

ASPECTOS TECNOLÓGICOS GENERALES PARA LA CONVERSIÓN A ETANOL DE LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA II

MSc. Juan Francisco Almenares-Verdecía, juan@cebi.uo.edu.cu,

Lic. Frande Ngoma-Presline, Dr. Manuel de Jesús Serrat-Díaz

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba

Por su elevado contenido de azúcares fermentables y su extraordinaria disponibilidad, entre otras muchas razones, es la biomasa lignocelulósica la materia prima de excelencia para la producción de etanol carburante, el cual es considerado como una alternativa más limpia a los combustibles fósiles. En este trabajo se tratan algunos de los retos que enfrenta la producción de este combustible renovable, derivados del empleo de este sustrato, que incluyen su pretratamiento por explosión de vapor (EV) y la hidrólisis enzimática (HE), así como los compuestos inhibidores de la fermentación que se generan como consecuencia de estos procesos. En este contexto, las capacidades productivas de la especie microbiana son fundamentales en el rendimiento y eficiencia del proceso fermentativo. El incremento en el consumo de glucosa y xilosa, la tolerancia a la temperatura y a los compuestos inhibidores son caracteres que pueden ser desarrollados o potenciados mediante la aplicación de diferentes estrategias de ingeniería evolutiva, siendo ésta una importante contribución en el mejoramiento de la tecnología del etanol lignocelulósico.

Palabras clave: etanol lignocelulósico, tolerancia a inhibidores, termotolerancia ingeniería evolutiva.

For their high content of fermentable sugars and their extraordinary readiness, among other many reasons, is the biomass lignocelulósica the matter excellence cousin for the production of ethanol fuel, which is considered as a cleaner alternative to the fossil fuels. In this work are treated some of the challenges that faces the production of this renewable fuel, derived of the employment of this substrate that include their pretratamiento for explosion of vapor (EV) and the enzymatic hydrolysis (EH), as well as the compound inhibitors of the fermentation that are generated as consequence of these processes. In this context, the productive capacities of the microbial species are fundamental in the yield and efficiency of the fermentative process. The increment in the consumption of glucose and xylose, the tolerance to the temperature and the compound inhibitors is characters that can be developed or powered by means of the application of different strategies of evolutionary engineering, being this a important contribution in the improvement of the technology of the lignocellulosic ethanol.

Key words: lignocellulosic ethanol, tolerance to inhibitors, thermo tolerance, evolutionary engineering.

Introducción

El cambio climático global es una realidad y uno de sus principales orígenes está en la quema indiscriminada de combustibles fósiles, lo que ha incrementado los niveles de CO₂ atmosférico. Se hace necesario un cambio de mentalidad que disminuya la explotación de los recursos energéticos no renovables, desarrollando un nuevo modelo de explotación energética en armonía con el medio ambiente, a partir de un mayor protagonismo de las energías renovables, eficientes, baratas y poco contaminantes /1/.

Una de las más importantes aplicaciones de la biotecnología moderna, a la vez que supone una respuesta a la contaminación ambiental, es la utilización de residuos orgánicos de la actividad humana y de materiales renovables para producir biocombustibles más limpios, como el etanol, factibles de ser empleados como sustitutos de los combustibles fósiles /1/.

La producción tradicional de etanol tiene lugar por la fermentación de sustratos azucarados o ricos en almidón. Emplear estos sustratos con este fin agrupa un conjunto de obstáculos tanto

económicos como éticos, pues estos sustratos son la base para la producción de alimentos esenciales para el hombre y los animales, en medio de la grave crisis alimentaria que afecta a una gran parte de los habitantes de países subdesarrollados.

El etanol de segunda generación se obtiene por fermentación de los azúcares simples fermentables (pentosas y hexosas) procedentes de la hidrólisis (química o enzimática) de los materiales lignocelulósicos /2/. Éste se considera una alternativa atractiva a los combustibles fósiles, por producir bajas emisiones y no generar cantidades netas de CO₂ /3, 4, 5/.

El incremento de los rendimientos en la producción de etanol de lignocelulosa depende de las características del microorganismo, del sustrato y de un proceso tecnológico apropiado. El microorganismo ideal para la producción de etanol de segunda generación debe poseer una serie de requisitos como ser rápido fermentador, tolerante a inhibidores generados en la etapa de pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, termorresistente, así como tolerante a elevadas concentraciones de etanol, además de ser capaz de producir etanol a partir de todos los azúcares presentes. En la naturaleza no existe un microorganismo con tales características /6/.

En tal sentido es posible conseguir las capacidades antes mencionadas mediante la exploración de la enorme y casi desconocida diversidad del mundo microbiano a través de una estrategia de búsqueda (screening) y la aplicación de la ingeniería evolutiva /7, 8, 9/. La ingeniería evolutiva se basa en la posibilidad de seleccionar células con propiedades ventajosas bajo condiciones que reflejen las características de un proceso industrial, por ejemplo diferentes fuentes de carbono o la presencia de inhibidores. La adaptación mediante ingeniería evolutiva se muestra como una alternativa prometedora para obtener microorganismos más tolerantes a las temperaturas y a los tóxicos generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica /10, 11/.

El objetivo de esta revisión es abordar algunos aspectos clave de la tecnología de producción de etanol de segunda generación, tales como las condiciones del pretratamiento, su influencia so-

bre la hidrólisis enzimática, los inhibidores generados y su efecto sobre la especie microbiana fermentadora y el rendimiento del proceso, no tratados en el artículo anterior. Estas cuestiones constituyen actualmente un obstáculo para el establecimiento de un proceso tecnológico eficiente y ambientalmente sostenible con el cual se obtenga etanol combustible a precios competitivos frente a los combustibles fósiles desarrollo.

Obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos

El bioetanol producido a partir de materiales lignocelulósicos, también llamado bioetanol de segunda generación, se presenta como alternativa de futuro a los biocombustibles de primera generación. La biomasa lignocelulósica es el material renovable más abundante sobre la tierra, con una generación anual cercana a los 25 000 millones de toneladas; habitualmente se encuentra formando parte de los residuos agrícolas, forestales y agroindustriales, por lo que no compete con el mercado alimentario y su coste es menor al de los materiales azucarados o amiláceos, lo que contribuye a disminuir el coste final del biocombustible.

La biomasa lignocelulósica puede clasificarse según Tomás Pejó. M. E. (2009) y Sung-Jae Yang *et. al.* (2010) /12, 13/ en seis grupo principales: 1) residuos agrícolas (p.ej bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, pajas de trigo, arroz y cebada), 2) maderas duras (p.ej. júcaro, guayacán, caguairán, yamaquey, etcétera), 3) maderas blandas (pino, picea), 4) residuos celulósicos (papel periódico, lodos de papel reciclado, residuos de papel de oficina), 5) biomasa herbácea (alfalfa, alpiste, limoncillo); y 6) residuos sólidos urbanos (RSU).

Entre las diferentes materias primas de origen lignocelulósico, el bagazo de caña es una fuente abundante de biomasa, principalmente en América Latina y el Caribe. Por cada 1,000 kg de caña, en el campo se pierden 232 kg, siendo procesados en la fábrica 768 kg, de los cuales se obtienen 104 kg de azúcar (aprox. 10 % de la caña), 26 kg de mieles finales, 221 kg de bagazo, además de la cachaza /14, 15/. Según las estadísticas de la Organización

de las Naciones Unidas para la Agricultura, en el mundo se produjeron 607 millones de toneladas de azúcar en el año 2007 /17/, lo que supone 13 400 millones de toneladas de bagazo disponible, siendo una de las fuentes de biomasa lignocelulósica más abundantes. El bagazo es una opción muy prometedora como materia prima en los procesos de producción de etanol de segunda generación mediante hidrólisis enzimática y fermentación /17, 18/.

Por su composición química, la biomasa lignocelulósica es muy diferente de los productos con alto contenido de azúcares o almidón. La compleja estructura de estos materiales, compuestos fundamentalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina, estas dos últimas íntimamente asociadas constituyendo una verdadera barrera física a la penetración de los enzimas celulolíticos, implica que los procesos para la obtención de etanol deban ajustarse de acuerdo a las características de estos componentes. /19/

La celulosa y hemicelulosas, deben ser hidrolizadas a azúcares simples, para luego ser fermentados a etanol. La fermentación de la glucosa, procedente de la celulosa, es un proceso establecido. Sin embargo, la fermentación de las pentosas derivadas de las hemicelulosas es un proceso que aún no es viable económicamente, por no existir microorganismos con la eficiencia fermentativa requerida para ello.

La lignina no puede ser fermentada a etanol, así como los extractivos y otros componentes presentes. Su presencia tiene efecto negativo en procesos fermentativos, por lo que cualquier proceso viable de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, tiene que incluir su extracción y aprovechamiento en la obtención de productos de valor y/o generación de energía. La lignina se puede emplear en la extracción de una gran variedad de productos de alto valor añadido, o como una fuente de energía que pudiera cubrir, total o parcialmente, las demandas energéticas de una planta productora de etanol a partir de biomasa. /20/

El proceso para producir etanol a partir de material lignocelulósico consta de cuatro etapas fundamentales: pretratamiento, hidrólisis, fermentación, y separación/purificación /21/. En los epígrafes que siguen serán abordadas las tres primeras de estas etapas.

Pretratamiento

El objetivo fundamental del pretratamiento es la separación de los componentes básicos de los materiales lignocelulósicos, celulosa, hemicelulosa y lignina. El pretratamiento tiene por objetivo modificar la estructura macroscópica y microscópica del material lignocelulósico, es decir debe disociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa de tal manera que todos los componentes como la hemicelulosa y la lignina sean separados /22/, debe alterar las características estructurales de la celulosa, tales como la cristalinidad o el grado de polimerización y provocar la solubilización y/o redistribución de la lignina, quedando la celulosa accesible para la posterior hidrólisis, ya sea ácida o enzimática. /23/

Los efectos sobre el material lignocelulósico son variados, sin embargo se pueden resumir en varios factores de interés para el posterior proceso de hidrólisis como son: incremento del área superficial y disminución de la cristalinidad de la celulosa, remoción de la hemicelulosa y la lignina, además de la modificación de la estructura química de la lignina. Desde un punto de vista económico, se ha estimado que el pretratamiento representa aproximadamente el 33 % del coste total del proceso /13, 24/ y por ello, es necesario desarrollar tecnologías eficientes que reduzcan los costos globales de producción de etanol.

En la actualidad existen diferentes tecnologías disponibles para pretratar la biomasa lignocelulósica, las que pueden ser clasificadas, según su naturaleza, en pretratamientos físicos, químicos, biológicos y fisico-químicos, o una mezcla de varios de ellos /12/. Entre los pretratamientos físico-químicos, la explosión por vapor (EV) es el más ampliamente utilizado y el de mejores resultados para biomasa lignocelulósica con las características del bagazo de caña /25, 26, 27/.

Pretratamiento de EV

Durante la EV la lignina es redistribuida y la hemicelulosa parcialmente solubilizada /13, 28/. Estudios recientes han concluido que la solubilización

parcial de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina son efectos incluso más importantes que la ruptura de las fibras o la modificación de la cristalinidad de la celulosa, para el aumento de la digestibilidad del bagazo de la caña de azúcar durante la hidrólisis /29/.

