



TRABAJO FIN DE GRADO

CELULOSOMA:

**IMPLICACIONES EN LA BIORREFINERÍA
DEL FUTURO**

AUTOR: ALEJANDRA DE LOS SANTOS BACARIZA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA, 2016



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

CELULOSOMA: IMPLICACIONES EN LA BIORREFINERÍA DEL FUTURO

AUTOR: ALEJANDRA DE LOS
SANTOS BACARIZA

FACULTAD DE FARMACIA,

7 JULIO 2016

PROFESOR: Dr. JUAN DIONISIO
BAUTISTA PALOMAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Y BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TRABAJO BIBLIOGRÁFICO

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. METODOLOGÍA.....	7
3. ANÁLISIS DEL ESTADO DEL ARTE.....	9
3.1. DESCRIPCIÓN MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	9
3.1.1. CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA.....	9
3.1.2. DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA.....	11
3.1.2.1. CELULASAS EXTRACELULARES.....	12
3.1.2.2. CELULOSOMA.....	13
3.1.3. ETAPAS DE LA CONVERSIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	15
3.1.3.1. PRETRATAMIENTO.....	16
3.1.3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	19
3.1.3.3. FERMENTACIÓN.....	20
4. ÚLTIMAS TENDENCIAS.....	20
4.1. ABORDAJES LLEVADOS A CABO A FECHA 2015.....	20
4.1.1.1. HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SEPARADAS (HFS).....	20
4.1.1.2. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SFS).....	21
4.1.1.3. SACARIFICACIÓN Y COFERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SCFS).....	21
4.1.1.4. BIOPROCESAMIENTO CONSOLIDADO (BPC).....	21
4.2. ¿QUÉ SE ESTÁ INTENTANDO HACER PARA MEJORAR?.....	23
4.2.1. APROVECHAMIENTO DE LOS SUSTRATOS.....	23
4.2.2. AVANCES EN BPC.....	24
4.2.3. CELULOSOMAS DE DISEÑO.....	24
4.2.4. CÓCTELES ENZIMÁTICOS.....	25
4.2.5. DISEÑO RACIONAL DE CELULASAS.....	26
4.2.6. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE GENES DE CELULOSAS DE LEVADURAS.....	27
4.2.7. EVOLUCIÓN DIRIGIDA.....	27
4.2.8. METAGENÓMICA.....	28
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

El bioetanol se clasifica en tres tipos de acuerdo con la biomasa utilizada. De primera generación, a partir de caña de azúcar o de almidón. Presenta la desventaja de competir con el uso de éstos como alimentos y por las tierras de cultivo. De segunda generación, a partir de biomasa lignocelulósica. Tiene la desventaja de requerir pretratamiento. De tercera generación, a partir de macro algas. Aún está en fase experimental, por lo que no son aplicables en escala industrial hasta el momento, además de no ser rentable. En el presente trabajo nos centraremos en la síntesis de bioetanol de segunda generación, exponiendo pues los distintos pretratamientos existentes, con sus ventajas y desventajas, y los nuevos abordajes que en un futuro próximo estarán en el mercado, con el fin de optimizar este proceso tanto en rendimiento como en coste.

PALABRAS CLAVE: celulosoma, material lignocelulósico, bioetanol, lignocelulosa, pretratamiento.

ABSTRACT

Bioethanol is classified into three types according to the biomass used. First generation from sugar cane or starch. It has the disadvantage of competing with the use of these as food and farmland. Second generation from lignocellulosic biomass. It has the disadvantage of requiring pretreatment. Third generation, from macro algae. It is still experimental, so they are not applicable on an industrial scale so far, besides not being profitable. In this paper we focus on the synthesis of second generation bioethanol, exposing for the various existing pretreatments, with its advantages and disadvantages and new approaches in the near future will be on the market in order to optimize this process both performance and cost.

KEYWORDS: celulosome, lignocellulosic material, bioethanol, lignocellulose, pretreatments.

1. INTRODUCCIÓN

Podríamos decir que la preocupación por el medio ambiente y el cambio climático global se han convertido en un tema de actualidad a nivel internacional. Los factores económicos y geopolíticos como la demanda mundial de energía con fuentes de petróleo, su alto precio y la inestabilidad de la oferta, han jugado un gran papel en la reactivación del interés en los recursos renovables.

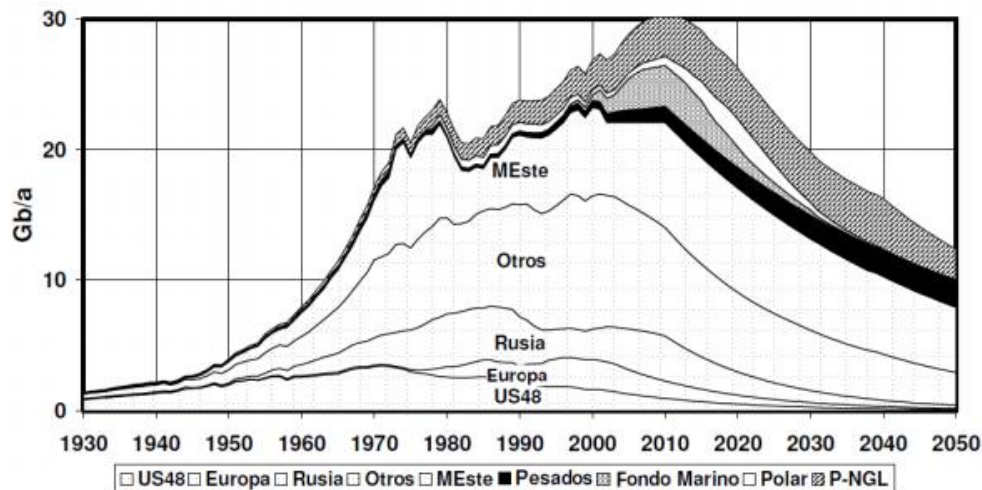


Figura 1. Podemos observar cómo algunos países ya han alcanzado el máximo de su generación de petróleo, los cuales son preocupantes datos e incitan a una conciliación inminente (gráfico tomado de Cortés Sordo, 2013).

El material lignocelulósico es el más abundante de los recursos renovables disponibles en la Tierra. Otro punto que hace que despierte el interés es el hecho de que sea la única fuente energética primaria interna, sostenible y renovable para la producción de combustibles líquidos para el transporte. Es por ello que sea la materia prima más atractiva para la producción de biofuels de segunda generación. La tecnología actual del proceso implica tres operaciones unitarias: pretratamiento del material lignocelulósico, hidrólisis enzimática y fermentación de los azúcares hasta biofuels. Por tanto el esquema a seguir es el siguiente:



Analizando la bibliografía existente, uno observa que en la conversión de material lignocelulósico en azúcares fermentables se obtiene un insignificante rendimiento, por lo que no es económicamente viable. Sólo el pretratamiento del material lignocelulósico representa un 40% del coste total de todo el proceso.

Diversas son las causas de este problema:

1. Compleja degradación por parte de los sistemas celulolíticos del polímero celulosa por la presencia de fibras cristalinas con enlaces de hidrógeno.
2. Poco conocimiento de estos sistemas implicados en el proceso de bioconversión del material lignocelulósico en azúcares fermentables.
3. Mal aprovechamiento del material lignocelulósico utilizado.
4. Variabilidad del proceso en los diversos microorganismos, y en las diversas estaciones del año.
5. Naturaleza heterogénea y recalcitrante de los residuos de celulosa.

