

03044

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO  
PROYECTO ACADEMICO DE ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y  
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA.

1  
25-

TESINA : ALTERNATIVAS BIOLÓGICAS PARA MEJORAR LA  
HIDROLISIS DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PRESENTA: BIOL. SANDRA A. OROZCO SUAREZ  
ASESOR: M.EN.C. GUILLERMO AGUILAR OSORIO

Cd. Universitaria, Agosto de 1992.

1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

I.-	INTRODUCCION	1
I.1 .-	Antecedentes	2
I.2 .-	Objetivos	8
II.-	COMPOSICION Y ESTRUCTURA DE LAS FIBRAS LIGNOCELULOSICAS	9
II.1.-	Composición y estructura anatómica	9
II.1.1.-	Estructura de la pared celular	11
II.1.2.-	Estructura superficial de la celulosa	12
II.2.-	Estructura cristalina de la celulosa	13
III.-	PRETRATAMIENTOS DE LAS FIBRAS LIGNOCELULOSICAS	15
III.1.-	Pretratamientos físicos	16
III.2.-	Pretratamientos químicos	17
III.3.-	Pretratamientos biológicos	22
IV.-	HIDROLISIS ENZIMATICA DE LAS FIBRAS DE LIGNOCELULOSA.	25
IV.1.-	Características del complejo de celulasas	25
IV.2.-	Modo de acción de las celulasas	28
V.-	DEGRADACION MICROBIOLOGICA DE LAS FIBRAS DE LIGNOCELULOSA	30
V.1.-	Degradación enzimática semicontinua de residuos lignocelulósicos.	30
V.2.-	Fermentación y sacarificación simultanea	32
V.3.-	Fermentación y sacarificación anaerobia	38
V.4.-	Producción de celulasas	39
V.5.-	Utilización de los hidrolizados de ligno celulosa.	41

VI.	ALTERNATIVAS EN LA HIDROLISIS EFECTIVA DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS	45
VI.1.-	Con respecto a los microorganismos	45
VI.1.1	Mutación e Ingeniería Genética	51
VI.2.-	Con respecto a las enzimas	57
VI.3.-	Con respecto a los procesos	61
VI.4.-	Con respecto al sustrato	65
VII.	CONCLUSIONES	70
VIII.-	REFERENCIAS	71

## I N T R O D U C C I O N

La literatura concerniente al uso de la biomasa lignocelulósica, especialmente hidrólisis y biotransformación de celulosa y hemicelulosa a productos como etanol y otros bioproductos. Esta literatura está justificada por la cantidad de biomasa disponible y así los investigadores consideran que puede aprovecharse enormemente esta biomasa. En México se producen aproximadamente 120 millones de toneladas de residuos agrícolas, de los cuales una parte se emplea como alimento para ganado (13).

El problema de la utilización de los residuos lignocelulósicos es que la hidrólisis enzimática es lenta y poco efectiva; esta baja eficiencia de conversión a celulosa a azúcares monoméricos es el resultado de varios factores tales como: la estrecha asociación física y química entre la lignina y los polisacáridos en la pared celular, lo que forma una barrera a la hidrólisis; además la celulosa posee una estructura cristalina muy resistente a la hidrólisis ( la estructura amorfa que es más susceptible al ataque enzimático se presenta en menor cantidad ) y por último, los sitios disponibles para el ataque enzimático son limitados (18).

Asimismo se ha demostrado que los pretratamientos de la lignocelulosa causan rompimiento de la barrera de lignina y esto puede incrementar la accesibilidad de la celulosa a las moléculas enzimáticas y, eventualmente, facilitar la hidrólisis (43). El otro componente de los residuos lignocelulósicos es la hemicelulosa, que también se remueve con un pretratamiento adecuado.

La presente revisión trata precisamente sobre la hidrólisis de residuos lignocelulósicos y la utilización de los productos de hidrólisis con énfasis en la cinética enzimática involucrada, proponiendo algunas alternativas que nos ayuden a aprovechar de una manera más íntegra los residuos agrícolas y mejorar la eficiencia de la hidrólisis.

## I.1.- ANTECEDENTES

Las primeras hipótesis concernientes a la naturaleza de la hidrólisis enzimática de la celulosa fué propuesta por Reese y colaboradores (2): Estas teorías también fueron apoyadas por otros autores, Erikson (8), Mandels (20), Fan (17) y Wood (58), que señalan un efecto sinérgico en la naturaleza de la degradación de la celulosa cristalina, en hongos imperfectos este efecto involucra tres tipos de enzimas hidrolíticas: 1) la endo-1,4 B-glucanasa, denominada también  $C_x$ , rompe cadenas de celulosa actuando de una forma azarosa sobre la superficie de la celulosa cristalina, ii) la exo-1,4  $\beta$ -glucanasa, denominada también  $C_1$  o celobiohidrolasa, corta la cadena de celulosa por los extremos no reductores produciendo celobiosa principalmente, aunque libera también glucosa; la celobiosa puede ser separada por iii) B-glucosidasa en dos unidades de glucosa.

Algunos autores han descrito que la hidrólisis de la celulosa está sujeta a inhibición por producto final. Howell & Stuck (4) lo describen en un sistema enzimático de *Trichoderma viridae* y señalan que se da la inhibición no competitiva por celobiosa. Los productos de reacción de la hidrólisis de celulosa por esta especie, son predominantemente oligómeros, los cuales están sujetos a hidrólisis por  $\beta$ -glucosidasa, celobiasas y celohexanasas. Este modelo se basa en la suposición de que todos los carbohidratos solubles son celobiosa (4).

Otras investigaciones sobre hidrólisis de celulosa han desarrollado modelos mecanicísticos para la hidrólisis enzimática de la celulosa y la expresan de una forma matemática (4,3,11) basando el modelo en la cinética típica de Michalis-Menten, pero involucrando el ataque azaroso y longitudinal de las enzimas celulolíticas sobre el sustrato, tomando de igual forma la cinética de inhibición por producto y tres tipos de enzimas: endo-glucanasa, exo-glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, así mismo señalan que la cinética de la hidrólisis está fuertemente afectada por la relación de las endo y exo-celulasas en la mezcla de reacción. El sustrato y el grado de polimerización son factores que no se toman en cuenta.

También estudios de hidrólisis de celulosa se han realizado en sustratos solubles de celulosa como carboximetilcelulosa (CMC) y acetato de celulosa soluble en agua (WSCA) y oligosacáridos de celulosa (celodextrinas que tienen un alto grado de polimerización (19,26)). Los resultados

de los estudios con celodextrinas representan un producto potencial intermedio y, por tanto, un sustrato aprovechable para producir celulasas, aunque los estudios con celodextrinas solubles está limitado por el grado de polimerización de las mismas.

Coughlin M & Mehra (67) trabajaron con cultivos mixtos de diferentes cepas de hongos, utilizando *T. reesei*, *P. capsulatum* y *Talarimyces emersonii* en fermentación semisólida (FSS) y una preparación de celulasas comerciales para catalizar extensivamente la sacarificación de residuos; además los autores suplementaron la mezcla de reacción con pectinasas comerciales y observaron una extensiva hidrólisis de los residuos, indicando con esto que existe una interacción sinérgica entre los dos sistemas enzimáticos y así, los microorganismos son capaces de crecer en conjunto. Asimismo observaron que se producen derivados de pectina, cuando calcularon el rendimiento de este azúcar represento el 75% del rendimiento potencial. La figura número 1 muestra parte del trabajo realizado por estos autores (63).

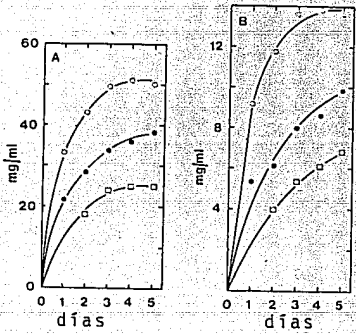


Figura No. 1.- gráfica que muestra la hidrólisis de pulpa de betabel con extracto de cultivo semisólido de *Trichoderma reese* ( ) solo, suplementado con extracto *Penicillium c.* ( ) y suplementado con una preparación de Pectinasas Sigma. (63)

Karube (7) i-movilizó las celulasas en una matriz de colágeno. Las enzimas utilizadas fueron celulasasa de *Trichoderma viridae* que son muy activas, pero se ha observado que disminuye su actividad en largos periodos de incubación. La utilización de enzimas inmovilizadas provee las siguientes ventajas; a) mantener estable la enzima en periodos largos de incubación y b) utilizar una menor cantidad de enzima. La desventaja que señala el autor es que el costo del proceso de inmovilización de la enzima es muy alto en relación con la cantidad de celulosa hidro-

lizada, en un largo tiempo de hidrólisis, por la dificultad de iniciar el contacto de la enzima con el sustrato insoluble. Sin embargo el autor observo que con la celulasa inmovilizada la hidrólisis de celulosa excede a la hidrólisis con celulasa libre, como se muestra en la figura número 2, la figura No. 3 se esquematiza el aparato utilizado para llevar a cabo el proceso descrito.

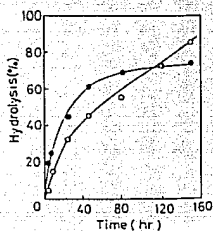


Figura No 2.-Hidrólisis de celulosa con celulasa inmovilizada (○) y celulasa libre (•), 182 mg de celulasa inmovilizada y 2 mg de celulasa libre (7)

Lee & Donaldson (9), se han enfocado a la hidrólisis anaeróbica y consideran que es una tecnología potencialmente atractiva para reducir el volumen de desechos sólidos, además una gran parte de los residuos puede convertirse a metano y dióxido de carbono y producir un sedimento biológicamente estable; señalando además que en este trabajo se pudo comprobar estudios anteriores como; la intolerancia al producto final (que en este caso fué metano). La figura no. 4 se esquematiza el proceso utilizado por estos autores.

Figura No. 3 Aparato experimental utilizado por Karube (7), 1) reactor de lecho fluidizado; 2) reserva de sustrato; 3) agitador magnético; 4) bomba peristáltica y 5) manómetro.

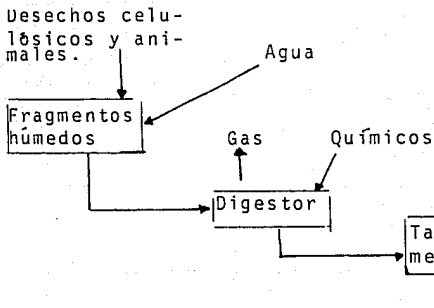
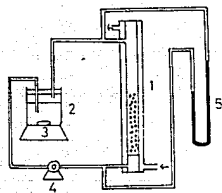


Figura No. 4 -Diagrama de flujo del proceso de digestión anaeróbica para desechos celulósicos(9).



Asimismo, la producción de enzimas celulolíticas ha causado gran interés por la idea de utilizarlas en la hidrólisis enzimática, motivo por el cual diversos autores han enfocado sus trabajos a este respecto (1, 20, 35, 37, 52, 59, 69). Mohagheghi & Grohman (37) produce celulasas con una cepa mutante de *Trichoderma reesei*, en un medio con una mezcla de celulosa y xilosa, los autores señalan que con este tipo de sustrato, se retrasó la fase de crecimiento; el ciclo fue corto y se logró un máximo de la productividad total de la enzima en un tiempo corto comparado con el crecimiento en un sustrato simple con celulosa. Así, la utilización de dos fuentes de carbono se observó muy bien; la xilosa fué utilizada primero para soportar el crecimiento, seguido por la utilización de la celulosa para inducir la producción de la enzima y proveer una fuente adicional del carbono para el metabolismo. La figura No. 5 esquematiza los resultados obtenidos por estos autores (37).

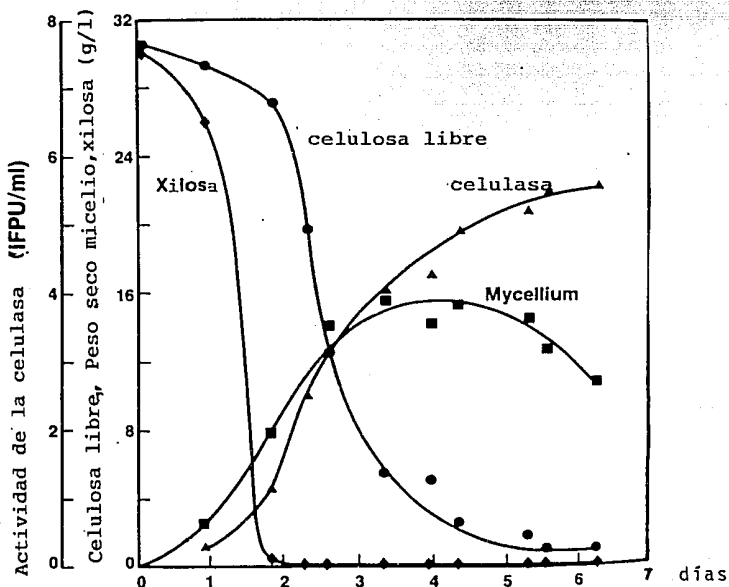


Figura No. 5.- Gráfica que muestra el crecimiento y producción de enzima con *T. reesei* RUT- C 30, creciendo en una mezcla de xilosa y celulosa (30: 30 g/l), a un pH= 4.8, T= 28°C (37).

Algunos autores se han enfocado a describir los componentes de la pared celular, la utilidad de cada uno de ellos y la resistencia que ofrece a la hidrólisis la compleja matriz de lignina (18,43,-44,57). Grohmann K. (44) describe el papel que juega el grupo éster de los polisacáridos de la pared celular en relación a la resistencia a la hidrólisis enzimática, como es el caso del xilano, que en la pared celular es insoluble y no reacciona con solventes, por la unión tan específica que tiene con la lignina; así la mayor fuente de grupos éster está presente en la fracción de xilano. Los resultados reportados por el autor indican que la desacetilación de la fracción de xilano - se puede incrementar de 5 a 7 veces la digestibilidad de la lignocelulosa, motivo por el cual se ve incrementada la hidrólisis de la celulosa. La figura 6 muestra el grado de desacetilación y la relación con la digestión de la biomasa.

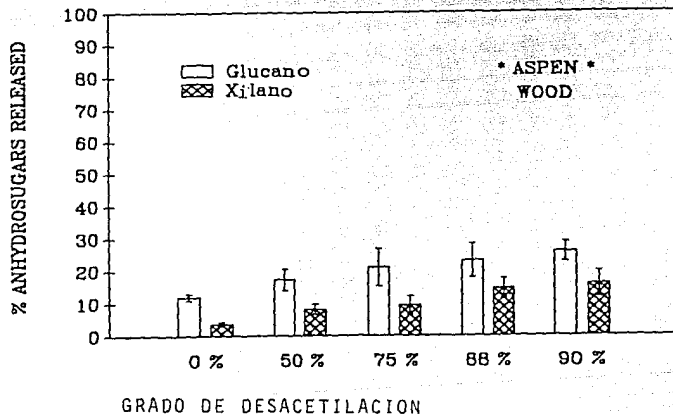


Figura No.6.-Resultados de la digestión de la biomasa - en relación al grado de desacetilación (44)

Otros trabajos se han enfocado a describir el sistema de enzimas celulolíticas, con diferentes microorganismos con la idea de encontrar la cepa que produzca mayor cantidad de enzima y con gran estabilidad: *Trichoderma reesei* y *Clostridium thermocellum* han sido los microorganismos más utilizados para producir celulasas, por la enzima extracelular que producen presenta una actividad alta (4,9,14,25,52,58).

## TIPOS DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS

México se ha caracterizado por dedicar una gran cantidad de suelo a los cultivos agrícolas y los desechos producidos como consecuencia de esta actividad, han sido considerados como contaminantes sólidos que no se llegan a recircular completamente; estos residuos tienen celulosa disponible así como otros polímeros que pueden ser -- utilizados como sustrato para una diversidad de microorganismos y producir algunos productos de interés comercial. En la tabla No. 1 se resume la producción de los principales residuos y la disponibilidad de celulosa.

CULTIVO	PRODUCCION ANUAL DE RESIDUO TON/AÑO	DISPONIBILIDAD DE CELULO SA.
Maíz	110,658 675	hojas, tallo y olote
Sorgo	12,448 040	Cáscara y tallo
Caña de azúcar	8,396 649	bagazo y hojas
Trigo	2,519 361	cáscara y paja
Frijol	617 819	tallo y cascara
Arroz	506 527	cáscara y paja

Tabla No. 1.- Principales residuos agrícolas producidos en México (13,66)

## I.2.- O B J E T I V O S

### GENERAL :

Analizar los procesos de hidrólisis de materiales -- lignocelulósicos tendiente a proponer algunas alternativas biológicas que mejoren estos procesos, con la idea de aprovechar más eficientemente todos los componentes que hay en estos residuos.

### PARTICULARES:

Evaluar los métodos que se han utilizado para mejorar la hidrólisis

Describir la cinética enzimática involucrada en el proceso de hidrólisis

Señalar asimismo los microorganismos capaces de degradar celulosa nativa y regenerada

Revisar los productos que de la hidrólisis se obtengan

Discutir las alternativas que han surgido para mejorar los procesos de hidrólisis.

## II. COMPOSICION Y ESTRUCTURA DE LAS FIBRAS LIGNOCELULOSICAS

### II.1.- COMPOSICION Y ESTRUCTURA ANATOMICA

El tejido lignocelulósico de todas las plantas terrestres es el mayor almacén de la energía fotosintética y de la materia orgánica renovable: Este tejido vascular tiene una compleja arquitectura molecular. Esto lleva a la capacidad de soportar grandes estructuras vivas, las cuales pueden ejecutar la función de transporte a través de todos los tejidos.

La celulosa y hemicelulosa constituyen aproximadamente del 60 al 80 % del peso seco de la planta, la celulosa es el principal componente de la pared celular y es un polímero lineal de D- glucosa con un alto peso molecular: Las moléculas individuales se encuentran unidas con enlaces B 1-4 y forman un material altamente cristalino-- que es muy resistente a la hidrólisis química, enzimática y microbiiológica (18).

La hemicelulosa está asociada con la celulosa y la lignina para proveer rigidez y flexibilidad a la pared celular. Es un compuesto de cadenas cortas de polisacáridos y está es la principal fracción no celulósica. En estado natural existe en forma amorfa y puede dividirse en dos categorías: Celulosanos, que incluyen a todas las hemicelulosas y los poliurónidos que son hemicelulosas que contienen ácido hexurónico y algunos grupos carboxilo (17,43).

La lignina es uno de los tres componentes básicos de la biomasa y suma del 20-30% de la pared celular; es un polímero tridimensional de origen fenólico con gran peso molecular y su estructura química completa no es clara. Las unidades básicas de la lignina en la planta son consideradas como ; 3,5, dimethoxy-4-hidroxifenilpropano, 3-methoxy-4-hidroxifenilpropano (67).