La EV se ha mostrado como un método de pretratamiento adecuado para aumentar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático para un amplio rango de materias primas como chopo /30/, eucalipto /31/, bagazo de caña de azúcar /32/, y paja de trigo /13, 25, 33/.

Sin embargo, este pretratamiento se muestra menos eficaz con las maderas blandas debido a su mayor contenido en lignina y menor número de grupos acetilo, lo que provoca que el proceso de autohidrólisis no sea tan efectivo. En el caso de la madera blanda es necesario añadir un catalizador ácido, lo que implica una mayor generación de productos tóxicos.

Entre las ventajas de la EV, cabe destacar la posibilidad de emplear tamaños relativamente grandes de partícula, evitar la adición de catalizadores ácidos, empleo de maderas blandas, alta recuperación de azúcares, buenos rendimientos en la posterior hidrólisis enzimática y su viabilidad para ser implementado a escala comercial. No obstante, entre sus limitaciones se encuentran la parcial degradación de los azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos tóxicos que son potencialmente inhibidores de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

Hidrólisis

El objetivo de la hidrólisis es la conversión de la celulosa en glucosa. Para ello se utilizan tanto procesos químicos (ácidos diluidos o concentrados) como enzimáticos. Otra opción considerada con fuerza en la actualidad es el desarrollo de nuevos microorganismos capaces de hidrolizar la celulosa y fermentar la glucosa a etanol.

La hidrólisis ácida puede realizarse empleando ácidos concentrados. Un conjunto de inconvenientes, tales como la gran cantidad de ácido empleado, lo costoso de su recuperación, la nece-

saria neutralización del medio antes de la fermentación, unido a los efectos corrosivos de los ácidos, hacen que este proceso no sea económicamente rentable. Si se emplean ácidos diluidos, se requieren temperaturas relativamente altas que provocan una mayor corrosión de los equipos y mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos. Es por ello, que los procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática son los que se muestran como la alternativa más prometedora.

Hidrólisis enzimática

El material insoluble obtenido tras el pretratamiento de EV está formado principalmente por celulosa y lignina, ya que gran parte de los azúcares hemicelulósicos son solubilizados durante el mismo. Con el fin de romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa se emplea la hidrólisis enzimática, la cual constituye una de las etapas limitantes del proceso global de producción de etanol combustible. Las principales dificultades al realizar la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica están relacionadas con la baja actividad específica de las enzimas actualmente disponibles, lo que conlleva el empleo de altas dosis de celulasas. Por otro lado, la propia naturaleza de la lignocelulosa, donde las microfibrillas de celulosa se encuentran embebidas en la hemicelulosa y la lignina, hace del pretratamiento una etapa crucial en los procesos de producción de etanol cuando es empleada la hidrólisis enzimática.

En un proceso de producción de etanol mediante sacarificación y fermentación simultánea (SFS) la producción enzimática puede llegar a constituir el 50 % del coste total del proceso /13/. Es por ello que en la última década se han realizado numerosos esfuerzos de I+D para disminuir los costes de los enzimas. Internacional y Novozymes Inc., los dos principales productores mundiales de enzimas, están colaborando con el objetivo de lograr una reducción significativa (10 veces) del coste actual del catalizador. /34, 35/ La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por el grupo de enzimas denominado genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa.

Las plantas superiores, de algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias) son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico, de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación de los medios de cultivo. El complejo celulolítico de hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad, cuya denominación y mecanismo de acción son los siguientes /34, 35/: endo- β -(1,4)-glucanasas (β -(1,4)-glucan glucanohidrolasa; EC 3.2.1.4); exo- β -(1,4)-glucanasas, dentro de las cuales se encuentran la celobiohidrolasa (β -(1,4)-glucan celobiohidrolasas; EC 3.2.1.91) y la glucohidrolasa (β -(1,4)-glucanglucanohidrolasas; EC 3.2.1.74) y β -(1,4)-glucosidasa o celobiasa (β -D-glucósido glucohidrolasa; EC 3.2.1.21).

La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando los enlaces β -(1,4) y generando nuevos extremos de cadena no reductores. Pueden actuar sobre celodextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HMC), así como sobre celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. Supone, aproximadamente un 20 % de las proteínas totales del complejo. La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Este enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Este enzima constituye del 50-80 % del complejo celulolítico.

La glucohidrolasa se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celooligosacáridos y CMC. La β -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que, sobre las endo y exoglucanasas produciría la celobiosa si se acumulara en el medio de reacción.

Si se añaden celulasas al material lignocelulósico la hidrólisis de la celulosa es demasiado lenta, debido a la asociación de esta con la lignina, que constituye una barrera física a la penetración de los enzimas. Otros factores como la porosidad (área superficial accesible), la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el contenido en lignina y hemicelulosa dificultan la accesibilidad de las celulasas reduciendo la eficiencia de la hidrólisis. Por todos estos factores es necesaria una etapa de Pretratamiento, previa a la hidrólisis de la celulosa, que altere la estructura del material lignocelulósico, facilitando la acción de los enzimas /36/.

Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso ampliamente utilizado por el hombre desde hace miles de años para la producción de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza. Cuando la fermentación se emplea en el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática son fermentados con la consiguiente producción de etanol y CO₂. La conversión estequiométrica de la glucosa y xilosa a etanol es de 0,51 g de etanol por gramo de azúcar. En la práctica es muy difícil obtener conversiones tan altas, ya que las levaduras derivan cierta parte de la fuente de carbono que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento.

