

ASPECTOS TECNOLÓGICOS GENERALES PARA LA CONVERSIÓN A ETANOL DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Juan Francisco Almenares Verdecia*, Manuel Serrat Díaz**

*Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, **Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente

Por ser la biomasa una fuente renovable y ampliamente disponible, su utilización para la producción de energía tiene una gran responsabilidad en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, y por consiguiente la prevención del calentamiento global. En este trabajo se abordan de manera general, las etapas del proceso tecnológico para la conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol; enfatizando en como, de las características estructurales de la lignocelulosa se derivan las propiedades químico-físicas que pueden condicionar el proceso.

Palabras clave: celulosa, hemicelulosa, lignina, etanol, pretratamientos.

To be the biomass a renewable and broadly available source, its use for the energy production has a great responsibility in the reduction of the emissions of gases of effect hothouse and consequently the prevention of the global heating. In this work they are approached in a general way, the stages of the technological process for the conversion of the biomass lignocellulosic to ethanol; emphasizing in as of the structural characteristics of the lignocellulose are derived the properties chemist physics that can condition the process.

Key word:

Introducción

La biomasa lignocelulósica es en la actualidad la más atractiva y prometedora fuente alternativa de energía renovable. Es el componente estructural mayoritario de las plantas maderables y no maderables. La lignocelulosa está constituida por tres polímeros estructurales: lignina, celulosa y hemicelulosa. Las propiedades químicas de sus componentes hacen de ella un sustrato de enorme valor biotecnológico. /1/ Los materiales lignocelulósicos, por su alto contenido de azúcares fermentables, han merecido particular atención como sustrato alternativo en la producción de etanol. En este sentido, con respecto a los sustratos tradicionales (azúcar de caña y remolacha, y materiales amiláceos), presenta la gran ventaja de su extraordinaria disponibilidad, al ser generadas anualmente de 5 a 25 billones de toneladas, generalmente como residuos de la actividad agrícola, forestal y agroindustrial. /2/

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, por lo que su conversión a etanol comprende dos etapas generales: la primera de pretratamiento e hidrólisis; donde se obtienen los azúcares simples fermentables (glucosa y

xilosa), y la de fermentación en la cual estos azúcares son convertidos en etanol, por la acción de los microorganismos.

Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos tienen tres componentes fundamentales: los polisacáridos, la lignina, y otras sustancias que no forman parte de la pared celular. /3, 4, 5/

Polisacáridos

El componente polisacárido comprende carbohidratos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que representan entre el 60 y el 80 % del peso total de los materiales lignocelulósicos. /3, 4, 5/

La celulosa es el componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras de madera. Es un polímero lineal de β -D-glucosa, con un peso molecular de aproximadamente 500 000 Da. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces β -(1,4). El número de azúcares de cadena (grado de

polimerización G.P.), varía en los diferentes materiales celulósicos entre 308 y 154 320.

El anillo de piranosa está en conformación 4C_1 , es decir, que los grupos $-CH_2OH$ y $-OH$, así como los enlaces glucosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo y los átomos de hidrógeno en posición axial. /3, 4, 5/ Cuando la molécula de celulosa está completamente extendida, y toma forma de cinta aplanada, con los grupos $-OH$ sobresaliendo lateralmente, se pueden formar puentes de hidrógeno inter e intra moleculares. La superficie de la cinta compuesta por átomos de hidrógeno unidos directamente a carbono es hidrofóbica. Estas dos características de la estructura molecular son las responsables de su estructura supramolecular, y determinan muchas de las propiedades físicas y químicas de la celulosa.

Los estudios de espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X, revelan que los puentes de hidrógeno intramoleculares se establecen entre los grupos hidroxilo en posición 3, los átomos de oxígeno de las glucosas adyacentes, y los intermoleculares entre los grupos hidroxilo en posición 6, además de los oxígenos de cadenas adyacentes. /3, 4, 5/ Aunque, considerados individualmente, estos puentes de hidrógeno son débiles; la gran cantidad de uniones de este tipo que se establecen entre las cadenas de glucosa componentes de las fibras de celulosa, le confiere una fuerza que es la responsable de la formación de agregados cristalinos que dan a la pared celular su enorme resistencia.