Entre las alternativas propuestas para hacer esta línea de resolución rentable encontramos:

1. Aumento de la eficiencia hidrolítica del material lignocelulósico en azúcares fermentables por la vía enzimática, ya que en comparación con la hidrólisis química parece que ofrece un mayor alcance para el avance en el futuro.
2. Reutilización de subproductos generados en la hidrólisis en biomateriales de alto valor añadido: nanocelulosa.

La aparición del nuevo concepto "celulosoma", complejo multienzimático formado por varios tipos de celulasas que actúan sinérgicamente para catalizar la hidrólisis de la celulosa, se ha apuntado como una posible vía para solucionar este problema. Es por ello que éste va a ser nuestro objeto de estudio.

Este complejo lo podemos encontrar en bacterias anaeróbicas tales como Clostridium. Existe evidencia de que la acción sinérgica de las enzimas celulosomales da lugar a una mayor eficiencia en la degradación de nuestro sustrato. Además este microorganismo ofrece la ventaja de que se puede combinar la producción de celulasas, la hidrólisis y la fermentación en un único biorreactor, es decir permite la sacarificación y fermentación simultánea. A este proceso se le denomina bioprocesamiento consolidado (BPC).

En el presente trabajo pretendemos revisar el estado del arte de los procedimientos seguidos para aumentar la eficiencia hidrolítica del material lignocelulósico.

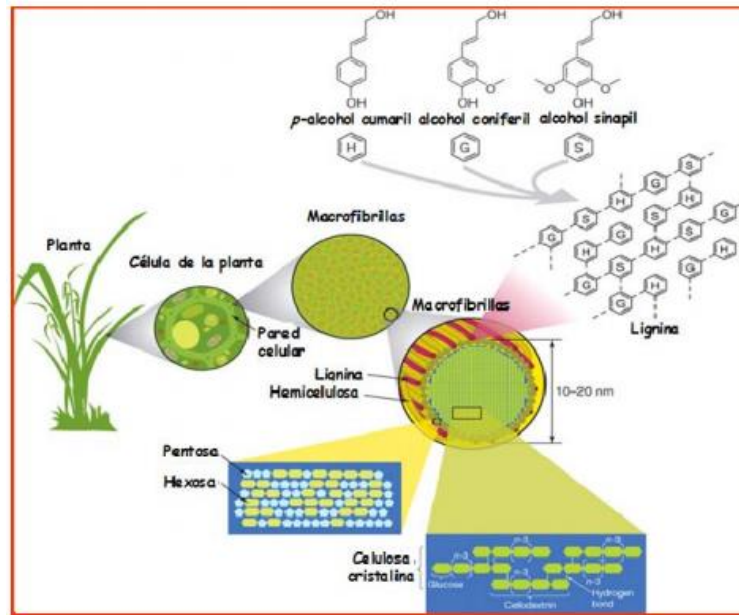


Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica (tomada de Castro-Martínez, 2009).

2. METODOLOGÍA

Ha consistido en la búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos utilizando los siguientes perfiles de búsqueda.

Tabla 1. Relación de las bases de datos utilizadas con las palabras claves.

	SCIENCEDIRECT	PUBMED
Cellulosome & lignocellulosic	15	20
Cellulosome & biofuels	11	28

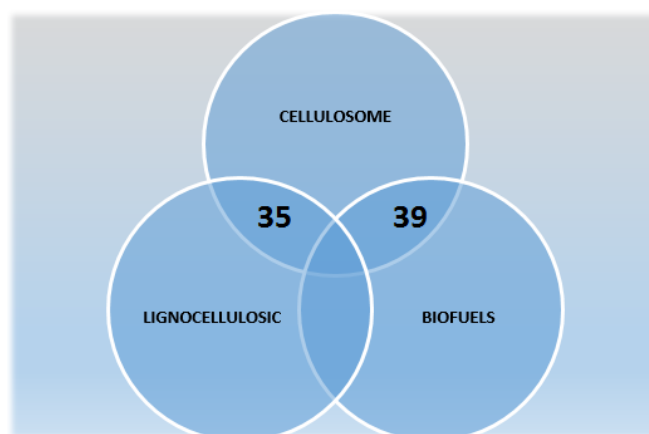


Figura 3. Diagrama de Venn relacionando las palabras claves utilizadas.

Tabla 2. Relación de los artículos distribuidos en los diferentes años en la base de datos ScienceDirect.

SCIENCEDIRECT	Cellulosome & lignocellulosic	Cellulosome & biofuels
2000-2005	2	0
2006-2010	7	6
2011-2015	5	5
2016 to present	1	0
TOTAL	15	11

Tabla 3. Relación de los artículos distribuidos en los diferentes años en la base de datos PUMBED.

PUMBED	Cellulosome & lignocellulosic	Cellulosome & biofuels
2000-2005	2	0
2006-2010	6	6
2011-2015	14	23
2016 TO PRESENT	3	4
TOTAL	25	33

3. ANÁLISIS DEL ESTADO DEL ARTE

A continuación se procede a la exposición de algunos conceptos necesarios para comprender el tema a tratar, y posteriormente haremos un despliegue de lo que se está llevando a cabo actualmente y lo que se pretende realizar en un futuro próximo.

3.1. DESCRIPCIÓN MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

3.1.1. CELULOSA HEMICELULOSA Y LIGNINA

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas. Es producida mediante la fotosíntesis, y se ha convertido en la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas (Álvarez-Castillo y cols., 2012).

Se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4, que se estructuran en largas cadenas lineales unidas mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares. Todo ello forma una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y una región amorfa susceptible a la degradación enzimática.

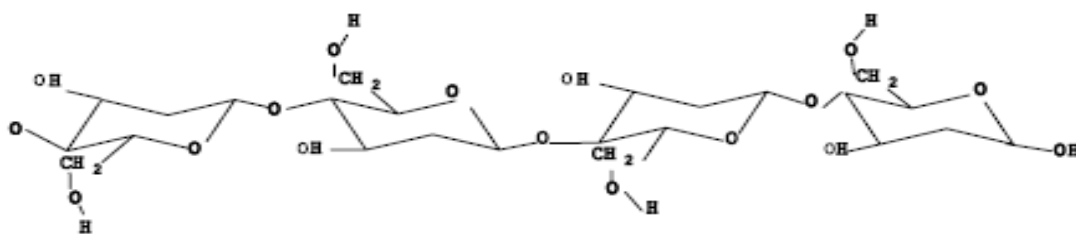


Figura 4. Estructura química de la cadena de celulosa (tomada de Tomás Pejo, 2009).

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas mediante uniones β -1,4 y ocasionalmente β -1,3.

Encontramos también los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico.

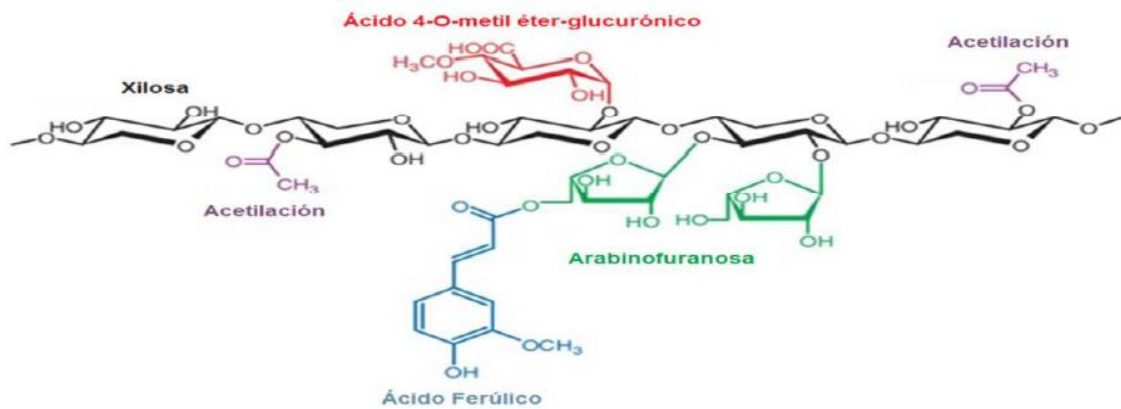


Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa (tomada de Martínez Restrepo, 2013).

