

Etanol Carburante

Ofelia Edith Carreón Rodríguez, Andrea Sabido Ramos López, Sara Centeno Leija, Laura Julieta Leal Reyes, Alfredo Martínez Jiménez*, Marco Tulio Fernández Sandoval

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo.
Postal 510-3 Cuernavaca, Mor, 62250
alfredo@ibt.unam.mx; marcot@ibt.unam.mx*

RESUMEN

México se encuentra ante una eventual crisis energética debido a la acelerada producción y reducción en las reservas probadas del petróleo. Para solventar este problema es necesario desarrollar tecnologías alternativas, que de manera progresiva vayan sustituyendo la variedad de combustibles derivados del crudo. En el caso de los combustibles para el transporte, el etanol anhidro representa una opción viable para oxigenar y complementar el uso de la gasolina como carburante. Brasil y Estados Unidos son los principales productores de etanol carburante (bioetanol) de primera generación, esto es utilizando como fuente de carbono sacarosa (caña de azúcar) y glucosa (maíz), respectivamente. México por otro lado, no es autosuficiente en ninguna de estas dos materias primas, ya que el empleo de las mismas, representa una competencia con el uso como alimentos y con la reducida superficie cultivable en México. La segunda generación de etanol plantea el uso de lignocelulosa para su producción, la biotecnología está realizando grandes avances para poner a punto estas tecnologías. En este trabajo se revisa, de manera general, las propiedades y el estado del arte de producción de etanol carburante de primera generación, y en una segunda parte se describen los avances que existen en los aspectos biotecnológicos y de ingeniería de vías metabólicas para la producción microbológica de etanol de segunda generación.

Palabras clave: Etanol, biocombustibles, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Due to accelerated declination in production and reduction in oil proved reserves, in the near future Mexico can have an energy crisis. To gradually replace the variety of fuels derived from crude oil, alternative technologies must be developed to produce renewable energy. In the case of transport fuels, anhydrous ethanol is a viable option to oxygenate and complement the use of gasoline. Brazil and the U.S. are the main producers of first generation fuel ethanol (bioethanol), that uses sucrose (cane sugar) and glucose (corn) as carbon sources, respectively. However, Mexico is not self sufficient in the production of these two commodities for food and feed purposes. The second-generation technologies uses lignocellulose as a raw material for the production of fuel ethanol, and biotechnology is a key disciple that is helping to develop these technologies. In this paper, a general overview about properties and the state of the art in the production of first-

generation fuel ethanol is presented. In a second part, the advances in biotechnology and metabolic pathway engineering are described for microbiological production of second-generation ethanol.

Key words: Ethanol, biofuels, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

PANORAMA ENERGÉTICO ACTUAL EN MÉXICO

El desarrollo tecnológico ha ido de la mano con el suministro de energía a través de la historia de la humanidad. En la Fig. 1 se muestra la distribución porcentual de energía

que diferentes recursos o tecnologías suministran en el planeta. Desde los inicios de la era industrial, la principal fuente de energía mundial ha sido el petróleo; sin embargo, en los últimos años ha existido un uso

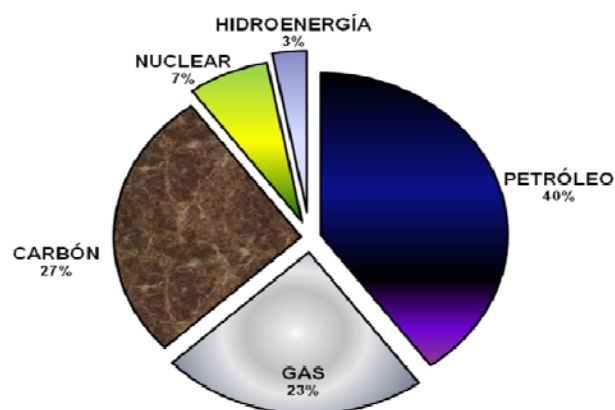


Fig. 1. Fuentes primarias de energía a nivel mundial (Cala, 2007).

desenfrenado de los recursos energéticos, por lo cual se pronostica escasez y aumento en sus precios para un futuro cercano. En la actualidad este energético abastece el 40% de la demanda mundial (ver Fig. 1). En el 2005 el consumo se ubicó en 77,237 millones de barriles de petróleo crudo, equivalentes a 211 millones diarios de barriles. Estados Unidos, Canadá y México representan el 5% de las reservas probadas de petróleo a nivel mundial (www.un.org/esa/population/publications), y en particular para México, sin aumentar su consumo diario, el horizonte previsto para el agotamiento de las reservas probadas no

rebasará los nueve años. Resulta entonces obvio que la oferta de energía requiere de una transición desde su actual dependencia de los hidrocarburos hacia fuentes de energía alternativas y renovables. Esta transición debe realizarse de forma gradual y ordenada, logrando el aprovechamiento de diferentes fuentes de energía, prestando particular atención a fuentes renovables de energía como la: eólica, hidráulica, geotérmica, maremotriz, solar y la obtenida a partir de la biomasa. A diferencia de la mayoría de las energías renovables, con las cuales se obtiene principalmente energía eléctrica o calor; por medio del uso de biomasa se

pueden obtener combustibles sólidos, gaseosos y líquidos, en los dos últimos casos haciendo uso de procesos biotecnológicos para obtenerlos.

En México, de acuerdo con la Comisión Federal de Electricidad y la Secretaría de Energía, dos tercios de la energía eléctrica que se consume se produce en termoeléctricas a partir de combustibles fósiles derivados del petróleo: diesel, combustóleo, aceites pesados y gas natural (Martínez *et al.*, 2006). El otro tercio lo produce en plantas hidroeléctricas, carboeléctricas, geotérmicas, eólicas y nucleares.

En términos de volumen 50 por ciento del petróleo extraído en México se exporta a los Estados Unidos (Martínez *et al.*, 2006), el 25 por ciento se emplea para producir combustóleo y diesel, el 14 por ciento para producir gasolina, el 2 por ciento para obtener turbosina y 9 por ciento para petrolíferos y petroquímicos. Sin embargo PEMEX debido a acuerdos comerciales exporta e importa gasolina, resultando en un balance del 40% de importación en el 2008. Otro aspecto importante a considerar respecto a la energía en México es que prácticamente 100% de los medios de transporte público y particular emplean directamente derivados de combustibles fósiles.

En especial para el sistema de transporte y no obstante el amplio desarrollo tecnológico actual, no existen muchas alternativas disponibles para sustituir la gasolina y el gas natural como formas portátiles y concentradas de energía para automotores.

De las opciones posibles destacan el almacenamiento de energía solar y eléctrica en baterías, la generación de energía eléctrica mediante celdas de combustible de hidrógeno y la combustión de metano, metanol, biodiesel o etanol producido mediante tecnologías biológicas. En cuanto a la energía solar y eléctrica en baterías su desventaja radica en que los módulos de almacenamiento todavía son difíciles de implementar a escala comercial por sus costos y tecnología empleada. Los combustibles líquidos, en particular el etanol producido mediante procesos biotecnológicos, son una opción más viable para México.

IMPLICACIONES AMBIENTALES DEL USO DE COMBUSTIBLES

El uso del petróleo crudo y sus productos (combustibles) han modificado de manera importante el medio ambiente. Como principal evidencia de la influencia humana, se encuentra el aumento en las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero (GEI); tales como el dióxido de carbono, metano y óxidos de nitrógeno, los cuales contribuyen al cambio climático actual.

Para contender con el problema de contaminación generado por los combustibles fósiles, afrontar la dependencia energética que representa el petróleo y su alza de precio se ha propuesto el uso de biocombustibles como el bioetanol (Ingram *et al.*, 1999). Las tecnologías biotecnológicas son favorables y sustentables ya que se encuentran basadas en la conversión de

material biológico renovable por medio de microorganismos o enzimas, abatiendo los problemas de contaminación originados por los combustibles fósiles. En comparación con los combustibles derivados del petróleo, mediante el empleo de combustibles generados por procesos biotecnológicos, no se incrementa la concentración neta de CO₂ en la atmósfera, sino que éste únicamente se recicla, integrando la actividad industrial al ciclo de carbono en nuestro planeta. Como resultado el uso de bioetanol, obtenido por medio de tecnologías biotecnológicas, permite disminuir las emisiones globales de gases de efecto invernadero y de otros gases contaminantes.

PRODUCCIÓN DE ETANOL EN EL MUNDO Y MÉXICO

En la última década el interés por los biocombustibles ha crecido de manera significativa en todo el mundo. Brasil fue pionero en desarrollar estas fuentes alternativas de energía desde el año 1975 (Wheals *et al.*, 1999), las cuales después fueron retomadas por otros países europeos y más intensamente por Estados Unidos.