El microorganismo comúnmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que puede usar todo tipo de hexosas y produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0,51 g/g). Además, si se emplea en procesos de producción de etanol a partir de lignocelulosa, muestra gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento. No obstante, *S. cerevisiae* presenta una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, que también están presentes en los materiales lignocelulósicos. De ahí el interés de utilizar en este proceso microorganismos capaces de fermentar de forma eficiente todo tipo de azúcares /37/. Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) Uno de los elementos más

importantes relacionados con el proceso global de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, ha sido la implementación y desarrollo del proceso conocido como sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en el que la hidrólisis y la fermentación tienen lugar simultáneamente en un mismo reactor.

En el proceso de SSF la glucosa liberada por acción de las celulasas durante la hidrólisis es directamente metabolizada a etanol por las levaduras. Esta continua eliminación de la glucosa del medio, minimiza la inhibición por producto final sobre la actividad de las celulasas /18/, lo que se refleja en una reducción del tiempo total del proceso y productividades de etanol más altas /25/.

El proceso SSF se presenta como un método viable y eficiente para la producción de etanol lignocelulósico ya que puede ser empleado a una gran variedad de materias primas y con diferentes tecnologías de pretratamiento. No obstante, las etapas de hidrólisis y fermentación requieren de condiciones de operación diferentes, por lo que se deben fijar unas condiciones de compromiso que satisfagan ambas etapas.

El pH óptimo para la hidrólisis enzimática se encuentra alrededor de 4,8 en cambio el pH para la fermentación, dependiendo del microorganismo, suele ser 5 o superior. En cuanto a la temperatura óptima, la de la hidrólisis se encuentra alrededor de 50 °C mientras que la mayoría de microorganismos fermentadores tiene su óptimo de temperatura entre los 30-37 °C /17, 38/. En este contexto, el empleo de levaduras acidófilas (tolerantes a pH muy bajos) y termotolerantes, como *Kluyveromyces marxianus* capaces de crecer y fermentar a temperaturas superiores a 40 °C, más cercanas a la temperatura óptima de la hidrólisis, aparecen como alternativas muy prometedoras /38/. El uso de levaduras termotolerantes lleva asociadas otras ventajas, ya que al realizarse la SSF a temperaturas más altas, además de conseguirse mayores rendimientos de la hidrólisis enzimática, se disminuye el riesgo de contaminación por otros microorganismos /40/.

La producción de etanol a temperaturas superiores a aquellas empleadas en sistemas convencionales contribuye a reducir los costos de operación asociados al mantenimiento de la temperatura

de crecimiento entre los 30 y 35 °C, lo cual resulta necesario para evitar la inhibición del proceso en sistemas a gran escala, por otro lado se consigue un incremento de la productividad y se reducen las demandas energéticas en la recuperación del producto, particularmente cultivos continuos y semicontinuos /36/.

Compuestos tóxicos generados en los pretratamientos y sus efectos sobre los microorganismos

Durante el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se obtienen dos fracciones, los sólidos insolubles en agua (WIS), a los cuales se les realiza la hidrólisis enzimática, y el prehidrolizado. Este último es la fracción líquida en la cual están presentes los azúcares provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa y los productos solubles de la lignina, así como una serie de productos de degradación, que actúan como inhibidores en la etapa de hidrólisis enzimática y en la fermentación. Estos compuestos son originados debido a las altas temperaturas (a mayores temperaturas de pretratamiento mayor cantidad de tóxicos se generan) y condiciones ácidas en las que se desarrollan los pretratamientos. La naturaleza y concentración de estos compuestos inhibidores dependerá del tipo de material pretratado (madera dura, blanda o herbácea), del método de pretratamiento utilizado, de las condiciones del proceso (temperatura y tiempo) y de la utilización o no de catalizadores /41/.

Los productos de degradación que actúan como inhibidores pueden dividirse en tres grupos /36/ derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos. Como consecuencia de las altas temperaturas empleadas en los pretratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis de la hemicelulosa se degradan, formando dos compuestos derivados del furano: el furfural, que procede de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado a partir de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). El furfural puede degradarse a ácido fórmico o bien polimerizarse y el HMF origina cantidades equimoleculares de ácido

fórmico y ácido levulínico /36/. Además de estos dos ácidos, en el prehidrolizado también estará presente el ácido acético, procedente de la hidrólisis de los restos de acetilo de la hemicelulosa.

La composición del prehidrolizado depende del tipo de madera del que provenga. Los hidrolizados procedentes del pretratamiento de maderas duras tienen una mayor concentración de furfural y ácidoacético que aquellos procedentes del pretratamiento de maderas blandas, debido al mayor contenido en pentosas y restos acetilados de las hemicelulosas de las maderas duras.

Furfural y HMF

Entre los efectos producidos por los furfurales sobre los microorganismos se ha descrito la reducción de la velocidad específica de crecimiento (μ), la disminución de la productividad volumétrica de etanol /11/ y una menor producción de biomasa /42/. Los efectos producidos por el HMF sobre los microorganismos revelan una menor toxicidad /41/.

El efecto tóxico provocado por estos aldehídos furánicos parece deberse a su reactividad y capacidad para combinarse con determinadas moléculas biológicas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, o a la producción de daños sobre la membrana plasmática /11/. El furfural produce la inhibición de enzimas glicolíticos y fermentativos /41/. La inhibición mostrada por el furfural sobre la alcohol deshidrogenasa podría explicar la excreción de acetaldehído observada durante las primeras horas de la fermentación en presencia de este derivado del furano /42/.