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que aportan rigidez, impermeabilidad, protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa). La lignina ofrece soporte estructural y resistencia a la degradación enzimática, debido a su naturaleza recalcitrante. La encontramos unida a la celulosa y hemicelulosa formando una barrera impermeable que dificulta el ataque enzimático.

De ahí la importancia de los procesos de deslignificación como paso previo a la hidrólisis enzimática con el fin de obtener mayores rendimientos de hidrólisis.

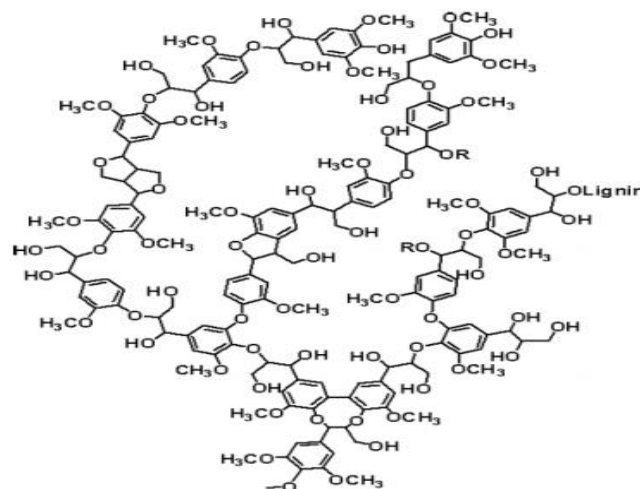


Figura 6. Estructura química de la lignina.

La celulosa y hemicelulosa son degradadas mediante sistemas enzimáticos extracelulares, mientras que la lignina es despolimerizada por peroxidasa y lacasa a través de reacciones de oxidación.

Tabla 4. Contenido en material lignocelulósico de algunos residuos agrícolas (tomada de Cuervo, 2009).

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0

3.1.2. DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

Los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan la celulosa a través de celulasas extracelulares, que comentaremos posteriormente. Estas celulasas dominan actualmente en las aplicaciones industriales.

- HONGOS BASIDIOMICETOS: *Aspergillus* y *Penicillium*.
- BACTERIAS AEROBIAS: *Cellulomonas* y *Streptomyces*.

Los hongos y bacterias anaerobias degradan mediante celulosomas, que explicaremos con más detenimiento en el siguiente apartado.

- HONGOS: *Anaeromyces* y *Caecomyces*.
- BACTERIAS ANAEROBIAS: *Clostridium* y *Ruminococcus*.

3.1.2.1. CELULASAS EXTRACELULARES

Como acabamos de ver los microorganismos aerobios utilizan celulasas para degradar la celulosa. Estas actúan en sinergismo para llevar a cabo el proceso.

Existen tres tipos de celulasas:

- ENDOGLUCANASAS → cortan regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos causando la disminución del largo de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores.
- EXOGLUCANASAS O CELOBIOHIDROLASAS → actúan sobre los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa.
- BETA-GLUCOSIDASAS → hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa.

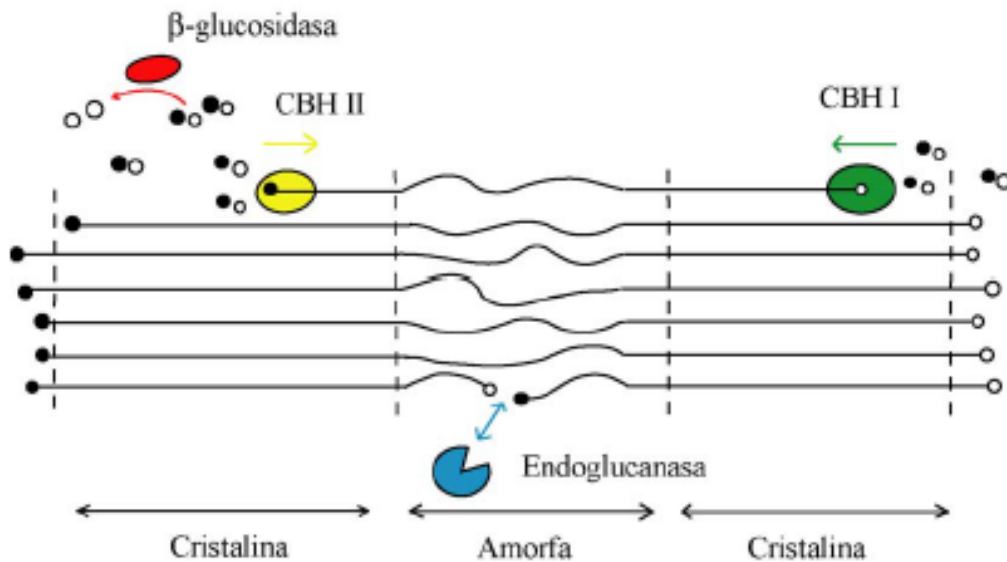


Figura 7. Mecanismo sinérgico entre las distintas celulasas extracelulares (tomado de Tomás Pejó, 2009).

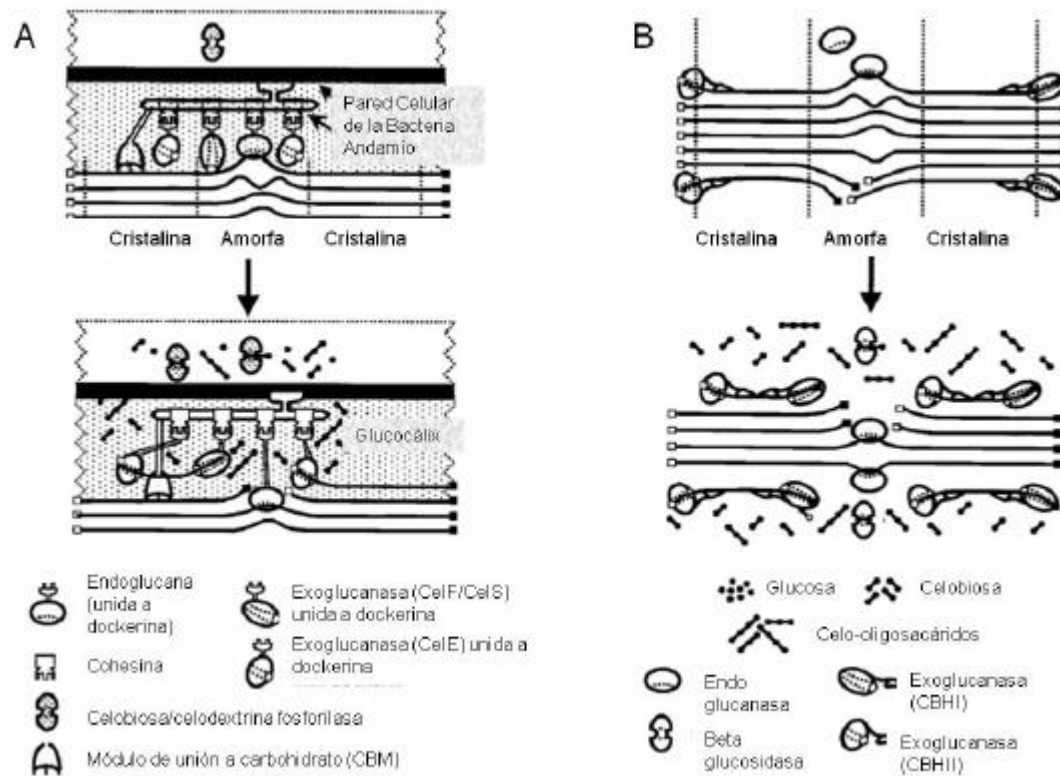


Figura 8. Hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina mediante celulasas extracelulares (tomada de Cuervo, 2009).

