



Universidad Zaragoza

**Trabajo de fin de grado: “Hidrólisis enzimática para
producción de biocombustibles: revisión bibliográfica de
procesos”**

Grado en biotecnología

Facultad de Ciencias

2021

Autor: Darío Bazco Marco

Tutor: Jaime Soler Herrero

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	5
2.- ABSTRACT.....	5
3.- NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO.....	5
4.- METODOLOGÍA.....	6
5.- INTRODUCCIÓN.....	6
5.1.- DEFINICIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	7
5.2.- CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES.....	7
6.- BIOCOMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	8
6.1.- BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	9
6.2.- PRINCIPALES BIOCOMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	10
7.- PRODUCCIÓN BIOETANOL/BIOBUTANOL.....	11
7.1.- RETRATAMIENTOS DE LA MATERIA PRIMA LIGNOCELULÓSICA....	11
7.1.1.-PRETRATAMIENTOS FÍSICOS.....	11
7.1.2.-PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS.....	12
7.1.3.- PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	13
7.1.4.-PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS.....	14
7.2.- INTRODUCCIÓN A LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	15
7.3.-FERMENTACIÓN.....	15
7.4.-SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN.....	16
8.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	16
8.1.-ORGANISMOS Y ENZIMAS PRINCIPALES.....	16
8.2.- CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	19
8.3.-EFECTOS INHIBITORIOS EN LA HIDRÓLISIS.....	21
9.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	22
10.- CONCLUSIONES.....	23
11.- CONCLUSIONS.....	23
12.- BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I.....	24
ANEXO 2.....	29
ANEXO 3.....	32
ANEXO 4.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Concentración de azúcares tras la hidrólisis enzimática de la pulpa de remolacha sin pretratar	30
TABLA 2: Concentración de los azúcares tras la hidrólisis enzimática de la pulpa de remolacha pretratada con ácido sulfúrico concentrado	31
TABLA 3: Condiciones, reactivos y procedimientos llevados a cabo en la producción de biobutanol a partir de la pulpa de remolacha	31
TABLA 4: Tipos de biomasa según su composición	32
TABLA 5: Tabla de países más productores y consumidores de biodiésel	32
TABLA 6: Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de caña de azúcar crudo e hidrolizado.....	34
TABLA 7: Producción de bioetanol de 2G	35
TABLA 8: Ventajas y desventajas de los pretratamientos de la lignocelulosa.....	36

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1: Documentos depositados en ScienceDirect desde 1998 con la palabra “biofuel”	25
ILUSTRACIÓN 2: Documentos depositados en Scopus desde 1998 con la palabra “biofuel”.....	25
ILUSTRACIÓN 3: Autores que han depositado artículos en Scopus con la palabra “biofuel”	26
ILUSTRACIÓN 4: Países con mayor número de documentos con la palabra “biofuel” en Scopus	26
ILUSTRACIÓN 5: Áreas a las que pertenecen los documentos depositados en Scopus hasta la fecha con la palabra “biofuel”	27
ILUSTRACIÓN 6: Documentos depositados en Scopus con la palabra “bioethanol”	27
ILUSTRACIÓN 7: Áreas a las que pertenecen los documentos depositados en Scopus hasta la fecha con la palabra “bioethanol”	28

ILUSTRACIÓN 8: Áreas a las que pertenecen los documentos depositados en Scopus hasta la fecha con las palabras “enzymatic hydrolysis”	28
ILUSTRACIÓN 9: Áreas a las que pertenecen los documentos depositados en Scopus hasta la fecha con las palabras “biofuel AND enzymatic hydrolysis”	29
ILUSTRACIÓN 10: Esquema del proceso de producción de bioetanol	30
ILUSTRACIÓN 11: Consumo de biocombustibles fósiles de algunos países y su producción.....	32
ILUSTRACIÓN 12: Consumo de combustibles fósiles por persona en Pakistán hasta el año 2017.....	33
ILUSTRACIÓN 13: Países por producción de etanol en 2018	33
ILUSTRACIÓN 14: Comparación de los rendimientos del proceso de producción de bioetanol 2G según la materia prima utilizada.....	36

1. RESUMEN

La constante creciente masa poblacional del planeta exige cada vez una mayor oferta de energía capaz de abastecer la demanda de toda la población mundial. Esta energía debe ser obtenida de la materia de forma eficiente y rentable. Hasta los últimos años, se han explotado los recursos del planeta teniendo en cuenta su rentabilidad económica y una alta eficiencia en su producción. Todo esto ha ocasionado un evidente agotamiento de los recursos y la necesidad de buscar fuentes alternativas de energía, entre las que se encuentran los biocombustibles. En esta revisión bibliográfica se pretende encontrar una forma de producción de biocombustibles de segunda generación utilizando la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica, que ofrece un amplio abanico de posibilidades económicas, no contaminantes y altamente eficientes de obtener energía de manera limpia, barata y segura. Para ello se ha expuesto la forma de realizar esta degradación de la lignocelulosa proveniente de la biomasa, que en muchos casos dificulta la hidrólisis de la celulosa para la producción de material aprovechable.

La forma de evitar estos obstáculos se centra en los pretratamientos de esa biomasa lignocelulósica, para su posterior hidrólisis en unas condiciones determinadas que se detallan, y utilizando enzimas dependiendo de esas condiciones.

Para finalizar, se presentan las principales oportunidades que ofrece este campo y una visión global de los problemas y las ventajas de utilizar esta nueva vía para la obtención de biocombustibles.

2. ABSTRACT

The constantly growing population mass of the planet demands an ever greater supply of energy capable of supplying the demand of the entire world population. This energy must be obtained from matter in an efficient and profitable way. Until recent years, the planet's resources have been exploited considering its economic profitability and a high efficiency in its production. All this has led to an obvious depletion of resources and the need to seek for alternative sources of energy, including biofuels. This bibliographic review aims to find a way to produce second-generation biofuels using enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, which offers a wide range of economic, non-polluting and highly efficient possibilities to obtain energy in a clean, cheap and safe way. Due to this, the way to carry out this degradation of lignocellulose from biomass has been exposed, which in many cases hinders the hydrolysis of cellulose for the production of usable material.

The main way to avoid these obstacles focuses on the pretreatments of this lignocellulosic biomass, for its subsequent hydrolysis under certain conditions that are detailed, and using enzymes depending on those conditions. Finally, the main opportunities offered by this field, a global vision of the problems and the advantages of using this new way to obtain biofuels are presented.

3. NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO

Realizando una primera búsqueda en ScienceDirect con la palabra clave “biofuel” encontramos un total de 84.188 resultados, de los cuales 12.577 tienen que ver con la hidrólisis enzimática, y 8.072 de ellos tratan sobre los pretratamientos que se llevan a cabo antes de la hidrólisis. Del amplio campo de los nuevos métodos de obtención de energía, vemos que los de obtención de

biocombustibles de segunda generación representan una pequeña parte del total, y aún más el proceso de hidrólisis enzimática para la obtención de los mismos.

Se vienen publicando numerosos artículos sobre la producción de biocombustibles, sobre todo a partir del siglo XXI, y en los que las palabras más recurrentes son “bioethanol” con 21.603 documentos relacionados, “pretreatment” con 16.045, o incluso “enzymatic” con 18.907. También encontramos palabras como “lignocellulose”, que aparece en 8.686 documentos, o la mayoritaria, “biomass” que está presente en 57.606. Como acaban de mostrar los resultados de las búsquedas, la obtención de biocombustibles se centra sobre todo en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, detallando además los pretratamientos y métodos previos a su producción, entre los que se encuentra la hidrólisis enzimática.

Si ordenamos en Scopus por antigüedad de artículos sobre biocombustibles (“biofuel”), los más antiguos datan de 1972, y no existen muchos de esos primeros años, de un total de 74.463 documentos que encuentra el buscador. Los primeros documentos se centran en electrodos con glucosa o con perspectivas encaminadas más hacia el futuro, por lo que se ve que no era un problema que la sociedad viera tan urgente por aquel entonces como se presenta ahora. También en Scopus, si filtramos por “enzymatic AND hydrolysis AND biofuel” vemos un total de 2721 documentos, y el más antiguo data de 1997.

Por tanto, hay una gran cantidad de artículos que versan sobre la producción de biocombustibles a través de distintas enzimas o cócteles enzimáticos. Pero, en comparación con otros campos o ámbitos de investigación, es un tema relativamente novedoso y no tan bien estandarizado como otras vías de obtención de biocombustibles. De aquí es de donde surge la necesidad de realizar este TFG, en el que se va a tratar de recopilar toda la información posible para identificar los principales métodos usados para estos procesos, qué material utilizan y cuáles son sus ventajas e inconvenientes; esperamos así que sea posible determinar las condiciones y metodologías óptimas para la producción de biocombustibles a través de la hidrólisis enzimática.

4. METODOLOGÍA

Una vez claro el objetivo establecido, llevamos a cabo una serie de búsquedas con palabras clave presentes en la hidrólisis enzimática, la producción de biocombustibles de 2ª generación, las enzimas utilizadas, en qué se centran los procesos de hidrólisis en este ámbito, etc. Para todo ello, las bases utilizadas fueron Alcorze, Scopus, Dialnet, ScienceDirect, Google Scholar, Mendeley y Researchgate, así como reservorios de TFG de otras universidades.

Después de un número considerable de búsquedas de fuentes contrastadas, llegó el momento de la selección de la información más importante para este estudio, de entre revistas, tesis doctorales, otros TFGs, artículos, etc. Con toda esta información seleccionada y desordenada, surge la necesidad de organizarla según unos criterios que sigan la estructura que buscamos en el TFG, por lo que se escogen en cada momento los documentos que mejor recojan la información requerida por el apartado del trabajo en el que se esté trabajando. La última dificultad añadida que encontramos fue el hecho de expresar todas esas ideas, esa información y las conclusiones y nuevas posibilidades de manera clara y concisa con el fin de facilitar su comprensión y amenizar su lectura.

5. INTRODUCCIÓN

El crecimiento demográfico actual está llevando al planeta al límite, no sólo por el calentamiento global, cada vez más insostenible, sino por el agotamiento de los recursos naturales, entre ellos los combustibles fósiles, que generan la mayor parte de la energía de cada país, especialmente en aquellos más pobres(1). Esto se debe al rápido aumento de la población mundial a partir del siglo XIX, hasta el cual no se superaron los 1.000 millones de habitantes, pero tras el cual se alcanzan los 7.000 millones en poco más de medio siglo. A este ritmo, se prevé que se superen los 9.300 millones de habitantes en 2.050 o los 10.100 millones en 2.100(2).