El furfural y el HMF son metabolizados tanto por bacterias como levaduras /34, 43/. En condiciones de anaerobiosis, como consecuencia del metabolismo del furfural se produce principalmente alcohol furfurílico, y en menor concentración ácido furoico. La hipótesis de que la reducción de furfural a alcohol furfurílico está catalizada por un alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH está prácticamente aceptada /3/. En condiciones de anaerobiosis, durante la fermentación, se produce glicerol para regenerar el exceso de NADH producido en la biosíntesis y mantener el balance redox intracelular /11, 41, 42/. Sin

embargo, cuando la fermentación tiene lugar en presencia de furfural no se observa producción de glicerol, lo que sugiere que la reducción del furfural a alcohol furfurílico se acompaña de la oxidación del NADH en condiciones de anaerobiosis /11, 41, 42/.

Sin embargo, esta hipótesis puede ser refutada por algunos argumentos. La especificidad de una enzima por un sustrato determinado viene dada por la forma y tamaño del centro activo. El centro activo del alcohol deshidrogenasa de *S. crevisiae* es muy pequeño para aceptar moléculas mayores que el acetaldehído. Además, la mayoría de los experimentos relacionados con la especificidad de este enzima se han realizado con preparaciones comerciales que, por un lado son una mezcla de isoenzimas y por otro, difieren en algunos aminoácidos con la alcohol deshidrogenasa clonada de *S. crevisiae*, lo cual puede influir en la especificidad del enzima por el sustrato /41, 42/.

Ácidos alifáticos

Los ácidos alifáticos débiles producen descenso del rendimiento en etanol /41/ y disminución de la producción de biomasa /42/. Uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto inhibitorio de los ácidos alifáticos es la teoría del desacoplamiento. Según ésta, el efecto tóxico depende del pKa de los ácidos y del pH del medio. Únicamente la forma no disociada de los ácidos penetra en la célula por difusión, donde como consecuencia del mayor pH intracelular se disocia, provocando un descenso del pH /44/. Este descenso del pH debe ser compensado por un ATPasa de membrana, que bombea protones al exterior a costa de la hidrólisis de ATP; de aquí la menor cantidad de ATP disponible observada en presencia de ácidos alifáticos. Cuando la concentración de ácido es suficientemente alta, se supera la capacidad de bombeo de protones, lo que origina la acidificación del citoplasma y la posterior muerte celular /44, 45/.

Compuestos fenólicos

Durante el pretratamiento, una parte de la lignina también se degrada originando una gran

variedad de compuestos fenólicos. Se trata de un grupo de compuestos muy heterogéneo que se pueden encontrar en forma de monómero, dímeros y polímeros con una gran diversidad de sustituyentes /46/. Entre ellos, se encuentran ácidos, aldehídos y alcoholes aromáticos. Los fenoles originados en el Pretratamiento varían según el tipo de biomasa, ya que la composición de las ligninas difiere considerablemente atendiendo al grupo taxonómico al que pertenezca la especie vegetal. Un derivado fenólico muy abundante en los hidrolizados de maderas duras es el ácido-4-hidroxibenzoico. Se origina por la rotura de los enlace éster que lo unen a los grupos hidroxilos de los alcoholes cinámlicos que forman la lignina /42/. Otros derivados fenólicos abundantes en los hidrolizados de maderas duras son el siringaldehído y el ácido sirínico, procedentes de la degradación de las unidades siringilpropano de la lignina /41/. El 4-hidroxibenzaldehído y los ácidos gentísico, salicílico y protocatéquico han sido identificados también en hidrolizados procedentes de maderas duras /41/.

Otros derivados fenólicos identificados, tanto en maderas blandas como el pino y el abeto /13, 47/ como en maderas duras como el chopo, roble y sauce, han sido la vainillina y el ácido vainílico, derivados de la degradación de las unidades de guayacilpropano de la lignina. Además de los compuestos anteriormente citados, otros derivados fenólicos detectados en los hidrolizados de diferentes tipos de maderas han sido el catecol /42/, guayacol, hidroquinona, aldehído coniferílico y ácido homainílico /41/.

De los inhibidores identificados en los hidrolizados de los materiales lignocelulósicos, los compuestos aromáticos de bajo peso molecular son los que han mostrado mayor toxicidad para los microorganismos /41, 48/. Aunque el mecanismo de inhibición no se conoce completamente, se ha estudiado el efecto de los derivados fenólicos sobre procariontes como *Klebsiella pneumoniae* /48/ y *Escherichia coli* /11, 48/. El efecto tóxico de los aldehídos aromáticos puede deberse a una interacción con determinadas zonas hidrofóbicas de las células y a la pérdida de la integridad de la membrana, afectando así su capacidad para actuar como una barrera selectiva. El efecto tóxico

de los alcoholes aromáticos se debe al daño que éstos ocasionan a la membrana plasmática; su efecto inhibitorio puede basarse en mecanismos semejantes al de los ácidos alifáticos, descrito anteriormente /49/

Aunque se han realizados diversos estudios sobre el efecto de los derivados fenólicos sobre levaduras /49/ y especialmente sobre *Saccharomyces cerevisiae* /50/, el mecanismo de inhibición sobre los eucariotas no está completamente aclarado. Sin embargo, debido a que la estructura de la membrana plasmática es similar a la de los procariontes, se postula que los mecanismos de inhibición pueden ser similares /49, 50/.

Al igual que con el furfural e HMF, existen datos en la bibliografía que demuestran la capacidad de determinados microorganismos, tanto bacterias como *K. pneumoniae* /51/ o *Z. mobilis* /11/, como levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Pachisolen* y *Candida* /50/ de metabolizar los aldehídos aromáticos. Sin embargo, los datos reportados sobre el papel del alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* en la conversión de estos compuestos resultan contradictorios /52, 53, 54/. Otras enzimas, que pueden estar implicadas en el metabolismo de los aldehídos aromáticos son la vainillina oxidoreductasa /55/, la aldosa reductasa y la arilalcohol deshidrogenasa /53, 54, 55/.