Brasil y Estados Unidos actualmente son los dos países que producen la mayor cantidad de etanol como biocombustible, con tecnologías consolidadas a partir de caña de azúcar (sacarosa) y maíz (glucosa), respectivamente (Wheals *et al.*, 1999). Para esto se utiliza a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo el proceso de fermentación y cultivos alimentados o continuos a escalas mayores de cien metros cúbicos de fermentación (Wheals *et al.*, 1999;

Mielenz, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005).

Bajo la actual política de estímulo a la producción de etanol que el gobierno de Estados Unidos está llevando a cabo, la producción del biocombustible en este país alcanzó los 9 billones de galones en 2008 (datos del departamento de agricultura de los EUA). Como resultado de este impulso en la oferta de etanol, se ha incrementado la superficie cultivada con maíz que se destina a la producción de este biocombustible, desplazando el área cultivable de frijol de soya, y además ocasionando el alza en el precio del maíz en el mercado internacional.

Desde hace más de cuatro mil años el etanol es producido por el hombre a través de procesos de fermentación utilizando principalmente levaduras. En México es usado principalmente en bebidas y en menor proporción como solvente y material de curación; su producción está basada en la fermentación de azúcares provenientes de melazas, de ingenios azucareros, de azúcares obtenidos del agave y de granos en general. Sin embargo, el uso de etanol producido por estas material primas, utilizado para la producción de bebidas alcohólicas, no puede canalizarse hacia la generación de etanol carburante debido a la limitada cantidad de etanol que se produce.

La capacidad de producción de las destilerías mexicanas es de aproximadamente 346,000 litros/día; con rendimientos entre 230 y 250 litros/tonelada de melaza procesada. Los Ingenios La Gloria y San Nicolás (ubicados en Veracruz) cuentan con destilerías con la capacidad

para producir etanol anhidro, ésta asciende a 115,000 litros/día. La producción de los efluentes de la destilación, denominados vinazas, es superior actualmente a 750 millones de litros, cuyo destino principal es la ferti-irrigación de los cañaverales aledaños a los ingenios dada la gran cantidad de materia orgánica y como fuente de potasio para el cultivo de la gramínea, subsecuentemente. No existen reportes del empleo del jugo de caña directo como materia prima en las destilerías de nuestro país.

Los excedentes de la industria azucarera nacional ascienden en promedio a 500 mil toneladas anuales (aunque durante el 2009 no hubo excedentes). El mercado nacional es aproximadamente de cien millones de litros diarios de gasolina. Considerando los rendimientos teóricos de conversión y la eficiencia de fermentación y recuperación de etanol, a partir de los excedentes de sacarosa únicamente se puede obtener el equivalente al 0.8 por ciento del volumen de gasolina (0.8 millones de litros por día), por lo tanto esta alternativa no llegaría a solventar el consumo equivalente de oxígeno para la gasolina, ya que se sabe que la característica oxígeno del MTBE (metil terbutil éter), el cual se importa en parte en México, puede ser sustituida agregando 3% en volumen de etanol a la gasolina (Schifter *et al.*, 2001); aunado a que el precio de producción de este etanol sería mayor que el de venta actual de la gasolina (Martínez *et al.*, 2006).

Es de vital importancia reconocer que la superficie agrícola actual del país es insuficiente para producir materias primas

(tales como el maíz o la caña de azúcar) para la elaboración de biocombustibles que sustituyan por completo a los hidrocarburos y simultáneamente satisfagan la demanda alimenticia de la población.

Según las Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), y de Energía (SENER) existe una oportunidad importante para que México emprenda la producción de etanol a gran escala, pero antes deben superarse varios retos políticos, económicos, de seguridad alimentaria y de desarrollo de tecnología. Sin embargo, la producción de etanol a partir de caña de azúcar o diversos granos con las tecnologías maduras existentes no es factible en México, debido a la demanda de estos productos para consumo humano (Martínez *et al.*, 2006), y a que en México no existe una tecnología madura de producción de bioetanol como combustible carburante, a pesar de que México ocupa el séptimo lugar entre los países productores de azúcar en el mundo.

La agroindustria de la caña de azúcar es una de las más antiguas en México, y su cultivo ocupa alrededor de 658 mil hectáreas que se procesan en 59 ingenios distribuidos en 217 municipios de 15 estados de la República. A pesar de que su valor en el Producto Interno Bruto se ha reducido, de esta actividad dependen más de 3 millones de personas, genera miles de empleos directos e indirectos y es el sustento de casi 6 mil familias por ingenio. Por ello, esta industria se considera de interés público y detonadora del desarrollo regional. Los 22 ingenios que se localizan en el estado de

Veracruz producen más del 40% del total nacional de azúcar, para lo que se utilizan alrededor de 240 mil hectáreas.

Por otro lado, el precio de la caña de azúcar en México es elevado (cerca de 38 dólares americanos por tonelada), cifra que comparada, por ejemplo con países de Centro y Sudamérica, es prácticamente del triple. Esto desde luego, está íntimamente relacionado con el costo de producción, debido a factores tales como: el minifundio (<4.5 Ha/agricultor); agroinsumos; agua y energía; así como a las fluctuaciones del precio de las melazas, que inhiben frecuentemente la producción de alcohol. A la Agro Industria de la Caña de Azúcar en México, se le ha denominado sector en crisis permanente, por la recurrencia de los problemas que la aquejan; no obstante, la importancia que en lo económico, lo político y social tiene, obliga a los involucrados a la búsqueda de formulas que ayuden a su sostenimiento. Por todo lo anterior, se puede concluir que la viabilidad económica de la producción de etanol anhidro en nuestro país, depende de varios aspectos a considerar como el costo de la materia prima a emplear, la autosuficiencia energética, la economía de escala (mayor tamaño de las destilerías), la incorporación de la cogeneración, la introducción de la biotecnología para mejorar los procesos de fermentación y los subsidios a la agricultura (producción de caña destinada para etanol y/o exportación de azúcar al mercado mundial).

Basados en los hechos citados en los párrafos anteriores, la lignocelulosa, que en México pueden ser los residuos

agroindustriales, como el bagazo de caña, residuos derivados del maíz, arroz, sorgo, trigo, entre otros, así como bagazos y hojas de agaves, pastos de crecimiento rápido, e incluso lignocelulosa proveniente de zonas semiáridas, parecen ser una buena alternativa para la producción de etanol; desde el punto de vista económico, de abundancia y de desarrollo rural. A manera de ejemplo, la industria azucarera obtiene como co-producto alrededor de 14.1 millones de toneladas de bagazo de caña por zafra, los cuales están concentrados en los 59 ingenios del país. Este bagazo de caña, con tecnologías y procesos biotecnológicos de punta, pueden ser convertidos en 7.05 millones de litros de etanol por día, esto es aproximadamente el 7% en volumen de la gasolina consumida por día. Esto es, si el 43% del bagazo de caña se convierte en etanol se puede oxigenar toda la gasolina que se consume en el país con un 3% de etanol, (Martínez *et al.*, 2006), el 47% restante del bagazo podría seguir usándose en los ingenios como combustible, pero se requeriría una reconversión en los ingenios para usar calderas más eficientes, a base de bagazo y no usar las actuales que tienen más de cincuenta años de vida, para satisfacer sus necesidades energéticas.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ETANOL COMO CARBURANTE

El etanol a presión y temperatura ambiente es líquido, incoloro, inflamable, soluble en agua, de tal manera que es fácilmente almacenado y transportado. No obstante, es un líquido higroscópico y forma

un azeótropo con el agua, dando lugar a un producto que tiene el 96% v/v de etanol en agua, el cual no debe ser usado en mezclas gasolina-etanol debido a que puede ocurrir separación de fases. Por otro lado, el etanol anhidro (<0.4% v/v de humedad) se utiliza para la oxigenación de gasolinas y para aumentar el octanaje de las mismas. En comparación con las gasolinas, el contenido energético del etanol es aproximadamente de un tercio menor con respecto a la gasolina o diesel, sin embargo, su calor de vaporización es casi tres veces mayor y su número de octanos también es superior. Los motores de combustión interna que utilizan gasolina pueden emplear como energético mezclas de ésta conteniendo hasta 20% de etanol. El desarrollo tecnológico en Brasil ha permitido la comercialización de automóviles que pueden emplear mezclas de etanol hasta del 95% en gasolina, y desde el 2003 se comercializan los vehículos denominados Flex-Fuel (de combustible flexible), los cuales tienen un sistema modificado de inyección de combustible que permite llenar el tanque de combustible con gasolina oxigenada con MTBE, cualquier mezcla de gasolina-etanol anhidro o bien etanol anhidro puro.

En relación a la emisión de gases, el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) realizó una investigación probando mezclas en relación de 3%, 6% y 10% de etanol anhidro con gasolina (Schifter *et al.*, 2001). Las pruebas de emisiones se realizaron en 12 motores, representativos del parque vehicular que se utiliza en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México a 2,200 m.s.n.m. (con y sin

convertidor catalítico). Los resultados claramente muestran que hay una reducción del 33% en las emisiones de monóxido de carbono, 10% en hidrocarburos totales, 15% en benceno, 15% en 1,3, butanedieno, una ligera disminución de óxidos de azufre, pero un incremento en un 5% para las emisiones de óxidos de nitrógeno. No debe descuidarse de modo alguno el impacto del etanol sobre algunos elastómeros y juntas del motor; situación que ya fue superada por la industria de automotores brasileña.