En la actualidad, un 94% de la energía utilizada por el sector del transporte proviene del petróleo, y sólo un 5% del gas natural y un 1% de biocombustibles. El petróleo copa el mercado de las reservas de energía utilizadas en todo el mundo y, a pesar de que la fuente no parece que vaya a terminarse tan pronto como se esperaba, el problema radica en si la velocidad de procesamiento y distribución del mismo será suficiente para abastecer el mercado en unas décadas(2).

Estos problemas generan un inminente agotamiento de las fuentes de energía, y han obligado a buscar nuevas fuentes alternativas, como son los biocombustibles, los cuales presentan una vía de obtención de energía más limpia y renovable. Una fuente renovable permite su uso casi ilimitado para abastecer a la población, y se presentan como las grandes candidatas a salvar al planeta de su agotamiento(2,3). Una vez establecido el objetivo de cambiar las fuentes de energía no renovables por otras que sí que lo son, el reto que se presenta es el de utilizar esta nueva forma de obtención de energía de manera económica, ecológica y eficiente, además de poder hacerlo con unas técnicas disponibles o posibles de adquirir(4-7).

5.1 DEFINICIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles, por definición, comprenden aquellos combustibles que se obtienen a partir de biomasa. Según la Directiva 2009/28/CE del fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, se entiende por biomasa a la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias (tanto vegetales como animales), de la silvicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales municipales(8,9). Además, en esta directiva, se fija el objetivo de que el 10% de la energía utilizada en el transporte en el año 2020 proceda de fuentes renovables. Por ejemplo, en la Directiva 2009/30/CE del 23 de abril de 2009 se fija el objetivo de reducir un 6% las emisiones de gases de efecto invernadero en el sector del transporte. También se definen los biocombustibles como los biocarburantes que provienen de compuestos orgánicos de base celulósica extraída de plantas(8).

5.2 CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES

Según la biomasa que se utilice para generarlos tendremos las 4 clases distintas de biocombustibles(4,9-21):

1. **Biocombustibles de 1ª generación:** se obtienen de cultivos agrícolas como la caña de azúcar, trigo, cebada o maíz, remolacha o cultivos de aceites como la palma o el girasol. Su producción comenzó en los años 90, cuando agricultores de maíz estadounidenses sintetizaron combustible a partir de maíz para alimentar la maquinaria que utilizaban. Es un proceso de conversión bastante simple y barato, pero presenta un rendimiento bajo, además del dilema que presenta el hecho de utilizar campos de cultivo para

producción de biocombustibles en vez de producir alimentos, o de la deforestación que dejan a su paso(8,22,23).

2. **Biocombustibles de 2ª generación:** a principios del siglo XXI entran al mercado los biocombustibles de segunda generación, que son producidos a partir de residuos sólidos agrícolas o urbanos (en concreto se utilizan los componentes orgánicos de estos residuos)(24–26), además de biomasa lignocelulósica, proveniente de paja de cereal, bagazo de caña de azúcar. En este caso, al utilizar residuos como materia para la producción, no se compite con los cultivos dedicados a la alimentación, lo que les confiere una ventaja con respecto a los de 1ª generación. El problema que presentan es la necesidad de pretratamiento de la materia prima para conseguir el biocombustible de manera rentable y eficiente, y los costes y la dificultad de estos pretratamientos son elevados. Pertenecen a esta segunda generación el biodiésel sintético, el octanol, el metanol, o el biobutanol. Este último se utilizaría para sustituir a la gasolina, debido a su contenido energético mayor que el del biodiésel(13,27).
3. **Biocombustibles de 3ª generación:** son considerados más energéticos respecto a las generaciones anteriores. Son producidos a partir de microalgas o cianobacterias que se cultivan en tanques o lagunas y que tienen una alta tasa de crecimiento y sin afectar a cultivos destinados a alimentación. Es una energía fácil de producir, pero implica un coste elevado, posibilidad de contaminación al crecer los cultivos y también un alto aporte de energía para el mantenimiento de estos cultivos(9,28–30).
4. **Biocombustibles de 4ª generación:** consiste en el cultivo de microalgas fundamentalmente, pero en este caso se modifican genéticamente para solventar algunos de los problemas que presentaban los combustibles de 3ª generación. Tienen un mayor rendimiento y contienen mayor cantidad de lípidos, pero su limitación es la necesidad de una inversión inicial alta, además de la necesidad de seguir investigando en este campo debido a su reciente descubrimiento(31,32).

De las cuatro generaciones de biocombustibles ya nombradas, la primera es la que, por desgracia, sigue siendo la más utilizada. Pese a este hecho, la producción de combustibles de 2ª generación, procedentes de la biomasa lignocelulósica, está a la cabeza de las investigaciones y aun así es uno de los campos con más camino por recorrer(33,34). Esta revisión bibliográfica se va a focalizar en estos combustibles de 2ª generación y su proceso de producción, en especial la etapa de la hidrólisis enzimática, posterior a los pretratamientos y anterior a la fermentación(8,13,31,35).

6. BIOCOMBUSTIBLES DE 2ª GENERACIÓN

Como ya se ha descrito en el apartado anterior, pertenecen a este grupo los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica proveniente de paja de cereal o caña de azúcar o bagazo, entre otros(31,36–40). Presentan numerosas ventajas frente a los de primera generación, como la emisión prácticamente nula de dióxido de carbono durante el proceso, pero su mayor desventaja es la necesidad de ser sometidos a pretratamientos previos a la hidrólisis de los azúcares que degraden partes de esa biomasa que dificultan el proceso, como es la lignina(9,23,35).

6.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

El 75% de la biomasa vegetal está compuesta de polisacáridos. Dentro de la agricultura, hay un enorme porcentaje de azúcares que no se aprovecha para la alimentación debido a su naturaleza no comestible, por lo que la porción destinada a la industria alimentaria es mínima. La parte no digerible de los vegetales es la biomasa celulósica o lignocelulósica, y se utiliza tanto en producción de otros productos químicos como en la producción de energía. El material lignocelulósico se compone, entre otras cosas, de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. Cada uno tiene unas características, unas propiedades y, por tanto, una función distinta, por lo que tienen que ser tratados por separado y de distinta forma. Cabe destacar que entre estos tres componentes dan forma a la pared celular, ya que forman fibrillas y fibras entre sí, ofreciendo la consistencia característica de las células vegetales(23,41).

La pared vegetal está dividida en 3 componentes, que conviene entender a la hora de estudiar la forma de degradarlos:

- a) Lámina media. Es la parte que une las células con las fibrillas de celulosa que forman su pared. Está compuesta por lignina principalmente.
- b) Pared primaria. Consta de una matriz amorfa, formada por hemicelulosa en su mayoría, y una parte fibrilar, con un alto contenido en celulosa formando esas fibrillas.
- c) Pared secundaria. Al predominar las zonas fibrilares, su componente mayoritario es la celulosa.

Estas tres partes que forman la pared celular, presentan numerosos polímeros que la endurecen y dificultan su degradación, entre los que destacan los 3 siguientes(42,43):

- **Celulosa:** es el componente básico de la pared vegetal, y le aporta rigidez y dureza. Está formada por subunidades de D-glucosa unidas por un enlace glucosídico beta 1-4 y que, en su conjunto, forman las fibrillas de celulosa. Representa el 50% de las paredes de las células vegetales, por lo que es el compuesto orgánico y el polisacárido más abundante del mundo(44).

En las fibras de celulosa se pueden distinguir dos zonas. La zona cristalina es la que estabiliza esta fibra y presenta una gran insolubilidad y rigidez. Por otra parte, las mejores zonas en las que focalizar la degradación de la pared vegetal son las zonas amorfas, ya que presentan menos puentes de hidrógeno y dejan la celulosa más expuesta. En la degradación de estas zonas para facilitar la posterior hidrólisis enzimática de los azúcares, el grado de cristalinidad de la celulosa es crucial, ya que las zonas cristalinas impiden la degradación del polímero de celulosa ya que reducen su accesibilidad(39,40,45).

- **Hemicelulosa:** heteropolisacárido compuesto por xilosa, arabinosa, manosa, glucosa y galactosa. Sirve de soporte para las fibras de celulosa y permite el enlace de la pectina, además de servir de unión entre las fibras de celulosa y la lignina, aportando rigidez a la pared.

Aunque es más fácilmente hidrolizable que la celulosa, dificulta el proceso porque aporta mayor fuerza a las fibras de celulosa, por lo que es importante tratar de solubilizar la hemicelulosa si se quiere evitar una inhibición o bajo efecto de las enzimas en la hidrólisis(39,40).

- **Lignina:** también es uno de los polímeros más abundantes de la naturaleza (10-15% de la biomasa proveniente de residuos agrícolas), es una sustancia sólida e incolora que se deposita en las paredes vegetales para la formación de madera (proceso de lignificación). Su función principal es dar soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra infecciones y estrés oxidativo. Además, es un compuesto altamente recalcitrante.

Se trata de una molécula polifenólica con diversas estructuras que forma una matriz alrededor de las fibrillas de celulosa e impide así la accesibilidad de las enzimas. El otro gran problema que presenta es la aparición de inhibidores enzimáticos debido a su degradación, que afectan al proceso de hidrólisis y al de fermentación, además de la unión inespecífica de la lignina degradada a las celulasas y hemicelulasas, disminuyendo la actividad de estas enzimas y, por tanto, el rendimiento de la degradación de la biomasa mediante hidrólisis enzimática(39,41).

Como ya se ha comentado, diversos factores como la cristalinidad de la celulosa o el contenido de lignina son limitantes a la hora de aprovechar el material lignocelulósico para su hidrólisis enzimática(46,47). Por lo tanto, son necesarios una serie de pretratamientos para liberar en mayor o menor medida los azúcares reductores(48). La investigación de estos tratamientos y la introducción de posibles mejoras significarán romper la barrera que hace que los biocombustibles no sean la principal fuente de energía mundial(35,37,41,49–51).

6.2 PRINCIPALES BIOCOMBUSTIBLES DE 2ª GENERACIÓN

Entre los biocombustibles de 2ª generación, destacan el bioetanol y el biobutanol. También destacan el **metanol** y el **octanol**, pero son menos producidos y utilizados que los ya descritos(52). Así mismo, pese a que los más desarrollados y comercializados hasta el momento son el bioetanol y el **biodiésel**, el biobutanol presenta grandes oportunidades y alternativas(23,42,53).

Bioetanol: es el etanol resultante de la fermentación de los azúcares de materias primas ricas en sacarosa, almidón o celulosa. Estas materias primas ricas en sacarosa pueden ser la caña de azúcar o la de remolacha, que son las fuente de etanol más utilizada en el mundo, por encima de las ricas en almidón como el maíz, y de los materiales lignocelulósicos como madera y restos agrícolas(4,13,22,38,54).