De la estructura de la celulosa se deduce la naturaleza química, sus propiedades físicas, mecánicas y su estructura fibrilar. La estructura molecular de la celulosa y las estructuras de la protofibrilla y microfibrilla son aspectos importantes que dirigen la hidrólisis de la celulosa. Una fibra de celulosa tiene regiones amorfas y cristalinas; normalmente hay un 70 % de celulosa cristalina en la celulosa nativa. /3, 4, 5/

Las hemicelulosas están constituidas por polímeros de unidades de anhidroazúcares, unidas por enlaces glucosídicos, formado por más de un tipo de azúcares (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su pa-

pel es facilitar la unión entre la lignina y la celulosa. En estado natural existe en forma amorfa con un G.P que no excede de 200. Existen dos tipos de hemicelulosa que se encuentran tanto en las maderas duras como en las blandas; estos son los xilanos y los glucomananos.

En las maderas, duras las hemicelulosas predominantes son los xilanos, un polímero de unidades de β -xilopiranosas unidas por enlace β -(1,4), con ligeras ramificaciones. En los xilanos los grupos hidroxilo pueden estar sustituidos por residuos de ácidos 4-O-metilglucurónico unidos por enlace α -(1,2), y por grupos acetilos unidos a través de enlaces éster a posiciones 2 y 3 del anillo de pentosa. Los glucomananos en tanto son polímeros lineales de glucosa y manosa unidos por enlaces β -(1,4), con predominio de las manosas y que no presentan ramificaciones ni grupos sustituyentes laterales. /3, 4, 5/

En los xilanos de maderas blandas el esqueleto de polímero es idéntico al de maderas duras, los sustituyentes son los residuos de ácido 4-O-metilglucurónico, unidos por enlaces α -(1,3). Los glucomananos, tienen dos tipos de sustituyentes, los grupos O-acetil unidos por enlaces éster a las posiciones 2 y 3 del esqueleto del azúcar, y la galactosa unida por enlaces α -(1,6), es decir, estos glucomananos son galactoglucomananos. /3, 4/

Lignina

La lignina es el más complejo y peor caracterizado de los componentes de la madera y representa entre el 20 y el 35 % de ésta. La lignina confiere rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos. Fundamentalmente, es un polímero tridimensional de unidades de fenilpropano, unidas por enlaces éter (C-O-C) y carbono-carbono (C-C), siendo los primeros mayoritarios. /5, 6/

Es una sustancia fenólica, formada por la ordenación irregular de varios grupos hidroxilo y metoxilo, sustituidos por unidades de fenilpropano, ligados por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada. /5, 6/

Otras sustancias

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros. Los componentes solubles en solventes neutros, constituyen del 4-10 % del peso seco de la madera. Actúan como intermediarios, metabólicos, como reserva de energía o como parte de los mecanismos de defensa contra ataques microbianos. Contribuyen al olor, color y resistencia al marchitamiento. Las cenizas son menos del 1 % del peso seco de la madera. /5, 6/

Procesamiento de la biomasa lignocelulósica para producción de etanol

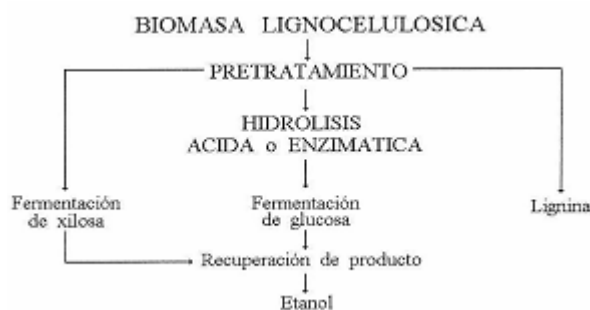


Fig. 1 Proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

La conversión de la lignocelulosa en etanol, comprende dos etapas generales: (i) pretratamiento e hidrólisis, donde se obtienen los azúcares simples fermentables (glucosa, xilosa) y (ii) fermentación, donde estos azúcares son convertidos a etanol. /6, 7/

Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos

El término pretratamiento es ampliamente usado en la literatura de los procesos ingenieriles, para referirse a las etapas del proceso en las cuales se convierte la biomasa lignocelulósica de su forma nativa, (la cual es muy recalcitrante a la acción hidrolítica del sistema enzimático celulasa), a una forma en la cual la hidrólisis enzimática es efectiva. La mayoría de los enlaces β -glucosídicos

en los materiales lignocelulósicos es inaccesible a la acción de las enzimas celulasas, producto al pequeño tamaño de los poros en la distribución espacial de la biomasa, y por consiguiente la inaccesibilidad enzimática a esto asociada. /8/ La estructura propia de los materiales lignocelulósicos es la principal causa limitante en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. La asociación de la celulosa con la lignina, constituye una verdadera barrera física a la penetración de los enzimas celulolíticos. Este hecho, junto a la cristalinidad de las moléculas de celulosa, hace necesario un pretratamiento, que altere dicha estructura, para facilitar la acción de las enzimas.

Entre los objetivos fundamentales de los pretratamientos de los materiales lignocelulósicos se pueden citar: la reducción de la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo lignina-celulosa, aumentar el área superficial de las fibras de celulosa y disminuir la presencia de las sustancias que dificultan dicho proceso.

Para que un pretratamiento sea eficiente, debe reunir, entre otras características tener un bajo consumo energético, bajos costes de inversión y mantenimiento; utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables; además la posibilidad de aplicación sobre diversos sustratos.

Existen numerosos pretratamientos de materiales lignocelulósicos descritos en la bibliografía especializada, /9/ y algunos de ellos son muy eficaces con respecto al incremento del rendimiento de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, no todos son aplicables a escala industrial, debido a los altos costes y dificultades técnicas que conllevan. Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden clasificar en tres grupos generales: físicos, químicos y biológicos. En la tabla 1 se muestran algunos de los diferentes tipos de pretratamientos más utilizados.

La evaluación de la efectividad de los mismos se hace basado en el rendimiento de la hidrólisis subsiguiente del material pretratado, en función de la cual se determinan las condiciones óptimas de operación en cada caso. Todos estos procesos han demostrado que bajo condiciones apropiadas se producen derivados de fibras pretratadas de plantas herbáceas y/o derivados de madera dura

que retienen toda la celulosa presente en el material original; ello permite acercar la hidrólisis enzimática al rendimiento teórico. La forma en la cual la celulosa, y particularmente la hemicelulosa

y la lignina, emergen del pretratamiento, son diferentes según los procesos. En la tabla 1 se describen algunos de los pretratamientos más estudiados y aplicados.

Tabla 1
Pretratamientos más empleados en materiales lignocelulósicos

FISICOS		BIOLOGICOS
Mecánicos	No mecánicos	Hongos, actinomicetos
Molienda:	Vapor a alta presión	
Molino de bolas	Extrusión	
Molino de rodillos	Expansión	
Molino de martillo	Pirólisis	
Molino coloidal	Radiación de alta energía	
QUIMICOS		
Alcalis: hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, amoníaco, sulfato de amonio		
Ácidos: clorhídrico, fosfórico		
Disolventes de la celulosa: cadoxen, CMCS		
Gases: dióxido de cloro, dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre		
Organosolventes: ext butanol-agua, ext etanol-agua, ext benceno-etanol, ext etilenglicol		
Agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno, ozono		

Pretratamientos físicos

Los pretratamientos físicos se suelen dividir en dos categorías; mecánicos y no mecánicos. En los mecánicos, se utilizan las fuerzas de impacto y cizalladura, que conducen a materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y densidad aparente más alta. /10/ Entre estos pretratamientos, cabe mencionar diferentes tipos de moliendas (molino de bolas, martillo, cuchillas, rodillos), así como procesos de molienda e hidrólisis simultáneas. /11/ Los pretratamientos de carácter físico no mecánico, someten al residuo celulósico a la acción de agentes externos que provocan alteraciones diversas del material de partida.