Ingeniería evolutiva

Con el fin de aumentar la tolerancia a los tóxicos generados en la etapa de pretratamiento se han seguido diversas estrategias /10, 56/. Entre ellas se destacan la ingeniería metabólica, la mutagénesis y los métodos de selección natural, como la ingeniería evolutiva /37, 57/. La ingeniería evolutiva se basa en la posibilidad de seleccionar células con propiedades ventajosas bajo condiciones que reflejen las características de un proceso industrial, por ejemplo, diferentes fuentes de carbono, la presencia de productos de inhibidores o la temperatura. En este contexto se han desarrollado diferentes estrategias de ingeniería evolutiva con cepas recombinantes de *S. cerevisiae* para conseguir una eficiente fermentación de la xilosa /57/. La adaptación mediante ingeniería evolutiva se muestra

como una alternativa prometedora para obtener microorganismos más tolerantes a las temperaturas y a los tóxicos generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica /10, 11/.

Con el objetivo de obtener una cepa de *S. cerevisiae* con mayor tolerancia a los productos tóxicos y más eficientes en el consumo de xilosa, se sometió a la cepa F 12 a un proceso de evolución mediante la adaptación /9/. Cuando los microorganismos se crecen en medio líquido, las células mejor adaptadas para crecer en un determinado entorno, evolucionan a lo largo del tiempo y terminan desplazando a la población original, como consecuencia de un proceso natural de selección clonal /9/. En este caso, la adaptación se desarrolló en medio líquido, mediante transferencia secuencial de las células de levadura a medios con concentraciones crecientes del prehidrolizado y por ende, de los inhibidores. Al mismo tiempo se fueron realizando aumentos progresivos de la temperatura.

El prehidrolizado empleado para la adaptación se obtuvo tras la filtración de la paja de trigo pretratada con explosión a vapor a 210 °C durante 5 min. Este prehidrolizado se correspondía con un material pretratado completo con 15,2 % (p/p) de sólidos insolubles y fue diluido con agua destilada hasta 4, 6, 8 y 9 % (p/p), para realizar la adaptación. El proceso comenzó creciendo el microorganismo en presencia del prehidrolizado diluido al 5 %. Cada cultivo fue crecido a 42, 44, 46 y 48 °C, pH 5,0 durante 48 h. Para que las concentraciones de azúcares fueran las mismas en todas las diluciones del prehidrolizado, se añadió glucosa y xilosa hasta alcanzar la concentración de azúcares del prehidrolizado sin diluir (15,6g/L y 3,6 g/L de xilosa y glucosa, respectivamente) /9, 22/.

Con el objetivo de comprobar la eficacia que el proceso de ingeniería evolutiva tiene en la obtención de levaduras con mayor tolerancia a los tóxicos a elevadas temperaturas, y mejor producción de etanol a partir de xilosa, se desarrollaron diferentes pruebas de fermentabilidad con prehidrolizados de paja de trigo. Al emplear prehidrolizados al 8 % a 44 °C se obtuvieron mayores diferencias entre la cepa adaptada y la cepa parental. En ese caso, al emplear el prehidrolizado obtenido a 200 °C durante 5 min. (con menor concentración de tóxicos), la cepa ori-

ginal consumió la glucosa completamente tras 40 h, mientras que la cepa adaptada lo hizo en 12 h. A la misma dilución, el consumo de glucosa fue mucho más lento a 46 °C cuando se empleó el prehidrolizado obtenido a 210 °C (mayor concentración de tóxicos). En este caso la cepa adaptada consumió completamente la glucosa tras 48 h, mientras que la cepa original no consumió la totalidad de la glucosa hasta las 140 h.

Estos resultados demuestran que pese a los efectos negativos que tiene la temperatura sobre la fermentación y los productos de degradación sobre el consumo de azúcares, el empleo de cepas adaptadas supone una tasa mayor de asimilación de la glucosa. Resultados similares se obtuvieron en fermentaciones con hidrolizados de bagazo de caña de azúcar en los que la presencia de los compuestos fenólicos, furaldehídos y ácidos alifáticos producían un retraso en el consumo de glucosa /10, 13, 22/. En el mismo estudio, al igual que ocurre con los prehidrolizados de paja de trigo, la adaptación de *S. cerevisiae* a los compuestos inhibidores presentes en el prehidrolizado se tradujo en un más rápido consumo de glucosa /9, 13/. Durante las fermentaciones de los prehidrolizados se evaluó además la capacidad de la levadura de consumir la xilosa durante 140 h, expresado como porcentaje del total de xilosa presente en el medio (40 g/L). El mayor consumo de xilosa (85 % del contenido de xilosa potencial) se obtuvo al emplear la cepa adaptada con el prehidrolizado con menor concentración de productos tóxicos y diluido hasta un 4 % (p/p). Es destacable que el mayor incremento en el consumo de xilosa entre la cepa original y adaptada se observó al emplear los prehidrolizados más concentrados (8 % p/p), consumiéndose el 53 y el 67 % de la xilosa disponible en el prehidrolizado obtenido a 200 y 210 °C, respectivamente. Estos resultados mostraron el éxito de aplicar la ingeniería evolutiva para conseguir microorganismos que utilicen más eficientemente la xilosa /9, 13/.

Conclusiones

El empleo de sustratos lignocelulósicos para la producir etanol combustible constituye un paso de avance en la disminución de los costos del proce-

so, pero entraña dificultades que pudieran dar al traste con este objetivo. La ingeniería evolutiva constituye una alternativa posible para mejorar la respuesta del microorganismo a los inhibidores y los aumentos de temperatura durante la fermentación, al tiempo que se logra un incremento en la tasa de consumo de pentosas y hexosas, lo que se traduciría en mayores rendimientos y productividad de etanol. La simplicidad técnica de la ingeniería evolutiva representa una ventaja importante frente a los complejos y costosos procedimientos que implican la manipulación genética in vitro de los microorganismos.