El hecho de que usar materias ricas en sacarosa sea más rentable se debe a que los microorganismos que hidrolizan este disacárido producen azúcares reductores, que son fácilmente asimilados por las levaduras para su fermentación. En el caso del almidón (polisacárido) es necesario un primer proceso de licuefacción con alfa o beta amilasas para liberar los azúcares del almidón, y un proceso posterior de sacarificación, en el que ya sí que se convierte a azúcares reductores gracias a la glucoamilasa(22,55).

Posteriormente, la sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructosa, que son metabolizadas por las levaduras formando etanol y dióxido de carbono. En la teoría, 1kg de glucosa genera 0.511 kg de etanol y 0.489 kg de dióxido de carbono, pero en la práctica, gran parte de la glucosa es utilizada para el crecimiento de nuevas células de levadura(22).

Biobutanol: hasta el año 2005, el uso de butanol estaba limitado como precursor químico. Sin embargo, recientemente se ha considerado su uso como combustible, incluso se ha llegado a

sugerir la futura sustitución de la gasolina por éste gracias a sus características similares. Además, puede ser mezclado en cualquier concentración con la gasolina, mientras que el etanol sólo permite un 85%, además de tener menor presión de vapor, ser menos corrosivo y poder ser usado como combustible sin ninguna modificación previa.

Los procesos de obtención de butanol a partir de la fermentación de biomasa surgieron en la década de 1910, utilizando maíz, trigo y centeno como principales sustratos. Esta fuente de combustible fue apartada en gran parte del mercado con la aparición del petróleo, de bajo coste. Pero el interés por los biocombustibles se ha retomado en el siglo XXI cuando, por ejemplo, la Unión Europea en la Directiva 2009/28/CE estableció que los biocarburantes utilizados para el año 2020 debía superar el 10% del total(8,34).

7. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL/BIOBUTANOL

Para la producción de biocombustibles de segunda generación, es inevitable realizar un paso previo de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para destruir la lignina (esto permite a las enzimas acceder más fácilmente a la celulosa y hemicelulosa para convertirlas en azúcares fermentables), modificar la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área superficial o eliminar algunas sustancias que puedan interferir en la hidrólisis enzimática. Tras el pretratamiento, habrá que realizar una etapa de hidrólisis enzimática, donde se convierte la celulosa en monómeros de glucosa y la hemicelulosa en xilosas, azúcares fermentables(56). Para la conversión final de biomasa en combustible, estos azúcares resultantes de la hidrólisis son fermentados en distintos compuestos según el organismo utilizado para ello (por ejemplo, la glucosa se puede convertir a acetona, butanol y etanol por la bacteria *Clostridium acetobutylicum* o *Saccharomyces cerevisiae*. El último paso para poder aprovechar esos productos de la fermentación como biocombustibles es purificarlos del resto de productos del proceso(8,14,36,57–59).

7.1 PRETRATAMIENTOS DE LA MATERIA PRIMA LIGNOCELULÓSICA

Los pretratamientos de los polímeros procedentes de la biomasa son indispensables para que las levaduras puedan fermentar los azúcares resultantes y obtener así los productos de fermentación. Los esfuerzos por degradar los componentes de la pared vegetal se centran en la naturaleza recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, que ya se ha visto que está relacionada con distintos factores como la cristalinidad de la celulosa, el contenido en lignina, la formación de inhibidores producidos en la eliminación de la lignina, etc(41,60,61).

Es el paso más costoso técnica y económicamente de obtención de biocombustibles de 2ª generación, y numerosos estudios buscan abaratar estos costes para rentabilizar estos procesos en relación coste/eficiencia(62). Según la técnica que utilizan para degradar la biomasa lignocelulósica se clasifican en distintos tipos de pretratamientos(49,63–65).

7.1.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

El objetivo de los pretratamientos físicos es aumentar la superficie específica accesible de la biomasa lignocelulósica para las enzimas, lo cual se puede conseguir bien formando poros o bien disminuyendo el tamaño de las partículas lignocelulósicas(66). Además, al disgregar las moléculas de celulosa y lignina, reducen la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa. Generalmente, se obtienen fragmentos de 2 mm, o hasta 0.2 mm(46,51,67).

Entre estos procesos se encuentran aquellos que son **mecánicos**, como la **molienda**, **astillado** o **triturado**, que disminuyen el tamaño de las partículas. Sin embargo, necesitan un gran aporte energético y económico para ello y el hecho de que reduzcan el tamaño de la biomasa no implica que la lignina se elimine de ella, sino que sigue presente y puede seguir interfiriendo con las enzimas. También se encuentra entre ellos la **pirólisis**, proceso de transformación de la biomasa mediante la aplicación de energía en ausencia de oxígeno, generando productos gaseosos no combustibles, aceites y residuos carbonosos.

Por otro lado, se encuentra la **irradiación** y **pretratamiento ultrasónico**(68,69), que no es capaz de separar la celulosa o hemicelulosa de la lignina por sí sola, pero se utiliza conjuntamente con otros pretratamientos químicos. De hecho, está comprobado que la aplicación de **microondas** a un ya existente pretratamiento químico resulta más efectiva que la adición de calor. También son utilizados los **rayos gamma** y **rayos de electrones** combinados con la rotura mecánica, hidrotermal o química de la biomasa. En cambio, el problema continúa siendo el elevado coste de estos pretratamientos, por lo que no son muy utilizados(64).

7.1.2 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

Los pretratamientos químicos son los más utilizados a escala comercial. En ellos, se utilizan reactivos químicos tales como ácidos, bases o agentes oxidantes, con el objetivo principal de desestructurar la lignina rompiendo sus enlaces. Se debe tener en cuenta la temperatura a la que se realiza el proceso, ya que, a mayor concentración de ácidos y mayor temperatura, menos tiempo hará falta para que se lleve a cabo la reacción. Estos procesos, a diferencia de los físicos, sí que consiguen separar la hemicelulosa de la lignina, ya que alteran la estructura de esta última(70).

- **Hidrólisis ácida:** degrada la hemicelulosa a xilosa, arabinosa y otros azúcares, además de alterar la estructura de la lignina a través de los enlaces glucosídicos de celulosas y hemicelulosas. Al solubilizar la hemicelulosa con ácidos diluidos (sulfúrico, nítrico o clorhídrico), permite utilizar otro proceso para hidrolizar la lignina que ahora ya queda libre, resultando así en la liberación casi total de la celulosa. Como inconveniente presenta productos que pueden inhibir etapas posteriores, tales como el fenol, acético, furfural o 5-hidroximetilfurfural, resultantes de la degradación de la lignina.

También se utilizan algunos ácidos orgánicos como el fórmico, acético o el propiónico para tratar el material lignocelulósico debido a su baja acidez relativa y una alta solubilización de lignina. En general, este tratamiento se suele realizar a altas temperaturas (alrededor de 180°C) y en un corto periodo de tiempo para evitar así la corrosividad de los ácidos(71,72).

- **Hidrólisis alcalina:** su principal función es la de degradar la lignina mediante la rotura de sus enlaces éster, incluso puede llegar a reducir la cristalinidad de la celulosa. Para ello se utilizan bases, como el hidróxido de calcio, de sodio o de amonio(49,67,73).

El principal problema que presenta es la formación de inhibidores, así como los altos costes operacionales, pero presenta las mejores tasas de conversión en azúcares reductores en procesos posteriores, lo que confirma que la lignina es la principal barrera a la hora de acceder a la celulosa para su hidrólisis(68,74).

- **Tratamiento con iones líquidos:** los iones líquidos son sales compuestas por cationes orgánicos y pequeños aniones inorgánicos que, en su conjunto, resultan ser unos poderosos solubilizadores de material lignocelulósico, aumentando así la superficie específica. Se trata de una tecnología emergente y todavía en proceso de investigación.

Sin embargo, las enzimas utilizadas en la posterior hidrólisis no mantienen su actividad en presencia de los iones líquidos, por lo que no permite realizar directamente la hidrólisis enzimática(75).

Tratamiento con organosolventes: utiliza solventes orgánicos para hidrolizar la lignina (metanol, etanol, etilenglicol, acetona, ácido acético, etc) y solubilizar la hemicelulosa, además de aumentar la exposición de la celulosa a las enzimas, aumentando su digestibilidad. Se utiliza en un rango de temperaturas de 100-250°C(76).

El problema de este proceso reside en sus altos costes y la posibilidad de explosiones o riesgos en general debido al carácter inflamable de los solventes. Además, se puede dar el caso de que la lignina despolimerizada con esta técnica aumente su adsorción hacia las celulasas, inhibiendo aún más el proceso que la lignina nativa (serán necesarias unas condiciones y un tipo de solvente para evitar este inconveniente) (63,77,78).

- **Delignificación oxidativa:** el método más utilizado es la **ozonólisis**, aunque también se emplean la oxidación húmeda (con oxígeno) o el peróxido de hidrógeno. El proceso consiste en la liberación de radicales libres por parte de los agentes oxidantes que fragmentan y eliminan la lignina de la matriz lignocelulósica(50,68,79).

La principal ventaja de esta técnica es la mínima formación de inhibidores enzimáticos, pero presenta unos costes elevados y pérdida de parte de la hemicelulosa durante la reacción.

La desventaja de estos pretratamientos es que no tienen un alto porcentaje de eliminación de lignina, presentan riesgo de aparición de inhibidores de procesos posteriores(77), y requieren una neutralización posterior en caso de que se hayan utilizado ácidos o bases. Los organosolventes y el ozono producen menos inhibidores de etapas posteriores debido a su menor agresividad sobre la biomasa, pero esto también resulta en un menor rendimiento con respecto al tratamiento con ácidos o bases(80–83).

7.1.3 PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

La combinación de los tratamientos físicos y químicos para degradar la biomasa lignocelulósica abre un amplio abanico de posibilidades y combinaciones. El objetivo principal de esta combinación es solubilizar la lignina y la hemicelulosa rompiendo sus uniones a altas temperaturas. El punto crítico está, entre otras cosas, en la temperatura a utilizar, ya que a una temperatura determinada se pueden producir ácidos que ayuden en la degradación, pero a partir de cierta temperatura se forman inhibidores enzimáticos(84).(5,47,62,85)

- **Explosión de vapor:** en este proceso se degrada la hemicelulosa y se transforma la estructura de la lignina utilizando vapor de agua a altas presiones (20-50 bar) y altas temperaturas (160-270°C) durante unos 5 minutos como máximo.

Las ventajas que presenta esta técnica son la baja contaminación y la posibilidad de reciclar el vapor de agua utilizado en la hidrólisis. Como inconveniente, se produce una

descomposición parcial de la celulosa y se generan algunos inhibidores enzimáticos, además de necesitar aporte de energía para conseguir las altas temperaturas y presiones, pero sigue siendo uno de los métodos más utilizados(47,62,85).