ETANOL A PARTIR DE LIGNOCELULOSA

Procesamiento de lignocelulosa

Como se citó antes, la producción de etanol a partir de residuos agroindustriales (lignocelulósicos) no atenta contra cultivos que son utilizados principalmente para consumo humano. La lignocelulosa es un polímero natural más abundante en el planeta, representando cerca del 50% de la biomasa en la tierra y se encuentra en residuos agrícolas, industriales, forestales, municipales, pastos de crecimiento rápido, material vegetal del mar, y biomasa proveniente de zonas semiáridas. La lignocelulosa está constituida de tres principales fracciones: celulosa (40-50%), compuesta de moléculas de celulosa; hemicelulosa (25-35%), un heteropolímero ramificado que contiene hexosas (15%), pentosas (85%), ácidos urónicos y generalmente esta acetilada (Gray *et al.*, 2006); y lignina (15-20%), la cual es un polímero de carácter fenólico (Zaldivar *et al.*, 2001) (Fig. 2).

Artículos

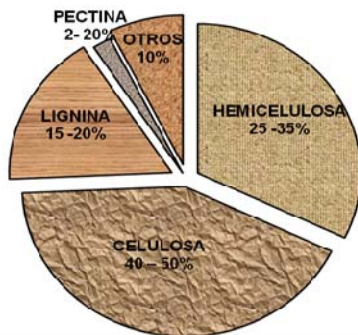


Fig. 2. Composición de la lignocelulosa

La conversión de las materias primas a etanol involucra: el pretratamiento (procesamiento e hidrólisis de la lignocelulosa), detoxificación de la hemicelulosa, sacarificación enzimática de la celulosa, fermentación y recuperación del etanol [destilación y deshidratación (Fig. 3)]. Cualquier biomasa lignocelulósica en su forma nativa, es resistente a la sacarificación enzimática, por lo que estos residuos

necesitan ser pretratados para facilitar la depolimerización de la celulosa e hidrolizar la hemicelulosa (Saha, 2004). Así pues, el objetivo del procesamiento consiste, por un lado, en incrementar el área expuesta de la materia prima, permitiendo con ello una mayor accesibilidad de las enzimas que hidrolizan la celulosa (Galbe & Zacchi, 2002) y por otro generar jarabes de azúcares ricos en pentosas y hexosas.

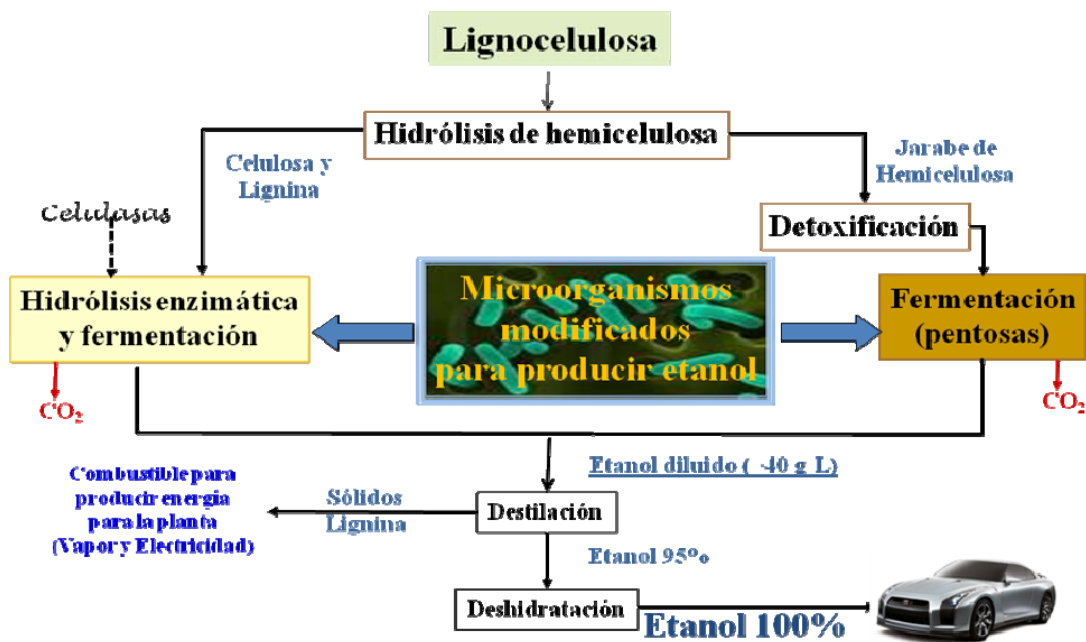


Fig. 3. Esquema del proceso de producción de etanol carburante a partir de lignocelulosa.

Hidrólisis ácida

Aunque existen otros métodos, el procesamiento con ácido diluido a altas temperaturas se ha convertido en una operación común para el pretratamiento de muchos materiales lignocelulósicos, por su relativa facilidad para realizarlo y por su bajo costo. Como se citó, este proceso permite la hidrólisis de la hemicelulosa en pentosas y hexosas, remueve parte de la lignina, y hace más accesible la estructura de la celulosa, a tal punto que una fracción pueda ser convertida a glucosa enzimáticamente (Saha, 2008). El primer paso en la hidrólisis con ácidos diluidos, es mezclar una proporción de 1-2 % de ácido sulfúrico con la biomasa para que la hemicelulosa se hidrolice a temperaturas mayores a 130°C (Sun *et al.*, 2002). Con este método se obtienen jarabes de hemicelulosa que contienen pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (principalmente glucosa y manosa), además de presentar una concentración de 3–10 g L⁻¹ de ácido acético, pequeñas concentraciones de furanos (furfural e hidroximetil-furfural) y fenólicos derivados de la hidrólisis parcial de la lignina (Martínez *et al.*, 2001). Los furanos, fenólicos y el acético inhiben el crecimiento de los microorganismos y tienen un efecto sinérgico de toxicidad, por tanto es necesario “detoxificar” los hidrolizados para mejorar la fermentabilidad de estos jarabes (Fig. 3). Para llevar a cabo la detoxificación de los hidrolizados, la adición de Ca(OH)₂ es un método de los más efectivos y menos costosos, este método es conocido generalmente como “overliming” (alcalinización). La metodología consiste en

añadir el hidróxido hasta llevar a un pH aproximado de 10 a temperatura ambiente ó 60°C, con la finalidad de reducir las concentraciones de furfural, hidroximetilfurfural y compuestos fenólicos y permitir la formación de una sal insoluble en función del tipo de ácido utilizado, además reduce de esta forma la concentración de sales solubles durante la fermentación (Martínez *et al.*, 2001).

Hidrólisis enzimática

Por otro lado, la sacarificación de la celulosa (Fig. 3) se lleva a cabo enzimáticamente mediante celulasas. Las enzimas provenientes de hongos, son consideradas como una de las mejores alternativas para la hidrólisis de fuentes lignocelulósicas, para lo cual se requiere de la acción combinada de diferentes tipos de actividades: 1) endoglucanasas, las cuales cortan internamente enlaces β- 1, 4 de glucosa; 2) celobiohidrolasas, que cortan en los extremos de las moléculas de celulosa generando disacáridos de glucosa (celobiosa), y 3) β- glucosidasas, las cuales hidrolizan celobiosa y productos de cadena corta en monómeros de glucosa (Ingram *et al.*, 1998). Debido a que las celulasas son inhibidas por su producto (glucosa, celobiosa, celotriosa, etc.), además de tener una baja actividad específica, baja tasa de reacción y un alto costo, este procesamiento presenta limitantes para aplicarse a escala comercial. Una alternativa para mitigar la inhibición por producto es mediante la sacarificación y fermentación simultánea (SSF por sus siglas en inglés), en la cual el microorganismo

convierte los azúcares en etanol tan pronto como éstos son liberados por acción enzimática en un mismo reactor (Saha, 2008). No obstante, los procesos de SSF requieren que las condiciones del cultivo y las de la actividad enzimática sean compatibles, principalmente con respecto al pH y temperatura (Galbe & Zacchi, 2002; Zaldivar *et al.*, 2001). A lo largo de los últimos años, se ha hecho un gran progreso en cuanto al desarrollo de nuevas enzimas hidrolíticas se refiere y se espera que pronto las compañías productoras de enzimas lancen al mercado nuevas generaciones de mezclas enzimáticas con mejores propiedades y más baratas que las que actualmente se comercializan. Cabe aclarar, que un pretratamiento eficiente es fundamental para que la estructura de la celulosa quede lo suficientemente expuesta para que las celulasas puedan liberar glucosa de eficientemente (van Maris *et al.*, 2006).

MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR LIGNOCELULOSA

Actualmente, en diferentes partes del mundo, y teniendo como principales exponentes a Brasil y a Estados Unidos, la tecnología madura de producción de etanol utiliza cepas de levaduras, siendo el género *Saccharomyces sp.* el más ampliamente utilizado; las cualidades que hacen que este microorganismo sea el más empleado, son su capacidad de convertir rápidamente los azúcares a etanol, alta tolerancia al etanol (más de 80 g/l), elevada osmotolerancia,

tolerancia a variaciones en la temperatura, resistencia a un ambiente ácido y tiene una amplia aceptación en los procesos industriales ya que es un microorganismo que ha sido utilizado por siglos por el ser humano (Ingram & Buttke, 1984).

En el proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar, están presentes microorganismos intrínsecos que vienen en la caña, en especial levaduras, algunas que se han identificado son del género *Saccharomyces sp.*, *Torula sp.* y *Pichia sp.* Sin embargo, en el proceso de obtención de etanol para fines carburantes, la permanencia de linajes diferentes a *Saccharomyces sp.* no es deseable debido a los altos rendimientos y niveles de etanol requeridos (Schwan *et al.*, 2001; Pataro *et al.*, 2000). A partir de los años 90, en Brasil se empezaron a utilizar inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* para sustituir las levaduras nativas de la caña y tener un mejor control de la fermentación.

Por otro lado, el desarrollo de microorganismos que sean capaces de metabolizar la amplia variedad de azúcares presentes en la lignocelulosa, principalmente glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa, de preferencia de manera simultanea y con mínimos requerimientos nutricionales, es necesario para simplificar el proceso y reducir los costos de la producción de etanol a partir de lignocelulosa. Así mismo, además de poseer altas productividades y rendimientos de etanol, los microorganismos deben reducir la formación de subproductos indeseables, tolerar la liberación de inhibidores generados por la

hidrólisis de la lignocelulosa, tener una elevada tolerancia al etanol y al estrés osmótico ocasionado por la elevada concentración de azúcares fermentables (Zaldivar *et al.*, 2001). A pesar del uso extensivo de *S. cerevisiae* para la obtención de etanol a partir de sacarosa, glucosa o fructosa, este microorganismo presenta una serie de desventajas para su aplicación en la producción del mismo a partir de hidrolizados de hemicelulosa, tales como: altos costos de aireación, elevada producción de biomasa, y principalmente su incapacidad para metabolizar pentosas (componentes principales de la hemicelulosa), por lo que a lo largo de las últimas dos décadas se han seleccionado y generado diferentes microorganismos capaces de producir etanol con el fin de cumplir los requisitos de un proceso fermentativo a partir de hidrolizados de hemicelulosa. Entre los microorganismos más promisorios se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Zymomonas mobilis* y la misma *S. cerevisiae* modificadas por ingeniería de vías metabólicas (Dien *et al.*, 2003).

La falta de microorganismos con capacidad industrial para la producción de etanol a partir de biomasa, es uno de los principales obstáculos para el desarrollo de la producción de etanol a partir de residuos agroindustriales. Recientemente, mediante el uso de técnicas de biología molecular, evolución dirigida e ingeniería de vías metabólicas, diversos grupos de investigación se han dedicado a la modificación de la fisiología y de vías metabólicas de diferentes microorganismos

con la finalidad de obtener cepas con la capacidad de metabolizar todos los azúcares provenientes de los residuos agroindustriales, y al mismo tiempo para obtener mejores rendimientos y productividades de etanol. Un paso limitante en el desarrollo de cepas etanológicas, es la integración de genes recombinantes y la expresión eficiente de éstos en el microorganismo hospedero en condiciones no aireadas, así como la sobreexpresión de los genes propios del microorganismo para incrementar la producción de etanol, manteniendo un balance entre la fisiología microbiana y las altas productividades (Dien *et al.*, 2003).

INGENIERÍA METABÓLICA DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Escherichia coli

E. coli presenta diferentes ventajas como biocatalizador para la producción de etanol, dentro de las cuales se encuentran: su capacidad para fermentar una amplia gama de azúcares (hexosas y pentosas, además de ácidos urónicos), su amplio conocimiento en cuanto a su uso a nivel industrial en la producción de proteínas recombinantes. Actualmente existen muchos procesos aerobios a escala comercial con este microorganismo, requerimientos mínimos para su crecimiento, y una mayor tolerancia a inhibidores generados por la hidrólisis de la hemicelulosa en comparación con *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* (Zaldivar *et al.*, 1999; Zaldivar & Ingram, 1999).

Durante el metabolismo anaerobio, las

las cepas silvestres de *E. coli* forman acetil Co-A a partir de piruvato por la enzima piruvato formato liasa (PFL). Al utilizar acetil CoA, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADHE) forma acetaldehído, para después formar etanol usando la misma enzima. Esta vía fermentativa está desbalanceada, debido a que se genera una molécula de NADH por cada molécula de piruvato formada a partir de glucosa, pero se requiere de dos moléculas de NADH para convertir el piruvato en etanol. Razón por la cual el flujo de

carbono hacia la formación de etanol no es considerable en cepas silvestres de *E. coli* (ver Fig. 4a). Un balance similar se obtiene para el consumo de otras hexosas y también para pentosas. En cambio *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* convierten piruvato a etanol utilizando las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADHB), y esta vía sólo consume una molécula de NADH por cada molécula de etanol producida (Dien *et al.*, 2003) (Fig. 4b).

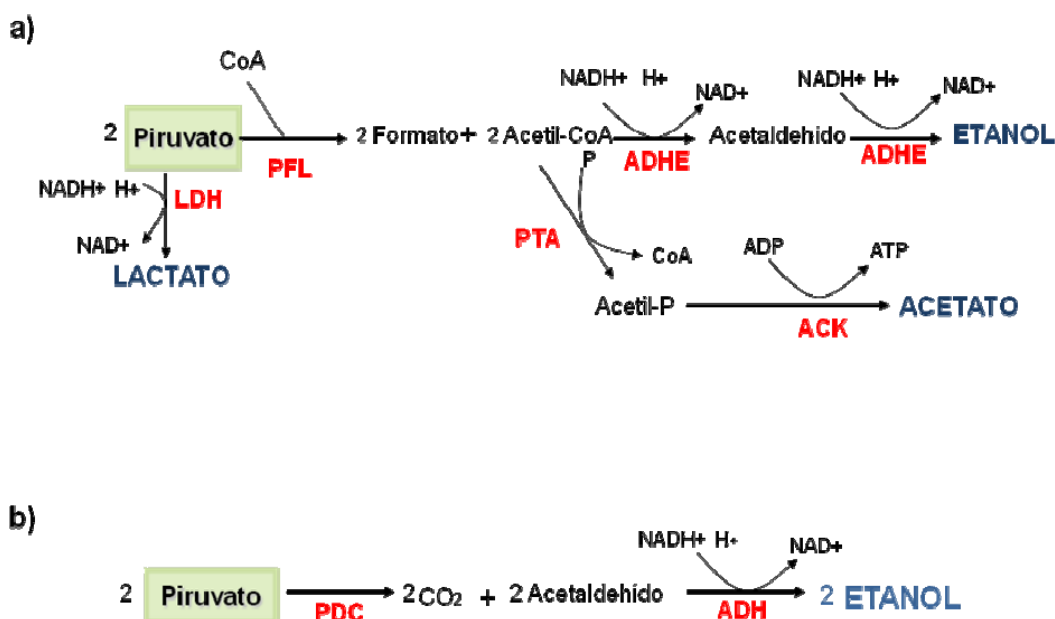


Fig. 4. Vías de formación de etanol en: a) *Escherichia coli*; y b) *Zymomonas mobilis*. PDC, piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis*; ADH, alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis*; PFL, piruvato formato liasa; PTA, fosfotransacetilasa; ADHE, alcohol deshidrogenasa de *E. coli*; ACK, acetato cinasa; LDH, lactato deshidrogenasa.

Para mantener el balance redox en *E. coli* una cantidad igual de acetil-CoA debe ser convertida a acetato. Así, los rendimientos teóricos de etanol por la vía nativa de *E. coli* son menores a los posibles con la vía basada en las enzimas PDC y ADHB de *Z. mobilis*. Adicionalmente, la enzima PDC de *Z. mobilis* permite canalizar el piruvato a etanol en

cepas modificadas de *E. coli*, debido a que la PDC tiene una K_m más baja por el piruvato (0.4 mM) que otras enzimas que compiten por este metabolito en condiciones de fermentación (por ej. 2 mM para el caso de la piruvato formato liasa y 7 mM para la lactato deshidrogenasa). Como se muestra adelante, se ha comprobado que altos niveles de

Artículos

glucosa o xilosa son fermentados eficientemente a etanol por cepas modificadas de *E. coli* que sobreexpresan PDC y ADH de *Z. mobilis* (Ingram *et al.*, 1998).