3.1.2.2. CELULOSOMA

Complejos multienzimáticos exocelulares especializados que actúan sinérgicamente para catalizar la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa. Están formados por varios tipos de celulasas, soportadas en una unidad de estructuración (Tabla 5). Los celulosomas se encuentran entre sí formando policelulosomas, que se observan como protuberancias en la superficie celular de bacterias celulolíticas (Hernández-Santoyo y cols., 1999).

En *C.thermocellum* se han encontrado diferentes genes que codifican 18 diferentes enzimas celulosomales. Tanto éstas, como las celulasas extracelulares poseen dominios catalíticos similares. La principal diferencia estriba en que las celulasas celulosomales tienen un dominio de anclaje, el cual ayuda a la integración de la enzima dentro del complejo celulosómico. También presentan un dominio de unión a la

celulosa (DUC). Todos ellos están conectados mediante péptidos de enlace, ricos en Pro, Thr y Ser (glicosidados).

Las subunidades que forman el complejo están organizadas por su interacción con una subunidad estructural especializada (scaffolding).

Tabla 5. Componentes del celulosoma.

ENDO-1,4-β-GLUCANASAS	Rompen los enlaces glicosídicos internos de la celulosa de forma aleatoria.
EXO-1,4-β-GLUCANASAS (celobiohidrolasas)	Actúan cortando la celobiosa del extremo no reductor de la cadena y en algunas ocasiones liberan pequeñas cantidades de glucosa.
β-GLUCOSIDASAS	Completan la hidrólisis de cadenas pequeñas de celooligosacáridos y de celobiosa, liberados por otras enzimas, hasta glucosa.
XILANASAS	Detectadas en <i>C.thermocellum</i> .
PROTEINAS QUE UNEN CELULOSA	Polipéptido CipA
COMPONENTES NO PROTEICOS	Xilosa, manosa, galactosa, glucosa, n-acetilglucosamina, Zn y Ca.

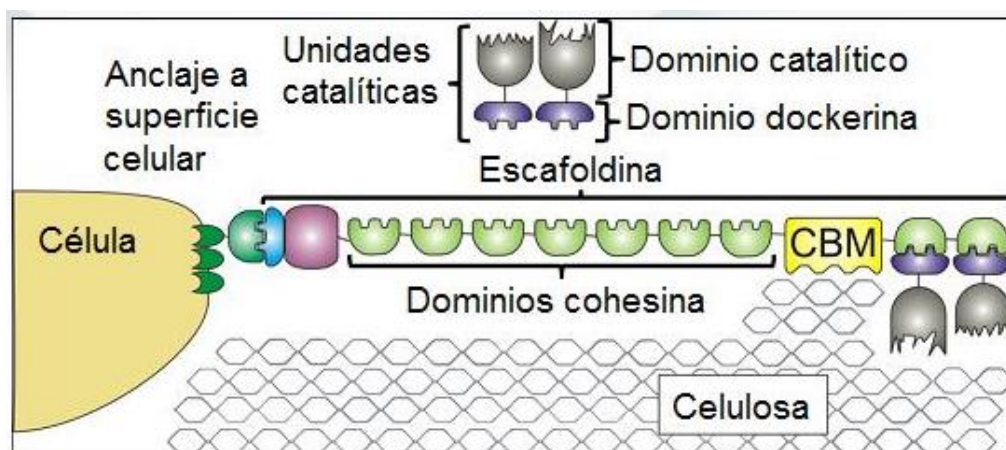


Figura 9. Representación de un celulosoma natural.

En general, la estructura del celulosoma es muy estable (requiere elevadas temperaturas para romperlo), flexible y la interacción con el sustrato implica un cambio conformacional.

El celulosoma comprende numerosas subunidades, que agrupadas forman un orgánulo policelulosomal similar a una protuberancia, conocida como protubozima. Estas protuberancias podemos localizarlas en la superficie de diferentes microorganismos.

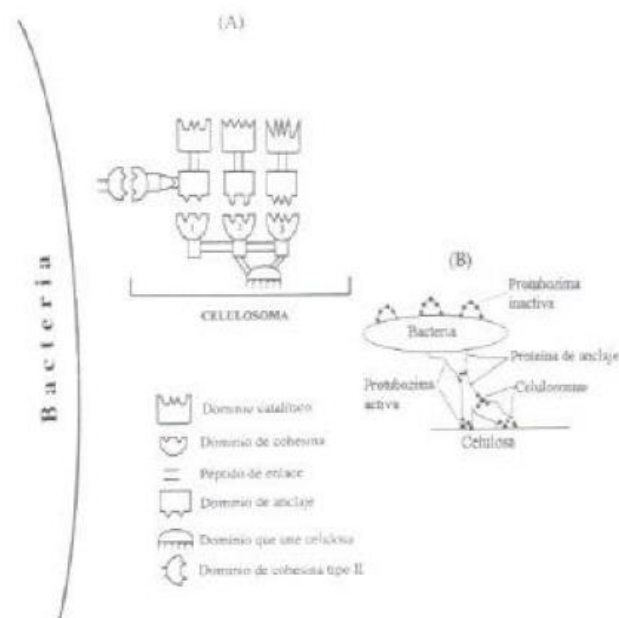


Figura 10. Representación de un celulosoma cubriendo la parte exterior de la protuberancia inactiva, constituyendo los policelulosomas. Las protubozimas al ponerse en contacto con la celulosa sufren un cambio conformacional, estableciendo una conexión con la misma (tomada de Santoyo, 1999).

3.1.3. ETAPAS DE LA CONVERSIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Los principales métodos conocidos para llevar a cabo la hidrólisis son el uso de catalizadores ácidos o enzimáticos.

En la HIDRÓLISIS ACIDA se pueden utilizar ácidos concentrados como el H_2SO_4 y HCl , o diluidos. Presentamos aquí algunas características de este método:

CONCENTRADOS	DILUIDOS
Necesidad grandes cantidades.	Requieren altas temperaturas.
Recuperación costosa.	Mayor corrosión de los equipos.
Necesaria neutralización antes de la fermentación.	Mayor degradación de los azúcares hemicelulósicos.
Efectos corrosivos.	

Se observa claramente que el proceso no es rentable económicamente y por tanto la opción de hidrólisis enzimática es más prometedora.

La HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA consta de las siguientes etapas, descritas a continuación.