- **Explosión de vapor con amoníaco:** se expone la biomasa a amonio a altas temperaturas y presiones, seguido de una posterior reducción repentina de la presión. Se utilizan 1-2 Kg de amonio por cada Kg de biomasa seca, a unos 90°C durante 30 minutos. Rompe los enlaces de la lignina con los carbohidratos sin generar compuestos inhibidores y con una alta efectividad(74,86).
- **Explosión con dióxido de carbono:** consiste en combinar vapor y dióxido de carbono supercrítico a altas presiones, lo que genera la rotura de la biomasa lignocelulósica.

Es un tratamiento económico, mínimamente tóxico y que promueve la reducción del efecto invernadero gracias al uso del dióxido de carbono. En cambio, los productos pueden inhibir procesos posteriores(79,84).

- **Tratamiento con aguas calientes:** al humedecer la biomasa y someterla a presiones altas, se solubiliza la hemicelulosa sin necesidad de añadir ácidos que generen inhibidores ni realizar pretratamientos físicos(46,50,87,88).

7.1.4 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Los pretratamientos biológicos del material lignocelulósico se centran en la degradación de la lignina por acción directa de bacterias y **hongos** o de enzimas de esos microorganismos(89). Entre los microorganismos utilizados, destacan los hongos de podredumbre blanca (*Phanerochaete crysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoletus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus*), y entre las **enzimas** más utilizadas se encuentran la lacasa, peroxidasas de lignina, manganeso peroxidasas, todas ellas producidas por los hongos de podredumbre blanca(71,83,84,90).

Entre las ventajas de este procedimiento se encuentran: la reducción del grado de polimerización de la celulosa, el no requerimiento de químicos, el bajo coste económico y energético que demanda, la no formación de inhibidores y la nula toxicidad ambiental. Sin embargo, el factor limitante es el tiempo que tardan en actuar ya que, al ser agentes biológicos, no tienen un efecto inmediato sobre el sustrato, sino que dependen mucho de las condiciones y el crecimiento de los microorganismos (la duración de la reacción suele ser de unos 30-60 días). Además, existen pérdidas de carbohidratos debido a su absorción por parte de los organismos, que utilizan parte de la glucosa para su propio crecimiento, lo que disminuye el rendimiento(64,71,75,91).

En resumen, los distintos pretratamientos ofrecen una visión de las ventajas y desventajas que presentan determinadas condiciones de operación o diferentes tipos de biomasa, así como cada uno de los pretratamientos(92-94). El objetivo está en, basándose en los problemas que presenta cada uno, utilizarlos de forma combinada para evitar estas desventajas y obtener una biomasa pretratada y lista para la hidrólisis lo más rápida y eficientemente posible. Un ejemplo de esto es la combinación del tratamiento fúngico con alguno físico o químico, evitando así la lentitud relativa del primero y la formación de inhibidores o toxicidad de los químicos(43).

7.2 INTRODUCCIÓN A LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Una vez realizado el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, se requiere un paso de hidrólisis de los polímeros de celulosa y hemicelulosa ya liberados de la lignina y la enrevesada estructura que adoptan en la pared vegetal, para ser convertidos en azúcares fermentables. Este paso de hidrólisis se puede realizar de forma **química**, la cual utiliza ácidos como el sulfúrico para ello, o **enzimática** (también llamada **sacarificación**), y en la que se va a centrar esta revisión bibliográfica, que hace uso de enzimas específicas o cócteles enzimáticos(95) para degradar estos polímeros(30,51,60).

La hidrólisis enzimática resulta más atractiva que la química debido a la no aparición de inhibidores, así como las mejores condiciones en las que tiene lugar (unos 50°C y pH=5), que no interfieren con el resto de materiales que no interesan(96,97). En cambio, la hidrólisis ácida requiere unas temperaturas muy altas, neutralización posterior, además de tener menor rendimiento y una menor selectividad(42,65,98,99).

Cabe destacar que, cuantos más o mejores han sido los pretratamientos administrados al material, más eficiente es la hidrólisis enzimática. Esta afirmación no es extraña, ya que sabiendo que cuanto más se trata esa masa lignocelulósica más accesibles quedan la celulosa y hemicelulosa a las enzimas, por lo que la hidrólisis enzimática resultará un proceso más sencillo(51,70).

Los intentos de mejorar las técnicas de hidrólisis enzimática se centran en abaratar el coste, ya sea mediante la mejora de la actividad de las enzimas o proponiendo algunas nuevas para formar cócteles enzimáticos más eficientes que alcancen mayores rendimientos(8,100).

7.3 FERMENTACIÓN

Tras la obtención de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática, tiene lugar la fermentación de estos azúcares para la obtención de ácidos o alcoholes aprovechables como fuente de energía. Esta fermentación es llevada a cabo por numerosas bacterias y hongos, de entre las que destacan *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* en la producción de etanol. *S. cerevisiae* es utilizada en la fermentación de la glucosa, pero no es capaz de hacerlo con las pentosas provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa, donde actúa *Z.mobilis*, con un rendimiento mayor y un metabolismo más intenso, pero menos utilizado debido a su susceptibilidad a la contaminación. Para solventar algunas de estas limitaciones, se puede llevar a cabo una sacarificación y co-fermentación simultáneas, utilizando por ejemplo recombinantes de *S.cerevisiae* que sean capaces de fermentar tanto la glucosa como las pentosas(83,101).

En el proceso de fermentación es necesario la adición de compuestos que permitan a los microorganismos seguir vivos y seguir fermentando azúcares, por lo que se añaden nitrógeno, sulfuros, fósforo, entre otros. Las condiciones de temperatura y pH también deben ser controladas para una producción óptima de bioetanol. El rendimiento máximo calculado para la producción de etanol son 0.511 gramos de etanol por cada gramo de glucosa, pero teniendo en cuenta las pérdidas de azúcares derivadas a otras rutas metabólicas de los microorganismos productores, el rendimiento resultante es de 0.484 gramos de etanol por cada gramo de glucosa(22,54).

El principal problema que se presenta es la toxicidad del etanol producido hacia los microorganismos, ya que a partir de un 7% de etanol empiezan a aparecer efectos inhibitorios(30,35,38).

7.4 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN

La mezcla producida tras la fermentación está constituida en su mayor parte por etanol y agua, por lo que es necesario separar estos componentes para purificar el etanol. Actualmente, la destilación es la técnica más utilizada en un rango de concentraciones de entre 10-85%. El inconveniente que tiene es la presencia de un azeótropo en la mezcla de etanol y agua, lo que obliga a trabajar a bajas presiones (destilación a vacío) o añadiendo agentes que cambien estas condiciones, como el benceno(102).

8. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática en la producción de biocombustibles, de manera ideal, va a convertir el 100% de la celulosa en glucosa y sin la formación de compuestos inhibidores, y en condiciones menos agresivas. Las enzimas son proteínas de alta masa molecular, específicas y activas catalíticamente que en la producción de biocombustibles presentan unas tasas de conversión mayores que en el caso de la hidrólisis química.

Bajas tasas de conversión de celulosa implican una baja eficiencia y un alto coste del proceso y, está comprobado que, cuantos más pretratamientos previos sufra la biomasa, las enzimas muestran una mejor conversión de celulosa en glucosa(67). Esto ocurre por la recalcitrancia de la lignocelulosa, que en el material crudo imposibilita el acceso de las enzimas a la celulosa, y que mayormente tiene su origen en la existencia de la lignina y su interacción con la celulosa(51,91,103).

En la producción industrial (a gran escala) de biocombustibles, se deben tener en cuenta factores como qué organismos producen enzimas más eficientes y qué mezclas de enzimas degradan mejor diferentes tipos de material lignocelulósico, así como entender las interacciones que presentan algunas enzimas entre sí y con la biomasa que van a hidrolizar(104).

8.1 ORGANISMOS Y ENZIMAS PRINCIPALES

La hidrólisis de la **celulosa** mediante enzimas requiere la acción de las celulasas, pertenecientes a la superfamilia de las glicosil hidrolasas, que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono. Se han descrito dos mecanismos de acción para las glicosil hidrolasas, que dependen de la distancia entre los dos aminoácidos que forman el centro catalítico de estas enzimas (uno ácido que actúa como donador de protones, y otro base o nucleófilo que suele ser aspartato y glutamato). Si se encuentran a 5.5 Amstrong, se da el **mecanismo de conservación**, que consiste en una primera glucosilación y una deglucosilación posterior; y si esa distancia es de 10 Amstrong, se da el **mecanismo de inversión**, en el que la hidrólisis se lleva a cabo en una sola etapa gracias a que la mayor distancia entre estos dos aminoácidos permite la entrada de la molécula de agua entre la base y el azúcar para disociarlos(90).

Los sistemas de celulasas se encargan de la degradación de la celulosa y su conversión en azúcares monoméricos aprovechables en la fermentación(105). Las celulasas no son una sola enzima, sino que se refieren a diferentes enzimas que actúan sobre el mismo sustrato, y cada una

de las cuales tiene una función diferente(106–109). No obstante, el esquema clásico de acción de las celulasas describe la acción sinérgica de 3 clases de enzimas:

- **Endo-1,4- β -glucanasas**, que degradan los enlaces internos de la cadena de celulosa.
- **Exo-1,4- β -glucanasas**, que atacan los extremos reductores o no del polímero de celulosa.

Las exoglucanasas productivas son **celobiohidrolasas**, y son de las enzimas más presentes en los preparados comerciales, así como uno de los principales objetos de estudio(107,110).

- Por último, las **β -glucosidasas** convierten la celobiosa a glucosa. Es una función muy beneficiosa para el rendimiento y la efectividad del proceso, ya que la celobiosa resulta ser un inhibidor de la función de las celulasas. Es decir, mientras las endoglucanasas y exoglucanasas se dedican a desestabilizar el polímero de celulosa y degradarlo para reducir su complejidad, las β -glucosidasas convierten esa celulosa degradada y simplificada en azúcares aprovechables en la fermentación para la producción de los biocombustibles(110). Todas estas enzimas tienen algo en común, y es que son todas hidrolasas, lo que significa que rompen los enlaces glucosídicos por adición de una molécula de agua(107,111).

Junto a las enzimas degradadoras o convertidoras de celulosa se encuentran los Módulos de Unión a Carbohidratos (del inglés Carbohydrate Binding Modules, CBMs), que están unidos covalentemente a los dominios catalíticos de las enzimas, y que tienen que ver con la afinidad de éstas por la celulosa. Por otro lado, las expansinas son unas proteínas extracelulares (~28 kDa) que se encuentran en las paredes celulares de todas las plantas terrestres, y actúan relajando la pared celular rompiendo enlaces de hidrógeno para facilitar la hidrólisis.