La lignina funciona como preservativo y cemento entre las fibras individuales, adopta una forma de matriz compuesta de microfibrillas celulósicas como una forma de protección (45).

DESECHO	% DE CELULOSA	% HEMICELULOSA	%LIGNINA	COMPOSICION (PESO %)			
				GLUCOSA	XILOSA	ARABINOSA	CENIZAS
P E N T O S A S							
Madera dura	40- 55 %	24- 40 %	18- 25 %	60	23	-	-
Paja de cebada	25- 40 %	25 -40 %	10- 30 %	39	13.9	4.3	12.4
Paja de Maíz	30- 40 %	30 %	15.1%	37	13.9	3.0	4.3
Paja de trigo	30- 40 %	25- 30 %	14.5%	34.7	18.0	2.2	9.6
Bagazo de caña de azúcar	44 %	20- 25 %	10.0%	-	-	-	-
Frijol (hoja y ta- llo )	33 %	10 %		-	-	-	-

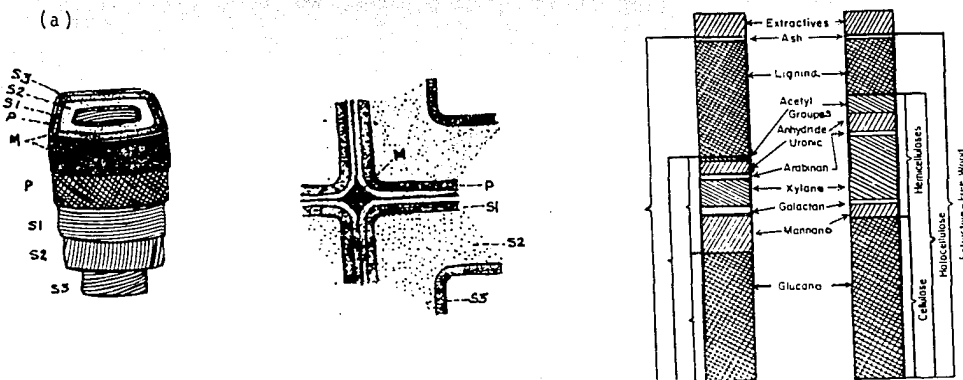
Tabla No. 2.- Composición química de algunos residuos ligno-  
celulósicos, tomado de Tsao (67) y Schaffner (69).

### II.1.1.- ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE LA PLANTA.

La arquitectura de la pared celular en la planta se muestra en la figura No. 7, en ella (a,b) se muestra la pared primaria (P), la otra delgada pared es la pared secundaria (S1), la substancial pared -- media (S2) y la muy delgada pared interna (S3) algunas veces llamada pared terciaria.

Alrededor de cada pared en la pared secundaria (S). La celulosa y otros constituyentes de la pared están agregados dentro de finas y delgadas uniones llamadas microfibrillas. En la microfibrillas están distribuidas entidades de pocas moléculas de celulosa, y así, a través de una microfibrilla a otra. En la pared (S1), los grupos de microfibrillas están alternativamente unidas en helices. En la pared media (S2), los grupos de microfibrillas están orientadas en bandas (lamellae) cercanamente paralelas a la célula; y la pared interna (S3) en dirección cercanamente a la (S2). La pared primaria (P) tiene un arreglo irregular de helice alrededor de la célula. Circundante a la fibra está excesivamente lignificada.

En la figura No.7(c) se muestra la distribución de los constituyentes químicos de una típica pared celular.



(b)

(c)

Figura No.7.- Diagramas que muestran la estructura de la pared celular (a,b) y la composición química (c), (46,66)

En la figura No. 3 se muestra otro diagrama donde se esquematiza la distribución de los constituyentes químicos en la pared celular la medida se da en porcentajes en base al peso seco. (43).

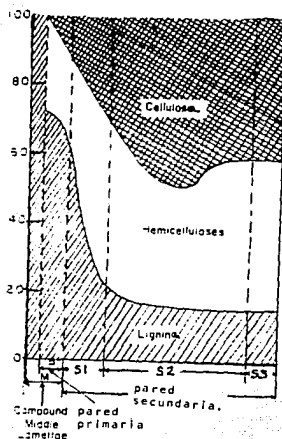


Figura No. 2.-Diagrama que muestra la distribución de los constituyentes químicos en la pared celular (43).

### II.1.2.- ESTRUCTURA SUPERFICIAL DE LA CELULOSA

Un examen de la superficie externa de la celulosa revela dos grandes categorías de capilares que existen en la madera y las fibras de algodón, los denominados capilares gruesos, como el lumen de la célula, los llamados aperturas en hoyo y poros de la membrana, con una talla alrededor de 20 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los más grandes capilares de la pared celular usualmente existen en el espacio entre las microfibrillas y las moléculas de celulosa en la región amorfa. La talla de estos espacios son dependientes de la humedad contenida en la celulosa; cuando la celulosa es saturada con agua estos poros se expanden a su máxima dimensión; la talla aproximada de estos espacios de vacío con saturación de agua en la madera, algodón y pulpa de madera fue estimada entre 1, - 0.5 y 2.5 nm respectivamente (67).

Se puede incrementar el total de superficie interna de material poroso con un adecuado pretratamiento, y en general, esta área tiene varios órdenes de magnitud de superficie externa.



## II.2.- ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA CELULOSA

La celulosa como ya hemos mencionado, es un polímero lineal de unidades de glucosa anhidra pura, conectados por enlaces 1,4-B- glucosídicos y en la naturaleza existe en alto estado organizado conocido como-cristal fibroso (figura 9.).

Las unidades básicas repetidas forman una celda unitaria, la --cual se ha definido como una red monoclinica con cadenas de celulosa em-pacadas en las esquinas y en el centro de la celda, comose aprecia en la figura 5 F; esta estructura ha sido bien aceptada excepto por algunas co rrecciones menores sobre la orientación de las cadenas llegandose a la -conclusión de que las grandes cadenas de celulosa pueden orientarse en -formación antiparalela y paralela (18).

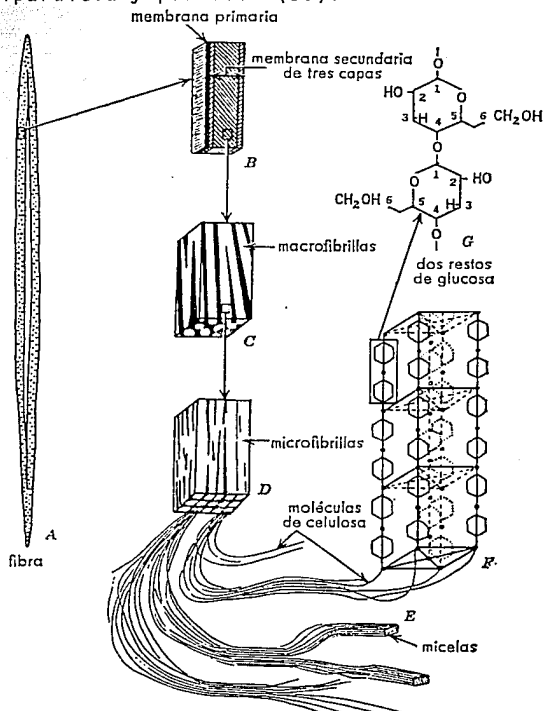


Figura 9.- Interpretación de la estructura de la membrana.La fibra (A);Membranas (B);Macro y Microfibrillas (C,D); Ordenación de las moléculas de celulosa (E,F,G). Tomado de Essau K.(89)

La segunda posible estructura para la celulosa es la estructura de cristalita y posiblemente sea la más importante que las otras estructuras de la celulosa.

En la figura 10 se muestran dos modelos representativos de la orientación molecular en la cristalita. La región cristalina es una región muy ordenada y se separa entre una y otra región cristalina un área de menor orden que es la región amorfa. La región cristalina tiene una longitud aproximada de  $500\text{Å}$  en la celulosa nativa y alrededor de  $150\text{Å}$  en la celulosa regenerada, estas longitudes a menudo son referidas a un nivel y a un grado de polimerización, que es una característica de la celulosa para la hidrólisis (18).

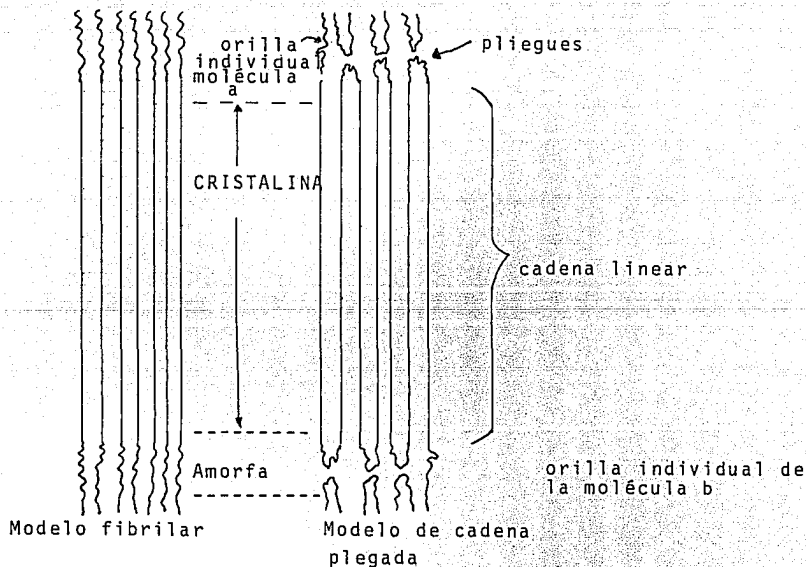


Figura 10- Esquema de los modelos fibrilar y de cadena plegada, según Chang y colaboradores (18)

La molécula de celulosa contiene normalmente un mínimo de 10 consecutivos pares de región amorfa y cristalina en una fibra; esta es una de las propiedades básicas de la celulosa.

En la misma figura 6 se ilustra otro modelo llamado de cadena plegada en la estructura de la cristalita. Aquí las moléculas de celulosa son visualizadas como pliegues adelante y atrás a lo largo del eje fibrilar con 101 planos de latices cristalinos, así las moléculas de celulosa forman láminas o placas unidas a lo largo del pliegue. Esto constituye la unidad molecular básica de las fibras de celulosa, una particularidad de este modelo es que los enlaces glucosídicos del pliegue (B 1 pliegue) son diferentes; éstos químicamente mucho más débiles que los pliegues B-lineales y estructuralmente más importantes en la integridad del cristal. Sin embargo, los enlaces glucosídicos en ambas regiones, la cristalina y la amorfa, son todos enlaces  $\beta$ -lineales.

La estructura cristalina juega un papel muy importante en la degradación hidrolítica de la celulosa; se ha observado que la celulosa cristalina reacciona más lentamente que la de baja cristalinidad (amorfa) en la hidrólisis enzimática (18,43,45).

### III.- PRETRATAMIENTOS DE LAS FIBRAS LIGNOCELULOSICAS

Los sustratos nativos lignocelulósicos requieren de alguna forma de pretratamiento para remover la cubierta de lignina, la lignina se desbarata en polímeros holocelulósicos, de esta forma se puede incrementar la accesibilidad de la enzima a la celulosa y de igual forma se puede modificar su estructura.

Diferentes pretratamientos se han desarrollado y la literatura a este respecto es muy amplia. En el pretratamiento se pueden utilizar componentes baratos y equipo accesible y sí se fracciona la lignina y la hemicelulosa en sus componentes, estos pueden utilizarse comercialmente.

Los pretratamientos que se dan dependen mucho del residuo que se utilice y se han dividido en dos grupos :

- PRETRATAMIENTOS FISICOS
- PRETRATAMIENTOS QUIMICOS

### III.1.- PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

Algunos autores clasifican a los pretratamientos físicos en dos categorías: Mecánicos y No Mecánicos (43).

En el pretratamiento mecánico se utilizan fuerzas físicas que -- pueden dividir el material lignocelulósico en partículas más finas que la hacen más susceptible a la hidrólisis.

**MOLINO DE BOLAS (Ball milling).** El molino de bolas utilizado en lignocelulosa y celulosa es un método efectivo que mejora la hidrólisis enzimática. La fractura y las fuerzas comprensivas del molino causan reducción en la cristalinidad, decrece el grado de polimerización, así como la talla de la partícula. Sin embargo, el costo de la energía consumida y de todo el proceso es increíblemente alto, y el resultado sobre el rango de saccharificación no es adecuado para propósitos industriales (23,43).

**MOLINO COLOIDAL.** El molino coloidal consiste de dos discos que cierran cada uno girando en dirección opuesta, y en el cual el sustrato pasa a través de los dos discos. Mandels (3) señala que el alto costo de operación de este pretratamiento lo hace inadecuado a gran escala.

**MOLINO MARTILLO.-** Este tipo de molino consiste de un rotor y un juego de martillos que se acoplan entre sí a la revolución del motor, los martillos impactan el sustrato, rompiendo las placas de las moléculas de celulosa. Mandels (3) señala que el efecto de este molino es como de prensa-- y se logra incrementar la susceptibilidad de la celulosa a la enzima (3,43).

**DESGASTE MECANICO.-** En este tipo de pretratamiento a la celulosa nativa se pone en contacto con una cuchilla de acero, que realiza una especie de pulida sobre la superficie de la fibra; esto trae como consecuencia el rompimiento de la pared celular y de la matriz de lignina. De esta forma, se logra incrementar el rango de hidrólisis en más del 50 % (del contenido de celulosa presente) . Es una técnica sencilla, que no requiere gran consumo de energía, pero no es factible para propósitos industriales (41).

En los pretratamiento físicos No Mecánicos se utilizan algún sistema físico, para disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar el área de superficie. Estos son algunos de los pretratamientos No Mecánicos:

**PIROLISIS .-** La pirólisis ha sido un pretratamiento recientemente investigado, es un proceso que puede incrementar la susceptibilidad del material celulósico a la hidrólisis. Este pretratamiento consiste en colocar el sustrato en un reactor a una temperatura de 300°C y así la celulosa rápidamente se descompone en productos gaseosos, los cuales llevan grandes cantidades de carbón residual; sin embargo, a temperaturas intermedias la descomposición es más lenta y algunos productos volátiles se pierden. Existe un notable cambio en la cristalinidad pero el consumo de energía es muy elevado y hay que cuidar la formación de productos indeseados. Se llega en cambio a remover más del 50% de celulosa (18), Fan et al (43) señalan que con el pretratamiento de pirólisis en una atmósfera de helio a 170°C, logra mejorar notablemente la hidrólisis.

**EXPLOSION DE VAPOR (Steam-explosion) .** En este pretratamiento se emplea vapor caliente utilizando una rápida descarga sobre el sustrato. Esta técnica desbarata la textura de las fibras y disminuye el grado de polimerización de la celulosa, produce fibras individuales en las cuales la lignina no cubre más los componentes de carbohidratos y puede fácilmente extraerse. La lignina se rompe en subproductos con un rango en el peso molecular de 170- 700 D. Estos productos, los cuales retienen la estructura básica de la lignina fueron reportados de alta reactividad (18).

Fan (43) observó que la digestibilidad de la celulosa fue de 53% del total de la bimesa colocada en el reactor.

**EXPLOSION POR CONGELACION.-** Este tipo de pretratamiento se desarrolló con el fin de incrementar la reactividad de la celulosa y el rango de hidrólisis. Este proceso se realiza con un líquido volátil que se lleva a presión elevada que lo volatiliza y en consecuencia reduce la temperatura; además de que este pretratamiento descristaliza la celulosa, Dale (21) señala que este proceso es económico, porque se puede utilizar amoníaco que es relativamente barato y se puede recuperar fácilmente del reactor. La cantidad de celulosa removida es alta y los azúcares fermentables de la celulosa removida se incrementa a más del 70%.

### III.2.- PRETRATAMIENTOS QUIMICOS

Los pretratamientos químicos han sido extensivamente usados para remover la lignina de la celulosa y destruir la estructura cristalina. Tradicionalmente, la industria del papel los ha utilizado en el proceso de deslignificación del material lignocelulósico para producir calor y

papel de las largas fibras; sin embargo, estos procesos son extremadamente riguroso y costoso para ser utilizado como pretratamiento de residuos lignocelulósicos (43).

Aunque todos los pretratamientos son usualmente efectivos tienen ventajas que no deben ignorarse, esto incluye un equipo especial que resista la corrosión y asu vez necesita un extensivo lavado y un desagüe especial para los desechos químicos. A continuación mencionaremos algunos pretratamientos químicos.

#### A L C A L I S

**HIDROXIDO DE SODIO :** Este tipo de pretratamiento ha sido utilizado para mejorar la digestibilidad del material lignocelulósico. La sosa diluida causa hinchamiento del material lignocelulósico, incrementa el área de superficie, decrece el grado de polimerización y baja la cristalinidad separando las ligaduras entre la lignina y los carbohidratos.

Varios sustratos responden de diferente manera al tratamiento con hidróxido de sodio; en la mayoría, la sosa tiene un efecto positivo, aumentando la hidrólisis. En la figura 11, se observa la cantidad requerida para aumentar la digestibilidad de varios sustratos (43).

**PEROXIDO ALCALINO.-** En este tipo de pretratamiento, se utiliza para aumentar la digestibilidad de la celulosa a pHs de 10.5 - 11.5, utilizando peroxido alcalino al 1% y en un tiempo aproximado de 24 hrs.(27), a estas condiciones una parte de la lignina y toda la hemicelulosa fue solubilizada, de tal forma que la celulosa es altamente susceptible a la digestión enzimatica con celulasascon este pretratamiento decrece el peso seco del residuo (debido a la solubilización de la hemicelulosa), se incrementa la eficiencia de la sacarificación y consecuentemente una gran parte de la celulosa es convertida a glucosa. Este pretratamiento requiere un fuerte control del pH, porque a menor pH disminuye el rango de sacarificación (43).

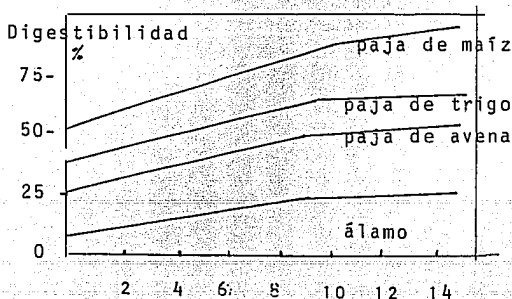


figura 11.- Cantidad óptima de NaOH requerido para aumentar la digestibilidad de varios sustratos lignocelulósicos.(43)

## A C I D O S

Los ácidos también son utilizados para aumentar el la hidrólisis. Las últimas investigaciones se han dirigido a pretratamientos ácidos para incrementar la hidrólisis enzimática y los más utilizados son los que a continuación se mencionan.

**ACIDO SULFURICO :** En este tipo de pretratamiento se utiliza ácido diluido 1:1 para separar la fracción de pentosa y el residuo es secado y --mezclado con ácido concentrado (70-80%) para disolver la celulosa, la --cual es eventualmente precipitada en solución por adición de metanol. La celulosa precipitada es fácilmente sacarificada por hidrólisis enzimática. Con este pretratamiento se obtiene del 35-40% de rendimiento de azúcar sobre la celulosa digerida (43).

