos pero se requiere una gran cantidad de ozono lo que eleva los costos (Vidal & Molinier, 1988).

Hidrólisis ácida

Los ácidos como el H_2SO_4 y HCl concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión. Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos que hidrolizan la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, en los residuos queda la celulosa y la lignina, esta última se extrae con solventes orgánicos. El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa,

pero su costo es alto en comparación con otros pretratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación (Eggeman & Elander, 2005).

Hidrólisis alcalina

Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Fan *et al.*, 1987). En las maderas duras hay un incremento en la digestibilidad y un descenso del contenido de lignina, en maderas suaves con lignina hasta

en un 26% no se han obtenidos resultados eficientes; en general la utilización de bases permite la disolución de la lignina, pero sus costos son altos, haciendo estos métodos no competitivos a gran escala (Sun & Cheng, 2002).

Deslignificación oxidativa

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50% de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación (Azzam, 1989).

Proceso organosolvente

Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona así como también ácidos inorgánicos como catalizadores (H_2SO_4 ó HCL) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación (Zhao *et al.*, 2009).

MÉTODOS BIOLÓGICOS

Los tratamientos biológicos son amigables con el ambiente e incrementan la accesibilidad al material celulósico favoreciendo una subsecuente hidrólisis y fermentación, sin embargo, es un proceso lento que limita su aplicación a nivel industrial (Hatakka, 1983). Las principales ventajas son el alto rendimiento del producto, las condiciones moderadas de la reacción, la poca generación de compuestos tóxicos y

una mínima demanda de energía (Kirk & Jeffries, 1996). Algunas bacterias y hongos de podredumbre blanca y parda oxidan completamente la madera, por lo que tienen aplicaciones biotecnológicas en la conversión de la lignocelulosa a productos de valor industrial (Balan *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 1998). Se han llevado a cabo búsquedas de organismos con capacidades celulolíticas, como en el trabajo de Li *et al.* (2008) que evaluaron la capacidad de *Fusarium concolor* para deslignificar la paja de trigo en 5 días, y proponen que podría utilizarse en pretratamientos de materiales lignocelulósicos usados en la industria del biopulpeo y la bioconversión a etanol. Zhang *et al.* (2007) utilizaron *Coriolus versicolor* en el pretratamiento del bambú, observando una disminución en la cantidad de lignina y hemicelulosa y un aumento hasta del 37% en la tasa de sacarificación después del tratamiento. Schilling *et al.* (2009) trataron restos de pino y abeto con hongos de podredumbre parda, *Gloeophyllum trabeum* y *Fomitopsis pinicola*, logrando un incremento en el proceso de sacarificación. Algunas bacterias celulolíticas utilizadas en pretratamientos biológicos son *Sphingomonas paucimobilis* y *Bacillus circulans* que incrementan la liberación de azúcares hasta en un 94% a partir de papel de oficina (Kurakake *et al.*, 2007). El descubrimiento de enzimas con propiedades importantes resulta muy valioso, Quiroz-Castañeda *et al.* (2009) reportaron la caracterización de la actividad celulolítica de los hongos *P. sanguineus* y *B. adusta* en paja de trigo, cuyas enzimas son capaces de

tolerar condiciones elevadas de temperatura y funcionan en un amplio rango de pH, lo que los hace potenciales candidatos para ser utilizados en procesos industriales que requieren la hidrólisis de la celulosa.

Una alternativa atractiva a la bioconversión es la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en donde las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentativos están en un mismo reactor (Chandrakant & Bisaria, 1998). La SSF consolida la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los azúcares en un solo paso, sin embargo, la actividad de las celulasas puede ser inhibida por productos finales como la celobiosa y la glucosa. Entre los organismos usados en la sacarificación y fermentación simultánea están *S. cerevisiae*, diversas especies de *Kluyveromyces* y *Candida* (van Markis *et al.*, 2006). El proceso de SSF tiene las siguientes ventajas: (1) aumentar la tasa de hidrólisis por conversión de los azúcares que inhiben la actividad de las celulasas; (2) disminuir los requerimientos de enzimas; (3) elevar el rendimiento del producto; (4) remover inmediatamente la glucosa al producir el etanol; (5) duración corta del proceso y (6) utilización de un único reactor. En cuanto a las desventajas se encuentran la incompatibilidad entre la temperatura de hidrólisis y de fermentación, la tolerancia de los microorganismos al etanol así como la inhibición de las enzimas por el producto (Sun & Cheng, 2002).

OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSA CON LEVADURAS

Los azúcares obtenidos de la biomasa celulósica pueden ser utilizados en la producción de bioetanol. La producción de etanol a partir de celulosa se logra a través de la degradación de ésta para obtener celooligosacáridos y glucosa, seguido de la conversión de la glucosa a etanol por diferentes microorganismos como levaduras y bacterias (Kotaka *et al.*, 2008). En los siguientes párrafos se describen las estrategias que se han seguido para generar levaduras que puedan hidrolizar celulosa mediante la expresión heteróloga de genes que codifican para celulasas.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un huésped atractivo para la producción de proteínas recombinantes de importancia médica y alimenticia, debido a que es un organismo no patógeno libre de endotoxinas para el hombre y su utilización a escala industrial se remonta hace siglos. Presenta como ventajas su fácil manejo y alta velocidad de crecimiento en comparación con las bacterias en condiciones anaerobias, posee una organización subcelular eucarionte capaz de realizar los procesos postraduccionales de proteínas complejas. Las levaduras además, secretan proteínas por medio de un sistema de multicomponentes, permitiendo la maduración, el plegamiento correcto y la formación de enlaces disulfuro en éstas, así como la glicosilación y otros procesos postraduccionales (Barnett, 1992).

La producción de etanol a partir del material celulósico ha sido motivo de numerosas investigaciones y se ha utilizado a *S. cerevisiae* para expresar genes de

celulasas con la finalidad de sacarificar y fermentar simultáneamente. En *S. cerevisiae* se han expresado genes que codifican para celulasas de hongos y bacterias con la finalidad de evaluar la hidrólisis de los diferentes polisacáridos de la pared celular. Penttilä *et al.* (1988) expresaron eficientemente en *S. cerevisiae* dos celobiohidrolasas, CBHI and CBHII, del hongo ascomiceto *Trichoderma reesei*, se encontró que ambas enzimas fueron capaces de hidrolizar celulosa amorfa e incluso celulosa cristalina. En esta levadura, también se ha expresado de manera eficiente el gen de una endoglucanasa (*cen1*) del hongo basidiomiceto *Irpelex lacteus*, observando un fuerte efecto sinérgico en la degradación de celulosa cristalina (Avicel) y amorfa cuando se coexpresó con el gen de una celobiohidrolasa (*ex1*) del mismo hongo (Toda *et al.*, 2005).

Existe evidencia que demuestra que la expresión de genes de celulasas en *S. cerevisiae* permite incrementar la utilización del material celulósico para la obtención de combustibles como el etanol, por ejemplo, Fujita *et al.* (2002) coexpresaron los genes de una β -glucosidasa (*bgl1*) del hongo *Aspergillus aculeatus* y de una endoglucanasa (*egl1*) de *T. reesei* en células de levadura para producir etanol utilizando como sustrato un β -glucano de cebada (polisacárido de 1200 residuos de glucosa unidas por enlaces β -1,4), las levaduras recombinantes fueron capaces de fermentar 45 g/l del β -glucano para producir 16.5 g/l de etanol en un periodo de 50 horas. El

rendimiento fue de 0.48 g/g en términos de gramos de etanol producidos por gramo de carbohidrato y corresponde al 93.3% del rendimiento teórico. Este resultado muestra una sacarificación y fermentación simultánea eficiente de la celulosa para obtener etanol empleando células recombinantes de levadura que expresan enzimas celulolíticas.

La expresión en *S. cerevisiae* de los genes que codifican para tres enzimas celulolíticas: una β -glucosidasa (*bgl1*) de *A. aculeatus* y una endoglucanasa (*egl1*) y una celobiohidrolasa (*cbh1*) de *T. reesei* permiten una fermentación directa y eficiente de la celulosa amorfa a etanol logrando un 88.5% del rendimiento teórico; este biocatalizador tiene la habilidad de inducir de manera sinérgica y secuencial la degradación de celulosa para la producción de etanol (Fujita *et al.*, 2004).

Se han realizado diversos esfuerzos enfocados en la expresión de genes de enzimas hidrolíticas en levaduras que permitan la utilización del material vegetal como materia prima en la producción de bioetanol; sin embargo, el crecimiento y la producción de etanol utilizando cepas de levadura de laboratorio es mucho menor si se compara con cepas utilizadas en la industria, como las levaduras empleadas en la elaboración de bebidas como el sake, estas levaduras proliferan rápidamente, fermentan vigorosamente y tienen una alta resistencia al etanol, como lo reportado por Kotaka *et al.* (2008) quienes expresaron en *S. cerevisiae* GRI-117-UK tres genes de β -glucosidasas y dos genes de endoglucanasas de

Aspergillus oryzae, utilizando como sustrato un β -glucano de cebada con características similares al material celulósico. La conversión del β -glucano a etanol fue del 69.6 % del rendimiento teórico y se obtuvo una concentración de 7.94 g/l de etanol en 24 horas, lo que hace atractivo el uso de este tipo de levaduras para la conversión de la biomasa en energía.