Estos sistemas de celulasas comprenden gran cantidad de enzimas que actúan de manera coordinada y sinérgica en la hidrólisis de la celulosa. De hecho, hay 4 tipos de sinergia:

- a) Sinergia endo-exo: entre endoglucanasas y exoglucanasas
- b) Sinergia exo-exo: entre exoglucanasas que actúan sobre extremos reductores y no reductores
- c) Sinergia entre exoglucanasas y beta glucosidasas que eliminan celobiosa y celodextrinas
- d) Sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los de unión al sustrato (celulosa)

Además, una vez identificadas algunas enzimas no hidrolíticas en organismos como *T.reesei* cuya función es debilitar las uniones no covalentes entre fibras de celulosa para facilitar la posterior acción de las enzimas hidrolíticas, se han añadido a los preparados comerciales este tipo de enzimas como xilanasas o pectinasas además de las endocelulasas, exocelulasas o beta glucosidasas(107,112).

Es curioso que, pese a la abundancia de la celulosa, sólo un pequeño porcentaje de microorganismos es capaz de degradarla por completo, y de los cuales los más representativos pertenecen a los hongos filamentosos(77). En cuanto a los microorganismos productores de estas celulasas encontramos:

- Especies bacterianas: *Clostridium sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Thermomonospora sp.*, *Streptomyces sp.*, etc.
- Especies fúngicas: *Trichoderma reesei*, *T. viridae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium helicum*, *A. nidulans*, ... de las cuales destaca *Trichoderma reesei* como la principal productora de celulasas, y fuente de estudio para su producción y una mejora de la eficiencia del proceso(89,90).

Se han hecho experimentos en los que se ha inducido la expresión de celulasas en *T. reesei*, lo que ha llevado a identificar a la **soforosa** como el inductor natural de la síntesis de celulasas. Sin embargo, lo más destacable del proceso de inducción de las propias enzimas es que se realiza gracias a varios factores actuando sinérgicamente, tal y como luego ellas actúan sobre sus sustratos(71,113).

La hidrólisis de la **hemicelulosa** es otro de los puntos clave en la hidrólisis enzimática para producir algunos de los biocombustibles de segunda generación y es llevado a cabo por las **hemicelulasas**. Existen varias enzimas pertenecientes a esta familia, tales como las xilanasas, las β -xilosidasas o las esterases. También existen manasas, endoglucanasas, alfa-galactosidasas o β -glucosidasas, pero no son tan eficientes como las tres primeras nombradas en la hidrólisis de la hemicelulosa(69,71,98,100,114).

- Las **xilanasas (endo-1,4- β -xilanasas)** son un grupo de enzimas extracelulares producidas por diversos organismos, entre los que destacan los hongos, que degradan los polímeros de xilanos a xilosa. Son muy empleadas en la industria de la pulpa y el papel, gracias a que catalizan la degradación de hemicelulosa para la liberación de celulosa en la biomasa vegetal.

- Las **β -xilosidasas** son enzimas que catalizan, al igual que las xilanasas, la degradación de la cadena principal del polímero de hemicelulosa(104).

- Por último, las **esterasas** van a catalizar la conversión de polisacárido feruloilado en ácido ferúlico y polisacárido libre actuando como hidrolasas de ésteres carboxílicos. Son enzimas desramificantes de xilano que degradan la pared e incluso sirven para remodelarla en las etapas de crecimiento de la planta y que se clasifican según su especificidad de sustrato(71).

Hay grupos de enzimas hemicelulolíticas que hidrolizan los puentes glicosídicos, mientras otras hidrolizan enlaces éster de grupos acetato o ácido ferúlico. Gran cantidad de hemicelulasas actúan sinérgicamente durante la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa a azúcares monoméricos, además de la liberación de la celulosa(115–117).

Como organismos productores de hemicelulasas principales se encuentran *Bacillus sp.*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella bryantii*, *Bacteroides succinogenes*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Botrytis cinerea*, entre otros, tanto de especies bacterianas como fúngicas.

La **lignina**, debido a su naturaleza recalcitrante, es el polímero que más interesa degradar para dejar la celulosa accesible a las enzimas hidrolíticas. Sin embargo, también es el más peligroso a la hora de escoger el tipo de degradación, ya que, si no se realiza de forma adecuada o con los medios correctos, puede generar inhibidores que dificultan el proceso aún más que al principio. Entre las enzimas degradadoras de lignina, las más importantes son las peroxidasas, las oxidasas y las lacasas.

- La lignina **peroxidasa** cataliza la reacción de oxidación del 1,2-bis(3,4-dimetoxifenil)propano-1,3-diol a 3,4-dimetoxibenzaldehído y 1-(3,4-dimetoxifenil)etano-1,2-diol usando peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la reacción, y un grupo hemo como cofactor. Es producida por *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Phlebia radiata*. Estos organismos secretan la enzima al exterior de la célula, que junto a dos iones calcio y un grupo hemo B participa en la rotura de los enlaces de las cadenas laterales de la lignina.

- Por otro lado, las **lacasas** son enzimas que pertenecen al grupo de las oxidasas de cobre azul, y que oxidan sustratos que tengan características parecidas al p-difenol, además de algunos compuestos biológicos. Se trata de una glicoproteína dimérica o tetramérica que presenta 4 átomos de cobre con funciones distintas, y que utiliza oxígeno como aceptor de electrones para eliminar protones de los grupos fenol hidroxilo. Es producida por los hongos *Bacillus subtilis*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus* o *Azospirillum lipoferum*, y se encarga tanto de la degradación de lignina como de la eliminación de fenoles tóxicos derivados de la degradación del polímero(69,71,89,97,103,108).

Algunos de los organismos productores de estas enzimas son: *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*, *Prevotella sp.*, *Phlebia sp.*, *Trichoderma reesei*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus sp.*, etc.

En resumen, la hidrólisis enzimática de la celulosa consta de 3 pasos: adsorción de las enzimas a la superficie del polímero de celulosa, degradación de la celulosa a azúcares fermentables y desorción de la celulosa. Durante todo este proceso, la actividad de las celulasas, hemicelulasas y demás enzimas va decreciendo, entre otras cosas, por el hecho de que la propia adsorción irreversible de las mismas a la superficie de la lignina las inactiva parcialmente(103,118,119). Esta inactivación parcial puede evitarse a veces con la adición de surfactantes como Tween o BSA, que se unen a proteínas no enzimáticas que podrían unirse inespecíficamente a los sustratos lignocelulósicos, evitando la acción de las enzimas sobre los mismos. Sin embargo, el exceso de estos surfactantes podría generar el efecto contrario por adsorción a la lignina(65,111,120).

8.2 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

A la hora de llevar a cabo una hidrólisis enzimática, ya sea en los pretratamientos o en la propia conversión de los polímeros en azúcares fermentables, hay diversos factores físicos (temperatura, humedad, tiempo de incubación, aireación, tamaño del sustrato, área superficial accesible, etc.), químicos (pH, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, cristalinidad de la celulosa, componentes orgánicos e inorgánicos, etc.) y biológicos (especie de microorganismo, así como su competitividad, interacciones y colaboración, etc.) a tener en cuenta(71,121).

- **Temperatura;** el efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano y la actividad enzimática varía según la especie y el tipo de enzima, ya que presentan diferentes actividades metabólicas durante la fermentación. Muchas bacterias y hongos pueden crecer en amplios rangos de temperatura y, dependiendo de los que soportan, se clasifican en 3 rangos: psicrófilos (-15°C a 20°C), mesófilos (20°C a 45°C) y termófilos (41°C a 122°C).

Teniendo en cuenta estos datos, es necesario estudiar qué tipo de microorganismo es más adecuado para trabajar en las condiciones que exige el motivo de esta revisión bibliográfica(71).

- **Humedad;** la humedad tiene un papel fundamental sobre el crecimiento microbiano y, además, puede influir directamente sobre la estabilidad de la biomasa lignocelulósica. Muchas bacterias y hongos prefieren vivir entre el 40-80% de humedad (por ejemplo, *Phlebia brevispora* tiene un rendimiento óptimo a una humedad del 85%), y microorganismos celulares necesitan un porcentaje aún mayor de humedad para propagarse.

Sin embargo, siempre hará falta un porcentaje moderado de humedad, ya que si ésta es muy alta provocará anaerobiosis, y si es muy baja va a generar un retraso en el crecimiento de los microorganismos(71).

- **Tiempo de incubación;** la naturaleza recalcitrante de la lignocelulosa es el factor que reclama unos tiempos de incubación mayores para su completa degradación en el caso de los tratamientos biológicos. El tiempo necesario para la degradación de la lignocelulosa va a variar entre especies de microorganismos y tipos de biomasa.

Es importante tener en cuenta que un tiempo mayor de incubación no va a resultar en una mejor degradación del material lignocelulósico. Esto se debe a que, llegado un determinado momento, los microorganismos van a empezar a consumir esos polisacáridos como fuente de carbono para su crecimiento y, aunque degradan la lignina, no va a generar un rendimiento final óptimo(71).

- **Tamaño de sustrato y aireación;** la oxigenación y el tamaño de las partículas a degradar van a jugar un papel imprescindible en la hidrólisis de la biomasa. La superficie del sustrato es el área que está en contacto con el exterior. Los tratamientos mecánicos tratan de reducir el tamaño de partícula para aumentar su superficie específica.

El punto clave está en el tamaño que queda de partícula, puesto que si es muy grande va a evitar que los hongos penetren y accedan al sustrato y, si es demasiado pequeño, va a evitar la oxigenación, dificultando el crecimiento de los microorganismos(71).

- **pH;** el papel del pH en la producción de biocombustibles está centrado principalmente en la etapa de la fermentación, que es cuando los microorganismos necesitan una actividad metabólica máxima para llevar a cabo la conversión de los azúcares de la manera más rápida y eficiente posible. Este parámetro suele variar a lo largo de los días de incubación, por lo que tiene que ser constantemente controlado.

Por lo general, cuanto más ligninolítico es un hongo, menor pH necesita para su actividad óptima (en torno a 4-5). No obstante, un pH muy bajo inhibe las celulasas de la hidrólisis, y un pH alto va a disolver las enzimas, perdiendo éstas su actividad(71).

- Por último, hay que tener en cuenta muchos más factores como pueden ser la **complejidad estructural** de la lignocelulosa (cristalinidad de la celulosa), la **pérdida de polisacáridos** o la **adaptación microbiana** a los cultivos(71).

Para aumentar la eficiencia del proceso de hidrólisis y fermentación, pueden combinarse estas dos técnicas realizándose a la vez en el mismo tanque (sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)), hidrólisis previa con SSF (PSSF), o en el mismo tanque y con un solo organismo que realice la fermentación (hidrólisis y co-fermentación simultáneas (SSCF)).