Mediante técnicas de biología molecular e ingeniería de vías metabólicas se han construido diferentes cepas etanológicas de *E. coli*, entre ellas, de una primera generación, la cepa de *E. coli* denominada KO11 ha sido una de las más estudiadas. Esta cepa tiene integrado en cromosoma el operón *PET* (production of ethanol), el cual

contiene los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Z. mobilis*, bajo el control del promotor de la piruvato formato liasa (*Pfl*), el cual se expresa fuertemente en condiciones anaerobias (Fig. 5). Además *E. coli* KO11 tiene integrado el gen *cat*, que codifica para la cloramfenicol acetil transferasa y le confiere resistencia a cloramfenicol. Cabe resaltar que en *E. coli* KO11 se generó una interrupción en el gen *frd*, que codifica para la enzima fumarato

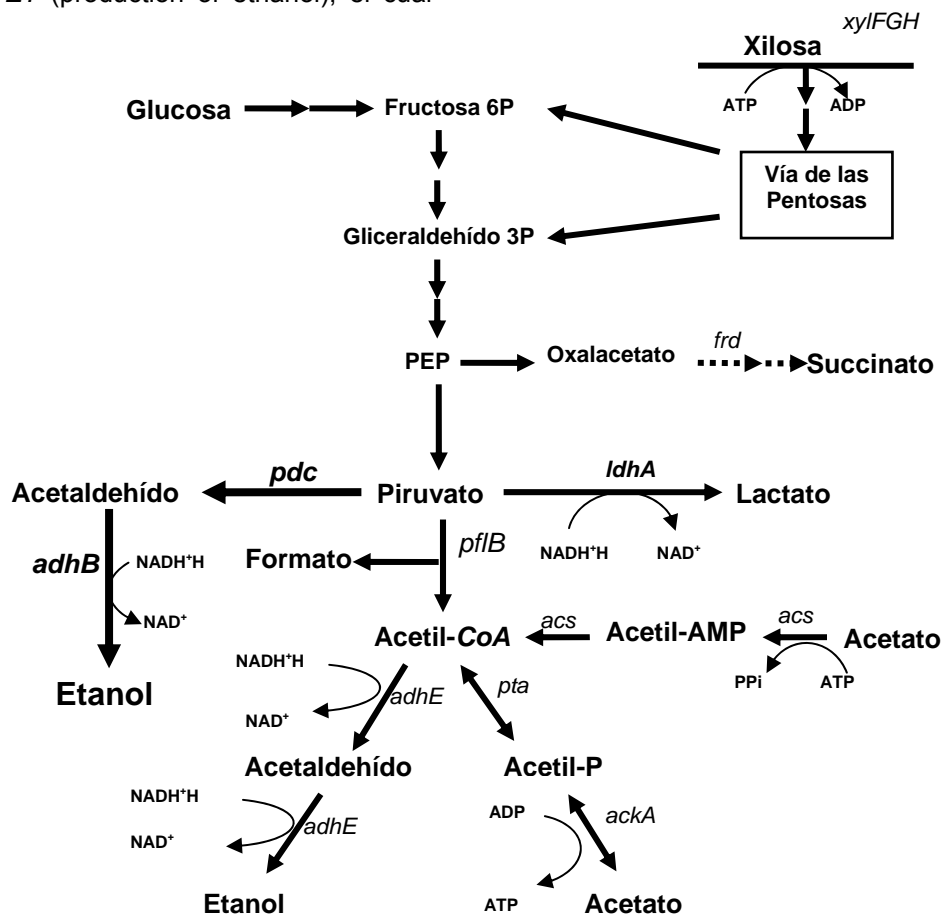


Fig. 5. Metabolismo fermentativo y vías de asimilación de glucosa y xilosa de *E. coli*. El operón *PET* consiste de los genes *pdh*, piruvato descarboxilasa y *adhB*, alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis*. Abreviaturas: *frd*, fumarato reductasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *pflB*, piruvato formato liasa; *ldhA*, lactato deshidrogenasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *ackA*, acetato cinasa; *acs*, acetil-CoA sintetasa, *xyIFGH* transportador de xilosa ABC dependiente de ATP de *E. coli*.

reductasa, impidiéndole generar succinato a partir de fumarato en anaerobiosis (Ohta *et al.*, 1991a). Se ha encontrado que cuando KO11 es cultivada utilizando hidrolizados de hemicelulosa de bagazo de caña o medios minerales suplementados con glucosa y xilosa, la cepa sólo alcanza rendimientos de etanol menores al 70% del teórico, en comparación al 95% alcanzado en medios ricos (Huerta *et al.*, 2007). Esto se debe a que parte del carbono se desvía a la producción de ácidos orgánicos como lactato y acetato. Esto ha dado origen a la generación de variantes de esta cepa. Mientras que la productividad de etanol con la cepa KO11 es similar a la obtenida con levaduras en cultivos lote, la tolerancia al etanol es mucho menor. Utilizando esta misma cepa, se seleccionaron por evolución metabólica en medio líquido, mutantes con un incremento en la tolerancia al etanol, así como en medio sólido, con un incremento en su producción. Como resultado de esta evolución, se obtuvo la cepa *E. coli* LY01, capaz de crecer en presencia de 50 g/l de etanol (Jarboe *et al.*, 2007).

Otras cepas modificadas genéticamente de *E. coli*, incluyen las denominadas *E. coli* FBR1 y FBR2, las cuales fueron construidas transformando la cepa FMJ39 (*E. coli* Δpfl , Δldh) con dos conversiones del operón *PET* (conteniendo los genes *pdh* y *adh* de la vía etanológica de *Z. mobilis*), respectivamente. Una ventaja de estas cepas es que la única vía que tienen para oxidar el NADH es la vía heteróloga para la producción de etanol. Razón por la cual en condiciones anaerobias estas cepas son

estables, debido a que requieren del plásmido para poder sobrevivir (Hespell *et al.*, 1996).

Una tercera generación de cepas etanológicas derivadas de *E. coli*, incluye interrupciones en todos los genes que codifican para enzimas que catalizan reacciones hacia la formación de productos de fermentación y que compiten con la disponibilidad de piruvato para ser convertido en etanol por la vía heteróloga. Un ejemplo de esto es la cepa LY160, derivada de *E. coli* KO11, con el genotipo: $\Delta adhE$, $\Delta ackA$, $\Delta ldhA$, $PrrIE::pdc_{Zm}-adhA_{Zm}-adhB_{Zm}$, $\Delta mgsA$ (Fig. 5) a la cual se le insertó el operón conteniendo los genes *pdh*, *adhA* y *adhB* de *Z. mobilis* mediante un transposón bajo el promotor ribosomal *rrnB*. Esta cepa ha demostrado ser eficiente al crecer en medio mineral con 1 mM de betaína suplementado con 9% de xilosa con rendimientos del 95% del teórico máximo (0.51 g de etanol por g de azúcar) (Martinez *et al.*, 2007; Yomano *et al.*, 2008).

La capacidad de estas cepas de *E. coli* para la producción de etanol a partir de la biomasa ha sido demostrada con múltiples sustratos como bagazo de caña, residuos agroindustriales, madera, etc (a nivel laboratorio). Los rendimientos, con respecto al teórico, se encuentran entre el 70% -100% dependiendo medio utilizado: medios complejos con glucosa o xilosa; mezclas de estos azúcares en medios minerales; y fermentación de todos los azúcares que se encuentran en hidrolizados de hemicelulosa con alto contenido de pentosas (Jarboe *et al.*, 2007). No obstante una de las principales

limitantes aún para que *E. coli* sea aplicada a nivel industrial para producir etanol es su baja tolerancia al mismo etanol. Actualmente, de forma independiente dos compañías, una de Japón y otra de los EUA, están utilizando cepas etanológicas de *E. coli* para demostrar a escala semicomercial la producción de etanol a partir de lignocelulosa.

Zymomonas mobilis

Uno de los microorganismos más estudiado para la producción de etanol es la bacteria Gram negativa (*Z. mobilis*), ésta presenta mayores tasas específicas de consumo de azúcares y velocidades de producción de etanol que las levaduras. Además, *Z. mobilis* produce menos biomasa y presenta mayor tolerancia hacia el etanol (hasta 120 g/l) (Dien *et al.*, 2003). Desafortunadamente este microorganismo no puede asimilar las pentosas presentes en los jarabes de hemicelulosa. Diferentes cepas de *Z. mobilis* han sido modificadas con la finalidad de expresar enzimas hidrolíticas de microorganismos capaces de utilizar polímeros de glucosa. Gunasekaran & Chandra-Raj (1999) produjeron cepas con la capacidad de metabolizar tanto hexosas como pentosas.

Z. mobilis presenta altos rendimientos y productividades de etanol debido a que este microorganismo metaboliza la glucosa anaeróbicamente mediante la vía de Entner-Doudoroff (ED) en lugar de la de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Dien *et al.*, 2003). La vía ED genera sólo la mitad del ATP generado por la vía EMP por mol de glucosa,

como consecuencia, *Z. mobilis* genera menos biomasa y por lo tanto una mayor cantidad de carbono es dirigida hacia los productos de fermentación. Además, todas las enzimas relacionadas con la fermentación se expresan de manera constitutiva y comprenden aproximadamente el 50% de la biomasa (Sprenger, 1996).