Entre éstos se encuentran los tratamientos con radiación, la utilización de vapor a altas presiones y la pirólisis a temperaturas intermedias.

Molienda y trituración: En general los pretratamientos por molienda, por vía seca o húmeda; tiene el inconveniente de su alto consumo energético. Aunque de manera general, es necesario triturar previamente el material lignocelulósico hasta un cierto tamaño de partícula para su manejo posterior.

Radiación de alta energía: Este pretratamiento es de una eficiencia comprobada en algunos casos, ya que rompe los enlaces β -glucosídicos y los enlaces entre la celulosa y la lignina; /5, 10, 11/ su alto coste, lo hace difícil de llevar a la práctica.

Explosión por vapor: El efecto del pretratamiento con vapor a alta presión (steam-explosion), es una modificación de combinaciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras lignocelulósicas) y químicas (despolimerización y rotura de los enlaces C-O-C). En este trata-

miento, el material lignocelulósico se somete a temperaturas entre 190 – 230 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, en un intervalo entre 1 a 10 min. Luego, se somete el material a una brusca despresurización, combinando los efectos, de altas temperaturas y presiones. /3, 9/ El efecto mecánico está causado por la rápida evaporación del agua interna, esta evaporación crea una fuerza de cizalladura que producen la separación de las fibras, principalmente, de las regiones más débiles (celulosa amorfa). La introducción de vapor dentro de las estructuras de los materiales lignocelulósicos, asegura que la difusión de la fase vapor sea de mayor magnitud que la difusión de la fase líquida. Primero, se produce la penetración del vapor, luego su condensación. Al despresurizarse el material se produce una rápida evaporación del agua capilar, que tiene como efecto mecánico desagregar y romper algunas de las fibras, probablemente con mayor efecto sobre las regiones más débiles (celulosa amorfa). /11/ La explosión por vapor ha sido reconocida como un método muy efectivo para el pretratamiento de maderas duras y residuos agrícolas. Este tratamiento se ha aplicado a diferentes materiales como eucalipto, /11, 12/ residuos herbáceos /13/, y bagazo. /14/

Explosión por vapor con amoníaco (AFEX): Es un proceso similar a la explosión por vapor en el que cada kilogramo de biomasa seca es impregnada por 2 kilogramos de amoníaco líquido a una temperatura en torno a los 90 °C, y un tiempo aproximado de 30 min. Transcurrido este tiempo el material es sometido a una rápida descompresión /4, 15/. La diferencia de la explosión de vapor y otros tipos de tratamiento ácido, es que en este proceso no se solubiliza la hemicelulosa. Utilizando materiales con bajo contenido en lignina de hasta 15 %, se han obtenido rendimientos de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa del 90 %, después del pretratamiento.

Como ventajas del proceso, se producen inhibidores que afectan las posteriores etapas del proceso de producción de etanol. /4/

Pretratamientos químicos

El objetivo fundamental de estos pretratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la

estructura de las cadenas celulósicas, de manera que sean fácilmente atacables por las enzimas. Entre los más estudiados se encuentran los tratamientos con agua caliente líquida, oxidación húmeda, álcalis, ozono, ácidos, agentes oxidantes y solventes orgánicos. La mayoría de los pretratamientos químicos, persiguen la ruptura de los enlaces de hidrógeno en las regiones cristalinas de la fibra, con el objetivo de abrir la estructura, y permitir el paso de los agentes hidrolíticos. En este grupo hay que incluir la utilización de ácidos como H₂SO₄, H₃PO₄, sales como ZnCl₂, y álcalis como NaOH, NH₃, Ca(OH)₂. /3, 4/