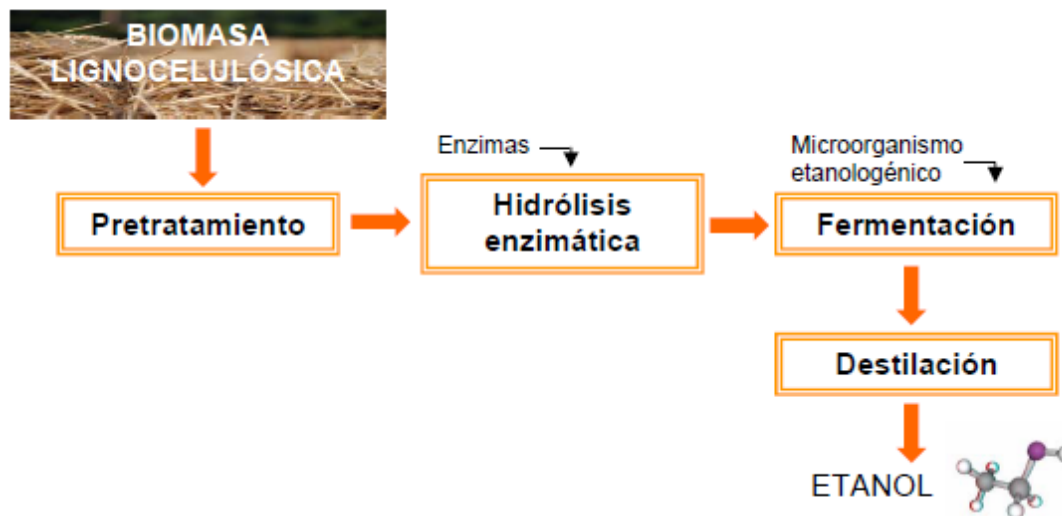


Figura 11. Esquema del proceso de hidrólisis enzimático (tomado de Tomás Pejo, 2009).

3.1.3.1. PRETRATAMIENTO

El objetivo del pretratamiento es mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa, disociando el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de ésta. Al remover la lignina y hemicelulosa reducimos la cristalinidad de la celulosa e incrementamos la porosidad del material, mejorando así la liberación de los azúcares,

evitando la degradación o pérdida de carbohidratos y la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación.

Como hemos mencionado antes el pretratamiento representa aproximadamente un 40% del coste total del proceso de bioconversión, de ahí la necesidad de desarrollar tecnologías eficientes que reduzcan este alto porcentaje.

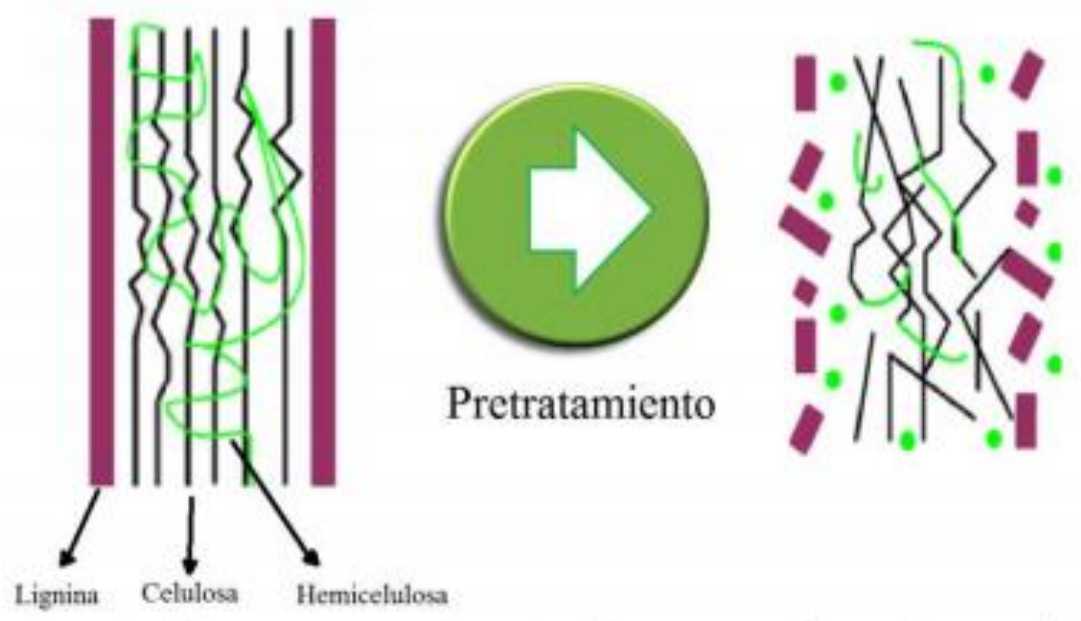


Figura 12. Biomasa antes y después del pretratamiento (tomada de Cortés Sordo, 2013).

Citaremos algunos pretratamientos que existen actualmente (ver Tabla 6).

Tabla 6. Pretratamientos.

<p>PRETRATAMIENTOS FÍSICOS</p>	<p>MOLIENDA: utiliza fuerzas de impacto y cizalla para disminuir la cristanilidad de la celulosa. Supone altos costes energéticos y de capital.</p>
<p>PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS</p>	<p>ÁCIDO DILUIDO: mejora significativamente la hidrólisis enzimática.</p> <p>OZONO</p> <p>PERÓXIDOS</p> <p>SOLVENTES ORGÁNICOS</p>
<p>PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS</p>	<p>HONGOS: sus principales inconvenientes es que también consumen celulosa y la lentitud con la que llevan a cabo el proceso.</p>
<p>PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS</p>	<p>EV: explosión por vapor (más utilizado), para un amplio rango de materias primas.</p> <p>ACL: agua caliente en fase líquida, sometemos la biomasa a agua caliente en estado líquido y alta presión durante un período de tiempo, obteniendo una gran recuperación de azúcares y bajas concentraciones de productos de degradación.</p> <p>AFEX: explosión por vapor con amoniaco, impregnamos la biomasa con amoniaco a alta presión y a temperaturas menores de 100°C.</p> <p>LI: líquidos iónicos, sales compuestas únicamente por iones que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente. Poseen mayor estabilidad térmica y química respecto a los solventes orgánicos. Al ser un producto barato, el coste de producción es bajo, compensa el escaso rendimiento obtenido. Existen dos tipos (ver Tabla 7)</p>

Tabla 7. Tipos de líquidos iónicos.

	VENTAJAS	INCONVENIENTES
LÍQUIDO IÓNICO APRÓTICO (AIL)	Buen rendimiento en la hidrólisis de celulosa.	Poco biodegradable. Alta higroscopicidad.
LÍQUIDO IÓNICO PRÓTICO (PIL)	Baja toxicidad. Baja higroscopicidad. Bajo coste de producción.	Pocos antecedentes en su estudio. Rendimientos insuficientes respecto a algunos AILs.

3.1.3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

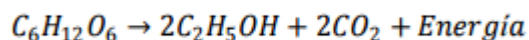
Es la etapa limitante del proceso global.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Método amigable con el medio ambiente. Incremento en la accesibilidad al material celulósico. Alto rendimiento del producto. Poca generación de compuestos tóxicos. Mínima demanda de energía. Tolerabilidad de altas temperaturas. Rango amplio de pH.	Proceso lento (limita uso industrial). Baja actividad específica de las enzimas. Empleo alto de celulasas.

El último inconveniente citado representa una parte significativa en el alto coste del proceso. En la última década se han realizado numerosos estudios para afrontar este problema, que comentaremos en apartados posteriores.

3.1.3.3. FERMENTACIÓN

Proceso por el que los azúcares liberados en la hidrólisis se transforman en biofuels, generalmente etanol, y CO₂. Este proceso sigue la siguiente reacción:



El microorganismo habitualmente utilizado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su capacidad de utilizar todo tipo de hexosas y a la producción de etanol con un rendimiento muy cercano al teórico. La principal limitación se presenta cuando se quiere utilizar en la fermentación de azúcares hemicelulósicos, ya que no es capaz de fermentar pentosas como la xilosa. Por esta razón se buscan microorganismos capaces de fermentar tanto pentosas como hexosas, y que también sean capaces de tolerar los posibles tóxicos generados durante el pretratamiento (Tomás Pejo, 2009).