**ACIDO CLORHIDRICO:** Para este pretratamiento se ha utilizado el ácido al 5% en una solución concentrada de  $ZnCl_2$  a altas temperaturas; después de enfriar la celulosa en forma amorfa se precipita con acetona. De esta forma, con concentraciones del 20 % de celulosa, por hidrólisis enzimática - se obtiene en solución el 19 % de glucosa y el 1% de celobiosa. Se considera por lo tanto una eficiencia del 100 % (49).

**ACIDO FOSFORICO :** En este tipo de pretratamiento se utiliza ácido fosfórico al 85% y una temperatura de 2°C, en períodos de tiempo entre 2-10 h. El sustrato que se obtiene es hinchado y esto aumenta la región amorfa y, consecuentemente aumenta la hidrólisis enzimática. Se ha observado que aumentando el tiempo (100 h), aumenta aproximadamente el 30% la digestibilidad en condiciones adecuadas de hidrólisis (47).

## G A S E S

El pretratamiento con gases tiene la ventaja de que la penetración es más fácil e uniforme através del sustrato, lo cual lo lleva a una extensión uniforme. A continuación se mencionan los más utilizados:

**DIOXIDO DE CLORO:** Es un agente activo para la técnica de despulpe, el cual utiliza cloruro de sodio en una solución de ácido acético para solubilizar la lignina. El máximo incremento (a nivel de laboratorio) de la digestibilidad fue del 43%; los autores (3) señalan que el incremento se debe a que la lignina se descompone en cloruros y óxidos.

**OZONO:** Este tipo de pretratamiento puede ser muy efectivo para degra-

dar lignina pero puede producir excesiva cantidad de contaminantes, aunque se obtiene un drástico incremento de la digestibilidad de la celulosa contenida en el residuo (38). Se observó que el ozono ataca ambos, la lignina y los carbohidratos, aunque la velocidad de reacción es lenta.

**DIOXIDO DE SULFURO** : El pretratamiento con dióxido de sulfuro está relativamente inexplorado, lo que es evidente por la pocas publicaciones. El pretratamiento con dióxido de sulfuro puede ser efectivo para la lignocelulosa. Este proceso consiste en hacer reaccionar con  $SO_2$  gaseoso a la lignocelulosa a  $120^\circ C$  de 2 a 3 h. Este pretratamiento aparentemente rompe el complejo lignina-carbohidrato y depolimeriza la lignina. Muchos de los carbohidratos de los residuos son convertidos a azúcares después de un pretratamiento con  $SO_2$  por un espacio de 2 h y el 70- 80 % de los carbohidratos-residuales son convertidos a azúcares después de un pretratamiento de 3h. (18).

#### A G E N T E S O X I D A N T E S

Los agentes oxidantes han sido utilizados para pretratar la lignocelulosa; estos agentes causan una modificación estructural de la celulosa penetrando dentro de ella y oxidándola. Se ha observado que algunos oxidantes-penetran y reaccionan con ambas regiones, la cristalina y la amorfa, en la celulosa cuando existe algunos otros que solamente atacan la región amorfa. Algunos agentes oxidantes existen en forma gaseosa, por eso han sido considerados en esta sección.

Cloruro de potasio ( $NaClO_2$ )	Hipoclorito de Sodio( $NaOCl$ )
Bromato de potasio ( $KBrO_3$ )	Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )
Iodato de potasio ( $KIO_3$ )	Dióxido de nitrogeno ( $NO_2$ )
Permanganato de potasio ( $KMnO_4$ )	Dióxido de cloro ( $ClO_2$ )
Peroxidosulfato de potasio( $K_2S_2O_8$ )	Dióxido de azufre( $SO_2$ )
Perclorato de potasio ( $KClO_4$ )	Ozono ( $O_3$ )



TIPO DE PRETRATAMIENTO	PRODUCCION DE AZUCAR *	EXTENSION DE LA HIDROLISIS **	COSTO DEL REACTIVO***	COSTO DEL PRETRATAMIENTO ****
<b>PRETRATAMIENTOS QUIMICOS</b>				
Ac. Caustico	341.0	20.5	0.04	0.12
Ac. Sulfuroso.	252.9	16.0	0.32	1.26
Ac. Hipoclorito	239.9	13.3	0.94	3.92
Ac. Acetico	279.9	20.9	7.51	26.84
Butanol	72.4	4.7	2.86	39.49
Ac. Sulfúrico	140.5	9.4	0.11	0.78
<b>PRETRATAMIENTOS FISICOS</b>			<b>COSTO DE LA ENERGIA CON SUMIDA.</b>	
Molino de Bolas	256.98	9.1	1.48	5.82
Molino de Rodillo (1/4 h)	160.0	6.48	2.24	14.0
Molino de extrusión fina. con presión.	64.29	2.5	0.01	0.1
Irradiación UV	207.02	5.6	0.1	0.48

\* (Kg de paja/g Az.)

\*\* (después de 8h,  $gl^{-1}$ )

\*\*\* (por Kg de paja, \$/Kg) U.S.

\*\*\*\*( basado en azúcar \$/Kg) U.S.

Tabla No. 3.- Tabla que muestra la diferencia de los costos del Proceso de Pretratamientos Químicos Y Físicos según Fan y Colaboradores (43)

### III.3.- PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS DE LAS FIBRAS DE LIGNOCELULOSA

La degradación biológica de las fibras de lignocelulosa es la parte más importante del ciclo de carbono y nitrógeno en la biosfera, la eficiente descomposición de la pared celular, sobre todo la lignina, es evidente en la naturaleza por la baja acumulación de biomasa que se observa año con año.

El esfuerzo para aislar microorganismos con la habilidad de descomposición de los residuos lignocelulósicos ha tenido frutos, y el número de microorganismos conocidos para atacar la lignocelulosa se ha expandido. Todo ha supuesto que la degradación es el resultado de la acción cooperativa entre diferentes hongos, bacterias y microflora de suelo (45). Los mecanismos descritos, de los cuales se han derivado muchos estudios, han sido estudiados en hongos y, probablemente son hasta hoy los organismos más estudiados de todos los habitantes del suelo.

#### H O N G O S

Los hongos clasificados como de la pudrición blanca (basidiomicetos y algunos ascomicetos) atacan alternativamente polímeros de lignina. Ellos tienen la capacidad de producir enzimas, las cuales oxidan compuestos fenólicos y han sido utilizadas como base para identificación de hongos degradadores.

Los hongos de la pudrición blanca atacan alternativamente causando rompimiento de uniones interlineales de C-C, B- aril, rompimiento de anillos aromáticos, oxidación de C y C=C, hidroxilación aromática y demetilación de grupos metoxilo.

En 1950, T. Reese (2) aisló y describió al hongo *Trichoderma viridae* subsecuentemente clasificó a *Trichoderma reesei*, capaz de producir las enzimas más activas. Existen suficientes trabajos que demuestran la capacidad de este hongo para producir un sistema enzimático de celulasas, que logran hidrolizar altos niveles de celulosa (9,10,17,45).

El sistema de enzimas capaces de inducirse con sustratos celulósicos es el sistema de celulasas, son una mezcla de endo- B- 1,4 glucanhidrolasa y B- glucosidasa. Este sistema de enzimas ha sido fundamentado en numerosos hongos mesófilos y termófilos, en bacterias mesófilas y termófilas y algunos ascomicetos.

Algunos otros microorganismos producen también otras enzimas-hidrolíticas como endo-1,4 B xilanasas, B- xilisidasas, 1,3- arabinosidasas, manasa y acetil- esterasa. (45).

La más interesante posibilidad fue la de producir cepas mutantes de *Trichoderma* que puede abastecer una gran cantidad de B-glucosidasa. -- Trabajos recientes con este objetivo han sido llevados particularmente en U.S.A. (Genecor, CMA, Universidad de Rutgers), en Francia, Finlandia y Dinamarca (NOVO) y la productividad se ha incrementado en dos órdenes de magnitud (32).

Porque la temperatura óptima para la producción de celulasas puede ser de 45-50 °C y la mayoría de los microorganismos productores su rango está entre los 30-40°C, se han hecho varias pruebas con diferentes microorganismos con la idea de incrementar el rango de tolerancia a la temperatura, tales como ; *Schyzosaccharomyces pombe* (32), *Candida brassicae*, *Candida acidothermophilus*, *Zygonomas mobilis* (42) y mutantes termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* y *Streptomyces* sp (36). Johnson y colaboradores (42) señalan que los organismos termotolerantes presentan grandes dificultades en el proceso.

Algunos otros hongos se han probado por tener capacidad de hidrolizar residuos celulósicos. Entre los que destacan se encuentran: *Chrysosporium lignorum* (32,36), *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neocallimastix frotalis*, *Penicillium funiculosum*, *P. pirophilum*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Talaromyces* sp y *Sporotrichum cellulolyticum* (46).

## B A C T E R I A S

Las bacterias probablemente han jugado un papel secundario en la degradación de residuos celulósicos; únicamente pocas cepas han sido capaces de atacar el polímero y, muchas veces los productos de bacterias son indeseables, como ácido acético, ácido láctico y otros ácidos orgánicos, los cuales son difíciles de separar del proceso. En suma, únicamente pocas cepas se reportan capaces de producir celulasas con una actividad capaz de degradar celulosa insoluble a azúcares solubles, en este contexto las cepas más activas son generalmente bacterias termófilas : *Aceivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellulolyticum*, *Actinomicetos*, *Microspora calcae*, *Pseudonocardia thermofila* y *Thermonospora* sp. (42).

*Clostridium thermoCELLUM*, es la bacteria que ha atraído más interés según Halliwell y colaboradores (50). Esta bacteria es donadora del más poderosa sistema de celulasas. En el Instituto Tecnológico de Massachusetts se ha trabajado con esta bacteria termotolerante a una temperatura de 60 °C, y es capaz de convertir glucosa y celobiosa a etanol. Así mismo se propuso utilizar co- cultivos con *Clostridium saccharotricum*, en orden de utilizar pentosas simultáneamente y favorecer el proceso por eliminación de oligosacáridos. El porcentaje de eliminación de oligosacáridos y el porcentaje de conversión es aproximadamente tres veces más alto que con un cultivo simple; sin embargo, el co- cultivo no está libre de inconvenientes para la obtención de ciertos productos como ; ácido láctico, ácido butírico y etanol. (46)

La tabla No. 4 nos señala algunos microorganismos celulolíticos que también pueden degradar celulosa.

## MICROORGANISMOS

### BACTERIAS

#### CEPAS ANAEROBICAS

##### Gram-positivos

*Ruminococcus albus*  
*Ruminococcus flavefaciens*  
*Eubacterium cellulosoLvens*  
*Clostridium cellulovorans*  
*Clostridium stercorarium*  
*Clostridium thermoCELLUM*

#### CEPAS AEROBICAS (Gram- positivos)

*Bacillus* sp  
*Streptomyces flavogriseus*  
*Cellulomonas fimi*  
*Thermonospora* sp.

Gram- negativos  
*Cellvibrio gilvus*  
*Cellvibrio fulvus*

*Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*

### HONGOS

#### CEPAS ANAEROBICOS

*Neocallimastic frontalis*  
 (Phycomycetes)

#### AEROBICOS

*Trichoderma reesei*  
*Sporotrichum pulverulentum*  
*Myrothecium verrucaria*  
*Penicillium iriense*  
*Phanerochaete chrysosporium*

Tabla No. 4.- Algunos Organismos Celulolíticos que degradan celulosa (70).

## IV.- HIDROLISIS ENZIMATICA DE LAS FIBRAS DE LIGNOCELULOSA

### IV.1.- CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO DE CELULASAS

Estudios en filtrados de cultivos de hongos han demostrado que existen tres tipos de enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa nativa; éstas son, endo- 1,4- $\beta$ -glucanasa (endo-1,4- $\beta$ -D glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.4 ), celobiohidrolasa (1,4- $\beta$ -D-celobiohidrolasa, EC 3.2.1.91 ) y  $\beta$ - glucosidasa (EC 3.2.1.21 ). Algunos sistemas de celulasas contienen glucohidrolasa (1,4- $\beta$ -D glucan-4- glucohidrolasa, EC 3.2.1.74 ), siendo éste un constituyente menor y la celobiohidrolasa es el mayor constituyente del sistema de celulasas, capaz de degradar celulosa altamente cristalina; a veces está ausente en algunos sistemas de celulasas (46).

La especificidad de esta enzima ha sido estudiada en una gran cantidad de sustratos y con un número grande de microorganismos, los cuales incluyen hongos, actinomicetos, mixobacterias y bacterias verdaderas; sin embargo, únicamente los hongos han llegado a excretar mayor cantidad de celulasas al medio y sorprendentemente estas enzimas son las que más se han estudiado.

### ADSORCION Y DESADSORCION DE LAS ENZIMAS

La adsorción de las enzimas en la superficie del sustrato es un requisito para la hidrólisis de la celulosa; esto debe estudiarse con detalle para que podamos entender la cinética de este sistema heterogéneo - celulosa- celulasa. Uno de los principales trabajos sobre la adsorción de celulasas en celulosa fue realizado por Halliwell (50), el reporta que, en fase acuosa, la enzima llega a estar relativamente libre, inmediatamente después de la mezcla de celulasas y el sustrato, porque la adsorción de la enzima por la celulosa depende de la cantidad inicial de celulasas presente y a la subsecuente incubación de la mezcla.

La celulosa nativa que llega a estar en contacto con la celulosa exhibe extensivos cambios en sus propiedades físicas como : Rompimiento transversal, baja en la tensión superficial y baja en el grado de polimerización. Estos cambios están asociados con la naturaleza inestable de los sustratos de celulosa y ocurren simultáneamente o sucesivamente. El más significativo fenómeno es la fragmentación y el hinchamiento de la celulosa nativa.

La adsorción de la proteína en solución es independiente del pH, pero fuertemente dependiente de la temperatura y del tipo de celulosa.

## E N Z I M A S

### EXO- 1,4 - $\beta$ - CELOBIOHIDROLASA ( $C_1$ )

Esta enzima también llamada  $C_1$  (17, 18, 35, 45, 46). La celobiohidrolasa es la enzima que tiene mayor afinidad por la celulosa y se reporta con gran capacidad de degradar la celulosa cristalina (aprox.80% de la celulosa presente en el residuo). Degrada la celulosa por rompimiento de unidades de celobiosa, pero no los extremos reductores; no ataca la celulosa substituída pero degrada la celulosa hinchada (por algún pretratamiento) a celooligosacáridos solubles y, fácilmente degrada fibras de algodón que tiene un alto grado de polimerización, con pocos extremos reductores que son accesibles a la enzima, aparentemente la degrada en forma muy lenta (59).

### ENDO-1,4- $\beta$ -D- GLUCANASA ( $C_x$ )

Llamada por algunos autores  $C_x$  (1,2,45,59) o CM- Celulasa, no ataca la celulosa cristalina, pero actúa en la región amorfa de las fibras de celulosa y de esta forma abre nuevas cadenas finales para ser atacadas por la celobiohidrolasa.

Reese and Mandels (1,2) han resumido el modo de acción de las endoglucanasas de la manera siguiente: Las endo-enzimas son glucanasas características que actúan azarosamente y son responsables de la hidrólisis de las cadenas de glucano de alto peso molecular. Este material tiene pocos extremos reductores y no se obtienen apreciables rangos de hidrólisis por exo-enzimas. Estas enzimas actúan preferentemente en cadenas largas y solo actúan en derivados de celulosa soluble. Al actuar, las endoglucanasas causan una rápida disminución en la viscosidad con un relativo incremento de extremos no reductores. Algunos autores (46,59) señalan que la acción no es extremadamente azarosa porque ambas ligaduras finales son afectadas y algunas veces también se afecta las ligaduras internas.

Estas endoglucanasas también pueden hidrolizar celodextrinas solubles, y la hidrólisis se incrementa cuando disminuye el grado de polimerización en el interior y en los límites del sustrato.



#### IV.2.- MODO DE ACCION DE LAS CELULASAS

La relativa facilidad con la cual cada particular sistema enzimático actúa en la celulosa depende de muchos factores incluyendo:

- 1) El reconocimiento obligatorio de la celulosa soluble, particularmente la unión de la enzima - molécula dentro de la celulosa.
- 2) La difusión y movilidad dentro de la matriz de celulosa sólida.
- 3) La relativa eficiencia de la hidrólisis en la región cristalina o la capacidad de convertir la región cristalina en región amorfa.
- 4) Las reacciones hidrolíticas necesarias para formar azúcares solubles.
- 5) Las características de la inhibición por producto de varias enzimas celulósicas.

Algunos autores llegan a suponer que las celulasas son un complejo enzimático multicomponente y la celulosa cristalina es hidrolizada por sinergismo de los componentes de las celulasas (26).

Recientes modelos para la hidrólisis enzimática de celulosa proponen un mecanismo en el cual, la endoglucanasa inicia el ataque y se forman cadenas con terminaciones no reducidas actuando por un mecanismo "end wise" igual que las celobiohidrolasas. Este mecanismo, sin embargo puede ser una explicación satisfactoria de los eventos que resultan de la solubilización de las áreas amorfas; esto no contempla los problemas estéricos que existen para las enzimas cuando atacan cadenas de celulosa altamente ordenadas, que tienen rigidez por las posiciones de la uniones de hidrógeno. Las enzimas que atacan estructuras semejantes exhiben altos grados de estereoespecificidad; la naturaleza y el grado de esta estereoespecificidad fue demostrado por Siegfert (59) señalando que, para el caso de celulasas de *T. koningii* y *T. reesei*, únicamente la fase de la celulosa en la celda unitaria definida como fase 101 (por índices de Miller, 58) es hidrolizada por la enzima.

Sin embargo, otros hongos pueden sintetizar enzimas capaces de atacar otras fases del cristalita y ésta puede ser una explicación de la incapacidad de las endoglucanasas para cooperar con celobiohidrolasas para solubilizar celulosa altamente ordenada (58). Existen otras explicaciones que son posibles para todas estas observaciones, pero todas son especulaciones; estas especulaciones incluyen las siguientes posibilidades:

- a) La endoglucanasa de hongos puede generar grupos finales, los cuales no están en la configuración correcta para ser atacados por celobiohidrola-



sa de otras fuentes(58), y b) únicamente estas celobiohidrolasas y endoglucanasas pueden formar un complejo en la fase de la celulosa cristalina y cooperar efectivamente(57).

Estas especulaciones son el resultado de algunos estudios que demuestran la importancia de las diferencias de adsorción en la celulosa(59). Recientes trabajos han demostrado que las endoglucanasas de *T.reesei* y la celobiohidrolasa de *T.koningii* solubilizan la celulosa altamente ordenada (60). La figura 13 nos muestra de que forma se da el efecto sinérgico entre las celobiohidrolasas.