Pretratamiento con agua caliente líquida: En este caso se somete la biomasa a la acción del agua caliente en torno a una temperatura de 220 °C, durante un tiempo determinado. El reactor debe estar presurizado para mantener el agua en estado líquido. Durante este pretratamiento se recupera la mayoría de los pentosanos /11/, y se obtiene un hidrolizado que no muestra inhibición en el posterior proceso de fermentación. /16/

Oxidación húmeda: El material lignocelulósico se somete a la acción de agua a elevadas temperaturas en presencia de oxígeno. Este tratamiento, a penas, genera productos de degradación como el furfural e hidroximetilfurfural. /17, 18/

Tratamientos con ozono: El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa de numerosos materiales lignocelulósicos como la paja de trigo, bagazo pino, algodón y serrín de chopo. /18/ La degradación se limita a la lignina, ya que la hemicelulosa es atacada ligeramente y la celulosa apenas se ve afectada.

Hidrólisis con álcalis: El tratamiento con NaOH diluido produce un hinchamiento de la biomasa; lo que provoca un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos y degradación de la lignina. /4, 15/.

Pretratamientos biológicos: Estos pretratamientos consisten en someter a la biomasa lignocelulósica a la acción de microorganismos que degradan la lignina y la hemicelulosa, con lo que se destruyen, así las estructuras que protegen a la celulosa hacen más accesible al ataque hidrolítico.

Estrategias de producción de etanol de la biomasa lignocelulósica

Existen cuatro alternativas principales para la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica, las que pueden dividirse en dos grandes grupos:

- a) procesos en dos etapas y b) procesos en una etapa.

El esquema de procesamiento de la biomasa, incluyendo hidrólisis enzimática o microbiana, lleva implícito cuatro transformaciones mediadas por la actividad biológica.

- (1) producción de enzimas sacarolíticas (celulasas y hemicelulasas), (2) la transformación a azúcares por la hidrólisis de los carbohidratos de la biomasa pretratada, (3) fermentación de los productos de hidrólisis de la celulosa, (las hexosas; glucosa, manosa y galactosa) y (4) fermentación de los productos de hidrólisis de la hemicelulosa, (las pentosas, xilosa y arabinosa).

Los procesos en dos etapas realizan la hidrólisis (ácida o enzimática), y la fermentación por separado (HFS).

En la hidrólisis enzimática, una parte de la biomasa pretratada, es utilizada como sustrato para la obtención de enzimas. Una vez producido, las enzimas del complejo celulolítico se añaden al resto del material pretratado en un reactor de hidrólisis. La glucosa obtenida se pasa a otro reactor, donde se realiza la fermentación a etanol, por la acción de microorganismos. La ventaja de este proceso es que, al estar separadas la hidrólisis y la fermentación, ambas etapas pueden realizarse en sus condiciones óptimas.

La etapa de hidrólisis se realiza a la temperatura óptima de la enzima cercana a los 50 °C, mientras que la fermentación se realiza a la temperatura óptima del microorganismo productor de etanol.

El principal problema de estos procesos de HFS por vía enzimática, es el bajo rendimiento de hidrólisis, debido a la inhibición por la presencia del producto final, glucosa y celobiosa. Para elevar el rendimiento de hidrólisis, se emplean

complejos celulolíticos con actividades β -glucosidasa más elevadas, pues la celobiosa es un inhibidor del complejo celulolítico más potente que la glucosa; y para aumentar el rendimiento de etanol se aconseja emplear un microorganismo capaz de fermentar glucosa y celobiosa. /19/

Configuración del proceso

La categorización del proceso está dada por el grado de consolidación de estos eventos. La hidrólisis y fermentación separada (SHF), incluye cuatro pasos del proceso, que representan cuatro etapas de biocatálisis. La fermentación y sacarificación simultáneas (SSF) consolida la hidrólisis y la fermentación de los productos de hidrólisis de la celulosa en un único paso del proceso, ocurriendo en dos pasos adicionales del proceso la producción de celulosa y la fermentación de los productos de hidrólisis de la hemicelulosa. La sacarificación simultánea y cofermentación (SSCF) incluyen dos pasos del proceso, la producción de celulosa y un segundo paso en el cual ocurren la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los productos de hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa. En el bioproceso consolidado (CBP), la producción de celulosa, hidrólisis y fermentación de los productos de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, están combinados todos en un solo paso del proceso. /9/