4. ÚLTIMAS TENDENCIAS

Comentaremos ahora los diferentes mecanismos utilizados hasta la fecha y los novedosos métodos que, de ser posible, se aplicarán en un futuro muy cercano.

4.1. ABORDAJES LLEVADOS A CABO A FECHA 2015

4.1.1. HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SEPARADAS (HFS)

Hidrólisis y fermentación de la glucosa realizadas en dos reactores diferentes.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Cada etapa realizada en sus condiciones óptimas de pH y temperatura. Posibilidad de reciclaje de las células.	Dos pasos → aumento del coste. Inhibición de las celulasas por el producto final (glucosa).

4.1.2. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SFS)

Hidrólisis y fermentación tienen lugar en un mismo reactor, de manera simultánea.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Un solo paso → disminución del coste. Amplia elección de microorganismos eficientes. Empleo de menores concentraciones de enzimas. Se minimiza la inhibición por el producto final, ya que conforme se produce la hidrólisis la glucosa se va transformando a etanol.	Necesidad de fijar unas condiciones de temperatura y pH acorde a ambos procesos. Imposibilidad de reciclaje de células. NO fermentación de las pentosas.

4.1.3. SACARIFICACIÓN Y COFERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SCFS)

Tanto la glucosa como la xilosa están presentes en el medio y son fermentados simultáneamente.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Un solo paso → disminución del coste. Empleo de menores concentraciones de enzimas. Se minimiza la inhibición por producto final. Aprovechamiento de la mayoría de azúcares presentes en la materia prima.	Necesidad de fijar unas condiciones de temperatura y pH acorde a ambos procesos. Imposibilidad de reciclaje de células. Microorganismos fermentadores de pentosas poco desarrollados.

4.1.4. BIOPROCESAMIENTO CONSOLIDADO (BPC)

Conlleva la combinación de las 4 reacciones biológicas necesarias para la transformación de la lignocelulosa a etanol en un único reactor:

1. Producción de las enzimas (celulasas y hemicelulasas).
2. Hidrólisis del material a azúcares.
3. Fermentación de las hexosas.
4. Fermentación de las pentosas.

Para la aplicación de dicho proceso se necesita un único microorganismo, o mezcla de éstos, capaces de hidrolizar y fermentar la biomasa pretratada. Entre los microorganismos capaces de degradar la celulosa, las bacterias celulolíticas del género *Clostridium* han sido las más estudiadas y caracterizadas.

Estas bacterias digieren la celulosa mediante el complejo enzimático extracelular llamado celulosoma. Los celulosomas son capaces de hidrolizar tanto la parte amorfa como la parte cristalina de la celulosa. En concreto, *Clostridium thermocellum* es una bacteria que utiliza la celulosa como única fuente de carbono y lleva a cabo la fermentación produciendo lactato, acetato, etanol, H₂ y CO₂ (Tomás Pejo, 2009).



Es el candidato perfecto por su naturaleza anaerobia y su tolerancia a altas temperaturas (termófilo). Su capacidad para hidrolizar y fermentar y dar lugar a productos de valor añadido como es el etanol, además de otros compuestos beneficiosos industriales, lo convierte en un biocatalizador atractivo para la CBP.

Además, *C.thermocellum* presenta las velocidades más altas de hidrólisis de celulosa conocidas hasta el momento. Sin embargo, no es capaz de fermentar la xilosa, por tanto para esta causa utilizamos *Clostridium thermosaccharolyticum*, permitiendo la cofermentación simultánea de glucosa y xilosa a etanol en un mismo reactor.

A pesar de todas las ventajas que implicaría la realización de este tipo de BPC, en la actualidad todavía no existen microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente BPC. Sin embargo, existen expectativas de poder superar las limitaciones de los actuales microorganismos mediante dos estrategias, que comentaremos en el apartado siguiente.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<p>ÚNICO REACTOR.</p> <p>No necesaria la adición de enzimas exógenas.</p> <p>Aumento del rendimiento del producto.</p> <p>Corta duración.</p>	<p>No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un eficiente proceso.</p> <p>Inhibición por productos finales.</p> <p>Incompatibilidad entre la temperatura de hidrólisis y de fermentación.</p>

4.2. ¿QUÉ SE ESTÁ INTENTANDO HACER PARA MEJORAR?

4.2.1. APROVECHAMIENTO DE LOS SUSTRATOS

El aprovechamiento máximo de los sustratos es esencial para la mejora del rendimiento y la aceptación por parte de los inversores.

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes del planeta por lo que en las últimas décadas ha cobrado un creciente interés para el desarrollo de proyectos sostenibles basados en la química verde (Álvarez-Castillo y cols., 2012). Esto conduce además de la generación de energía por la obtención de bioetanol a la generación de materiales celulósicos novedosos, para el aprovechamiento total de este compuesto:

- Biomateriales compuestos con fibras de celulosa.
- Whiskerías y microfibras de celulosa.

Después de la celulosa la lignina es la segunda fuente renovable más abundante que existe en la naturaleza, por lo que se han desarrollado usos alternativos para aprovechar este subproducto:

- Una vez seca es vendida a la industria química para ser utilizada como reactivo para productos poliméricos.
- Generación de fibras de carbón para la industria de los materiales reforzados.

4.2.2. AVANCES EN CBP

Las dos estrategias para superar las limitaciones en el CBP son:

1. La manipulación de microorganismos que manifiestan una alta actividad celulolítica con el fin de mejorar su producción de etanol, aumentando los rendimientos o la tolerancia al mismo.
2. La modificación genética de microorganismos que presentan altos rendimientos a etanol, de manera que sean capaces de producir enzimas para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa.

Dichos avances podrían implicar importantes mejoras en el proceso de producción de bioetanol en un futuro, pero se encuentran todavía en una etapa inicial de investigación.

4.2.3. CELULOSOMAS DE DISEÑO

La asociación de celulasas y celulosomas ofrece una mayor actividad hidrolítica. Esta afirmación fue de inspiración para la creación a través de manipulación genética de celulosomas sintéticos utilizando la subunidad 18; complejo de proteínas denominado rosettasome. Este complejo tiene la ventaja de que es capaz de acomodar un mayor número de enzimas en una sola partícula, al contener un módulo de cohesinas fusionado a cada subunidad del rosettasome. Algunas de las características que presentan son:

- La posibilidad de unión a los módulos dockerin que contienen endo y exo glucanasas.
- El aumento de la actividad de degradación de celulosa en comparación con las enzimas libres en solución.
- El aumento de actividad dependerá de la relación y cantidad de glucanasas unidas.
- Son termoestables.
- En presencia de ATP/Mg²⁺ forman estructura de doble anillo.

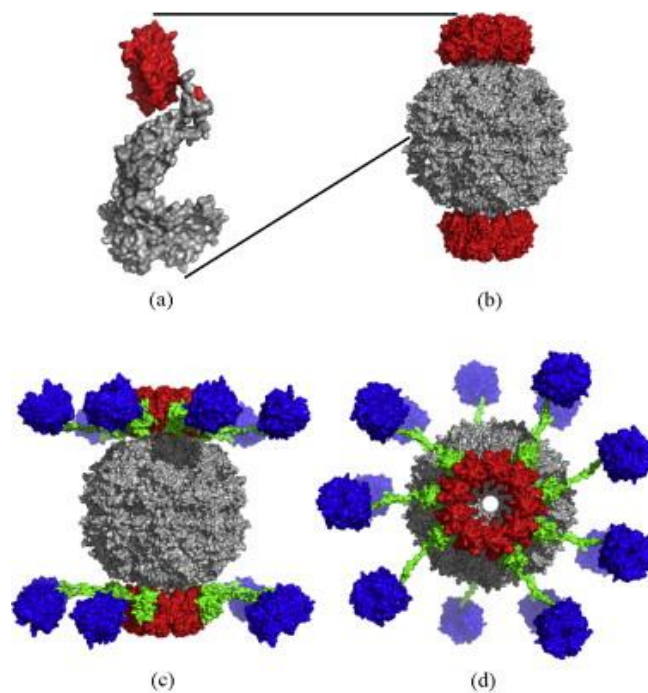


Figura 13. Posible modelo de la rosettasome unida al módulo de cohesina (a y b) y un rosettazyme (c y d) tomado de Mitsuzawa, 2009.