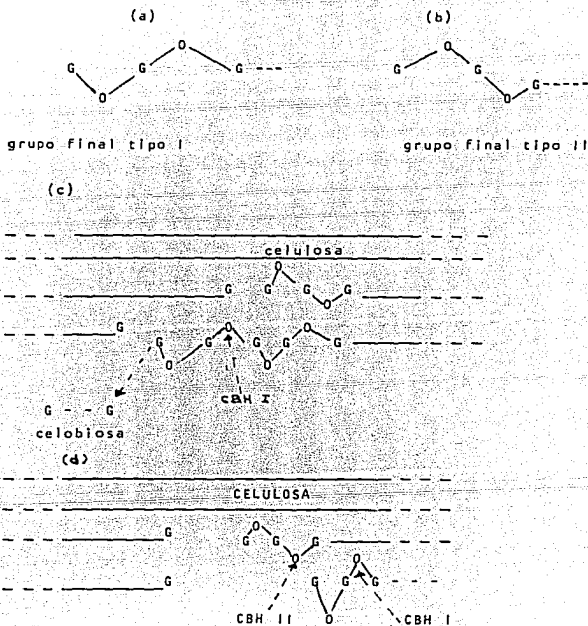


Figura 13- Modelo utilizado para explicar el sinergismo entre celobiohidrolasas (CBH) I y II de *P. funiculosum* en celulosa cristalina solubilizada. a y b.- dos tipos de extremos no reductores en el cristal de celulosa c.- muestra la celobiohidrolasa atacando y d.- CBH ataca las nuevas cadenas-tomado de Wood (58).

## V.- DEGRADACION MICROBIOLÓGICA DE LAS FIBRAS DE LIGNOCELULOSA

### V.1.- DEGRADACION ENZIMÁTICA SEMICONTINUA DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Se presta mucha atención a la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos, así como a la recuperación y reuso de las enzimas celolíticas, debido al costo de la enzima, que es más del 60% del costo total de la hidrólisis. La adsorción de la celulasa en la celulosa es un prerrequisito para la subsecuente reacción de hidrólisis, pero el mecanismo de adsorción de la enzima no está completamente entendido (71). La adsorción de la celulasa depende de las condiciones de reacción y las propiedades estructurales de las fibras.

Varios componentes del complejo de celulasas tiene diferentes afinidades de adsorción para sustratos celulósicos. Se ha demostrado que el mayor componente adsorbido en la celulosa ha sido la exo-B-glucanasa para un complejo de celulasas balanceado de *Trichoderma harzianum* (71), que se pasa a través de una simple columna de celulosa.

La recuperación de la celulasa adsorbida en residuos insolubles se ha reportado en varios trabajos, elucidando métodos para adsorción, como desajustar el pH para la celulasa adsorbida en celulosa cristalina. Se puede utilizar otro tipo de agentes para recuperar la enzima, como los granulos de DEAE-inorgánico o el uso de membranas de ultrafiltración, y para reutilizarla se ha utilizado un sistema de dos fases y la ultrafiltración.

Mitsuro & Vemura (71) desarrollaron un método para reciclar las enzimas y llevar una hidrólisis continua de lignocelulosa, utilizando un reactor de 10 l con una unidad de ultrafiltración, para recuperar y reutilizar la celulasa, utilizando el principio de adsorción y desadsorción de la celulasa en el curso de la hidrólisis. En la figura No. 9, Mitsuro(71) muestra el proceso efectuado para la hidrólisis continua de lignocelulosa.

La temperatura del reactor fue mantenida a 45°C y la mezcla de reacción fue continuamente agitada por un motor de pala horizontal (fig 14). La unidad de succión para la ultrafiltración fue operado intermitentemente y el residuo de lignina en la mezcla de reacción se filtró a través de una membrana por succión. Los productos de la hidrólisis fueron separados con un filtro y una membrana de ultrafiltración. La lignocelulosa se adicionó al reactor en intervalos apropiados, de acuerdo a la concentración del sustrato (5 W/V). La reacción se llevó a cabo por 10 días hasta que la actividad enzimática disminuyó.

Comparado con un sistema en lote con frascos de 500 ml, en el proceso semicontinuo, la enzima consumida fue menor en este proceso, para la cantidad de fibras reducidas, en orden de 2.08 Kg a 4.9 g y 19.5 gr. Los azúcares reductores, basado en los polisacáridos de lignocelulosa fueron de 48.5% en las fibras agrícolas y 82.2 % en la pulpa de madera. Se observó grandes sumas de oligosacáridos en los hidrolizados de la pulpa de madera y para completar la conversión de estos azúcares a monosacáridos se suplementó con B-glucosidasa y B-xilosidasa. La B-glucosidasa es generalmente la que se encuentra en más bajos niveles, porque esta enzima es específicamente inactivada bajo condiciones de acidez.

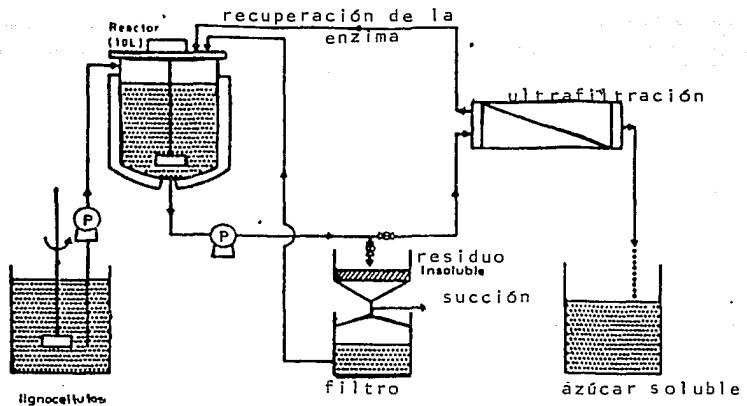


Figura No.14.- Diagrama que muestra el proceso para la hidrólisis continua de materiales lignocelulósicos (71).

## V.2.- FERMENTACION Y SACARIFICACION SIMULTANEA

El proceso de fermentación y sacarificación simultánea tiene como finalidad remover continuamente los azúcares por los microorganismos y reducir la inhibición por producto final del complejo enzimático (49).

Para el proceso de fermentación y sacarificación simultánea pueden estar combinada una variedad de caminos : Pretratamiento, 2) Producción enzimática y fermentación y 3) hidrólisis.

La fermentación se ha propuesto en dos sistemas : Semisólida (FSS) y fermentación sumergida; la sumergida normalmente, se utiliza para propagar el microorganismo y posteriormente inocular un sistema semisólido.

La extensión de la sacarificación está más afectada por la fuente de celulasas y la inhibición por producto (1); la glucosa producida por sacarificación enzimática, raramente excede una concentración de  $50 \text{ g l}^{-1}$ , por la inhibición de la glucosa sobre la actividad de la celulasa. Se han echo varios ensayos para acoplar la sacarificación con otras reacciones para remover glucosa; Isomerización a fructosa, fermentación y oxidación de glucosa a ácido glucónico, en orden de extender la hidrólisis.

Sengupta & Naskar(62) propagaron hongos comestibles (*Termitomyces clypeatusen*) en cultivo sumergido e inocular un sistema semisólido con un sustrato compuesto por residuos agrícolas, e inducir la autodigestión del sustrato. De esta forma el rendimiento de azúcares reductores es más del 63% a partir de bagazo de caña. Así mismo señala que la sacarificación enzimática de los desechos agrícolas es dependiente de la naturaleza del residuo agrícola, observa además una alta actividad enzimática de celulasas, xilanasas y amilasa. En la tabla No. 5 observamos los resultados obtenidos.

La sacarificación continua de celulosa pura también ha sido estudiada por Ghose (61) y Wrigth (38), que coinciden en utilizar el proceso de sacarificación y fermentación simultánea para producir etanol en un sistema semisólido, Ghose señala que el etanol producido por los microorganismos ejerce inhibición. Esta inhibición por producto se puede eliminar si continuamente se remueve el etanol formado. en el proceso de fermentación semisólida se tiene la ventaja de poder recuperar con facilidad el producto.

DESECHO	% DE CARBOHIDRATO (% de glucosa equivalente W/W )	AZUCAR REDUCTOR*	% DE SACARIFICACION(carbohidratos contenidos)	AZUCAR IDENTIFICADO EN EL EXTRACTO	% DE GLUCOSA EN EL EXTRACTO AUTODIGESTION
PAJA DE TRIGO	65	60	10	glucosa,xilosa	60-65 %
FIBRA DE COCO	43.7	13	3.3	glucosa,xilosa	60-65 %
BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR.	291.0	291	71.0	glucosa	85-90 %

\* mg de glucosa equivalente/ gr de desecho

Tabla No. 5.- Autodigestión por hongos comestibles en fermentación semisólida (FSS). Azúcares obtenidos en la sacarificación (62)

En la figura 15 se esquematiza, el proceso utilizado por Wriath (38) involucrando la sacarificación y fermentación simultánea.

En este proceso, el pretratamiento es indispensable para remover la lignina y la hemicelulosa, así como aumentar el área de superficie y abrir las estructuras para que se realice la hidrólisis enzimática; sin embargo, el grado de digestibilidad también es directamente proporcional a la degradación del xilano removido; cuando se ha hidrolizado más del 93% del xilano, se incrementa la digestión de la celulosa.

El sistema semisólido utilizado en este caso fue en un reactor en lote, operado a 37°C. con una carga enzimática de 7 IU/g de celulosa y un cultivo mixto de levaduras *B. clausenii* y *S. cerevisiae*. El sustrato fue pretratado con ácido sulfúrico 1.1 % por 10 minutos a 160°C.

Lignocelulosa

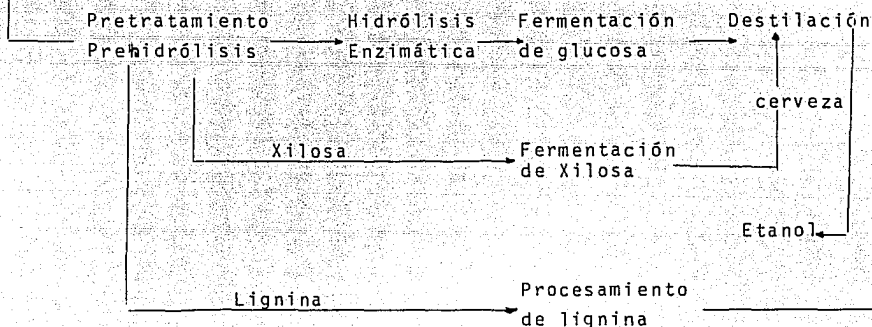


Figura 15- Diagrama que muestra el proceso utilizado para producir etanol a partir de residuos lignocelulósicos, involucrando la sacarificación y fermentación simultánea en un sistema semisólido (FSS), Wriath (38).

La hidrólisis de celulosa es llevada por un complejo de enzimas que tienen tres diferentes modos de acción (Figura 16), primero la endo-glucanasa se absorbe en la superficie de la celulosa sólida y ataca el interior del polímero, dando dos nuevas cadenas cortas, la siguiente, exo-glucanasa remueve unidades de celobiosas, pero no los extremos no reductores de la cadena de celulosa. La celobiosa producida por esta reacción -- puede acumularse en solución e inhibir fuertemente la actividad de la exo-glucanasa. Finalmente en la reacción en la fase líquida la beta-glucosidasa rompe unidades de celobiosas a glucosa. La acumulación de glucosa también inhibe la actividad de la beta-glucosidasa, causando la reconstrucción de la celobiosa (38), esto puede limitar la concentración del producto, el rendimiento y la velocidad de reacción.

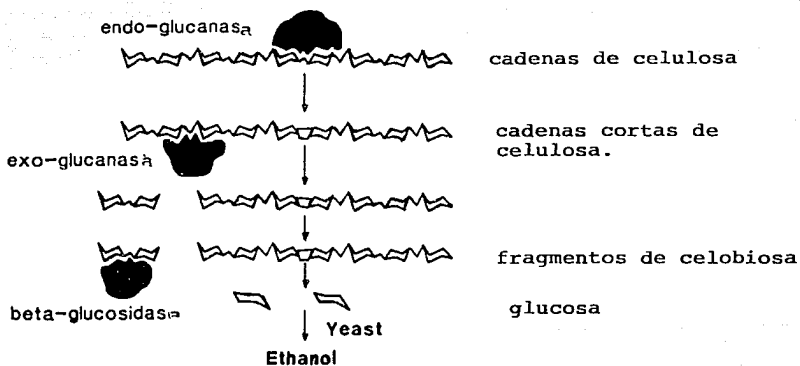


Figura 16.- Mecanismo de la hidrólisis enzimática de residuos celulósicos y fermentación semisólida (FSS), según Wrigth (38).

## COMPARACION DE FERMENTACION SEMISOLIDA CON LA SUMERGIDA.

Para entender la relación entre estos dos procesos, la comparación se debe realizar si se ha utilizado el mismo diseño. En la figura 17. Wrigth (38), nos muestra el costo de producción de etanol en un proceso en donde se separa la hidrólisis de la fermentación y se observa que el costo total por galon de etanol es de, \$7, 586.00 m.n. (\$ 2.66 U.S./gal), la producción enzimática abarca aproximadamente el 25 % del costo total, cerca de \$ 215.00 m.n. (\$ 0.65 U.S./ gal), un 15 % del costo total es para la fracción de celulosa y adicionalmente el otro 15 % es atribuido a la sección de hidrólisis en el reactor \$1240.00 m.n. (\$ 0.40 U.S./gal). El alto costo de la producción enzimática se debe al uso de una celulosa insoluble y a la inhibición de la actividad enzimática causada por la celobiosa y la glucosa.

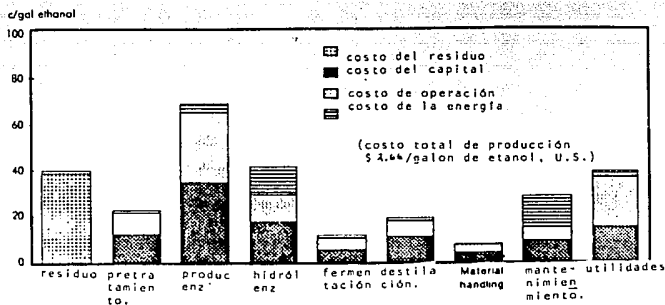


Figura 17.- Gráfica que nos muestra el costo de la producción de etanol en un proceso en donde se separa la hidrólisis de la fermentación. (38)

El hecho de remover continuamente la celobiosa formada, se refleja en un aumento en la producción de glucosa y consecuentemente de la producción de etanol. La más grande diferencia con este proceso y en donde se realiza la fermentación y sacarificación simultáneamente, es en el costo de la producción enzimática, que bajó de \$ 215.00 m.n. (\$ 0.65 U.S./gal) a \$ 303.00 m.n. (\$ 0.13 U.S./gal), debido a que se reduce la carga enzimática.



Esta es la mayor ventaja del proceso de fermentación y sacarificación simultánea, además el costo total de la producción de etanol se reduce a \$ 5450.00 m.n. (\$1.79 U.S/gal); esto también se debió a que se incrementa la concentración de etanol significativamente. En la figura 18 se observan los costos para la producción de etanol, en un proceso donde se utiliza la fermentación y sacarificación simultánea.

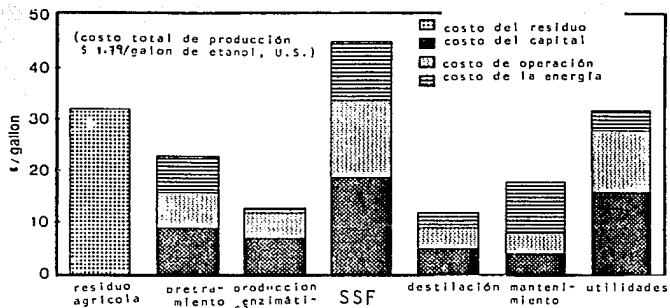


Figura 18. Costos del proceso para producir etanol, utilizando la sacarificación y fermentación simultáneamente (Wright, 38).

### V.3.- FERMENTACION Y SACARIFICACION ANAEROBIA

La gran mayoría de las investigaciones en bioingeniería están enfocados a la degradación aeróbica de los residuos lignocelulósicos empleando hongos termotolerantes, filamentosos y bacterias termófilas; sin embargo, la ruta de los organismos anaeróbicos es la misma, con el mismo potencial y con la ventaja de que no se requiere energía para la aereación.

La hidrólisis anaeróbica de la celulosa está acoplada a la producción de azúcares, ácidos, etanol, hidrógeno y  $\text{CO}_2$ . Debido a la interacción entre organismos celololíticos y bacterias acidogénicas; algunos de estos productos pueden también ser utilizados, si las condiciones son adecuadas. También se genera metano por metanógenos.

Está claro que la sacarificación y fermentación anaerobia es una alternativa para obtener los azúcares como; glucosa, celobiosa y otros oligosacáridos que están presentes. Algunos de estos metabolitos pueden utilizarse como sustrato para producir biomasa microbiana anaeróbica. Kato y colaboradores(29) sugieren utilizar cultivos puros de *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens*, para digerir la celulosa pretratada, también pueden crecer levaduras que producen alcohol y ácidos.

Se ha sugerido que el anaerobio termotolerante *Clostridium thermo cellum* puede sacarificar la celulosa y convertir los azúcares a etanol y ácido acético. Dependiendo del tipo de sustrato de que se trate, son los microorganismos anaeróbicos que sacarifican la lignocelulosa (considerando el tipo de pared celular es el rango de digestión).

Huatzapple & Humprey (30) proponen emplear cultivos mixtos en condiciones anaerobias y en un proceso de FSS, empleando un sustrato celulósico y levadura. Con este sistema, la glucosa removida por la levadura se refleja en un incremento de la hidrólisis de celobiosa a glucosa y la inhibición por producto se controla. Así se obtiene un incremento en la sacarificación y en la actividad enzimática. Ghose (61) señala que en este tipo de proceso se debe remover el etanol producido para evitar la inhibición por producto.

#### V.4.- PRODUCCION DE CELULASAS

La clave o el punto principal en los procesos de hidrólisis -- es la producción de enzimas hidrolíticas y los avances que se requieren en las investigaciones son para producir altas concentraciones de enzimas con una gran actividad.

Las celulasas son enzimas inducibles. Los inductores conocidos -- incluyen: Celulosa, derivados de celulosa, celobiosa cefarosa y lactosa. Ciertas celulosa es insoluble en solución acuosa. El mecanismo para inducir la biosíntesis de celulasas puede involucrar, una reacción de celulo -- sa con grandes cantidades de celulasas, producidas igualmente sin el in -- ductor para proveer celobiosa y así promover la inducción (1,2).

La efectividad del inductor depende del transporte del inductor -- dentro del microorganismo dentro del microorganismo, la celulosa, celo -- biosa y lactosa son efectivos a altas concentraciones. Pero el efecto del inductor en el componente individual de la celulosa no es muy claro (67).