Una limitante importante para el uso de *Z. mobilis* en la producción de etanol a partir de biomasa, es su capacidad de fermentar únicamente glucosa, fructosa y sacarosa (Dien *et al.*, 2003). Por lo que se han realizado diversos trabajos para lograr que este microorganismo pueda fermentar azúcares como xilosa y arabinosa.

Zhang *et al.* (1995) mediante la introducción y expresión de cuatro genes de *E. coli*: xilosa isomerasa (*xyIA*), xilulosa cinasa (*xyIB*), transcetolasa (*tktA*) y transaldolasa (*talB*), lograron obtener la cepa *Z. mobilis* (pZB5) capaz de fermentar xilosa y producir etanol con un rendimiento del 86%. Las enzimas xilosa isomerasa y xilulosa cinasa convierten a la xilosa en xilulosa-5-fosfato, intermediario en la vía de las pentosas fosfato, y posteriormente la transcetolasa y la transaldolasa convierten a la xilulosa-5-fosfato en intermediarios de la vía ED (Fig. 6).

Utilizando una estrategia similar, Deanda *et al.* (1996) lograron construir una cepa de *Z. mobilis* capaz de fermentar arabinosa a través de un plásmido que expresa cinco genes de *E. coli*: L-arabinosa isomerasa (*araA*), L-ribulosa cinasa (*araB*), L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa (*araD*), transcetolasa (*tktA*) y transaldolasa (*talB*). Los tres

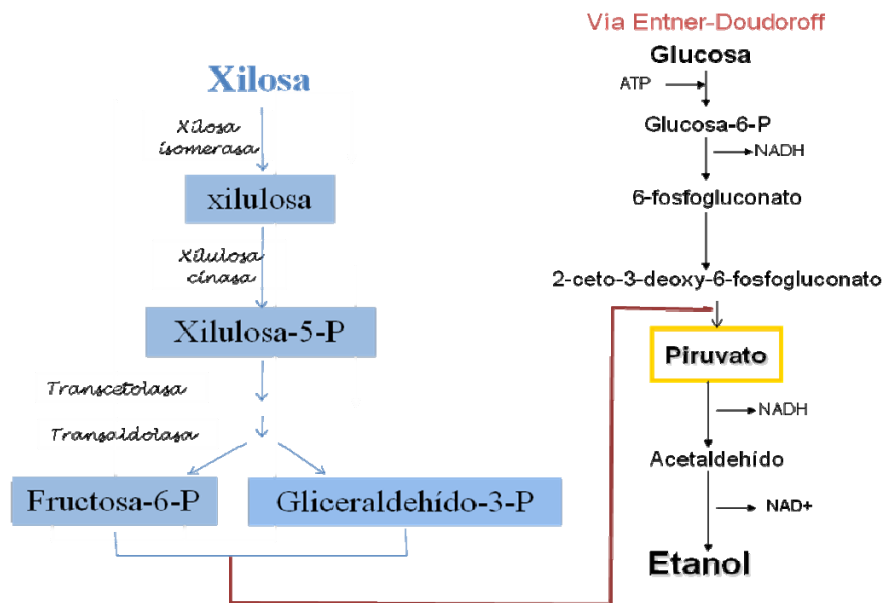


Fig. 6. Metabolismo fermentativo de glucosa a etanol de *Zymomonas mobilis* y vía heteróloga para el metabolismo de xilosa a piruvato.

primeros genes codifican para las enzimas responsables de convertir la arabinosa en xilulosa-5-fosfato, posteriormente este compuesto es convertido en intermediarios de la vía ED por la transcetolasa y la transaldolasa. La cepa obtenida, *Z. mobilis* ATCC39676 (pZB206), fue capaz de fermentar arabinosa a etanol con un rendimiento del 98% con respecto al teórico.

La cepa *Z. mobilis* AX101 construida por Zhang *et al.* (1995), tiene integrado en su genoma los 7 genes necesarios (antes mencionados) para metabolizar tanto xilosa como arabinosa. Esta cepa metaboliza la arabinosa a menor velocidad con respecto a la xilosa, y generalmente de forma incompleta (50% de la arabinosa inicial). Sin embargo, cuando *Z. mobilis* AX101 crece con mezclas de azúcares se ha observado que el rendimiento y la productividad de la fermentación de arabinosa se incrementan.

En cultivos que con 40 g/l de glucosa, 40 g/l de xilosa y 20 g/l de arabinosa, *Z. mobilis* AX101 logró fermentar el 100 % de la glucosa y xilosa inicial y el 75 % de la arabinosa en 50 h (Lawford & Rousseau, 2002; Mohagheghi *et al.*, 2002).

La principal desventaja de la cepa *Z. mobilis* AX101 radica en su baja tolerancia a los furanos, fenólicos y ácido acético, especialmente en presencia de etanol. El ácido acético se encuentra comúnmente en hidrolizados de hemicelulosa en concentraciones de 2 a 10 g/l. La adición de 2.5 g/l de ácido acético (pH 5.5) y 30 g/l de etanol en los cultivos generó una disminución en la producción de etanol a partir de xilosa cercana al 50% (Lawford & Rousseau, 2002). Por lo que es necesario mejorar la tolerancia de *Z. mobilis* AX101 hacia el ácido acético.

Klebsiella oxytoca

K. oxytoca es una bacteria entérica que ha sido aislada creciendo en papel y en madera. Este microorganismo es capaz de crecer en un pH tan bajo como 5 y a una temperatura de 35°C, puede utilizar para su crecimiento una gran variedad de azúcares incluidos hexosas y pentosas, así como celobiosa y celotriosa, lo cual lo hace muy interesante para producir etanol a partir de celulosa. En los procesos de sacarificación con celulasas las enzimas son inhibidas por la presencia de la celobiosa (Freer & Detroy, 1983), por lo tanto para realizar procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con *K. oxytoca* disminuiría la cantidad de celulasas que se agrega a los cultivos.

K. oxytoca fermenta la glucosa hacia una gran variedad de ácidos orgánicos y productos neutros. En particular la producción de etanol en *K. oxytoca* se lleva a cabo mediante la vía de la piruvato formato liasa (PFL). La introducción del operón PET (conteniendo los genes *pdh* y *adh* de la vía etanológica de *Z. mobilis*) en *K. oxytoca* (M5A1), logró aumentar la concentración de etanol hasta el 90% del total de productos de fermentación (Ohta *et al.*, 1991b). Esta cepa tiene a la vez la capacidad de fermentar xilosa tan rápido como la glucosa (2 g/l h), esto es aproximadamente 2 veces más rápido que la cepa *E. coli* KO11.

Wood & Ingram (1992) lograron integrar el operón PET en el cromosoma de *K. oxytoca* y tras métodos de mutagénesis y selección (con el objeto de incrementar su producción de etanol), la cepa resultante se denominó *K. oxytoca* P2 y tuvo la capacidad

de metabolizar glucosa (100 g/l) o celobiosa (100 g/l) en 48 horas, con producciones entre 44-45 g/l de etanol. También se han integrado en el cromosoma de esta bacteria dos genes de endoglucanasas extracelulares (*celZ* y *celY*) de *Erwinia chrysanthemi*, además del transportador auxiliar (*out*), la cepa celulolítica fue denominada *K. oxytoca* SZ21 (Zhou & Ingram, 2000). Esta cepa fue capaz de fermentar lentamente celulosa (Sigmacell 50), sin la necesidad de agregar celulasas adicionales (Zhou *et al.*, 2001).

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae es la levadura que se utiliza por excelencia para la producción de etanol, ésta, a pesar de ser un microorganismo etanológico por naturaleza, es incapaz de metabolizar pentosas. Por lo que uno de los grandes retos a desarrollar, es la expansión de los azúcares fermentables a utilizar por *S. cerevisiae* (van Maris *et al.*, 2006).

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* pueden fermentar glucosa, manosa y fructosa, así como los disacáridos sacarosa y maltosa a través de la vía EMP, mientras que en el caso de la D-galactosa, ésta se metaboliza por la acción conjunta de la vía Leloir y la glucólisis (van Maris *et al.*, 2006). Por su parte, la producción de etanol a partir de otras fuentes de carbono (D-xilosa, L-arabinosa, ácido galacturónico y L-ramnosa), requiere de una extensa investigación y aplicación de ingeniería vías metabólicas para que las pueda metabolizar hacia etanol.

A pesar de que *S. cerevisiae* no puede fermentar ni asimilar xilosa, ésta no es una característica general para todas las levaduras. Sólo un pequeño número de levaduras facultativas pueden metabolizar dicho azúcar y fermentarlo hasta etanol, esto gracias a la acción conjunta de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, que convierten la D-xilosa en xilitol, y éste último

en D-xilulosa, respectivamente (Fig. 7). Sin embargo, debido a que ambas enzimas tienen especificidad por diferentes cofactores (NADPH y NADH respectivamente, aunque la xilosa reductasa puede utilizar ambos), existe un desequilibrio redox que al no ser balanceado, puede ocasionar que la xilosa no sea fermentada (van Maris *et al.*, 2006).