Lo que se pretende conseguir con estos celulosomas es que sean capaces de unirse tanto a la celulosa, como a la hemicelulosa y a la lignina. Es decir, disminuir la especificidad del complejo multienzimático por el sustrato.

Otra de las características que se requiere es la capacidad para acomodar múltiples cadenas de sustrato de distintas formas y tamaños, por lo que se debe sintetizar un sitio de reconocimiento que se pueda amoldar fácilmente.

4.2.4. CÓCTELES ENZIMÁTICOS

Empresas como Genencor y Novozyme están jugando un papel importante en la innovación ofreciendo un cóctel de enzimas para la degradación de la biomasa. Este cóctel se compone de celulasas, hemicelulasas, glucanasas y ligninasas (Iacasas). Pero como venimos comentando, también es necesaria aquí la reducción del coste para llevar a cabo este proceso.

Novozyme estima que el etanol celulósico reducirá las emisiones de CO₂ en un 90% en comparación con los combustibles a base de petróleo, tema que también se valora a la hora de emprender nuevos métodos para la producción de biofuels.

El último cóctel ofrecido por esta empresa es el Cellic CTec3, un avanzado complejo enzimático de celulasas y hemicelulasas que ofrece la más eficiente conversión en costo del mercado, de materias lignocelulósicas pre-tratadas a azúcares fermentables, para la producción de etanol a partir de celulosa. Ofrece nuevas oportunidades para optimizar el pre-tratamiento, la hidrólisis y la fermentación en el proceso y asegurar de esta forma el más bajo costo de producción de etanol a partir de celulosa.

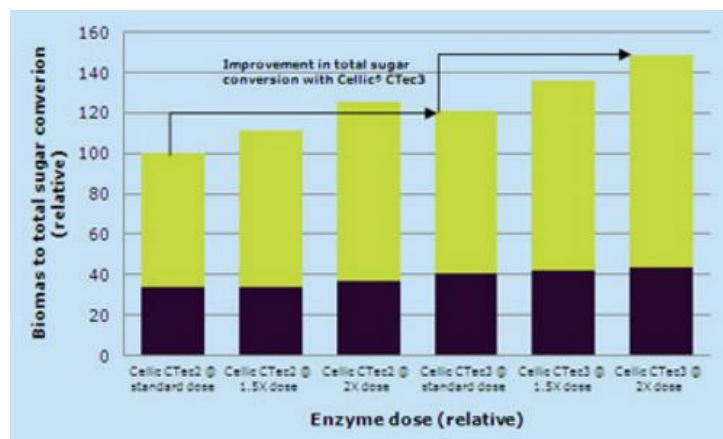


Figura 14. Evolución del complejo Cellic. Mejora de la conversión de biomasa desde Cellic 2 a Cellic 3 (tomado de Novozymes Cellic®).

4.2.5. DISEÑO RACIONAL DE CELULASAS

Este proceso implica:

1. Selección de la enzima adecuada.
2. Identificación de los aminoácidos que desean cambiarse en la proteína.
3. Caracterización de los mutantes.

El diseño racional conlleva un amplio conocimiento estructural y funcional de cada región proteica, y la modificación de la secuencia de aminoácidos se podría lograr mediante mutagénesis dirigida al sitio. La fe en este proceso se basa en que con

nuestro conocimiento científico actual se podría predecir la función de la estructura obtenida. Sin embargo la principal desventaja es la no disponibilidad de suficiente información de la mayoría de enzimas.

4.2.6. EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Esta técnica permite el desarrollo de enzimas con mejor especificidad, actividad, estabilidad y solubilidad, optimizando su uso industrial. Todo ello se realiza seleccionando y separando los mutantes beneficiosos de los deletéreos.

Ofrece una ventaja sobre el diseño racional: es independiente del conocimiento de la estructura de la enzima y de las interacciones entre enzima y sustrato. El mayor desafío que ofrece este método es el desarrollo de las herramientas necesarias para evaluar correctamente el rendimiento de los mutantes generados mediante técnicas de ADN recombinante.

4.2.7. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE GENES DE CELULOSAS DE LEVADURAS

Después de la hidrólisis de la celulosa por uno de los dos métodos obtenemos glucosa y celo-oligosacáridos. Por tanto como el paso siguiente es la conversión de la glucosa a etanol. ¿Cómo se puede llevar a cabo? Una de las estrategias es el uso de microorganismos tales como bacterias o levaduras las cuales hidrolizan la celulosa mediante la expresión heteróloga de genes que codifican celulasas.

En un estudio realizado se utilizó *S.cerevisiae* con el fin de expresar en ellas genes que codificaran celulasas capaces de sacarificar y fermentar al mismo tiempo.

Ejemplos:

- Expresión de dos celobiohidrolasas (CBHI y CBHII) pertenecientes al hongos *Trichoderma reesei*.
- Expresión de una endoglucanasa (cen1) y una celobiohidrolasa (ex1) del basidiomiceto *Irpex lacteus* observando un efecto sinérgico en la degradación de la celulosa tanto cristalina como amorfa.

- Expresión de una beta-glucosidasa (bgl1) de *A.aculeatus*, y una endoglucanasa (eglI) y una celobiohidrolasa (cbhII) de *T.reesei* permitieron una fermentación directa y eficiente de la celulosa amorfa a etanol logrando un 88,5% del rendimiento teórico.

4.2.8. METAGENÓMICA

Se trata de un conjunto de técnicas que permite obtener todos los fragmentos de ADN y ARN de una muestra concreta dando lugar a una huella genética. Esta poderosa herramienta es utilizada en nuestro caso para el descubrimiento de enzimas de diversos entornos y ambientes extremos. El estudio del material genético es una buena opción para la revelación de nuevos biocatalizadores que se encuentran atrapados en los genomas de microbios no cultivables (ver Figura 15).

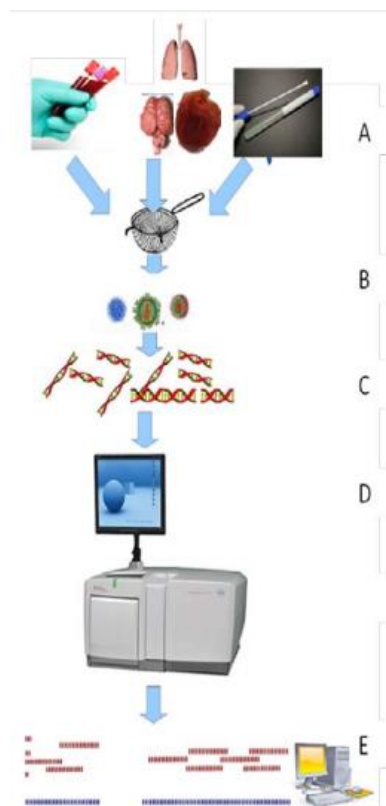


Figura 15. Esquema del rastreo metagenómico. (A) Toma de muestra; (B) Eliminación de material no aplicable; (C) Amplificación masiva; (D) Secuenciación a gran escala; (E) Análisis de las secuencias y comparación con las bases de datos ya existentes (tomado de Rubio-Guerri, 2010).