La biosíntesis de celulasas está reprimida por la presencia en -- el medio de glucosa y otros azúcares simples. Igualmente con la presencia de inductores, la síntesis de celulasas puede ser fuertemente inhibida -- por glucosa (1). Se ha demostrado que la glucosa actúa como represor de -- la biosíntesis de todos los componentes de la celulosa.

La regulación y biosíntesis de las celulasas es muy compleja. La -- celulosa es inicialmente producida por grandes cantidades de celulosa hi -- drolizada a celobiosa, la cual sirve para inducir la biosíntesis de todos los componentes de las celulasas. La celobiosa sin embargo, cuando apare -- ce en el medio inhibe la actividad de la endo-glucanasa y la celobiohidro -- lasa. El producto final de la hidrólisis, la glucosa, es fácilmente meta -- bolizada por el organismo.

*Trichoderma reesei* es el microorganismo más utilizado para la -- producción de celulasas. La ventaja de utilizar *T. reesei* como fuente de -- celulasas, es que las cepas de este microorganismo producen celulasas con todos los componentes que se requieren para la hidrólisis completa de la -- celulosa cristalina, aunque tiene la desventaja de no metabolizar la ligu -- nina y tiene bajos niveles de B-glucosidasa (3).

Sin embargo, la búsqueda de nuevas y posibles fuentes de celulasas -- continúa. Se han reportado trabajos para producir celulasas con otros hon --

gos incluyendo; *Aspergillus foetidus*, *A. fumigatus* y *A. niger*. Las celulasas de este hongo tienen altas concentraciones de endo B- glucanasa y B-glucosidasa, pero baja en exo-B-glucosidasa y limitada capacidad para hidrolizar celulosa cristalina. La celulosa de *A. niger* se encuentra -- comercialmente disponible (3).

Las condiciones óptimas para la producción de celulasas y crecimiento de *T. reesei* son diferentes. La producción de la enzima es generalmente dividida en dos fases: Durante la fase de crecimiento, la biomasa celular es acumulada alcanzando una concentración óptima (150 gr/l) y las condiciones cambian para la producción de la enzima. La temperatura y el pH óptimo para el crecimiento y producción son: pH 4 , a una temperatura de 30°- 35°C y pH 3 con una temperatura de 27-28°C, respectivamente; la aereación es importante para ambos : Crecimiento celular y producción enzimática de *T. reesei* . Se cree que durante la fase de producción de la enzima, los factores que afectan la calidad y cantidad de los componentes de celulasas son; el oxígeno para la energía del metabolismo y el sustrato (1,67) .

La celulosa insoluble puede ser considerada como el mejor inductor para la producción del complejo de celulasas: el nivel de sustrato para la producción enzimática es, generalmente, del 1% (67).

Se han echo varios ensayos para aumentar la producción enzimática: Por ejemplo, aumentando la velocidad de agitación, utilizando otra -- fuente de carbono como lactosa en cultivo en lote y bajo permanente limitación del azúcar. Con estas condiciones es posible incrementar la producción, de 15-20 IU de enzima por gramo de sólido a 22 IU gr de sólido. Además, la lactosa es también un azúcar barato como el polímero de celulosa y posiblemente la celulosa a través de intermediarios hidrolizados puede ser normalmente, adicionada como inductor (2).

La producción de la enzima lleva aproximadamente 13 días y representa simplemente la más costosa sección de la planta. Rolz (56) señala -- que los mejores rendimientos se han obtenido en un sistema en lote, cuando el sustrato es adicionado lentamente al reactor, alcanzando una carga de biomasa de 150 gr/l ( aunque recientes investigaciones sobre producción enzimática se han hecho en fermentación continua, semi-continua y en lote,obteniendo altos rendimientos celulares y alta productividad enzimática, teniendo como sustrato altos niveles de celulosa (8).

También se ha propuesto la producción de celulasas en sistema semisólido (FSS), con un proceso reciclable en dos fases y ultrafiltración.--

La recuperación de la enzima en FSS es un método que minimiza el efecto del alto costo de la enzima y se elimina el riesgo de contaminación del biorreactor. Los sólidos restantes, el micelio y la celulosa no hidrolizada son recuperables y pueden utilizarse como alimento animal -- (forraje) o como combustible (49,52).

Los más importantes parámetros en la sección de hidrólisis como: rendimiento, concentración, duración de la hidrólisis y enzima requerida, están estrictamente interrelacionados, una vez que el pretratamiento y la naturaleza de la enzima son seleccionados. Los rendimientos son más altos en sistemas más diluidos, cuando la inhibición es minimizada y cuando se incrementa la carga de la enzima, se incrementa el rendimiento del producto (2). Sin embargo, el consumo de energía durante el mezclado, la producción de la enzima y la hidrólisis no ha sido debidamente discutidos en la literatura.

El mezclado, para realizar la transferencia de oxígeno durante la producción de la enzima, es uno de los mayores costos de todo el proceso (52).

El conocimiento sobre la producción anaeróbica de celulasas es relativamente pobre comparado con la producción aerobia. En la siguiente tabla (6), se muestra un resumen de las características y sus condiciones de producción del complejo enzimático en bacterias de rumen, comparado con otras especies anaerobias de *Clostridium sp.* Ciertas cepas de bacterias celulolíticas no pueden utilizar la hemicelulosa como fuente de energía (58).

#### V.5.- UTILIZACION DE LOS HIDROLIZADOS DE LIGNOCELULOSA

La biodegradación de un medio rico de pentosas (el primer estado hidrolizado en un proceso de hidrólisis ácida, o la hidrólisis por un pretratamiento antes de la hidrólisis enzimática) es realizada con los microorganismos capaces de utilizar pentosas directamente como: *Phachysolen tannophilus*, *Pichia stipa*, *Candida shehatae*, *Clostridium thermosaccharolyticum*. Así mismo se puede transformar xilosa a xilulosa utilizando xilulosa isomerasa con *Sacharomyces cerevisiae*.

MICROORGANISMO	LOCALIZACION Y TIPO	FORMACION E INHIBICION	OPTIMO pH y Tem.
	Mayor celulasa extracelular	la celulosa es constitutiva	pH 6.0- 6.8
	Endo- B- 1,4 glucanasa	celobiosa y una menor cantidad de glucosa inhiben la acción enzimática.	T 45°C
	Exo- B- 1,4 glucanasa		
Mezcla de bacterias de Rumen	Extracelular	Condiciones anaerobias, no es esencial para obtener máxima actividad o estabilidad.	pH 6.9 T 49° C
Esporas de Termófilos	Extracelular	Inducida por celulosa; celobiosa y glucosa inhiben la actividad y síntesis enzimática.	pH 6.5 T 49°C
	Endo B-1,4 glucanasa		
	Exo B-1,4 glucanasa		
Mésófilos, anaerobios	Extracelular	Celobiosa y glucosa inhiben la acción y síntesis enzimática.	pH 6.5 T 40°C
	Endo B-1,4 glucanasa		
	Exo B-1,4 glucanasa		

Tabla No. 6.- Celulasas producidas anaerobicamente (58).

Estos microorganismos pueden utilizar la xilosa, incluyendo -- *S. cerevisiae* para producir etanol con gran eficiencia (53), el mayor in conveniente es que se utiliza xilosa-isomerasa para isomerizar la xilosa a xilulosa y después convertirla a etanol. Con esto se elevaría el - costo de producción de etanol, por la gran cantidad de enzima requerida.

Se han realizado trabajos con otras cepas sobreproductoras de xilosa-isomerasa con DNA recombinante de *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

#### F U R F U R A L

El furfural es un bioproducto de la hidrólisis ácida de pentosanos y puede ser fácilmente recuperado y purificado. El furfural puede utilizarse como combustible en la planta de fermentación y la fase de - purificación puede eliminarse.

Los usos con del furfural son limitados: como solvente (especialmente en la industria del aceite), en la producción de material de plástico (urea-furfural) y para el tetrahidrofurano y alcohol furfural. Muchas investigaciones se han dirigido a los métodos para obtener productos como: butadieno, estireno, vinilfurano, ácido adípico, adiponitrilo, hexametilendiamina, 1-butanol, lubricantes y plásticos. De todos estos productos, algunos no tienen aplicación industrial porque resulta - muy costoso obtener el furfural. La aplicación inmediata, es la de obtener alcohol a gran escala y a su vez el furfural puede convertirse en fu rano por eliminación de un grupo aldehídico y en tetrahidrofurano, por - subsecuente hidrogenación catalítica (54).

Otros usos de hidrolizados de pentosas, son la producción de - polioles furánicos y de xilitol, a partir de xilosa. Estos pueden utilizarse como productos intermedios para la obtención de productos químicos finos y en la industria farmacéutica, en la formulación de nuevos poliu - retanos, presentando gran estabilidad termal.

#### UTILIZACION DE LA LIGNINA

Para la producción de etanol por lignocelulosa puede ser econo - micamente competitivo a nivel industrial. Muchos de los trabajos experi - mentales para la utilización química de la lignina han sido para la in - dustria de la pulpa y el papel. La lignina para procesos hidrúlicos pue - de ser diferente dependiendo del proceso que se escoja.

Jansher and Fietchter (54), mencionan muchas de las aplicaciones de la lignina entre ellas: la producción de vainillina y de aldehído, aunque no tienen gran aplicación comercial por el reducido mercado de estos productos comparado con el del etanol. La lignina puede utilizarse como materia prima para obtener fenol-formaldehído y urea-formaldehído, un tipo de resina y adhesivo que se utiliza en la producción de láminas de madera.

#### PRODUCCION DE XILITOL

Una alternativa que se puede llevar a cabo es la de reducir el polímero de celulosa por un sistema hecho para producir xilitol que resulta muy atractivo.

El xilitol posee ciertas propiedades que son de gran valor comercial; éste es empleado como edulcorante en algunos productos alimenticios. Clínicamente, el xilitol puede ser utilizado como agente dulcificante disponible para diabéticos; también puede utilizarse en casos de deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Las propiedades anticariogénicas ya han sido demostradas por algunos investigadores (72).

#### PRODUCCION DE ACETONA-BUTANOL-ETANOL (ABE)

La producción de acetona-butanol por conversión anaeróbica de azúcares es un proceso muy conocido. El mismo microorganismo *Clostridium acetobutylicum* puede utilizar la glucosa y la xilosa para producir estos productos; en Francia y U.S.A. ya se han montado los procesos. La concentración del solvente producido (acetona-butanol-etanol) no debe exceder los 16-18 g/l, porque se presenta un efecto inhibitorio(53). Pero por ingeniería genética se han obtenido cepas que pueden soportar 23-24 g/l; sin embargo, este valor es bajo para que sea comercialmente aceptado (55).

En todas las categorías metabólicas, el pH juega un papel muy importante en la naturaleza de los productos finales; en el proceso de obtener butanodiol, la baja del pH favorece la formación de productos neutros (etanodiol), lo cual en condiciones alcalinas, lleva a la acumulación de ácidos orgánicos. Esto es evidente en la formación de ABE; los pHs altos estimulan la producción de acetatos.



Posiblemente la producción de biopolímeros puede realizarse utilizando los hidrolizados obtenidos con otros microorganismos, pero no existe información al respecto.

## VI.- ALTERNATIVAS EN LA HIDROLISIS EFECTIVA DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS

A pesar de las dificultades que existen para obtener la hidrólisis total de los residuos agrícolas no debemos desalentarnos; la hidrólisis de la lignocelulosa y de la celulosa pura ha sido demostrada (67) y un 10% de los jarabes de glucosa los produce la industria de la pulpa y el papel, que sin duda, son los que más se han interesado en mejorar los procesos de hidrólisis con la idea de abaratar los costos de producción de papel (67).

Asímismo se han realizado muchos trabajos en relación al aprovechamiento de la lignocelulosa y aún así existen oportunidades de investigación de problemas que aún no han sido resueltos.

En este apartado se pretende abordar y discutir algunas alternativas que han surgido con la idea de aprovechar de alguna forma la lignocelulosa y lo hemos clasificado en diferentes categorías.

### VI.1.- CON RESPECTO A LOS MICROORGANISMOS

Uno de los puntos principales de un proceso de hidrólisis en la biotecnología es la de utilizar microorganismos que sean capaces de degradar el sustrato disponible y obtener productos de interés comercial. A este respecto, existe una gran gama de microorganismos que ya se han utilizado para degradar lignocelulosa y otros que aún se desconoce su potencial para ser utilizado en este campo.

#### MICROORGANISMOS LIGNOCELULOLITICOS

La cantidad de lignina producida por la fotosíntesis en nuestro planeta está balanceada por la cantidad de lignina que es descompuesta por los microorganismos. Este fenómeno juega un papel central en el ciclo del carbono y esto ha supuesto que la degradación de la lignina es el resultado de una acción cooperativa entre diferentes hongos, bacterias y microflora del suelo (54).

Entre los microorganismos con mayor utilidad a este respecto se encuentran los que atacan la madera, porque son capaces de degradar lignina, celulosa, y entre ellos, los hongos de la pudrición blanca que atacan consecutivamente la lignina y la celulosa. Estos hongos son basidiomicetos, hay alrededor de 1000 especies y únicamente se conocen alrededor de 25 especies que han sido examinados para la descomposición de la lignina. La degradación de la lignina por estos microorganismos involucra un proceso cooxidativo y, consecuentemente, la fuente de carbono es necesaria, como celulosa ó hemicelulosa.

Lamed & Bayer (70), consideran que los hongos de la pudrición blanca que a continuación se detallan, son microorganismos que deben estar bajo investigación;

*Fomes fomentarius*

*Gonoderma appalanatum*

*Phellinus igniarius*

*Amillaria mellea*

*Pleurotus ostreatus*

Las ligninasas producidas por estos hongos al parecer atacan residuos fenólicos por desmetilación y de esta forma separa los polímeros - que conforman la lignina.

Eriksson (8) ha utilizado para degradar la lignocelulosa cepas mutantes de hongos de la pudrición blanca, por ejemplo *Poliporus adustus*, que fue irradiada con luz ultravioleta, actuando sobre el gen que controla la síntesis de manasas, celulasas y xilanasas e incrementa la actividad y consecuentemente la hidrólisis.

La delignificación biológica parece una técnica prometedora, pero la baja eficiencia en la hidrólisis ha evitado que no se haya utilizado en un proceso a nivel industrial. La posibilidad, sin embargo, existe, aumentando la eficiencia a través de un proceso parcial físico o químico del sustrato previo al tratamiento biológico.

También se han considerado a las levaduras para degradar a la lignina *Trichosporium fermentans* que la depolimeriza, los actinomicetos *Streptomicetetea sp* y *Nocardia sp*, las bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, las térmofilas *Aeromonas* y algunas cepas de *Bacillus polymixia* y *Cellulomonas* (43).

## MICROORGANISMOS HEMICELULOLITICOS.

El otro mayor componente de los residuos lignocelulósicos es la hemicelulosa que está compuesta por heteropolímeros lineales y ramificados solubles (D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido-glucónico). Estos azúcares individuales pueden ser metilados o acetilados y ser utilizados para un proceso comercial (72).

La bioconversión de la hemicelulosa es considerablemente más complicada que la de celulosa por la presencia de una fracción de no-xilosa sustituida con el xilano. La completa degradación de la hemicelulosa requiere la acción de enzimas que hidrolizan sustituyentes; en suma, la actividad de la endo B-1,4-xilanasa y B-xilosidasa.

Existe poca cantidad de endo-xilanasa en sustratos hemicelulósicos; la acetil xilano esterasa y L-arabinofuranosidasa son enzimas -- que también actúan en la holocelulosa y han sido objeto de varios estudios, pero existe muy poca información al respecto. En preparaciones en crudo de xilanasas de *Trichoderma reesei* se ha observado la presencia de 4-o-metil glucuronidasa y más recientemente, se ha visto que esta enzima también presenta actividad en residuos lignocelulósicos.

*Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* son los microorganismos que pueden sintetizar la glucuronidasa. Jhonson y col. (42) también han demostrado la presencia de esta enzima en *Streptomyces* sp. y recientemente se observó que las especies de *Streptomyces olivochromogenes* y *Streptomyces flavogriseus* presenta enzimas con actividad extracelular -- del complejo enzimático xilanolítico, de tal modo que son capaces de liberar ácido ferúlico de los residuos lignocelulósicos.

Se ha observado que la especie *C. thermosaccharolyticum* y algunas cepas de *C. thermoceilum* producen también xilanasas con una actividad capaz de convertir los sustratos no hidrolizados en monómeros de pentosa *Bacillus macerans* puede utilizar la hemicelulosa y producir etanol, ácido acético, CO<sub>2</sub> y acetona a un pH aproximado de 6.

La bioconversión de xilosa por levaduras también ha sido extensivamente revisado y se ha observado que son capaces de metabolizar azúcares de pentosa vía oxidación-reducción. Barnett (73) señala que más de 400 especies no consumen carbohidratos vía aeróbica, *Candida* sp. y *Candida tropicalis* han demostrado su capacidad de convertir hemicelulosa a etanol (67).

Un organismo capaz de producir simultáneamente las enzimas xilanasas y celulasas puede ser la alternativa más prometedora para la hidrólisis de holocelulosa; así se ha identificado mutantes de *Cellulomonas* con actividad de ambas clases de enzimas (72).

Los termófilos semejantes a *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermosaccharolyticum* (del cual su status taxonómico ha sido cuestionado), *thermoanaerobacter ethaniculus* utilizan xilosa y otros azúcares de pentosa y rangos comparables de hexosa. Notablemente todas estas especies no son celulolíticas, pero pueden consumir la gran cantidad de carbohidratos presentes en la hemicelulosa.

#### MICROORGANISMOS CELULOLITICOS

A este respecto ya se ha hablado en apartados anteriores y los microorganismos que degradan la celulosa son muy diversos e incluyen: -- hongos, actinomicetos, bacterias y mixobacterias. Sin embargo, los hongos han sido los microorganismos que logran excretar una mayor cantidad de enzimas celulolíticas dentro del medio de cultivo y, consecuentemente, logran hidrolizar más sustratos (80).

La mayoría de los organismos celulolíticos tienen la capacidad de degradar la región amorfa de la celulosa o las áreas hidratadas, pero pocos tienen la capacidad de degradar celulosa nativa, que contiene grandes regiones cristalinas. Los hongos *Trichoderma viridae*, *T. reesei* (2), *T. koningii* (50), *Fusarium solani*, *Sporotrichum pulverulentum* y *Talaromyces emersonii* son los organismos que han demostrado su capacidad celulolítica sobre la celulosa nativa.

Halliwell (50) considera a *Clostridium thermo cellulum* (que libera un sistema enzimático muy eficiente) como el microorganismo más prometedor para ser utilizado en la biodegradación de la lignocelulosa. Este organismo convierte la celulosa heterofermentativa a ácido acético y ácido láctico, así como etanol. Sin embargo Parisi (46) propone utilizar cocultivos en orden de aprovechar las pentosas simultáneamente; el cocultivo no está libre de inconvenientes, como la formación de otros productos como; ácido acético, ácido láctico y ácido butírico.