Procesos en una etapa

En estos procesos, la hidrólisis y la fermentación se realizan en el mismo reactor. La ventaja de éstos es que no se produce inhibición por el producto final que se produce en la operación en dos etapas, ya que la presencia de microorganismos fermentadores, junto con las enzimas celulolíticas, reducen la acumulación de azúcar en el fermentador en la medida en que éstos se producen. Por ello se consiguen mayores tasas de hidrólisis que en el proceso de hidrólisis y fermentación por separado, necesitándose una menor cantidad de enzimas, y como resultado se obtiene un aumento de los rendimientos de etanol. /3,4/ Otra ventaja es que se realizan en un mismo reactor, con lo cual se reducen los costes de inversión.

La mayor desventaja está dada en las diferentes condiciones óptimas de pH y temperatura de la etapa de hidrólisis y fermentación. Por ello, es necesario realizar el proceso en condiciones compatibles con ambas etapas, ya que la temperatura de óptima de hidrólisis está próxima a los 50 °C, y las levaduras productoras de etanol alcanzan su máximo rendimiento a una temperatura cercana a los 37 °C; es aconsejable el empleo de microorganismos termotolerantes, procesos de obtención de etanol en una sola etapa.

Procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SSF): En este proceso, las etapas son virtualmente las mismas que en el proceso de hidrólisis y el de fermentación separados (SHF), excepto que estos dos pasos se realizan en el mismo reactor. La presencia de levaduras junto con el complejo enzimático, normalmente de *Trichoderma reesei*, reduce la acumulación de azúcar en el reactor. Como el azúcar producido durante la hidrólisis de la celulosa, inhibe la acción de las enzimas celulolíticas, entonces es posible obtener mayores rendimientos y tasas de sacarificación en el proceso de SSF que en el de la SHF. Otra ventaja adicional es la utilización de un único fermentador en todo el proceso, con los que se reducen los costes de inversión.

En los procesos de hidrólisis y fermentación simultánea es necesario que la fermentación y la sacarificación sean compatibles y tengan similar pH, temperatura y concentración óptima de sustrato.

Bioproceso consolidado: Cuando las cuatro transformaciones de la biomasa lignocelulósica ocurren en un paso simple o etapa, esta configuración se denomina Bioproceso Consolidado (CBP). Esto se distingue porque un mismo microorganismo produce las enzimas hidrolíticas y realiza la fermentación de la biomasa. /19/

El término bioproceso consolidado es sinónimo de conversión microbiana directa (CDM). En 1996, se propuso que el término “bioproceso consolidado” fuera preferido al de “conversión microbiana directa” /19/.

Un paso del proceso dedicado a la producción de celulosa es uno de los rasgos de SHF, SSF y SSCF, pero no del CBP. Se cree que la produc-

ción de celulosa es llevada a cabo por microorganismos aeróbicos, dado por los mayores rendimientos de ATP y los mayores rendimientos de celulosa del metabolismo aerobio; comparado con el metabolismo anaerobio. Por el contrario, la conversión de los productos de hidrólisis a pequeñas moléculas para uso como combustible o compuestos químicos complejos es capaz de ser llevada a cabo por los microorganismos caracterizados por un catabolismo no oxidativo para todas las configuraciones del proceso. Un CBP requiere un microorganismo que combine las propiedades relacionadas con la utilización del sustrato y la formación de productos. /19/