Bibliografía

- 1 R. S. RAO; B. BHADRA; AND S. SHIVAJI. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks, *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47 19-24.
- 2 SIMON OSTERGAARD; Lisbeth OLSSON; AND JENS NIELSEN, Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, No. 1. vol. 64. Págs. 34–50
- 3 FENG-MING, LIN; BIN QIAO; AND YING-JIN YUAN, Comparative Proteomic Analysis of Tolerance and Adaptation of Ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to Furfural, a Lignocellulosic Inhibitory Compound Applied and environmental microbiology, 2009, vol. 75, No. 11. Págs. 3765–3776.
- 4 D. SINGH; P. NIGAM, I.; M. BANAT,; R. MARCHANT AND A. P. MCHALE, REVIEW. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part II – Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3 *World Journal & Biotechnology* 1998, 14. Págs. 823-834
- 5 Kaisa KARHUMAA; Beate WIEDEMENN; Barbel HAHN-HÄGERDAL; Eckhard BOLES and Marie-F GORWA-GRAUSLUND. Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain *Microbiol Cell Factories* 2006, 5:18. Págs. 5-18
- 6 Thomas W. Jeffries Engineering yeast for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 2006, 17: Págs. 320-326.
- 7 Cakar Z. P.; Seker U.O.S.; Tamerler C.; Sonderegger M.; Sauer U., *Evolutionary engineering of multiple-stress resistant Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 2005, 5. 569-578.
- 8 CHATERJEE R., and Yuan L. Direct evolution metabolic pathways. *Trends in Biotechnology* 2006. Págs. 24. 28-38.
- 9 TOMÁS-PEJÓ E; BALLESTEROS M; OLIVA J. M.; and OLSSON L. Adaptation of xylose fermentation yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production at high substrate loading. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 2010, 37: Págs. 1211–1220
- 10 MARTIN, C., MARCEL, M., ALMAZÁN, O., JONSSON, L. J. *Adaptation of a recombinant xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae to a bagasse of cane hydrolyzate with high content of fermentation inhibitors*. *Bioresource Technology* 2007, 98. Págs. 1767-1773.
- 11 Liu, Z. L.; SLININGER P. J.; GORSICH, S. W., Enhanced Biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005, 24. Págs. 451- 460.
- 12 SUNG-JAE Yang, Irina KATAEVA, SCOTT D. HAMILTON-BREHM, Nancy L. ENGLE; TIMOTHY J. TSCHAPLINSKI, Crissa DOEPPKE, Mark Davis, Janet WESTPHELING; and Michael W. W. Adams. Efficient Degradation of Lignocellulosic Plant Biomass, without Pretreatment, by the Thermophilic Anaerobe. *Anaerocellum thermophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, July 2010 No. 14. Págs. 4762–4769. vol. 75.
- 13 TOMÁS PEJÓ. M. E. Bioetanol de paja de trigo estrategia de integración de las etapas de proceso. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2009.
- 14 Proyecto PCI convocatoria Internacional, 2010 C/ 023431/09 – Intercambio de experiencias en busca de una Agroindustria Azucarera sostenible y diversificada.
- 15 Bamaga O.; Thakur M.; Verma M.. Assessment of cereal Straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America* 2003, 34, Págs. 53-58.
- 16 FAOSTAT. Food and Agricultural Organization (FAO). (2007) Available at <http://apps.fao.org/>
- 17 ALFANIA., GALLIFUOCOF., SAPOROSIA., SPERA A., CANTARELLA M. A comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000 25. Págs. 184-192.
- 18 OLSSON L., SORENSEN H. R., DAM B. P., CHRISTENSEN H., KROGH K. M., MEYER A. S. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and biotechnology*. 2006, 129-132, 117-129.
- 19 ZHANG, W., M. LIANG, and C. LU.. Morphological and structural development of hardwood cellulose during mechanochemical pretreatment in solid state through pan-milling. *Cellulose J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 2007b 14: Págs. 447–456