También se ha propuesto utilizar cocultivos de *C. thermo cellulum* con *C. thermohydrosulfuricum*, el cual no produce ácido butírico, de igual forma *C. thermo cellulum* con *Thermoanaerobacter ethaniculus*.

Las bacterias celulolíticas del rumen *Ruminococcus albus* y *R. -- flavefaciens* también forman un complejo de enzimas que logran degradar eficientemente la celulosa nativa; Wood (80) considera que estas bacterias ofrecen una gran alternativa para la hidrólisis biológica de la celulosa.

#### MICROORGANISMOS TERMOFILOS

Los microorganismos termófilos se han conocido desde hace mucho tiempo, especialmente por la estabilidad de sus esporas; ello facilita el proceso de pasteurización, pudiéndose llevar el proceso en condiciones asépticas.

Para aplicaciones técnicas, los organismos pueden crecer fácilmente y son relativamente económicos, termófilos como *Bacilli* y *Clostridia* pueden crecer en una gran variedad de mono, oligo y polisacáridos incluyendo por supuesto materiales celulósicos, péptidos, ácidos orgánicos y alcoholes. Los no esporulativos *Thermus aquaticus*, *T. thermophilus* y algunas otras especies de *thermus*, han sido reportadas con capacidad de crecer en un gran número de sustratos y ciertas cepas de este género crecen bajo condiciones limitadas de oxígeno, porque la solubilidad del oxígeno se reduce a altas temperaturas. Asimismo, la transferencia del oxígeno disuelto también se limita; así, en estas condiciones el oxígeno es completamente consumido y por lo tanto conduce a utilizar termófilos anaerobios estrictos como; *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanothermus fervidus*, *theranaerobium brockii*, *T. ethanolicus* o *Thermobacteroides acetoethylicus*.

La utilización de organismos termófilos nos provee de muchas ventajas cuando el proceso es llevado a más de 50°C tales como:

- Se reduce la viscosidad del medio, lo cual incrementa la calidad del mezclado de la fase líquido-sólido (80)
- La productividad puede incrementarse, así como la velocidad de reacción (se incrementa en organismos y enzimas).
- Por las altas temperaturas de operación, los reactores difícilmente se contaminan. Este es un punto muy importante que se debe considerar --- cuando se desea llevar a cabo un proceso a mayor escala.
- Se obtienen rendimientos altos de enzimas, que proviene de obtener enzimas de gran estabilidad; esto es de particular significado para la recuperación enzimática del cultivo y para la purificación de la misma.
- Sin embargo la contaminación en las enzimas proteolíticas puede ser un-

problema serio si se recupera el producto a bajas temperaturas.

- Las enzimas termoestables generalmente son más resistentes a la desnaturización y al efecto de detergentes y solventes orgánicos.
- Y, en extremo, los termófilos no son patógenos.

Los más recientes estudios han sido relevantes y las espectativas para utilizar bacterias y hongos termófilos han sido sobreestimada para la producción de enzimas termoestables y quimiorresistentes, para la producción de lagunos productos químicos y combustible, así como para el tratamiento de aguas residuales y desechos sólidos como es el caso de la celulosa, Sin embargo, para el conocimiento básico del microorganismo se debe de trabajar a altas temperaturas.

Así también se han realizado diversos trabajos para entender las bases moleculares de los termófilos, en los que hoy en día es más claro su mecanismo de vida, el control genético y metabólico y no es principalmente diferente a la vida de los organismos mesobióticos (81). La biología molecular está interesada en encontrar las bases que expliquen porque la vida es posible a tan altas temperaturas y porque los constituyentes celulares siguen siendo estables a esas temperaturas. Estas preguntas, aún sin respuesta, muestran el potencial de los sistemas termófilos que tienen teóricamente propiedades muy interesantes con respecto a la biodegradación de la celulosa.

La diversidad de los microorganismos es menor cuando se incrementa la temperatura. Los eucariotes nunca han mostrado que puedan crecer alrededor de 62°C y los procariotes fotosintéticos nunca se les ha observado alrededor de los 74°C; la ocurrencia de *Bacilli* en habitats de altas temperaturas se ha mostrado por largo tiempo.

Muchos microorganismos termófilos tienen aplicación a gran escala por lo importante de sus características metabólicas; como es el caso de *Thermoanaerobacter*, *Thermobacteroides*, la producción de metano por *Methanobacter*. Otros metanogénicos termófilos; de los facultativos aerobios, únicamente la especie *Thiobacillus* tiene un uso potencial.

Así como el interés de la aplicación de los termófilos se incrementa nosotros consideramos que los programas de aislamiento de termófilos debe continuar por las grandes ventajas e utilidades que proveen y de las que ya hemos hecho mención.

Así también hemos considerado ciertas limitantes, como la utilización de equipo especial, y las propiedades biológicas del organismo-

que pueden dificultar el uso de termófilos; sin embargo, la biotecnología avanzada con el uso de la Ingeniería Genética puede desarrollar en muchos casos, por ejemplo la producción de enzimas, con la transferencia del gen deseable y expresarlo en el microorganismo mesófilo, los cuales resultan de interés para un proceso económicamente y técnicamente posible.

#### MICROORGANISMOS QUE CRECEN EN MEDIOS COMPLEJOS

Existe una gran diversidad de medios o desechos agrícolas en los cuales en la degradación microbiana intervienen diversos microorganismos, dependiendo del tipo de residuo de que se trate. Las levaduras son los primeros colonizadores de los residuos y después intervienen las bacterias, actinomicetos y los hongos. Esta secuencia de sucesión coincide con la actividad enzimática de los organismos durante el proceso de degradación. Las especies que juegan el papel más importante a este respecto generalmente son; los hongos termófilos y termotolerantes : *Aspergillus fumigatus*, *A. oryzae*, *Thermoascus auranticus* y *Penicillium* sp. que son algunos de los microorganismos que se han aislado de diversos desechos agrícolas como : bagazo de caña, granos, bagazo de fruta, tabaco, lana, algodón, fibra de lino y de la madera. El potencial que ofrecen estos microorganismos, que logran crecer en medios tan complejos, es muy prometedor debiéndose de explorar aun más el conocimiento de las características y propiedades de estos microorganismos para utilizar los residuos (75). En la siguiente figura (13) se muestran algunos microorganismos utilizados para la biodegradación de la celulosa

#### VI.1.1.- MUTACION E INGENIERIA GENETICA

El máximo rendimiento en un proceso, es esencial para desarrollar continuamente nuevas cepas. Esto involucra el uso de técnicas genéticas combinadas con un proceso de selección diseñadas para mejorar las técnicas de aislamiento. Así nuevas cepas son producidas y esto es necesario para modificar los procesos de fermentación que son llevados a cabo con un mayor potencial con las nuevas cepas.

El mejorar una cepa puede ser dirigida directamente sobre el producto de interés o a incrementar el rendimiento o el título; sin embargo, se pueden dar otros cambios indirectos concerniente a los procesos de operación como por ejemplo, desarrollar inóculo, utilización de sustrato y recuperación del producto. Este tipo de mejoramiento tiene su raíz en el aislamiento de cepas con engrandecimiento de la esporulación (en hongos) ó alteración de las características morfológicas que afectan el crecimiento en los fermentadores ó las propiedades de filtración del cultivo.

La mutagénesis y selección han sido las técnicas más utilizadas para introducir cambios benéficos dentro de microorganismos de importancia industrial.

La recombinación ofrece otra alternativa que lleva a la modificación genética y se puede llevar a cabo através de procesos reproductivos asexuales o sexuales.

La más reciente tecnología de moléculas de DNA- recombinante " in vitro " y la clonación de genes provee nuevas y más métodos directos para la manipulación del genoma de diversos microorganismos. Estas técnicas tienden a consumir demasiado tiempo y una labor muy intensiva. Esto ya ha sido evaluado y ámbos mutagenesis y recombinación figuran ahora como estrategias para mejorar cepas y hacerlas producir diversos productos, las más grandes compañías involucran estas tecnologías en los procesos de fermentación.

Un restringido número de microorganismos han sido descritos -- con capacidad de depolimerizar la celulosa cristalina. Los más extensos estudios han sido en términos de enzimología y genética molecular. En el hongo filamentoso imperfecto *Trichoderma reesei* el cual degrada la celulosa por secreción de tres diferentes enzimas extracelulares, estas enzimas obviamente son de importancia comercial porque puede utilizarse en la conversión de la celulosa a alcohol industrial. Consecuentemente un gran número de grupos de investigación se ha concentrado en elucidar la estructura y la función de estas enzimas utilizando la química de las proteínas y la tecnología de clonación de genes. Los resultados de estos estudios has sacado a la luz como las proteínas extracelulares se encuentran secuenciadas en los cromosomas de hongos y así los datos son utilizados para producir enzimas extracelulares activas.

Shoemaker y colaboradores (88) han clonado y secuenciado genes cromosomales de las enzimas celobiohidrolasas y endoglucanasas, y



co secuenteemente ahora se conoce que cada enzima consiste de un polipeptido de cadena simple de un peso de 37 a 76 kilodaltons y cada una es sintetizada como una proteina con un peptido N-terminal que se identifica como un espacio extracelular. Cada polipeptido es modificado por N-glicosilación ó O-glicosilación y por acción de proteasas durante el proceso de secreción.

Los datos obtenidos con las celulasas saca a luz un numero de preguntas fundamentales sobre la naturaleza y función de las enzimas fungales, primero, cual es la estructura de los genes, sitios para iniciar la transcripción y de inserción de intrones. Segundo, si las proteinas extracelulares pueden ser significativamente modificadas por síntesis de polipeptidos, y cual puede ser la ventaja de entender estas modificaciones, cual de ellas se relaciona con los procesos de secreción.

La capacidad biosintetica de los microorganismos necesita modificarse en orden de mejorar su potencialidad comercial. Los trabajos de las vias biosinteticas, de regulación metabolica y los mecanismos enzimaticos son esenciales.

Un énfasis en los trabajos de DNA recombinante puede ser altamente beneficioso para diseñar programas con la finalidad de mejorar las cepas microbianas. Sorprendentemente los avances en fragmentación específica, clonación y secuenciación de DNA han sido exitosos. Los experimentos de recombinación "in vitro" para construir cepas híbridas no han tenido resultados que tengan una inmediata aplicación, las cepas compatibles deben de examinarse con varias combinaciones de donador/aceptor, así mismo se hace necesario desarrollar bancos de genes que adicionalmente involucra el conocimiento genético de las especies microbianas.

Las bacterias celulolíticas del rumen ; *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, son las más importantes especies que pueden degradar celulosa cristalina y ya se ha hecho clonación molecular de celulasas de *R. albus* en *E. coli* ; estas bacterias muestran actividad de los tres tipos de celulasas, por lo tanto, son una fuente importante para obtener clones y recombinar en otros microorganismos.

Un factor limitante en muchas fermentaciones es el hecho de que el microorganismo que lleva la conversión es intolerante a las altas con-

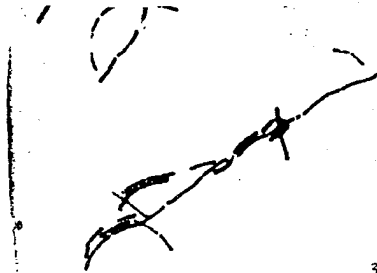
centraciones del solvente ( etanol, acetona, butanol etc.) o a los productos ácidos que son tóxicos y a un efecto inhibitorio, causando que el crecimiento y la fermentación se detengan.

La biotecnología ha minimizado este problema; de una forma, removiendo el solvente por extracción continua y por el otro, se ha dedicado la tarea de investigar la fisiología y la naturaleza molecular de la toxicidad y la tolerancia al producto. Así, se han producido microorganismos tolerantes por manipulación genética u optimizando la tolerancia por cambios en el medio o en las condiciones de fermentación. *Clostridium thermoceilum* y *C. thermohydrosulfuricum* son los microorganismos que aparentan tener mayor tolerancia al efecto del solvente; la expectativa es que las células se adapten a crecer en un medio con mayor cantidad de solvente, de igual forma que se adapta a crecer a altas temperaturas. Esto puede realizarse incrementando el radio de insaturación y saturación de las proteínas de la membrana. La idea es producir mutantes que tengan alteradas las proteínas de la membrana, porque se ha visto que estas proteínas son el blanco para futuras investigaciones en los mecanismos de tolerancia. Asimismo se ha logrado grandes avances con la ingeniería genética aplicada a este problema.

La tecnología genética puede también utilizarse para acelerar el desarrollo de una gran cantidad de biomasa para extracción y bioconversión, muchas generaciones tienen la necesidad de introducir algunas características deseables. La transferencia de rasgos entre diferentes especies es una gran ventaja para la biotecnología. El vector de DNA puede transferirse utilizando virus o bacterias.



2



3



4



5

Figura 19.- Algunos microorganismos utilizados para la biodegradación de la celulosa ; 1 y 2 bacterias metanogénas; *Methanococcus* sp y *Methanobrevibacter* sp.  
3. *Bacillus subtilis*, 5 y 6.- Fotografías de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* y *Amanita virosa*.

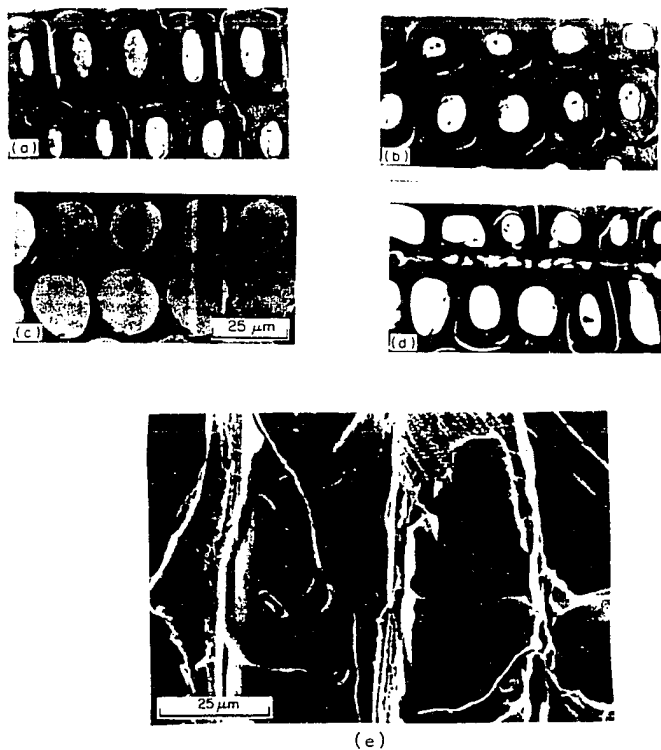


Figura 20.- Efecto de la degradación de la madera por hongos de la pudrición blanca (a) y de la pudrición café (b) y (d) Coriolus versicolor. (e) erosión producida por Phlebia radia en células de pino (Fotografías tomadas de Kent, 68)

## VI.2.- CON RESPECTO A LAS ENZIMAS

El complejo multienzimático de celulasas incluye tres tipos de enzimas, el mecanismo de acción y el sinergismo entre las enzimas no está del todo entendido. Un análisis del costo total para la producción de etanol a partir de celulosa, utilizando celulasas de *T. reesei* para hidrólisis enzimática, nos indica que incluye alrededor del 50% del costo de la producción total. Por ello es necesario recuperar las enzimas utilizadas en el proceso como una alternativa para disminuir el costo de producción. Las siguientes alternativas son algunas de las que se han propuesto para utilizar de una manera más eficiente la hidrólisis enzimática.

### ENZIMAS ESTABLES

El rápido crecimiento de la industria enzimática refleja la ventaja de utilizar enzimas en la catálisis industrial y la ventaja de utilizar enzimas estables de termófilos. Esto ha sido bien documentado; las propiedades que llevan a utilizar enzimas termoestables son que: las altas temperaturas les confieren cierta resistencia a los agentes desnaturalizantes, solventes y enzimas proteolíticas; en general, el crecimiento de los microorganismos a altas temperaturas hace más estable estas enzimas y las extracelulares aún son más estables que las intracelulares. Es por lo tanto, probable que puedan ser enzimas extracelulares la de los termófilos más extremos. Brager (83) aisló 6 termófilos de arqueobacterias y 9 eubacterias extremadamente termófilas (todas anaeróbicas) para la secreción de celulasas extracelulares, hemicelulasas (xilanasas), pectinasas, lipasa y proteasas. Estos microorganismos los aisló de aguas termales de Nueva Zelanda; sin embargo, considera que las arqueobacterias son la fuente de las enzimas más estables como; *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. solfataricus*, *Thermoproteus tenax*, *Thermococcus celer*, algunos otros microorganismos termófilos como: *C. thermocellum*, *C. stercorarius*, *C. thermocopriae*, que crecen alrededor de los 60- 65°C, tienen enzimas que presentan gran estabilidad; *C. thermocellum* ha sido llevado a los 90°C para probar su estabilidad (74) y se comprobó que la enzima es estable a 70°C por varios días, cuando se incubaba en presencia de sustrato.

### ENZIMAS INCANSABLES

Cuando nos referimos a este término, nos referimos a aquellas enzimas que no se saturan, en presencia de un sustrato, con la idea de recu-

perar y volver a reutilizarla, el máximo grado de recuperación de la enzima está determinado por la cantidad de enzima disponible en solución después de la hidrólisis. La actividad está basada en la formación de una gran cantidad de azúcares reductores a partir de varios sustratos; los productos de la hidrólisis nos indica que aún no se ha saturado el sistema enzimático y que sigue actuando sobre el sustrato. Esto tiene relación a su vez, con el grado de adsorción de la enzima y la máxima cantidad de celulasa que puede adsorberse, depende del método utilizado para medir la concentración de la enzima. Las celulasas de *Trichoderma reesei*; presentan un bajo grado de saturación que les permite reutilizarlas en hidrólisis continua.

Debemos prestar atención especial a este punto, donde la información que se requiere para encontrar las enzimas idoneas, que nos bajen el costo del proceso, por la reutilización de la enzima debe estar más disponible.

#### BALANCE EN EL SISTEMA

Los diversos estudios han demostrado que cada tipo de enzima que forma el complejo de celulasas consiste de una multiplicidad de formas con aparente doble función. La naturaleza y el origen de estos isocomponentes ha sido sujeto de mucha discusión en la literatura. Estas discusiones han habierto las posibilidades de que la multiplicidad de los isocomponentes pueda ser genéticamente determinada o causada por una proteólisis parcial (20) o por glicosilación diferencial de una cadena común de polipéptidos. Todas estas posibilidades pueden ser operadas.