En la SSF, el factor limitante es la temperatura, ya que no es necesaria la misma para la óptima actividad de las enzimas (45-50°C) no es la misma que la que pueden soportar las levaduras para sobrevivir (30°C), por lo que se realiza a 35°C durante 24 h, asumiendo que la eficiencia de las enzimas se verá afectada. En el caso de PSSF, la pre hidrólisis se lleva a cabo a 50°C durante 10 horas, y la sacarificación y fermentación a 35°C durante 24 horas. Por último, la SSCF va a tener lugar bajo las mismas condiciones que la SSF, pero en este caso la levadura puede ser recombinante y acota menos el rango de temperaturas aceptables(8,83,122).

Tras algunos pretratamientos, el pH de la mezcla resultante es aproximadamente de 4.2, y en la hidrólisis enzimática se requiere un pH=5, por lo que es necesaria una neutralización que se realiza con NaOH 6M. Una vez tenemos el pH adecuado de 5, tiene lugar la hidrólisis enzimática en un reactor a unos 50°C, por lo que es necesario enfriar la mezcla previamente a este proceso. Hay que tener en cuenta el porcentaje de la fracción sólida, el porcentaje en peso (5%), el tiempo de reacción (unas 72h), la agitación (unas 175 rpm), la presión (1bar), etc.

La hidrólisis en las condiciones detalladas por ejemplo de la pulpa de remolacha proporciona rendimientos del 65%, con una concentración de 14g/L de glucosa(8,83,122).

8.3 EFECTOS INHIBITORIOS EN LA HIDRÓLISIS

Como ya se ha comentado, la eficiencia del proceso de producción de biocombustibles de segunda generación mediante hidrólisis enzimática resulta ser una gran oportunidad de obtener energía de fuentes renovables a bajo coste y de forma sencilla. Sin embargo, esta técnica presenta dos grandes inconvenientes, que son las principales futuras vías de investigación sobre las que trabajar para conseguir esa rentabilidad, y están relacionadas entre sí.

Una de ellas son los pretratamientos, puesto que se ha comprobado experimentalmente que, cuantos más y mejores pretratamientos sufre la biomasa lignocelulósica, mucho más eficiente es la hidrólisis de los polímeros en azúcares fermentables como glucosa o xilosa. La cuestión es qué pretratamientos aplicar o cómo combinarlos, pero teniendo en cuenta que no por sobretratar el material va a generar una mejor biomasa sobre la que trabajar, puesto que algunos pretratamientos son corrosivos, tóxicos, degradan los polímeros que nos interesan o, de aquí deriva el segundo problema de la producción de biocombustibles, generar inhibidores que actúen en etapas posteriores (hidrólisis enzimática y fermentación)(74).

Estos inhibidores pueden actuar por adsorción a la lignina, por lo que impiden su degradación y la celulosa no puede ser liberada para exponerse a las enzimas hidrolíticas o, simplemente, es posible que interfieran con las enzimas, disminuyendo su actividad(123,124).

Inhibición por parte de la glucosa:

En numerosos estudios se han identificado inhibidores de la hidrólisis enzimática llevada a cabo, entre otras enzimas, por las celulasas. Algunos de estos compuestos inhibidores son: celobiosa, xilooligosacáridos, glucosa, ácidos débiles, furfural, 5-hidroximetilfurfural o compuestos fenólicos. Por ejemplo, el mecanismo de inhibición de la celobiosa resulta de su combinación con triptófano, lo que ocasiona su localización cerca del centro activo de las celobiohidrolasas, evitando así la acción de las celulasas. Los ácidos débiles, el furfural y los compuestos fenólicos son liberados en la explosión de vapor o el tratamiento hidrotermal, tras lo cual ejercen su efecto inhibitorio. Las β -glucosidasas reducen estos efectos inhibitorios pero, en

altas concentraciones de glucosa, se inhiben las propias β -glucosidasas, así como cócteles enzimáticos en general(125).

Compuestos fenólicos:

Los compuestos fenólicos afectan a la hidrólisis enzimática de tres formas distintas: inhibidores (reducen la producción de equivalentes de glucosa interfiriendo con el sustrato), no inhibidores (no afectan a la hidrólisis ni para bien ni para mal) y activadores. En estos últimos se ha identificado el grupo alcoxi $\text{CH}_3\text{-O}$, que se ha denominado como el responsable del efecto activador(77).

Inhibición directa de la lignina:

La lignina residual, la lignina disuelta y las moléculas fenólicas derivadas de lignina pretratada pueden desencadenar la pérdida de estabilidad y de actividad de las celulasas en la hidrólisis enzimática. Por ejemplo, la lignina disuelta puede precipitar de nuevo en la superficie de la biomasa en forma de gotas, reduciendo la accesibilidad de la misma. Estos fenómenos pueden deberse a diversos factores y tipos de pretratamientos, como puede ser la explosión de vapor, o el tratamiento alcalino, ya que pueden provocar que la lignina sea transportada de la pared de las fibras a la superficie, convirtiéndose en un obstáculo para la unión celulosa-celulasas(63).

La unión entre el calcio y lignina reduce la adsorción no enzimática de la lignina a la celulosa, y ligninas modificadas (sulfonato cálcico de lignina) pueden actuar como surfactantes en lugar de inhibidores(103).

Pero, como norma general, la lignina genera una adsorción de las enzimas y disminuye el rendimiento de la hidrólisis hasta en un 20%, y provoca una mayor inhibición cuanto mayor sea su peso molecular(118,126).

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Pese al abanico de posibilidades que ofrece el campo de los biocombustibles en cuanto a posibilidades de investigación y de mejora de cada una de las fases que comprende, en esta revisión bibliográfica, como su título indica, se van a exponer (125) algunas posibilidades de mejora relacionadas con la etapa de hidrólisis enzimática(54,57,107,113,127–135). Entre todas las posibilidades, hay algunas que implican el uso de polihidroxicanoatos(biomoléculas), microorganismos como los halófilos(sobreviven en concentraciones altas de sal), o métodos de edición de genoma como el CRISPR/Cas9 (técnicas biotecnológicas),... y otras que se centran en la mejora del proceso de producción a través de la combinación o edición de métodos ya existentes(5,6,87,136–139). Además de las expuestas durante la revisión bibliográfica, se pueden destacar tres vías de mejora en la producción de biocombustibles de segunda generación a través de la hidrólisis enzimática:

- a) Con respecto a la acción de los inhibidores, ya se ha comentado la posibilidad de añadir surfactantes (TWEEN, BSA, etc.) que eviten la captura e inactivación de las enzimas por parte de la lignocelulosa (111). Por ejemplo, la BSA actúa bloqueando la lignina para evitar que ejerza esa adsorción sobre las enzimas hidrolíticas(51,80,112,120).
- b) También es posible realizar una codigestión con varios sustratos, que resulta en un ratio C/N más favorable, mejora la concentración de nutrientes, diluye compuestos tóxicos e inhibitorios, y mejora la capacidad tamponadora. Como otra opción, se realizaron

ensayos en los que se inoculó fluido de rumen, mejorando así el rendimiento de la hidrólisis(75,140).

- c) Como último ejemplo, se han intentado llevar a cabo distintos procesos de hidrólisis de celobiosa con celulasas, en este caso beta glucosidasa, pero inmovilizadas en un soporte que evita que se unan a la lignina y, por tanto, que sean inactivadas(9,23,124).

10. CONCLUSIONES

Una vez concluida esta revisión bibliográfica, encontramos varios aspectos a destacar. El primero es de los más sorprendentes, y es que, pese a que los biocombustibles y el interés en el desarrollo de técnicas para su producción eficiente se encuentran, sino en la cima, cerca de ella en cuanto a interés público y tecnológico se refiere, todavía no se ha descrito un método general en cuanto a los procesos para su producción. Esto implica que no hay un estándar a seguir sobre las condiciones de reacción, qué enzimas utilizar, qué tipo de pretratamientos,... por lo que es un campo en el que seguir trabajando para aumentar el rendimiento de todos estos procesos, y así generar una eficiencia mayor que despierte aún más el interés comercial de los biocombustibles.

Además, en lo referente a las vías actuales de investigación de las fuentes de energía renovables, no hay consenso sobre cuál es la que mayores oportunidades puede tener. Los biocombustibles de primera generación son ahora mismo los combustibles provenientes de fuentes renovables más producidos, pero presentan sus desventajas y no resultan tener tantas posibilidades de desarrollo. Entre el resto de biocombustibles, los de segunda generación ofrecen muchas posibles vías de mejora y de investigación que harían de ellos los mayores productores de energía eficiente y renovable en el futuro, pero la complejidad de esas investigaciones provoca que muchos estudios se estén centrando en la producción de biocombustibles de tercera y cuarta generación, también muy rentables, pero no se sabe si tanto como la biomasa.

Por todo esto, en esta revisión bibliográfica hemos tratado de centrarnos en las oportunidades que ofrecen los biocombustibles de segunda generación, así como intentar proponer un método general para la conversión de los polímeros en azúcares fermentables. Este método de conversión de azúcares más eficiente y con menos inconvenientes resulta ser la hidrólisis enzimática, que es el eje central sobre el que gira el resto de información sobre los procesos de este trabajo.

En consecuencia, hemos tratado de ahondar en el tema de la hidrólisis enzimática con la intención de establecer las mejores condiciones posibles para este proceso, así como los organismos o enzimas más utilizados, pero teniendo en cuenta la limitación de brevedad de esta revisión no se han detallado las características ni las condiciones necesarias por cada una de ellas, puesto que la información disponible en bases de datos es muy difusa y necesita mayor investigación.

11. CONCLUSIONS

Once this bibliographic review has been completed, we found several aspects to highlight. The first is one of the most striking, and this is because despite the fact that biofuels and the interest in the development of techniques for their efficient production are, if not at the top, close to it in terms of public and technological interest, A general method regarding the processes for their production has not yet been described. This implies that there is no standard to follow about the reaction conditions, which enzymes to use, what type of pretreatments, ... so it is a field in

which to continue working to increase the performance of all these processes, and thus generate a higher efficiency that further awakens the commercial interest of biofuels.

Furthermore, with regard to current research ways for renewable energy sources, there is no consensus on which is the one with the greatest opportunities. The first generation biofuels are currently the most produced fuels from renewable sources, but they have several disadvantages and do not turn out to have as many possibilities for development. Among the rest of biofuels, second generation biofuels offer many possible ways of improvement and research that would make them the biggest producers of efficient and renewable energy in the future. However, the complexity of these investigations results in many studies focusing on the production of third and fourth generation biofuels, also very profitable, but it is not known if as much as biomass.