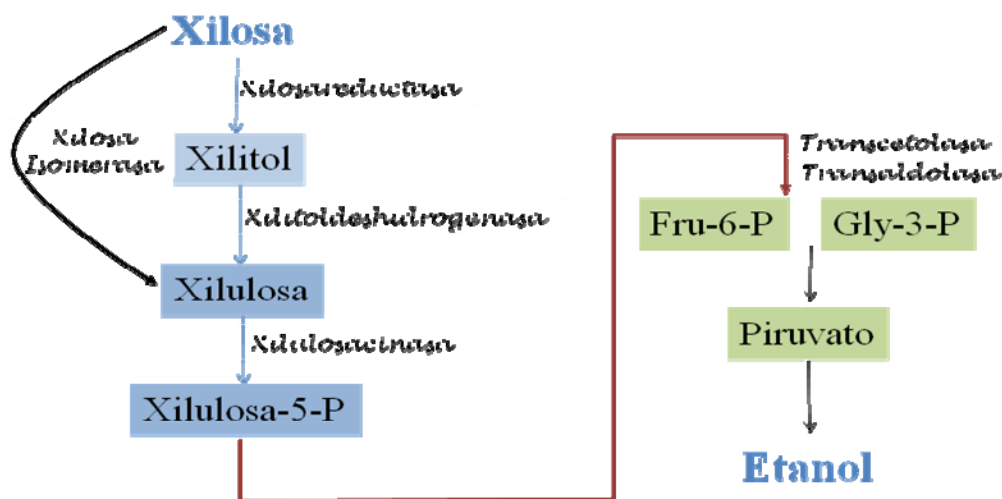


Fig. 7. Vía heteróloga para la utilización de xilosa y su metabolismo hacia la vía Embden-Meyerhof-Parnas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Debido a que *S. cerevisiae* es capaz de metabolizar xilulosa, una de las alternativas para la producción de etanol a partir de xilosa, es la introducción de una enzima heteróloga capaz de convertir la xilosa en xilulosa sin generar desbalances de cofactores. Una estrategia de este tipo se puede llevar a cabo utilizando la xilosa isomerasa, enzima que tiene la capacidad de

convertir la D-xilosa en D-xilulosa en una reacción de oxido-reducción neutra (Fig. 7). Sin embargo, la introducción de esta enzima no ha tenido resultados satisfactorios, lo cual se debe a plegamientos incorrectos de la proteína expresada, modificaciones postraduccionales, formación de puentes disulfuro y el pH interno de la levadura.

Una excepción a esta investigación, fue la expresión de la enzima xilosa isomerasa (*xylA*) de la bacteria *Thermus thermophilus*, ésta fue la primera xilosa isomerasa funcional en ser expresada en *S. cerevisiae*, no obstante, la actividad de dicha enzima a la temperatura de crecimiento de la levadura, no fue lo suficientemente alta como para permitir la fermentación eficiente de la xilosa (van Maris *et al.*, 2006). Por otra parte, se logró expresar satisfactoriamente la xilosa isomerasa del hongo *Piromyces* sp. E2 en la cepa *S. cerevisiae* RWB 202 permitiendo con ello el crecimiento en xilosa como única fuente de carbono, sin embargo es necesario utilizar condiciones aeróbicas para que pueda crecer y metabolizar la xilosa. Posteriormente, esta cepa se sometió a evolución metabólica, resultando la cepa *S. cerevisiae* RWB 202-AFX capaz de crecer en anaerobiosis, produciendo principalmente etanol, CO₂, glicerol y biomasa, y pequeñas cantidades de xilitol a partir de xilosa como única fuente de carbono (van Maris *et al.*, 2006). Sin embargo, la tasa de producción de etanol de esta nueva cepa (0.14 g/g célula-h) fue aún muy baja como para ser considerada en aplicaciones industriales, por lo que además de la expresión del gene *xylA*, se sobreexpresaron todos los genes involucrados en la conversión de xilosa en intermediarios de la glucólisis. Esta nueva cepa denominada *S. cerevisiae* RWB 217 sobreexpresa las enzimas: xilulocinasa (*xyl3*), ribulosa 5-fosfato isomerasa (*araA*), ribulosa 5-fosfato epimerasa (*araD*), transcetolasa (*tktA*) y transaldolasa (*talB*); así mismo, el gen que codifica para la aldosa

reductasa se eliminó para minimizar la producción de xilitol (van Maris *et al.*, 2006). La cepa resultante crece en condiciones anaerobias y hasta este momento presenta la tasa de producción específica de etanol más alta reportada utilizando xilosa (0.46 g/g célula-h).

Con el objetivo de mejorar el consumo de xilosa de esta última cepa en mezclas de glucosa-xilosa, a ésta se le sometió a evolución metabólica en una primera etapa por 85 generaciones en un quimiostato limitado de xilosa. Posteriormente este cultivo se utilizó para inocular un cultivo lote con una mezcla de glucosa-xilosa y de ahí se obtuvo la cepa *S. cerevisiae* RWB 218 que es capaz de fermentar ambos azúcares (20 g/l de cada uno) en 24 horas. Al utilizar xilosa como única fuente de carbono, esta cepa presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.12 h⁻¹, de consumo de xilosa de 1.2 g/g célula-h y una tasa de producción de etanol de 0.49 g/g célula h.

Al igual que la xilosa, sólo un número reducido de especies de levaduras pueden de manera natural asimilar L-arabinosa y fermentarla a etanol bajo condiciones microaerobias. Sin embargo, el período de fermentación es muy largo, entre 7-14 días. La vía de asimilación de la arabinosa ha sido descrita en los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* por acción de las enzimas: aldosa (xilosa) reductasa (*GRE3*), L-arabinitol 4-deshidrogenasa (*lad1*), L-xilulosa reductasa (*lxr1*), D-xilulosa reductasa y D-xilulocinasa (*XKS1*). De manera similar a lo que sucede con la vía de asimilación de xilosa, estas enzimas

presentan afinidad por diferentes cofactores, lo que resulta en un desequilibrio redox bajo condiciones anaerobias.

La primera cepa de *S. cerevisiae* en producir etanol a partir de arabinosa, sobre expresó todos los genes estructurales de la vía de asimilación de arabinosa de hongos, sin embargo, esta cepa únicamente produjo 0.35 mg de etanol/g célula-h en condiciones anaerobias, debido probablemente a los desbalances en los cofactores redox (van Maris *et al.*, 2006).

Una alternativa para la generación de una cepa de *S. cerevisiae* fermentadora de arabinosa es la sobreexpresión de la vía de utilización de arabinosa en bacterias (Fig. 8). En los primeros pasos de esta vía no están involucradas reacciones redox, y son las enzimas L-arabinosa isomerasa, L-ribulocinasa y L-ribulosa 5-fosfato 4-epimerasa, las encargadas de convertir la L-arabinosa a L-ribulosa, L-ribulosa-5-P y D-xilulosa-5-P respectivamente. Cada una de estas enzimas está codificada por los genes

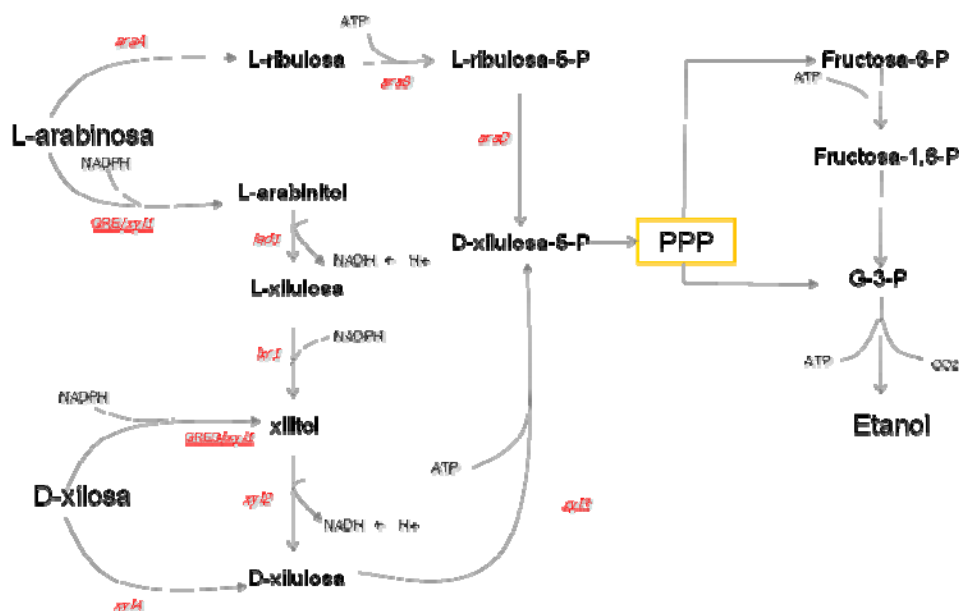


Fig. 8. Metabolismo de D-xilosa y L-arabinosa para cepas modificadas por ingeniería de vías metabólicas en *S. cerevisiae*. Las letras en cursiva son los nombres de los genes que codifican para las enzimas. Las enzimas subrayadas no se encuentran presentes en el metabolismo de la levadura progenitora. GRE3/*xy1*, aldosa/xilosa reductasa; *xy2*, xilitol deshidrogenasa; *xy3*, xilulocinasa; *xyA*, xilosa isomerasa; *lad1*, arabinitol 4-deshidrogenasa; *lxr1*, L-xilulosa reductasa; *araA*, L-arabinosa isomerasa; *araB*, L-ribulocinasa; *araD*, L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa; G-3-P, gliceraldehído-3-fosfato; PPP, ruta de las pentosas fosfato.