Conclusiones

Varios factores han incidido en el desarrollo de microorganismos con características específicas para la aplicación rentable a escala industrial del CBP. Los ahorros *a priori* de la tecnología, comparados con otras configuraciones del proceso que ofrece la hidrólisis enzimática, son el resultado de la eliminación de costos asociados con un paso del proceso dedicado a la producción de enzimas celulolíticas. Otros beneficios que podrían ser asignados, incluye un mayor rendimiento del producto de fermentación. Éstos podrían lograrse debido a la ausencia del metabolismo oxidativo en esa configuración, y a (i) la disponibilidad de todos los nutrientes para la producción de celulasas, atendiendo a pequeñas fracciones de nutrientes, comparado con otras configuraciones del proceso, (ii) la posibilidad de emplear complejos celulolíticos de elevada actividad específica en los organismos desarrollados para la configuración en CBP, y (iii) la acción sinérgica, célula-celulosa.

Bibliografía

1. Howard, R. L. Abotsi, E., Jansen, van Rensburg, E. L. and Hoard S, 2003, Lignocellulose Biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology, vol.2(12), págs.602-619.
2. Yasuya, F., Junji, I., Mit, Soyushi, U., and 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. *Applied and Microbiology*, Feb. págs. 1207 - 1212, vol. 70, No 2.
3. Ballesteros, M., 2001 Biocombustibles para el transporte: Tecnologías Energéticas e Impacto Ambiental. *JEN-CIEMAT 195 1-2001*, págs. 357-369. McGraw-Hill.
 4. 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 de Alcalá de Henares.
 5. Pala, H., Mota, M., Gama, F., M. (2007). Enzymatic depolymerisation of cellulose. *Carbohydrate Polymers* 68. págs. 101-108.
 6. Faria, L., Kolling, D., Camassola, M., Pinheiro, A. J., Pereira, L., 2008, Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulase in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bior. Technol.* 99 1417-1424.
 7. Ostergaard, S., Ostergaard, I., Olsson, L., and Nielsen, J., 2000 Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar., págs. 34-50, vol. 64, No. 1.
 8. Zandona, A., Siika-Aho, M., and Ramos, L. (2006). Method for characterization of the enzyme profile and the determination of CBHI (Cel 7a) core protein in *Trichoderma reesei* cellulase preparations. *World Journ. Microbiol. And Biotechnol.* 22: 821-825.
 9. Lee R. L., Weimer, P. J., H. Van Zyl, W., and Pretorius, I. S., *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*, 2002, Microbiology and molecular Biology Reviews, Sept., vol. 66, No. 3, págs. 506 - 507.
 10. Dekker, R. F. H., 1985, Pretreatment options for the enzymatic saccharification of lignocellulose. Symposium on the pretreatment of lignocellulosic materials, New Zealand.
 11. Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J. M., Cabañas, A., and Ballesteros M., 2003a. Changes in various physical/ parameters of *Pinus radiata* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass. Bioenergy* (en prensa).
 12. Ballesteros, I., Oliva, J., Navarro, A. A., González, A., Carrasco, J. E., and Ballesteros, M., 2000, Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84/86: 97-110.
 13. Ballesteros, M., Oliva, J., Manzanares, P., Negro, M. J., Ballesteros, I., 2002, Ethanol production for paper material using simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World J. Microbiol, Biotechnol.* 18: 559-561.
 14. Martín, C., Galbe M., Nilvebrant, N. O., and Jonson L. J., 2002, Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugar cane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98/100: 699-716. G.
 15. Sun, Y., and Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource Technology.* 83: 1-11.
 16. Laser, M. S., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J., and Lynd, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugar cane bagasse bioconversion to ethanol. *Bioresourtechnol.* 81: 33-44.
 17. Klinke, H. B.; Ahring, B. K.; Schmidt A. S.; Thomsen A. B., 2002, Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Biores. Technol.* 82: 15-26.
 18. Varga, E., Schmidt, A., Reczey, K., and Thomsen, A. B., 2003, Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104: 37-50.
 19. Lynd, L., R., H. van Zyl, W., Mc Bride, J., E. and Laser, M., 2005, Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinión in Biotechnology* 16: 577-583.