For all this, in this bibliographic review we have tried to focus on the opportunities offered by second generation biofuels, as well as to try to propose a general method for the conversion of polymers into fermentable sugars. This more efficient and less inconvenient sugar conversion method turns out to be enzymatic hydrolysis, which is the central axis around which the information about the processes in this work turns.

Consequently, we have tried to delve into the world of enzymatic hydrolysis with the intention of establishing the best possible conditions for this process, as well as the most used organisms or enzymes, but taking into account the limitation of brevity of this review, the characteristics or the necessary conditions for each one of the enzymes have not been detailed, since the information available in databases is very diffuse and needs further investigation.

11. ANEXOS

ANEXO I

Como se ha mostrado en el apartado de metodología, se ha comprobado la evolución de la investigación sobre biocombustibles desde su inicio hasta hoy. Para obtener esta información, hemos realizado búsquedas en distintas bases de datos con el término "biofuel". ScienceDirect ha ofrecido un total de 81.603 resultados, y en Scopus, por ejemplo, 74.756 documentos. Viendo la gráfica, es evidente la creciente investigación en este campo desde sus inicios.

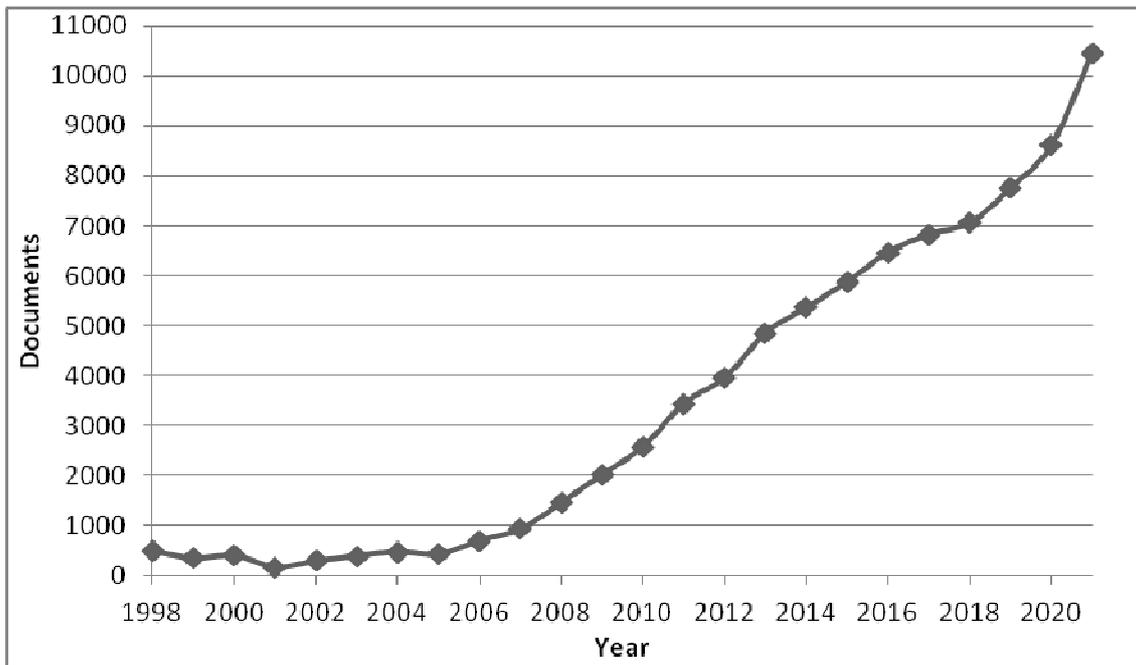


Ilustración 1: gráfica de los documentos depositados en ScienceDirect cada año desde 1998 que contienen la palabra "biofuel". **Fuente:** elaborado a partir de los datos de ScienceDirect referentes a la palabra "biofuel".

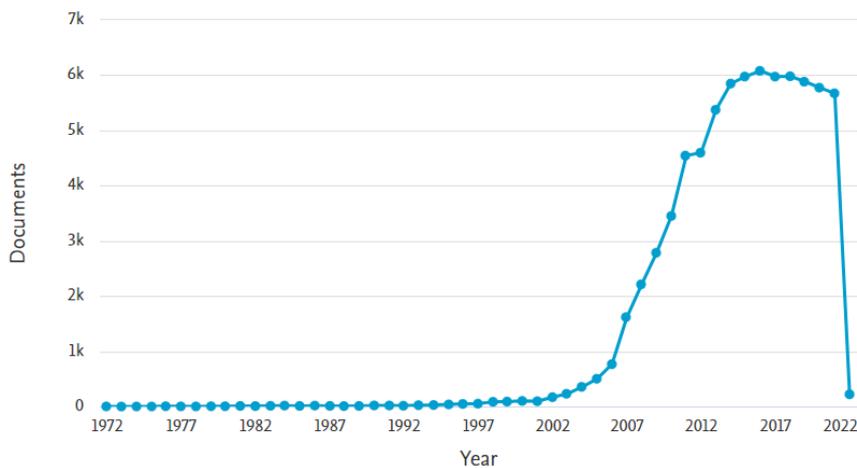


Ilustración 2: gráfica de los documentos depositados en Scopus cada año desde 1998 que contienen la palabra "biofuel". **Fuente:** elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra "biofuel".

Ahora vamos a analizar la cantidad de autores que trabajan en el ámbito de los biocombustibles con el fin de determinar los grupos de investigación más punteros en el campo.

Documents by author

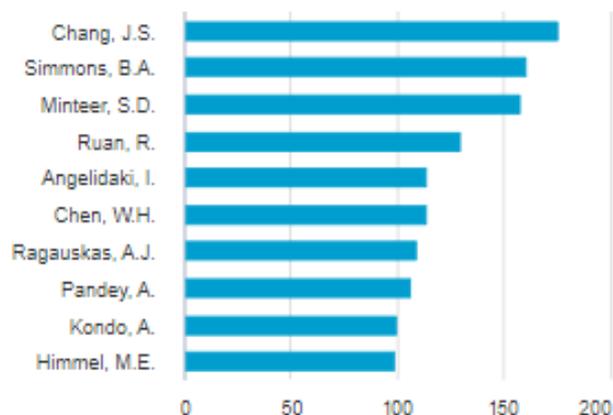


Ilustración 3: gráfica de los autores que han elaborado mayor cantidad de documentos pertenecientes a Scopus y que contienen la palabra “biofuel”. **Fuente:** elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra "biofuel".

Como se aprecia en la gráfica, destacan los autores Jong-San Chang(Corea del Sur), Blake A Simmons(California, EEUU) y Shelley D. Minteer (Utah, EEUU), que han llegado a publicar más de 150 documentos cada uno sobre los biocombustibles.

Estos datos encontrados también están avalados por la siguiente gráfica, que muestra que la mayor fuente de documentos relacionados con los biocombustibles son los Estados Unidos, seguidos por países como India o China.

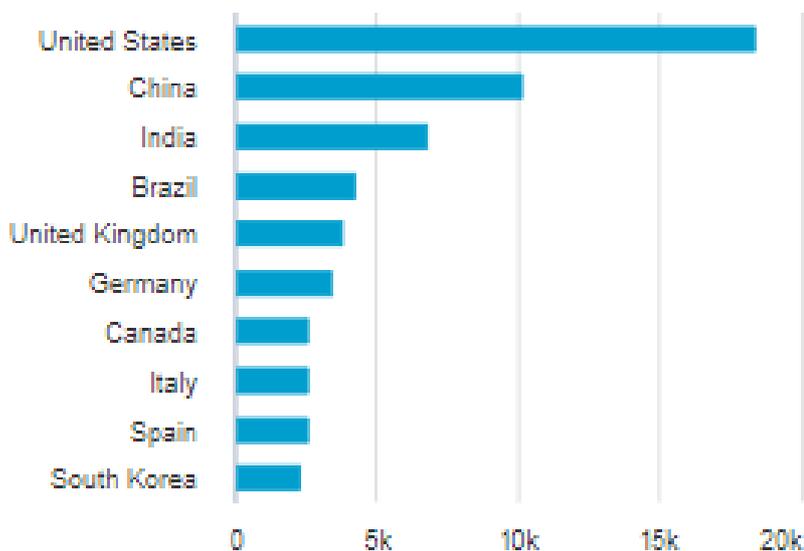


Ilustración 4: gráfica de los países con mayor número de documentos relacionados con la palabra “biofuel”. **Fuente:** elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra “biofuel”.

También es de utilidad organizar todos los documentos en una gráfica que permita estructurarlos por temas en los que ha aparecido la palabra “biofuel”.

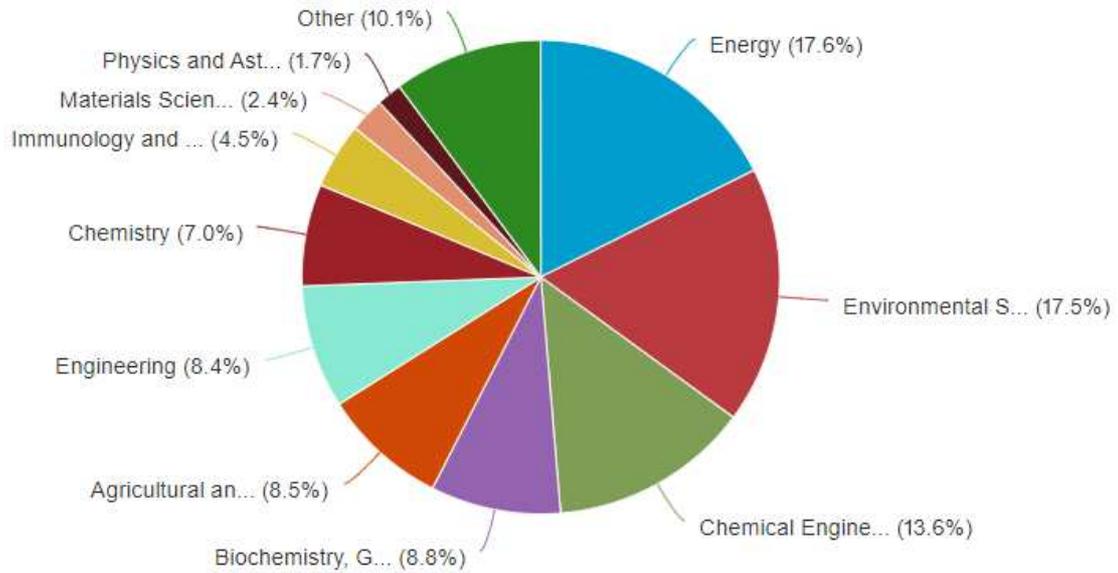


Ilustración 5: gráfica de los temas o ámbitos en los que aparece en Scopus la palabra “biofuel”.
Fuente: elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra "biofuel".