araA, *araB* y *araD*, los cuales fueron expresados en *S. cerevisiae*, no obstante, esta cepa únicamente acumuló L-arabinitol y no produjo etanol a partir de arabinosa (van

Maris *et al.*, 2006). Utilizando una estrategia similar y junto con la sobreexpresión de un gen que codifica para una permeasa de galactosa de levadura (*GAL2*), se sometió a

esta cepa a evolución metabólica bajo condiciones limitadas de oxígeno. La tasa específica de producción de etanol a partir de arabinosa de la cepa evolucionada fue entre 0.06-0.08 g/g célula-h y el rendimiento del 60% con respecto al máximo teórico (van Maris *et al.*, 2006). A pesar de los resultados obtenidos, la sobre expresión de la vía de arabinosa bacteriana, resulta una de las alternativas más promisorias para generar cepas de *S. cerevisiae* capaces de producir etanol a partir de este azúcar.

CONCLUSIONES

Con la valoración de los datos integrados en la presente revisión se pone de manifiesto que si bien, el etanol carburante no es la única solución a la problemática energética y ambiental, ha probado ser una alternativa sólida y suficientemente madura, como en el caso de Brasil, para atenuar de manera transitoria la escasez inminente de los combustibles fósiles, participar de la transición energética de combustibles fósiles a renovables y permitir a la vez el desarrollo de nuevas formas de bioenergía, con mayor sustentabilidad, más limpias, con mejor rendimiento energético y además que satisfagan la demanda de combustibles sin competir con el abasto de alimentos.

No podemos ignorar que la producción de bioetanol actualmente implementada compite con la industria alimenticia y que su tecnología requiere optimizarse. Por lo que para contender con lo anterior, es necesario implementar a nivel industrial el uso de lignocelulosa y mejorar varios aspectos para el aprovechamiento de la misma, tales como

la optimización de las condiciones de hidrólisis, la eliminación de inhibidores generados y la generación de microorganismos etanológicos, ya que la biomasa representa una materia prima más barata, con un alto contenido de azúcares fermentables, no interviene con el sector alimenticio y no se requiere de la sobreexplotación del suelo. El uso de la biología molecular, la ingeniería de vías metabólicas y la evolución dirigida, han permitido la obtención de diferentes cepas bacterianas capaces de producir etanol con elevados rendimientos, resistiendo concentraciones elevadas de etanol e inhibidores, además de fermentar tanto hexosas, pentosas y polisacáridos como la celulosa.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia Tecnología – México a través de los proyectos FOMIX Estado de Morelos: MOR-2007-CO1-80360 y Red de Fuentes de Energía; así como del Proyecto UNAM-PAPIIT-DGAPA: IN220908.

REFERENCIAS

- Cala Hederich & David F(2007). Entropía y Biocombustibles. Seminario Taller Nacional Biocombustibles sostenibles para Colombia, Centro de Convenciones Quirama, Carmen de Vivalora.
- Deanda K, Zhang M, Eddy C & Picataggio S (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4465-4470.

Artículos

- Dien BS, Cotta MA & Jeffries TW (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol: Current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 258-266.
- Gray KA, Zhao L & Emptage M (2006) Bioethanol. *Current Opinion Chem. Biol.* 10: 141-146.
- Gunasekaran G & Chandra Raj K (1999) Ethanol fermentation technology- *Zymomonasmobilis*. *Curr. Sci.* 77: 56-68.
- Freer SN & Detroy RW (1983) Characterization of cellobiose fermentations to ethanol by yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 541-557.
- Galbe M & Zacchi G (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628.
- Hespell RB, Wyckoff H, Dien BS & Bothast RJ (1996) Stabilization of pet operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4594-4597.
- Huerta-Beristain G, Utrilla-Carreri J, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G & Martínez A (2008) Specific ethanol production rate in ethanogenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15: 55-64.
- Ingram LO & Buttke TM (1984) Effects of alcohols on micro-organisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 25: 253-300.
- Ingram LO, Gomez PF, Lai X, Moniruzzaman M, Wood BE, Yomano LP & York SW (1998) Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 58: 204-214.
- Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martínez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW, Zaldivar J & Zhou S (1999). Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. *Biotechnol. Prog.* 15: 855-866.
- Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, Shanmugan KT & Ingram LO (2007) Development of ethanogenic bacteria. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol.* 108: 237-261.
- Lawford HG & Rousseau JD (2002) Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for co-fermentation of glucose, xylose and arabinose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 429-448.
- Mohagheghi A, Evans K, Chou YC & Zhang M (2002) Co-fermentation of glucose, xylose and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 885-898.
- Martínez A, Rodríguez ME, Wells ML, York SW, Preston JF & Ingram LO (2001) Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol. Prog.* 17:287-293.
- Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2002) Biotecnología energética sustentable: Etanol carburante para el transporte. *Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México*. Número 617, páginas centrales.
- Martínez A, Rodríguez Alegría ME, López-Munguía CA & Gosset LG (2006) ¿Etanol

Artículos

- carburante a partir de bagazo de caña? *Claridades Agropecuarias*. Publicación Mensual de la SAGARPA (Julio)pp. 33-39.
- Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol. Lett.* 29:397-404.
- Mielenz JR (2001) Ethanol production from biomass: Technology and commercialization status. *Curr. Op. Microbiol.*4: 324-329.
- Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT & Ingram LO (1991a) Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.*57: 893-900.
- Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT & Ingram LO (1991b) Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol-production from xylose and glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2810-2815.
- Pataro C, Guerra JB, Petrillo-Peixoto ML, Mendonça-Hagler LC, LinardiVR& Rosa CA (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *S. cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in *BrazilianJ.* *Appl. Microbiol.*89: 24-31.
- Saha BC (2004) Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. *In: Lignocellulose Biodegradation*. Saha BC, Hayashi K (eds). American Chemical Society, Washington. DC. pp. 2-34.
- Saha BC & Cotta MA (2008) Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass. Bioener.* 32: 971-977.
- Schifter I, Vera M, Díaz L, Guzmán E, Ramos F & López-Salinas E (2001) Environmental implications on the oxygenation of gasoline with ethanol in the metropolitan area of Mexico city. *Environ.Sci. Technol.* 35: 1893-1901.
- Schwan RF, Mendonça AT, Silva JJ, Rodrigues V & Wheals AE (2001) Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentation. *Antonie van Leeuwenhoeck.* 79: 89-96.
- Sprenger GA (1996) Carbohydrate metabolism in *Zymomonasmobilis*: A catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.*145: 301-307.
- Sun Y & Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83:1-11.
- van Maris AJ, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik MA, Wisselink HW, Scheffers WA, van Dijken JP & Pronk JT (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoeck.*90: 391-418.
- Vasconcelos JN, Lopes CE & França FP (2004) Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane

Artículos

- stalks. *Brazilian J. Chem. Eng.* 21: 357-365.
- Wheals AE, Basso LC, Alves DMG & Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* 17: 482-487.
- Wood BE & Ingram LO (1992) Ethanol-production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomal integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol-production and plasmids expressing thermoestable cellulose genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2103-2110.
- World Population Prospects, UNO. The 2006 revision population data base. www.un.org/esa/population/publications
- Xu TJ, Zhao XQ & Bai FW (2005) Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enz. Microb. Technol.* 37: 634-640.
- Yomano LP, York SW, Zhou S, Shanmugam KT & Ingram LO (2008) Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 30: 2097-2103.
- Zaldivar J, Martínez A & Ingram LO (1999) Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 24-33.
- Zaldivar J & Ingram LO (1999) Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 66: 203-210.
- Zaldivar J, Nielsen J, & Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34.
- Zhang M, Eddy C, de Anda K, Finkenstein M & Picataggio S (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Sci.* 267: 240-243.
- Zhou S & Ingram LO (2000) Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bac.* 182: 5676-5682.
- Zhou S, Davis FC & Ingram LO (2001) Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (celY) and CelZ (celZ) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 6-14.