Ha sido bien establecido que la celulosa cristalina es hidrolizada por sinergismo de todos los componentes que forman el complejo de celulasas; el sinergismo ha sido también objeto de muchas discusiones por los investigadores. Por ejemplo Wood (80), ha separado los componentes  $C_1$  y  $C_x$  de las celulasas de *T. koningii* en DEAE\_Sephadex. Cuando cada componente fue diluido a la cantidad inicial, la fracción que contiene la actividad de  $C_x$  retiene únicamente el 3% de la actividad de la celulasa del filtrado del cultivo original y el componente  $C_1$  únicamente el 4%, sin embargo, cuando las dos fracciones fueron recombinadas en sus proporciones originales el 92% de la celulasa del cultivo original fue recuperado. Esto nos demuestra claramente que la actividad del complejo de celulasas es dependiente de la acción sinérgica del componente  $C_1$  con los otros componentes.

Halliwel y colaboradores (50) también estudiarón el sinergismo de

las fracciones de cada enzima en el mismo microorganismo, limitándose cada uno de los componentes, pero cuando todos los componentes fueron recombinados en sus proporciones originales, mucha de la actividad del filtrado original fue recuperada.

Otros autores han realizado un análisis teórico de la degradación de los polisacáridos por las endo y exo enzimas haciendo varias combinaciones de enzimas. Han atraído un particular interés las enzimas de *T. viridis* a este respecto. Esta especie tiene diferentes exo y endo enzimas.

La idea de conocer o elucidar el balance en el sistema en cuanto a qué cantidad de cada enzima se requiere para efectuar una hidrólisis enzimática más eficiente, es muy importante. Esto nos ofrece alternativas respecto a la mejor utilización de las enzimas en la hidrólisis, pudiendo se probar combinaciones de enzimas provenientes de diferentes microorganismos, como en el caso de los co-cultivos. En los co-cultivos se está utilizando la capacidad de cada enzima para degradar cierta parte del sustrato; en este caso lo que pretendemos en una hidrólisis enzimática es conocer el "preparado" ideal de enzimas para degradar la lignocelulosa.

El problema que los investigadores generalmente llegan a enfrentar es: conocer " cual componente del complejo de celulasas " limita la sacarificación. Como ya he hemos mencionado cuando se purifica cada componente aisladamente muestran una actividad limitada sobre la celulosa cristalina y cuando se incrementan todos los componentes, no se incrementa en la misma proporción la hidrólisis (2).

Entonces se debe de ensayar las proporciones de cada componente para optimizar la hidrólisis enzimática. El balance adecuado nos llevará a encontrar el componente que limita la hidrólisis de la celulosa cristalina; esto también nos ayudaría a entender el efecto sinérgico del complejo de celulasas.

A su vez es deseable encontrar la estabilidad de cada componente enzimático a cambios de pH y a cambios de temperatura, esto surge con la idea de conocer la termoestabilidad de cada enzima, porque generalmente en condiciones de reactor, cuando se hidróliza lignocelulosa, se incrementa considerablemente la temperatura y cambia el pH.

Estandarizar las condiciones de actividad de cada enzima ha sido muy difícil porque la celulosa como sustrato no tiene un solo componente y las celulasas no son una sola enzima.

## NUEVAS ENZIMAS

Ya se ha hablado del complejo multienzimático, del cual están formadas las celulasas, pero a su vez se ha señalado la existencia de una familia de peroxidasa en la degradación de la lignina, estas enzimas son producidas por hongos de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* y se han crado grandes espectativas sobre la aplicación-potencial de estas enzimas en la biotecnología.

En algunos artículos, las llamadas ligninasas han sido caracterizadas como glucoproteínas, las cuales, en presencia de peróxido de hidrógeno oxidan a diferentes sustratos aromáticos por un mecanismo de transferencia de lectrones. A la luz de numerosasa investigaciones sobre el mecanismo de oxidación y las subsecuentes reacciones, no se duda que la lignin-peroxidasa juega un papel importante en la biodegradación de lignina y el material lignocelulósico. La producción de  $H_2O_2$  es esencial para la activación de estas enzimas (80).

También los hongos *Phlebia radiata*, *Coryolus versicolor*, *Panus-tigrinus* sp. y *Chrysosporium prulonosum*, producen lignin-peroxidasa (85); de *P. radiata* se ha separado y caracterizado 3 lignin-peroxidasa (EC.1.11.1) y una oxidasa. La oxidasa ha sido caracterizada y denominada Lacasa, benediol oxígeno-oxidoreductasa (EC. 1.10.3.2); similares productos fuerón detectados en cultivos de *P. chrysosporium*.

Algunas levaduras y hongos como *S. pulverolentum* (8) sintetizan celobiosa-oxidasa, *Trichoderma koningii* (58) y *T. reesei* (8) producen también la celobiosa-quinona oxidoreductasa, que también es producida por otro hongo, el termófilo *S. termofile* que filogenéticamente se asocia con los ascomicetos y algunas especies de hongos imperfectos.

La celobiosa - oxidasa de *S. pulverulentum* (8) es una hemoproteína que contiene un grupo FAD, que oxida celobiosa y altas concentraciones de celodextrinas con sus correspondiente ácido aniónico, pero utilizando oxígeno molecular. La celobiosa-quinona oxidoreductasa está involucrada en la degradación de la lignina y la celulosa. Oxida celobiosa (pero no celo-oligosacáridos) a celobiolactosa en presencia de un aceptor de electrones como radicales quinona o fenol. Producidos por la acción o degradación de la lignin-fenol oxidasa. Estas enzimas han sido objeto de interés por su participación en la degradación de la lignocelulosa y aún no salen a la luz, las propiedades y la actividad enzimática en la hidrólisis de los desechos agrícolas.



### VI.3.- CON RESPECTO A LOS PROCESOS

La reducción en el costo de las enzimas utilizadas para la sacarificación de la lignocelulosa ha sido identificada como la clave o el punto principal en el desarrollo económico de un proceso enzimático, basado en la conversión de la biomasa a alguna clase de energía; claramente significa reducir el costo, lo que puede lograrse al reciclar la enzima en la sacarificación después de la hidrólisis, sobre el residuo que no se ha digerido.

En la práctica, sin embargo, cuando la enzima satura el residuo que se hidroliza, drásticamente baja la actividad de la enzima. Esta baja en la actividad, tradicionalmente, se ha atribuido a la especificidad de la celulasa por la lignina y a la alta especificidad de la endoglucanasa y celobiohidrolasa por los enlaces de la celulosa; sin embargo, se ha reportado que la adsorción de la enzima es dependiente de la temperatura y el tipo de sustrato.

### PRODUCCION SEMICONTINUA

Muchas investigaciones se han enfocado a desarrollar métodos para realizar una producción continua de etanol a partir de residuos agrícolas. Una de las alternativas que han sido intensivamente estudiadas es el uso de un tipo de columna con células inmovilizadas, dentro del reactor; así se puede tener una alta densidad en el reactor con significativos rangos de dilución, resultando un incremento en la productividad del etanol, porque el problema de la inhibición por producto se minimiza y las altas concentraciones de etanol están sin contacto con la célula. Un número de diferentes técnicas de inmovilización han sido aplicadas en reactores para fermentaciones continuas en la producción de etanol (78).

Algunos trabajos con células inmovilizadas se han realizado con varias cepas de levaduras para biocatalisis y más recientemente la bacteria *Zymomonas mobilis* ha sido utilizada. Estas bacterias se han atrapado con alginatos de calcio, fibra de vidrio, resinas de intercambio y verniculita. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que es una levadura, también se han inmovilizado en fibra de vidrio.

Las desventajas de utilizar este tipo de proceso es que, la matriz en que se ha atrapado las células presentan resistencia a la difusión entre el medio de cultivo y el sustrato y que puede deteriorarse con el tiempo.

Axelsson (78) señala este proceso no puede aplicarse a gran escala, porque, en producción continua, se obtiene más fácilmente problemas por contaminación, por lo que debe buscarse un adecuado proceso para el escalamiento en un biorreactor. El diseño de un biorreactor requiere entender las características de la transferencia de masa y, sobre todo, la transferencia de masa de la célula especialmente con una alta densidad celular dentro del gel; así mismo, el autor (78) señala que la reducción en la velocidad de reacción es causada por la supersaturación de  $CO_2$  en la matriz, de tal forma que ya se han hecho biorreactores con variantes muy sofisticadas para minimizar el efecto del gas.

Una alternativa es la de utilizar un reactor horizontal con agitación intermitente y las células, inmovilizarlas en un gel de alginato de sodio. Davison (79) propone utilizar el lecho fluidizado con *Zimomonas mobilis*.

#### FERMENTACION Y SACARIFICACION SIMULTANEA.

Otra alternativa con respecto a los procesos es la fermentación y sacarificación simultanea, de lo cual ya se ha hablado en el cap. V.2 (pp.32); en este proceso se realiza la fermentación semisólida en la que se puede incrementar el rango de hidrólisis, el rendimiento y la concentración del producto, por la continua utilización del azúcar por las levaduras reduce la inhibición por producto final del complejo enzimático. Asimismo, en este proceso se pueden utilizar co-cultivos que involucran el crecimiento de dos o más organismos compatibles, donde uno es capaz de realizar celulólisis efectiva y el segundo (cepa adicional) es capaz de competir sucesivamente por los azúcares obtenidos, con lo que se puede obtener los azúcares deseables, los cuales predominan.

Utilizando este proceso, la celulosa es hidrolizada vía enzimática con un sistema de celulasas y el resultado son azúcares fermentables por microorganismos más adecuados (ejem. bacterias o levaduras). Una alternativa potencialmente más elegante, puede ser el de incorporar genéticamente las celulasas esenciales dentro de bacterias o levaduras que fermentan azúcares (79).

## FERMENTACION ANAEROBIA

Otra alternativa ha sido la fermentación anaerobia, que se ha considerado con un gran potencial para degradar celulosa, como lo es la fermentación aerobia, pero con la ventaja adicional de que se ahorra la energía requerida para la aereación.

La hidrólisis anaeróbica de la celulosa está acoplado, en la naturaleza, con la producción de azúcares, ácidos, etanol, hidrógeno y  $\text{CO}_2$ , debido a la interacción entre bacterias celulolíticas y acidogénicas; algunos de estos productos también pueden ser utilizados en las mismas condiciones para producir metano por metanógenos. Es claro que, la laternativa anaeróbica, otros productos como: glucosa, celobiosa y otros oligosacáridos pueden estar presentes y, estos metabolitos pueden ser utilizados como sustratos para la producción de biomasa aeróbica microbiana, por ejemplo, recientemente (81) se ha sugerido el uso de cultivos puros de *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens* para digerir celulosa. También el crecimiento de levaduras en alcohol y ácidos producidos y, finalmente, el crecimiento en  $\text{H}_2$  de bacterias y en  $\text{CO}_2$ , la biomasa producida puede ser una mezcla de bacterias y levaduras y finalmente se puede obtener metano.

Así, la fermentación anaeróbica puede ser aproximadamente similar a la aeróbica, empleando hongos termófilos, emplenado hongos termófilos o mesófilos en cultivo sumergido, como ya hemos mencionado la ventaja es la energía que se ahorra al no requerirse aereación y no es ta restringida por la dilución de los sólidos suspendidos en el sustrato.

Nos enfocamos, en casi todos los casos, a la producción de etanol, pero debemos añadir que el etanol sirve a su vez como material para sistetizar otros productos de interés comercial; etileno, butadieno, acetaldehido, acetona, butanodiol, isopropanol, Ac. fumárico, Ac. succínico y propiónico.

Pero debemos señalar que todas las alternativas requiere innovar tecnología o mejorar considerablemente la que se tiene al alcance; sin embargo, demostrar que un proceso es factible a gran escala, a veces, resulta costosísimo requiriendose a su vez un gasto de tiempo y los resultados no siempre son satisfactorios. Escalar, implica desarrollar investigaciones en Ingeniería de Procesos y equipo. Sin embargo, la investigación básica en hidrólisis de lignocelulosa aún tiene mucho

desarrollo.

#### VI.4.- CON RESPECTO AL SUSTRATO.

La naturaleza y estructura de la lignocelulosa ha sido tratada en numerosas publicaciones y lo fundamental es que la lignocelulosa está compuesta de celyosa, hemicelulosa y lignina; las cantidades de cada componente van de acuerdo al tipo de residuo que se trate.

La alta cristalinidad del material celulósico es el primero y fundamental obstáculo a la hidrólisis; también la lignina y la hemicelulosa limitan el ataque enzimático. En orden a llevar a cabo o hacer un proceso económicamente competitivo es necesario convertir cada uno de los componentes a productos deseables. Una de las alternativas que se han desarrollado para aprovechar mejor el sustrato lignocelulósico es el pretratamiento.

#### PRETRATAMIENTOS

Numerosos pretratamientos han sido desarrollados para incrementar la eficiencia de la sacarificación enzimática; estos pretratamientos utilizan métodos físicos, químicos y biológicos para remover la lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa (de esto ya se ha hablado en un apartado especial, capítulo III (pag. 15). Todos estos pretratamientos ha tenido resultados en el incremento de la hidrólisis de la celulosa, aunque, a veces los rendimientos de glucosa no han sido muy eficientes y pocos pretratamientos han sido desarrollados para llevar a cabo una conversión cuantitativa, de celulosa a glucosa, aunque todos los procesos sufren importantes inconvenientes, incluyendo el gasto tan alto de energía requerida, tóxicos y reactivos caros, generación de fracciones de productos tóxicos que intervienen en las subsecuentes reacciones de la fermentación (27).

A pesar de los inconvenientes se hace necesario el pretratamiento. Para remover la lignina y hemicelulosa y con esto aumentar la velocidad de reacción en la hidrólisis enzimática de la celulosa.

El pretratamiento con ácidos o hidrólisis ácida ha sido el más utilizado desde 1812 (46). Utilizando ácidos concentrados se tiene la ventaja de obtener altos rendimientos (virtualmente del 100%) pero sufre un gran consumo de ácido y el costo de recuperación es muy alto.

Diluir el ácido es extremadamente simple, pero se obtienen bajos rendimientos y se producen grandes sumas de productos de la degradación los cuales inhiben la actividad microbiana.

Sin embargo, cuando la hidrólisis de pentosas es rápida, se puede descomponer fácilmente a furfural. Así mismo el pretratamiento con ácidos diluido sobre la matriz de lignina y hemicelulosa, incrementa la velocidad de la hidrólisis de xilano a xilosa.

El pretratamiento físico llamado por explosión de vapor, descrito en el capítulo III.1 (pag. 17), ha sido el que más ha atraído la atención (46). La temperatura a la cual se lleva es aproximadamente a 125°C para la lignina, 165°C para el xilano y 234°C para la celulosa; sin embargo, recientes estudios (46) han mostrado que la explosión de vapor no necesariamente incrementa la hidrólisis y proponen un proceso denominado RASH (rapid Steam Hydrolysis) que consiste en la continua--extracción del gas y de los productos que se han solubilizado.

Los pretratamientos con solventes orgánicos han sido considerados como alternativa para remover la fracción de lignina. En este pretratamiento, la unión de la lignina con la hemicelulosa se rompe y ambas fracciones son solubilizadas cuando la celulosa es sólida. Muchas combinaciones de solventes, temperatura y tiempos de residencia se pueden realizar. La fracción orgánica es removida por evaporación y reciclaje en el reactor. En este tipo de pretratamiento la fase líquida --contiene xilosa.

Otro tipo de pretratamiento que ha sido propuesto y/o utilizado es emplear NaOH a una temperatura de 80°C; este proceso ha sido adoptado por la industria de la pulpa y el papel, aunque no se le ha encontrado una aplicación comercial, como en este caso.

Villet (87) señala que se hace necesario que varios pretratamientos para la lignocelulosa sean comparados con métodos enzimáticos como por ejemplo, con los métodos químicos y examinar el efecto de la catálisis redox puede ser provechoso. La eficiencia termodinámica del proceso de explosión de vapor también puede ser determinada y una evaluación económica de los pretratamientos (biológicos, químicos y físicos) basados en resultados experimentales se hace necesario.

Aunque el proceso de bioconversión de la celulosa, ha sido foco de mucha atención éste se considera como un pretratamiento que aún no ha rendido suficientes bioproductos.

## UTILIZACION DEL SUSTRATO

Después del pretratamiento en el primer estado hidrolizado se puede utilizar microorganismos capaces de utilizar las pentosas directamente como en el caso de, *Pauchysolen tannophilus*, *Plechia stipis*, *Candida shehatae*, *Clostridium thermosaccharolyticum*. Estudios recientes consideran a estas especies como alternativa para la utilización de la xilosa: los rendimientos en peso de xilosa son de aproximadamente 30% del peso original.

También se puede hacer una primera transformación de xilulosa a xilosa utilizando xilosa-isomerasa y *S. cerevisiae*, *P. thannhopilus*, en presencia de cantidades muy modestas de glucosa, degradan la glucosa rápidamente y la xilosa más lentamente, sin embargo, apreciables cantidades de xilitol son simultáneamente formadas en condiciones anaerobias (de 5 moléculas de xilosa ó 4 de xilitol se forma una de etanol).

Algunas levaduras convierten directamente la xilosa a etanol, incluyendo *S. cerevisiae*. Se mejora el proceso si se utiliza xilosa-isomerasa para isomerizar la xilosa a xilulosa y convertir la xilulosa a etanol.

El furfural es también un bioproducto de la hidrólisis ácida de pentosanos y puede ser fácilmente recuperado y purificado y se puede utilizar como combustible en la planta.

Asimismo el furfural puede utilizarse como solvente y producir materiales de plástico (urea-furfural) y tetrahidrofurano y alcohol-furfural. Se han hecho muchas investigaciones para obtener a partir del furfural otros productos como butadieno, estireno, vinilfuran, ácido adípico, adiponitrilo, hexametilén diamina, 1-butanol, lubricantes y plásticos, aunque no se ha tenido aplicación industrial por el costo tan alto del furfural.

Se puede utilizar los hidrolizados  $C_5$  para la producción de polioles. Los polioles furánicos son obtenidos de la xilosa por reacción en un medio hidro-alcohólico que activa los grupos metilénicos y pueden utilizarse ambos como productos intermedios para químicos finos y para la industria farmacéutica, en la formulación de nuevos poliuretanos que presentan estabilidad térmica.

Muchos de los trabajos experimentales para la utilización de la lignina han sido realizados con ligninasas, en la industria de la pulpa y el papel. La lignina, por un proceso hidrolítico, puede ser muy

diferente dependiendo del proceso que se lleve a cabo. Las mejores ligninas han sido obtenidas por los pretratamientos con explosión de vapor y con solventes orgánicos para la subsecuente hidrólisis enzimática (46).

La producción de proteína unicelular ya es del todo conocida y ha surgido como una alternativa en el aprovechamiento de los residuos agrícolas para alimentar ganado (13).

EN RESUMEN : Después de revisar las alternativas que han sido consideradas par aprovechar más íntegramente los residuos lignocelulósicos aun queda mucho por hacer; a continuación se enumeran lo que consideramos algunas necesidades de investigación par este respecto.