Cabe mencionar que la degradación de la biomasa vegetal genera además de las hexosas, grandes cantidades de azúcares como la xilosa y la arabinosa que no pueden ser fermentados por *S. cerevisiae*. Como se describe en otro capítulo de este número, *S. cerevisiae* y otras levaduras han sido manipulada genéticamente para transportar y fermentar pentosas (Becker & Boles, 2003; Jeffries, 2006). La integración de ambas estrategias, la de metabolizar toda la variedad de azúcares presentes en los hidrolizados de lignocelulosa, así como la de hidrolizar celulosa mediante la expresión heteróloga de celulasas en cepas de levaduras industriales productoras de etanol, permite prever los alcances que tendrá la biotecnología en la producción de etanol que no proviene de alimentos.

CONCLUSIONES

Actualmente la obtención de los energéticos derivados del petróleo atraviesa una fuerte crisis debido a una disminución en sus reservas, por lo cual la aplicación de nuevas tecnologías dirigidas a generar combustibles a partir de materiales renovables como la lignocelulosa, y no de alimentos, representa una alternativa viable a

la demanda energética mundial. En el material lignocelulósico se dispone de una gran cantidad de azúcares fermentables, sin embargo, su utilización se puede ver impedida por la recalcitrancia intrínseca del material, una solución a este problema han sido los diversos métodos físicoquímicos y biológicos que se han desarrollado para liberar los azúcares fermentables y obtener bioetanol. Algunas estrategias utilizando microorganismos como las levaduras se han enfocado en la obtención de etanol a partir de lignocelulosa mediante la expresión de enzimas celulolíticas y aprovechando la capacidad fermentadora de la levadura. En este proceso de sacarificación y fermentación simultánea se han obtenido cantidades y rendimientos significativos de etanol lo cual representa un punto de partida que conducirá al desarrollo de tecnologías encauzadas a satisfacer las necesidades energéticas en el futuro.

REFERENCIAS

- Alani F, Anderson WA & Moo-Young M (2008) New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases *Biotechnol. Lett.* 30: 123-126.
- Aro N, Pakula T & Penttilä M (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 719-739.
- Azzam AM (1989) Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health.* 24: 421-433.

- Balan V, da Costa Sousa L, Chundawat SP, Vismeh R, Jones AD & Dale BE (2008) Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 293-301.
- Barnett JA (1992) The taxonomy of genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomist. *Yeast*, 8: 1-23.
- Baldrian P & Valaskova V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 501–521.
- Becker J & Boles E (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4144-4150.
- Béguin P & Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 25-58.
- Ben-Ghedalia D & Miron J (1981) The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 823–831.
- Cazemier AE, Verdoes JC, Reubsaet FA, Hackstein JH, van der Drift C & Op den Camp HJ (2003) *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83: 135-48.
- Chandrakant P & Bisaria VS (1998) Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18: 295–331.
- Clark TA & Mackie KL (1987) Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. *J. Wood Chem. Technol.* 7: 373–403.
- Czaja WK, Young DJ, Kawecki M & Brown RM (2007) The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 8: 1-12.
- Dale BE, Henk LL & Shiang M (1984) Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. *Dev. Ind. Microbiol.* 26: 223–233.
- Ding SJ, Ge W & Buswell JA (2006) Cloning of multiple cellulose cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. *FEMS Microbiol. Lett.* 263: 207-213.
- Doi RH (2008) Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome & Non-Cellulosome Producers. *Ann. NY Acad. Sci.* 1125: 267-279.
- Duff SJB & Murray WD (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55: 1–33.
- Eggeman T & Elander RT (2005) Process and economic analysis of pre-treatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96: 2019-2025.
- Elberson MA, Malekzadeh F, Yazdi MT, Kameranpour N, Noori-Dalooi MR, Matte MH, Shahamat M, Colwell RR & Sowers KR (2000) *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria

- isolated from forest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 993-996.
- Fan LT, Gharpuray MM & Lee YH (1987) *In: Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Editor (ed). Springer, Berlin, p. 57.
- Fujita Y, Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Okada H, Morikawa Y, Kawaguchi T, Arai M, Fukuda H & Kondo A (2002) Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5136-5141.
- Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H & Kondo A (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1207-1212.
- Gray KS, Zhao L & Emptage M (2006) Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.
- Hatakka AI (1983) Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 350-357.
- Henrissat, B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Holtzapple MT, Humphrey AE & Taylor JD (1989) Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 207-210.
- Holtzapple MT, Jun JH, Ashok G, Patibandla SL & Dale BE (1991) The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 59-74.
- Islas J, Manzini F & Masera O (2007) A prospective study of bioenergy use in Mexico. *Energy.* 32: 2306-2320.
- Jeffries TW (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *In: Biochemistry of microbial degradation*. Ratledge C (ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 233-277.
- Jeffries TW (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 320-326.
- Karhumaa K, Wiedemann B, Hahn-Hägerdal B, Boles E & Gorwa-Grauslund M (2006) Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microb. Cell Fact.* 5: 18.
- Kilzer FJ & Broido A (1965) Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrodynamics* 2: 151-163.
- Kirk TK & Jeffries TW (1996) Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. *In: Enzymes for pulp and paper processing*. Jeffries TW & Viikari L (eds) American Chemical Society, Washington DC. pp. 2-14.
- Kotaka A, Bando H, Kaya M, Kato-Murai M, Kuroda K, Sahara H, Hata Y, Kondo A & Ueda M (2008) Direct ethanol production from barley β -glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* β -glucosidase and endoglucanase. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 622-627.
- Kurakake M, Ide N & Komaki T (2007) Biological pretreatment with two bacterial

- strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Curr. Microbiol.* 54: 424-428.
- Li L, Li XZ, Tang WZ, Zhao J & Qu YB (2008) Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 415-420.
- Lynd L, Weimer P, van Zyl W & Pretorius I (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 3: 506-577.
- Mackie KL, Brownell HH, West KL & Saddler JN (1985) Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *J. Wood Chem. Technol.* 5: 405-425.
- Martínez A, Speranza M, Ruiz-Dueñas F, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez M, Gübitz GM, Mansfield SD, Böhm D & Saddler JN (1998) Effect of endoglucanases and hemicellulases in magnetic and floatation deinking of xerographic and laser-printed papers. *J. Biotechnol.* 65: 209-219.
- Mes-Hartree M, Dale BE & Craig WK (1988) Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 462-468.
- Millet MA, Baker AJ & Scatter LD (1976) Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotech. Bioeng. Symp.* 6: 125-153.
- Ovando-Chacón SL & Waliszewski KN (2005) Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120.
- Penttilä ME, Andre L, Lehtovaara P, Bailey M, Teeri TT & Knowles JKC (1988) Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 63: 103-112.
- Pérez J, Muñoz-Dorado A, De la Rubia T & Martínez, E (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53-63.
- Quiroz-Castañeda RE, Balcázar-López E, Dantán-González E, Martínez A, Folch-Mallol JL & Martínez-Anaya C (2009) Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electron. J. Biotechnol.* [online]. <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol12/issue4/full/3/index.html>
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R & Tschaplinski T (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. 311: 484-489.
- Reshamwala S, Shawky BT, & Dale BE (1995) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 43-55.
- Rubin EM (2008) Genomics of cellulose biofuels. *Nature* 4: 841-845.
- Sasakura Y, Nakashima K, Awazu S, Matsuoka T, Nakayama A, Azuma J & Satoh N (2005) Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in

- the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 15134-15139.
- Schilling JS, Tewalt JP & Duncan SM (2009) Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009 (En prensa).
- Somerville C (2007) Biofuels. *Curr. Biol.* 17: R115-119.
- Sternberg D (1976) Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser.* 6: 35-53.
- Sun Y & Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1-11.
- Teunissen MJ & Op den Camp HJ (1993) Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63: 63-76.
- Toda H, Takada S, Oda M, Amano Y, Kanda T, Okasaki M & Shimozaka M (2005) Gene cloning of an endoglucanase from the basidiomycete *Irpex lacteus* and its cDNA expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1262-1269.
- van Markis AJA, Abbott DA & Bellissimi E (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current Status. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 391-418.
- Vidal PF & Molinier J (1988) Ozonolysis of lignin, improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 16: 1-17.
- Vlasenko EY, Ding H, Labavitch JM & Shoemaker SP (1997) Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresour. Technol.* 59: 109-119.
- Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Martin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirton E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides NC, Matson EG, Ottesen EA, Zhang X, Hernández M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson DE, Hugenholtz P & Leadbetter JR (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450: 560-565.
- Zhang X, Xu C & Wang H (2007) Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 149-51.
- Zhao X, Cheng K & Liu D (2009) Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 815-827.