5. CONCLUSIONES

Después de realizar este trabajo la evidencia más señalada que obtenemos es la necesidad de una drástica disminución en el coste de producción para lograr un rendimiento aceptable. Estas son las dos palabras que más preocupan en este campo: rendimiento y coste. Se observa que las investigaciones en esta materia no se encuentran estancadas, sino que siguen un proceso de evolución lento pero constante. En cualquier caso será necesario ampliar el estudio de algunos conceptos particularmente en lo referente al celulosoma y la ingeniería de proteínas en este ámbito, para conseguir avances y alcanzar nuestro objetivo, celulosomas modificados y/o sintéticos de altos rendimientos que permitan bajos costes, y por tanto procesos viables. Si bien otra vía que se está estudiando también, pero que no se ha discutido en este trabajo, es la revalorización de los sub-sub-productos (ligninas, celulosa no hidrolizada, etc.) obtenidos tras la obtención de azúcares fermentables, como por ejemplo bioasfalto y nanocelulosa.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bayer, E. A., Lamed, R., Himmel, M. E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18(3): 237–245.
2. Beukes, N., Chan, H., Doi, R. H., Pletschke, B. I. Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Tech.* 2008; 42(6): 492–498.
3. Castillo-Álvarez, A., Salgado-Delgado, R., Hernández-García, E., Domínguez-Domínguez, M. M., Granandos-Baeza, et al. Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Rev. Iberoam. Polim.* 2012; 13(4): 140–150.

Resultó útil a la hora de indagar cómo se aprovecha el material lignocelulósico, otros usos que se le pueden dar además del que nosotros estamos tratando, para la mejora del rendimiento del proceso.

4. Castro-Martínez, C., Valverde, M. E., Paredes-López, O. Biocombustibles : biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Ide@s CONCYTEG.* 2009; 54: 1246–1270.
http://www.concyteg.gob.mx/ideasConcyteg/Archivos/54072009_BIOCOMBUS TIBLE_BIOMASA_LINOCELULOSICA_PROC_PROD.pdf

Su contenido es similar al que nosotros tratamos en nuestro trabajo. Dispone de información válida sobre el material lignocelulósico y sus componentes, además de dar a conocer distintos pretratamientos.

5. Correia, M. A. S., Prates, J. A. M., Brás, J., Fontes, C. M. G. A., Newman, J. A., Lewis, R. J., et al. Crystal Structure of a Cellulosomal Family 3 Carbohydrate

Esterase from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into the Mechanism of Substrate Recognition. *J. Mol. Biol.* 2008; 379(1): 64–72.

6. Cortés Sordo, T. Evaluación de pretratamiento con líquidos iónicos próticos para la producción de bioetanol de segunda generación. 2013. http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/113670/cf-cortes_ts.pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. Ctec, C., Ctec, C., Ctec, C., Htec, C., Ctec, C. (n.d.). Etanol celulósico Novozymes Cellic[®] CTec3 - Asegure el menor costo posible en su planta. Ficha de aplicación, 1–6. http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Documents/AS_2012-04050-01_ES.pdf
8. Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R. E. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología.* 2009; 13(3): 11–25.

Información ampliada de la composición del material lignocelulósico y los distintos pretratamientos actuales clasificados según su método de actuación.

9. Ding, S. Y., Xu, Q., Crowley, M., Zeng, Y., Nimlos, M., Lamed, R., et al. A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008; 19(3): 218–227.
10. Hyeon, J. E., You, S. K., Kang, D. H., Ryu, S. H., Kim, M., Lee, S. S., et al. Enzymatic degradation of lignocellulosic biomass by continuous process using laccase and cellulases with the aid of scaffoldin for ethanol production. *Process. Biochem.* 2014; 49(8): 1266–1273.
11. Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2016; 55: 249–272.

12. Martínez-Restrepo, Y. M. Selección de hongos filamentosos con potencial para la degradación de lignocelulosa aislados de desechos agroindustriales de café e higuerilla. *J. Chem. Inf. Model.* 2013; 53(9): 1689–1699.
13. Mitsuzawa, S., Kagawa, H., Li, Y., Chan, S. L., Paavola, C. D., Trent, J. D. The rosettazyme: A synthetic cellulosome. *J. Biotechnol.* 2009; 143(2): 139–144.

Investigación sobre los celulosomas sintéticos, posibles estructuras y aplicaciones. Valoración del aumento del rendimiento.

14. Morais S., Himmel, M. E., Bayer, E. A. New Paradigms for Engineering Plant Cell Wall Degrading Enzymes. En: Himmel M. E. *Direct Microbial Conversion of Biomass to Advanced Biofuels*. 1st ed. Ámsterdam: Elsevier; 2015. p. 129-149
15. Morrison, M., Pope, P. B., Denman, S. E., McSweeney, C. S. Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new? *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009; 20(3): 358–363.
16. Munir, R. I., Spicer, V., Shamshurin, D., Krokhin, O. V., Wilkins, J., Ramachandran, U., et al. Quantitative proteomic analysis of the cellulolytic system of *Clostridium termitidis* CT1112 reveals distinct protein expression profiles upon growth on α -cellulose and cellobiose. *J. Proteomics.* 2015; 125: 41–53.
17. Percival Zhang, Y. H., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 2006; 24(5): 452–481.

Nuevos avances en el campo de investigación de los sistemas celulolíticos, ventajas y desventajas que nos ofrecen.

18. Rubio-Guerri, C., Vicente-Rubiano, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M. Metagenómica, la técnica que “descubre” nuevos virus. Universidad Complutense de Madrid, (C). 2010. http://www.colvema.org/WV_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf

19. Hernández-Santoyo, A., García-Hernández, E., Rodríguez-Romero, A. Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 1999; 43(3-4): 137-142.

Artículo muy completo en la materia del celulosoma, tratando en profundidad su estructura, componentes y mecanismo de acción.

20. Simões, M. F., Antunes, A., Ottoni, C. A., Amini, M. S., Alam, I., Alzubaidy, H., et al. Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea - A Metagenomic Approach. *Genomics. Proteomics. Bioinformatics.* 2015; 13(5): 310–320.

21. Tomás-Pejó, M. Bioetanol De Paja De Trigo: Estrategias De Integración De Las Etapas Del Proceso. *Renew. Sust. Ener. Rev.* 2009; Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas (Doctorado). <http://eprints.ucm.es/10802/1/T31774.pdf>

Artículo que aporta gran cantidad de información en lo referente al material lignocelulósico y el proceso de producción del bioetanol de segunda generación. También contiene los distintos pretratamientos más utilizados hasta la fecha.

22. Thomas, L., Joseph, A., Gottumukkala, L. D. Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: An insight on molecular approaches for strain improvement. *Bioresour. Technol.* 2014; 158: 343–350.

23. You, C., Zhang, X. Z., Zhang, Y. H. P. Mini-scaffoldin enhanced mini-cellulosome hydrolysis performance on low-accessibility cellulose (Avicel) more than on high-accessibility amorphous cellulose. *Biochem. Eng. J.* 2012; 63: 57–65.

24. <http://biosciences.dupont.com/>
25. <http://carrionvazquez-lab.org/es/page.cfm?id=19#.V2FD7fmLTNM>
26. http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/E_abrvjt.html
27. <http://metagenomics.anl.gov/>
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
29. <https://www.novozymes.com/en>
30. <http://www.sciencedirect.com/>
31. <http://www.wordreference.com/es/>