- 1.- Desarrollar cepas microbianas que hidrolicen celulosa y hemicelulosa.
- 2.- Mejorar las técnicas para seleccionar cepas microbianas que produzcan grandes cantidades de celulasas.
- 3.- Explorar otras especies celulolíticas
- 4.- Estudiar el mecanismo molecular de la producción de celulasas, la estabilización y activación, que es un requerimiento importante para un proceso eficiente.
- 5.- Elucidar el mecanismo de acción de xilanasas, para la conversión eficiente de la hemicelulosa a etanol. La hemicelulosa abarca aproximadamente el 25% del peso de la biomasa lignocelulósica.
- 6.- Investigar más a fondo la bioquímica y genética de los hongos fitopatógenos, para utilizarlos en la biodegradación de la lignocelulosa
- 7.- Desarrollar cepas con alta tolerancia a los solventes.
- 8.- Determinar en que momento de desarrollo de la biomasa puede ser cosechado el microorganismo, para una máxima producción de azúcares fermentables; esto es, en qué estado vegetativo o de crecimiento puede tener menos lignificación.
- 9.- Investigar la transferencia de genes para el crecimiento a altas temperaturas de termófilos obligados a mesófilos por métodos biotecnológicos.
- Estudiar el papel de los nucleótidos cíclicos en la represión catábolica. La manipulación genética es un método alternativo que puede

utilizarse para lograr una resistencia a la represión catabólica.

- 11.- Construir cepas híbridas microbianas que metabolicen pentosas, así como hexosas más eficientemente
- 12.- Desarrollar metodologías de Ingeniería química para el diseño y operación de nuevos biorreactores, que sean provistos de sustratos insolubles
- 13.- Examinar las preferencias de sustratos (fenómeno poliauxia) en la hidrólisis de desechos celulósicos.
- 14.- Diseñar un pretratamiento de bajo costo, que incremente los rendimientos de azúcares.
- 15.- También se hace necesario investigar e identificar los más prometedores microorganismos para la conversión de la lignina.
- 16.- Elucidar el mecanismo enzimático para la conversión de la lignina.
- 17.- Investigar la biogénesis de la lignina.
- 18.- Elucidar el sinergismo del complejo de celulasas. Tratar de encontrar los componentes idóneos para incrementar la hidrólisis.
- 19.- Estudiar la ecología microbiana de los procesos anaeróbicos.
- 20.- Investigar y optimizar la geometría de los fermentadores, incluyendo biorreactores con células inmovilizadas. Estudiar la adhesión microbiana a superficies sólidas.



## VII.- C O N C L U S I O N E S

La presente revisión, nos ha dado una idea sobre los trabajos que se han realizado en torno a mejorar la hidrólisis de la lignocelulosa. Las alternativas más prometedoras y la gran cantidad de microorganismos que pueden utilizar estos sustratos, pero aún así, el problema de utilizar al 100 % la lignocelulosa aún sigue superando cualquier intento que se ha hecho a este respecto, de tal forma que muchos investigadores ya han abandonado la idea de utilizar los residuos lignocelulósicos como sustrato y obtener algunos bioproductos de interés, además de que no se ha encontrado un proceso de hidrólisis económicamente factible.

Aun así, consideramos que no existe mejor alternativa que no sea la de integrar la diversidad de estudios, en donde se combinen los resultados obtenidos en investigación básica e investigación aplicada, esto involucra microorganismos, enzimas, pretratamientos y procesos, y así nacer trabajos integrando cada una de las áreas mencionadas.

Se ha observado que los productos que se pueden obtener mediante un proceso biotecnológico a partir de la lignocelulosa son muy diversos aunque destacan las enzimas celulolíticas que tienen aplicación comercial inmediata y consecuentemente están disponibles en el mercado, pero como la obtención es costosa, la hidrólisis enzimática también resulta de muy alto costo.

La biotecnología de hoy tiene la respuesta a la gran cantidad de preguntas que han surgido en torno a la utilidad de la lignocelulosa, -- que es considerada como un contaminante sólido llegando a ocupar un gran volumen, se deben considerar los procesos biotecnológicos de aplicación inmediata, para resolver el problema en un tiempo corto. Ya existe muchas soluciones a este respecto, como lo indica la gran cantidad de información obtenida para realizar esta revisión.

## VIII.- REFERENCIAS

- 1.- Mandels M. & Welber (1969). Production de Cellulases. Adv. Chem. Ser. 95, pp 391-414.
- 2.- Reese, Sing, Levison H. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viridae* as influenced by carbon sources and metals. J. Bacteriology 73, 485
- 3.- Mandels M., Hontz L. Strom N. (1971), J. Biotech. & Bioeng. No. 16
- 4.- Howell J. Distuck (1975). Kinetics of Solka flock cellulose hydrolysis by *T. reesei*. Biotech. & Bioeng. V. XVII, pp 873-893
- 5.- Wilke C. et al (1976). Biotech. & Bioeng., V. XVII, pp. 1313-1315
- 6.- Cysewsky G. & Wilke C. (1976) Biotech. & Bioeng. V. XVII, pp. 1292- 1313
- 7.- Karube I. & Shiger T. (1977). Hydrolysis of cellulose on a C. bead fluidized bed reactor. Biotech. & Bioeng. V. XIX, pp. 1183- 1192.
- 8.- Eriksson E. (1978). Enzyme mechanics involved in cellulase hydrolysis & fermentation of cellulose by *Trichoderma*. Biotech. & Bioeng. V. XXII, pp. 1037- 1053
- 9.- Lee D. & Donaldson (1985). Anaerobic digestion of cellulosic wastes. Biotech. & Bioeng Symp. No. 15, pp. 549-560
- 10.- Linko M. (1977). Evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic material. Adv. Biotech. & Bioeng. No. 5, Edit. Springer- Verlag
- 11.- Okasaki M., Young M. (1978). Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotech. & Bioeng. V. XX, pp. 637- 663
- 12.- Castanon M. & Wilke C. (1980). Adsorption & Recovery of cellulose during hydrolysis of NP. Biotech. & Bioeng. V. XXII, pp. 1037-1053
- 13.- De la Torre M. (1980). Producción de proteínas a partir de residuos lignocelulósicos Ciencia y Desarrollo. CONACYT, marzo No. 3
- 14.- Andreotti E. (1980). Laboratory experiment for high yield cellulose fermentation prepared for II International Course. Cum- Symp. on bioconversion and Biochemical Engineering. N.D. India. pp 1-18
- 15.- Cabello A., Conde J., Otero M. (1980). Prediction of degradability of sugar cellulosic residues by indirect methods. Biotech. & Bioeng. V. XXIII, pp. 2337- 2745
- 16.- Knappert D., Gretlein H., Alvini. (1980). Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotech. & Bioeng. V. XXIII pp. 2737- 2745
- 17.- Fan L., Lee Y., Beardmore D. (1980). Properties and mode of action of cellulases. Adv. Biochemical. Eng. V. 14, Springer. Verlag. pp. 159- 185

- 18 - Chang M. Chout T. (1981). Structure pretreatment and Hydrolysis of cellulose. Adv. Biochem. Eng. V. 17, Spring Verlag, pp. 16-45
- 19.- Neilson M., Keise R., Fizadet. (1982). Enhacement of hydrolysis by simultaneas attrition cellulosic substrates. Biotech. & Bioeng. V. XI, pp. 293- 304
- 20.- Mandels M. (1982). Cellulases. Anual reports on fermentation process. V. 5 Edit. George T. Tsao. Academic Press, cap. 2, pp. 35-78
- 21.- Dale & Moreira (1982) . A freeze- explosion technique for incresing cellulose hydrolysis. Fourth Symp. in Energy Production and Conservation. Published John W. & S.
- 22.- Chén L. & Shung (1982). Enzymatic hydrolysis of cellulose pretreated with Zn., Symp. of Biotech. in energy production & Conservation. J. Wiley & Sons.
- 23.- Dewey O. & Bokless S. (1982) Effect of compression milling of cellulose structure and enzymatic hydrolysis kinetics. Biotech. & Bioeng. V. XXIV, pp. 1047- 1067
- 24.- Puri N. (1983). Explosive pretreatment of lignocellulosic residues with high-pressure CO<sub>2</sub>. Forthe production on fermentation substrates. Biotech. Bioeng. V. XXV., pp. 3149- 3161.
- 25.- Strub A. & Chartier P. (1983). Enzymatic saccharification of cellulose & cellulosic materials. Energy from biomass. 2nd., E.C. Conference, pp. 1000- 1005
- 26.- Ladish M. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. Enzyme microb. technol., V. 5 No.2, pp. 82-102
- 27.- Gould M. (1983). Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic hydrolysis. Biotech. V. XXVI
- 28.- Godfrey T. and Reichelt. J. (1983). Industrial Enzymology, Edit. The Nature Press.
- 29.- Kato N., Tani Y. and Yamada H. (1983). Microbial utilization of methanol; Production of useful metabolites. Adv. Biotech. Process No.1, pp. 171- 202
- 30.- Huatzapple M. & Humprey C. (1984). The heat- model for enzymatic cellulose. Biotech. Bioeng. V. XXVIII.
- 31.- Wold S., Wilke C. & Blanch. (1984). Kinetics of the enz matic hydrolysis of cellulose Biotech. Bioeng. V. XXVI. pp. 221-230
- 32.- Malfait M. and Pennicks M. (1984). Ann. Microbiol. 135, V. 79
- 33.- Merchant R. (1986) Rev. Biotech. V. 4, No. 3 pp. 327- 399
- 34.- Bayat F., Makool T., Singh. (1986). Symp. No. 15 the Biotech. & Bioeng. Published. John Wiley and Sons INC.
- 35.- Deubald A. & Crawford (1987). Actives of cellulases during lignin solubilization by Streptomyces. Appl. Biotech. Microbial. No. 26, pp. 158-153
- 36.- Schafffeld G., Illanes A., Mejia G. (1987). Sequential acid and enzymatic hydrolysis of sugarbeet pulp. J. Chem. Technol. Biotech., V. 39, No. 3, pp. 161- 172

- 37.- Mohagheghi A. & Grohman K. (1988). Production of cellulase on mixtures of xilosa- and cellulose. *Appl. Biochem. Biotech.*, V. 19, pp. 263- 277
- 38.- Wriqth J. Wyman C. & Grohman. (1988). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. *Appl. Biotech. & Biochem.* V. 18. pp. 75- 88
- 39.- Duran M., Reyes C & Baeza (1988). Biomass photochemical XII. Chemical photochemical pretreatment of rice hull and its fungal degradation. *Biotech. & Bioeng.* V.32, pp. 564- 568.
- 40.- Gulati S. (1988) , *Biol. wastewater*. V.25, No. 4, pp. 309-313
- 41.- Eley M. & Cliford H. (1988). Treatment of municipal solid wastes by steam recycling and biomass utilization. *Appl. Biotech. & Bioeng.* V. 32. pp. 564- 568.
- 42.- Johnson K., Silva M., Mackenzie. & Schneider (1988). Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Appl. Biochem. & Biotech.* V. 20/ 21, pp. 245- 253.
- 43.- Fan L., Young H. & Gharpuray (1989). The nature of lignocellulosic and their pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. & Biotech.* V. 35, pp. 157- 187.
- 44.- Grohman K., Dale D. & Shroeder ( 1980). The role of ester groups in resistance of plant cell wall, polysaccharides to enymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. & Bioeng.* V. 19, pp 263- 277.
- 45.- Janshekar H. and Fietcher. (1989). Lignin; biosynthesis, aplication and degradation. *Adv. Biochem. & Biotech.* V. 27. pp. 101- 139.
- 46.- Parisi F. (1989). Advances in lignocellulosic hydrolysis and the utilization of the hydrolizates. *Adv. Biochem Eng. & Biotech.*, V. 36. pp. 53- 84.
- 47.- Schal & Brewil C. (1989). Assesment of pretreatment condition to obtain fast complet hydrolysis on high substrate. *Appl. Biochem. Eng. & Biotech.* V. 38. pp.53-84.
- 48.- Kadam S. & Demain (1989). Addition of clonrd. betha glucosidase enhances the degradation of cristalline cellulose by the Clostridium t. cellulase complex. *Biochem. Biophys. RES. Commun.* V. 161. No.2, pp 706- 711.
- 49.- Wilke C. (1975). Proc. of the VIIth Cellulose conf. 1. Wood chemicals a future- challenge T.E., Timell (ed.). N.Y. : Interscience p. 175
- 50.- Halliwell G., Griffin M. (1973). Bioconversion of cellulosic substrates into energy chemicals and microbial protein. *J. Biochem.* No. 135. pp. 587- 592
- 51.- Liu T. H. King K. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* V. III. pp. 439- 445.
- 52.- Gallo B. J (1981). Cellulase producing by microorganism. U.S. Patent No. 4, pp. 275- 163.
- 53.- Graba S., Besic S., Ban S. (1987) In.; *Proceding of the 4th European Congress on Biotech.* V. 27.Elsevier, Amsterdam, V. 3 , pp. 393- 402
- 54.- Owen P., Ward, Young ( 1989); *Enzymatic degradation of cell wall and related plant-polysaccharides.* CRC. *Critical Reviews in Biotech.* V. 8 Issue 4. pp. 237- 274
- 55.- Fick M. , Engasser G. (1987); *Proceding of the 4th European Congress on Biotech.* Elsevier, Amsterdam. V. 3. pp. 509- 516.

- 56.- Rolz C. (1982). Microbial Biomass from renewables. Review of alternatives. Adv. in Biochemical Eng. V. XXI. pp. 1-53
- 57.- Ward P., Moo Y. (1989). Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides, CRC, Critical reviews in Biotechnology. V.8, 14. pp. 237- 274
- 58.- Wood T. (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. Biochem. society transactions. V. 13, pp. 401- 410
- 59.- Hannele K. & Siegler J. (1985). Regulation of cellulase biosynthesis and secretion-- in fungi. Biochem. Society transactions , V. 13, pp. 411- 414.
- 60.- Mandels M. (1985). Application of cellulases. Biochem. Society transactions . V. 13 pp. 414-416
- 61.- Ghose T. & Roychoudhury (1984). Simultaneous saccharification and fermentation SFF of lignocellulosic to ethanol under vacuum cycling on step feeding. Biotech. & Bioeng. V. XXVI, pp. 377- 381
- 62.- Sengupta A. & Naskar (1984). Saccharification of untreated agrowastes during mycelial growth of mushroom Termitomyces clypeatus on solid beds. Biotech. Bioeng. V. XXVI, pp. 188-190
- 63.- Coughlan M. & Mehra R. (1986). Saccharification of agricultural residues by combined cellulolytic and pectinolytic enzyme systems. Biotech. & Bioeng. Symp. No. 15, John Wiley & sons.
- 64.- Ryu D., Andreotti R., Mandels M. (1979). Studies on quantitative physiology of T. reesei with two stage continuous culture for cellulase production. Biotech. & Bioeng. V. 21, pp. 1887- 1903.
- 65.- Andreotti R., Madeiros J., Roche & Mandels M. (1981). Proceeding second bioconversion symp. III, N. Delhi, March 1980
- 66.- Menezes J. & Menezes C. (1983). Utilización de celulasas para la sacarificación de productos agrícolas- Edit. Biotecnología de Enzimas, Carlos Huitron. UNAM, Mex .
- 67.- Tsao G. & Chang L. (1978). Cellulose and Hemicellulose Technology. Annual reports on fermentation process, V. 2 D. Perlman (Ed.) pp. 297 - 322
- 68.- Kent K (1978) Degradation and conversion of lignocellulose. Annual reports on fermentation process V.2. D. Perlman (Ed), pp. 267-292
- 69.- Schaffner & Toledo T. (1991). Cellulase production by Trichoderma reesei when culture xilosa based media supplement with sorbosa. Biotechnology & Bioeng. V. 37. -- pp. 12- 16
- 70.- Lamed R. & Bayer E. (1988) Cellulosome of Clostridium thermocellum, adv. Appl. Microbiol. V. 33, Academic press Inc. pp. 2-41
- 71.- Mizuro I., Venura S., Hayashi N. & Shimizu K. (1991). Semicontinuous enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. Biotech. & Bioeng. V. 37, pp. 948- 945
- 72.- Magee R. & Kosarick N. (1985). Bioconversion of hemicellulose. Adv. in Biochem. Eng. / Biotech. V. 37, pp. 948- 945
- 73.- Barnett J.A. (1976), Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. Eng.
- 74.- Lynd L. (1985). Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria. Critical evaluation of potencial and Review, Adv. Biochem. Eng./ Biotech. V.38, pp. 1-49.

- 75.- Shekar S. (1989). Economic importance of thermophilus fungi. Appl. Microbiol. Biotech. V. 31, pp. 1-10
- 76.- Carreira L., Wiegel J. & Ljung L. (1983). Biotech. Bioeng. Symp. No. 13; 1983
- 77.- Tasumoto K., Baker O., Tucker O. (1988). Digestion on pretreated aspen substrates. Appl. Biochem. & Biotech. V. 18; Aug. pp. 159-174
- 78.- Axelsson A. (1988). Experimental studies of immobilized- yeast. Appl. Biochem. & Biotech. V. 18; Aug. pp. 91- 108
- 79.- Davison B. & Scott (1988). Operability and feasibility of ethanol-- production by immobilized Zymomonas mobilis. Appl. Biochem. Bioeng. V. 18; Aug. pp. 19-34
- 80.- Wood, T. & McCrae (1979). Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. In Hydrolysis of cellulose; Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis, Adv. in Chem. Series, V. 181 pp. 181- 209
- 81.- Bernhard S. (1983). Biotechnology of thermophilic bacteria growth, products and application. Adv. Biochem. Eng./ Biotech. V. 28; pp. 70- 131
- 82.- Palmer R. (1986). Genetics and Biochemistry of Clostridium, relevant to development of fermentation process. Adv. Appl. Microbiol. V.13
- 83.- Brager J. M. & Daniel R. (1989). Very stable enzyme from extremely-- thermophilic archaeobacteria and eubacteria; Appl. Microbiol. Biotech. V. 32, pp. 223- 234.
- 84.- Kern H. ( 1989). Improvement in lignin peroxidase production. Appl. Microbiol. Biotech. V. 32, pp. 223- 234
- 85.- Kantelin A. & Hatakka A. (1989). Lignin peroxidase and laccase production by P. radiata. Appl. Microbiol. Biotech. V. 31 pp. 234- 239.
- 86.- Stozky G. & Babiech H. (1986). Survival and genetic transfer by genetically engineered bacterial in natural environments. Adv. Appl. Microbiol. V. 31, pp. 93- 136
- 87.- Villet R. (1986). Biotechnological research and development for biomass conversion to chemical and fuels. Symp. Energy and Biomass. -- pp. 97- 106
- 88.- Shoemaker S., Schweickert V. Ladier M. (1983). Molecular cloning of exocellobiohidrolase I derived from Trichoderma reesei L 27. Biotechnology No. 1, pp. 691- 696
- 89.- Essau K. (1986). Anatomía Vegetal. Ed. Omega, Barcelona España.