- 20 Wilson, D. B., Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1125. Págs. 289–297.
- 21 McCann, M. C.; and N. C. Carpita. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008, 11:314–320.
- 22 ALMENARES J. F., SERRAT M. Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulósica. *Tecnología Química* 2008, 28, No. 3. Págs. 63-70
- 23 WYMAN C. E., DALE B. E., ELANDER R. T., HOLTZAPPLE M., LADISCH M. R., LEE Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 2005, 96. Págs. 1959-1966.
- 24 JEOH, T.; C. I. ISHIZAWA.; M. F. DAVIS; M. E. HIMMEL; W. S. ADNEY; and D. K. JOHNSON. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol. Bioeng.* 2007. 98: Págs. 112–122.
- 25 BALLESTEROS I., NEGRO M.J., OLIVA J. M., CABAÑAS A., MANZANARES P., BALLESTEROS M., Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, 1-3. Págs. 496-508.
- 26 PÉREZ, J. A., GONZÁLEZ A., OLIVA J. M., BALLESTEROS I., MANZANARES P. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat Straw for bioconversión to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of chemical Technology and Biotechnology* 2007, 82, 929-938.
- 27 PALONEN, H; Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. Tesis Doctoral. 2004, <http://lib.tkk.fi/diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>.
- 28 Kristensen J. B., Thygesen L. G., Felby C., Jorgensen H., Elder T., Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *biotechnology for biofuels* 2008.1, 5. Págs. 110-119.
- 29 Oliva Domínguez. M. J., Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre la fermentación. Tesis Doctoral 2003. Universidad Complutense de Madrid. España
- 30 Himmel, M. E. S. Y.; Ding, D. K.; Johnson, W. S.; Adney, M. R.; Nimlos, J. W.; Brady, and T. D. Foust. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 2007. 315. Págs. 804–807.
- 31 HARRIS, D., and S. DeBolt.. Relative crystallinity of plant biomass: studies on assembly, adaptation and acclimation. *PLOS ONE* 2008, 3, 2897.
- 32 Hendriks, A. T. W. M. and Zeeman G., Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 2009, 100. Págs. 10-18.
- 33 Demain, A. L. M.; Newcomb, and J. H. Wu., Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005, 69. Págs. 124–154.
- 34 Fukuda, H. S.; Hama, S.; Tamalampudi, and H. Noda, Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.* 2008, 26:668–673.
- 35 Zhang, Y. H. P.; and L. R. Lynd., Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. *Applied and Environmental Microbiology* 2010, 15. Págs. 4881–4891 vol. 73,
- 36 MATSUSHITA, A., Inoue H., Kodaki T.; Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Sacharomyces cerevisiae* strain: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009b, 84 37-53.
- 37 Jorgensen, H., Kristensen, J. B.; Felby C., Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuel, Bioproducts and Biorefining* 2007, 20. Págs. 119-134.
- 38 ROSGAARD L., Andric P., Dam-Jonhansen K., Pedersen S., Meyer, A. S., Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2007, 2, Págs. 22-30.
- 39 LIMTONG, S., Sringiew C., Yongmanitchai, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* 2007, 98. Págs. 3367-3374.
- 40 Liu, Z. L., P. J. Slininger, B. S. Dien, M. A. Berhow, C. P. Kurtzman; and S. W. Gorsich, Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bishydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 31. Págs. 345–352.
- 41 MODIG, T., G. Liden, and M. J. Taherzadeh, Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* 2009, 363:769–776.
- 42 KATAEVA, I. A., S.-J. YANG, P. DAM, F. L. POOLE II, Y. YIN, F. ZHOU, W.-C. CHOU, Y. XU, L. Goodwin, D. R. Sims, J. C. Detter, L. J. Hauser, J. Westpheling, and M. W. W. Adams.. Genome sequence of the anaerobic, thermophilic and cellulolytic bacterium “*Anaerocellum thermophilum*” DSM 6725. *J. Bacteriol.* 2009, 191. Págs. 3760–3761.
- 43 Xia, J. M.; F. M. Lin; and Y. J. Yuan., Systematic analysis of yeast response to inhibitors. *Prog. Chem.* 2009, 19. Págs. 1159–1163.
- 44 Howard, R. L., Abostsi, E., Rensburg J., Howard S. Lignocelluloses biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2003, 2, 602-619.
- 45 Lam T. B. T., Kadoya K., Liyama K. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the

-
- bemzel position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls. *Phytochemistry* 2001, 57, 987-992.
- 46 BOLLÓK M., RÉCZEY K., ZACCHI G. Simultaneous Saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Applied Biochemistry and biotechnology* 2000, 84-86, 69-80.
- 47 ZOGAJ X., NIMTZ M., BOKRANZ W., ROMLING U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology* 2001, 39. Págs. 1452-1463.
- 48 GORSICH S. W., B. S. DIEN, N. N. NICHOLS, P. J. SLININGER, Z. L. LIU, and C. D. SKORY, Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 71. Págs. 339-349.
- 49 LARSSON S., QINTANA S., REIMAN A., NILVEBRANT N. O., JONSSON L. O., Influence of lignocellulose derived aromatic compounds on oxygen limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2000, 84-86. Págs. 617-632.
- 50 Zhang, Y. H. P., S. Y. Ding, J. R. Mielenz, J. B. Cui, R. T. Elander, M. Laser, M. E. Himmel, J. R. McMillan, and L. R. Lynd. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 2007a. 97. Págs. 214-223.
- 51 FENG-MING, LIN; BIN QIAO; and YING-JINYUAN, Comparative Proteomic Analysis of Tolerance and Adaptation of Ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to Furfural, a Lignocellulosic Inhibitory Compound *Applied and environmental microbiology*, 2009. vol. 75, No. 11. Págs. 3765-3776.
- 52 CHONG P. K. A. M.; BURJAH., RADIANINGTYAS A.; FAZELI and P. C. WRIGHT., Proteome analysis of *Sulfolobus solfataricus* p2 propanol metabolism. *J. Proteome Res.* 2007a. 6. Págs. 1430-1439.
- 53 CHONG, P. K., A. M., BURJA, H., RADIANINGTYAS, A., FAZELI, and P. C. WRIGHT. Proteome and transcriptional analysis of ethanol-grown *Sulfolobus solfataricus* P2 reveals ADH2, a potential alcohol dehydrogenase. *J. Proteome Res.* 2007b, 6. Págs. 3985-3994.
- 54 DE VRIJET A. E., MARS M. A., BUDDEN M. H.; LAI, C., DIJKEMA, P., DE WAARD, and P. A. CLAASSEN. Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Págs. 74:1358-1367.
- 55 ALMEIDA J. R. M. and HAHN-HÄGERDAL B. Developing *Saccharomyces cerevisiae* strain for second generation bioethanol: Improving xylose fermentation and inhibitor tolerance. *International Sugar Journal.* 2009, 111. Págs. 172-180.
- 56 WAHLBOM C. F., VAN ZYL W. H., JOSSON L. J., HAHN-HÄGERDAL B., OTERO R. R. C. Generation of the improved recombinant xylose – utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054, *FEMS Yeast Research* 2003. Págs. 3, 319-326.
- 57 SONDEREGGER M. and SAUER U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and environmental Microbiology* 2003, 69, 1990-1998.