Tal y como vemos en la gráfica, los biocombustibles se pueden aplicar a numerosos campos, pero los que más destacan y, por tanto, dejan ver que tienen mayor utilidad allí, son la energía o el medio ambiente. Es obvio que el mayor interés de los biocombustibles radica en su uso como fuente de energía renovable.

Vamos a estrechar el cerco viendo los documentos que contienen la palabra “bioethanol”:

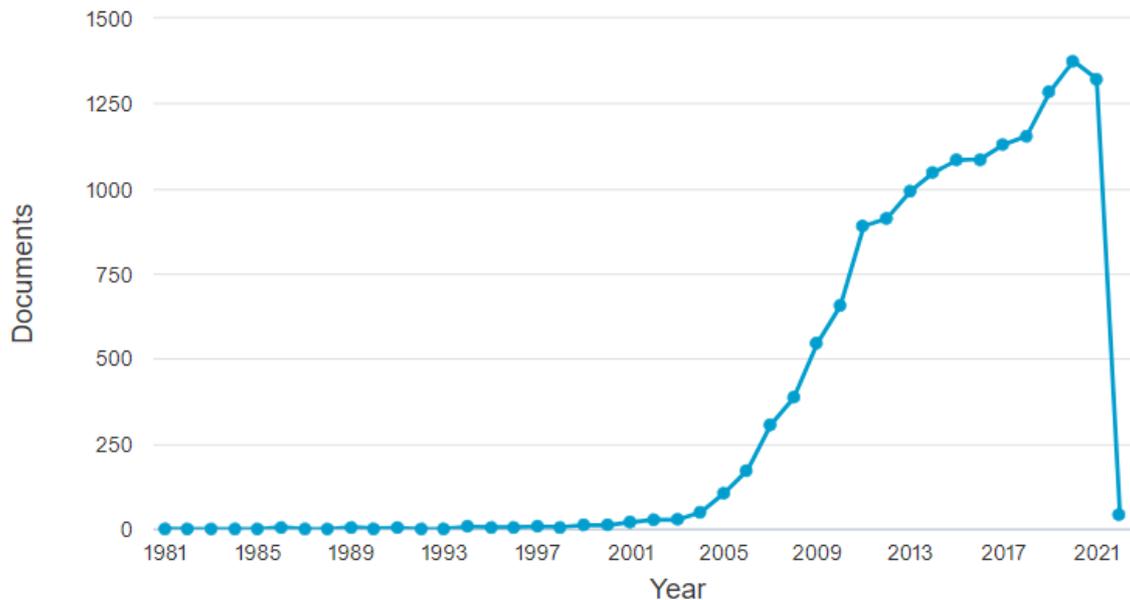


Ilustración 6: gráfica de los documentos en los que aparece en Scopus la palabra “bioethanol”.
Fuente: elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra "bioethanol".

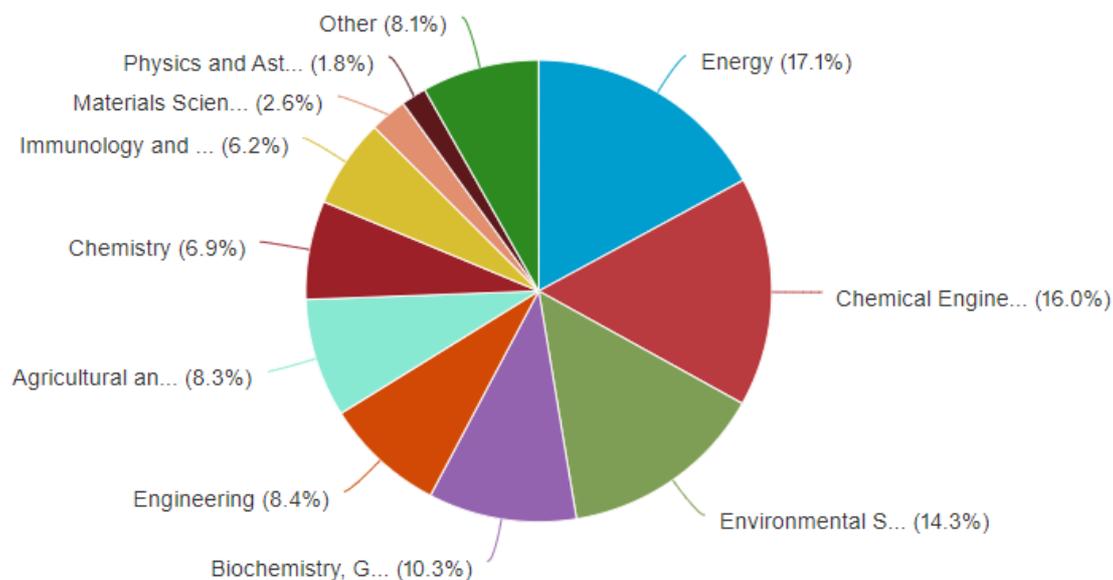


Ilustración 7: gráfica de los temas o ámbitos en los que aparece en Scopus la palabra “bioethanol”. **Fuente:** elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra "bioethanol".

En la ilustración 6 se aprecia un claro crecimiento exponencial del interés por el bioetanol a partir del año 2005 y hasta la actualidad y, como vemos en la gráfica 7, el interés principal del biocombustible continúa siendo su uso como fuente de energía y herramienta para la industria química.

Por último, vamos a focalizarnos algo más, buscando información directamente sobre la hidrólisis enzimática para la producción de estos biocombustibles.

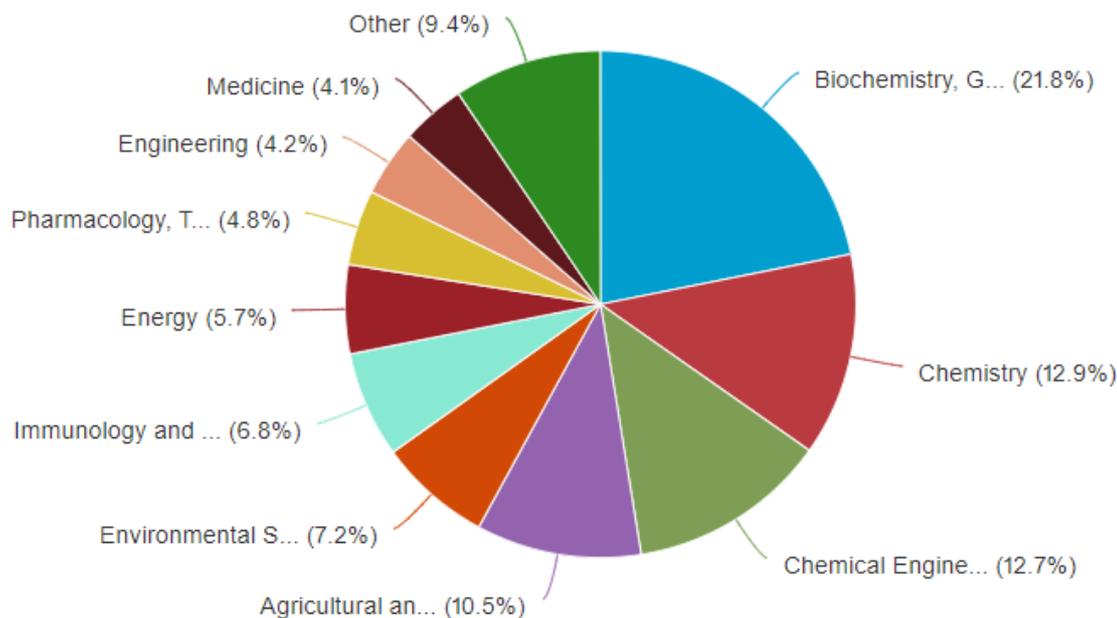


Ilustración 8: gráfica de los campos en los que aparece en Scopus la palabra “enzymatic hydrolysis”. **Fuente:** elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la palabra "enzymatic hydrolysis".

Inesperadamente, el ámbito de la producción de energía no es el objetivo principal de la investigación de la hidrólisis enzimática, sino que lo es la industria bioquímica. Esto se debe a la gran cantidad de aplicaciones que posee esta técnica en cualquier industria. Para encontrar cuán importante es la hidrólisis mediada por enzimas en la producción de biocombustibles nos remitimos a la figura 9, en la cual sí que encontramos la relevancia de la hidrólisis enzimática para la producción de energía, cuya principal área de investigación son las ciencias medioambientales.

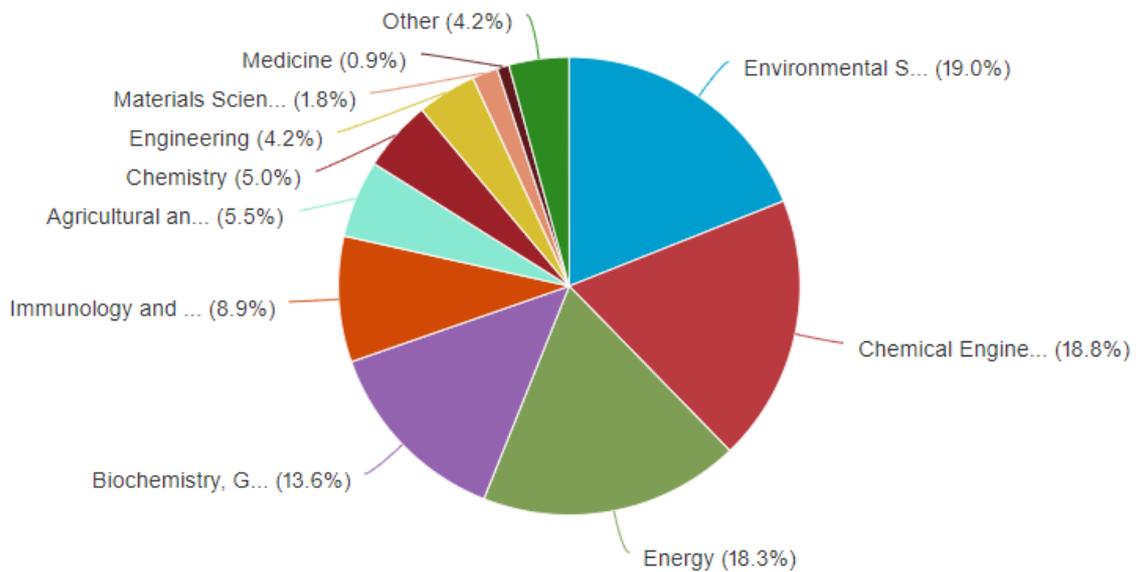


Ilustración 9: gráfica de los campos en los que aparecen en Scopus las palabras “biofuel AND enzymatic hydrolysis”. **Fuente:** elaborado a partir de los datos de Scopus referentes a la búsqueda "biofuel AND enzymatic hydrolysis".

ANEXO 2

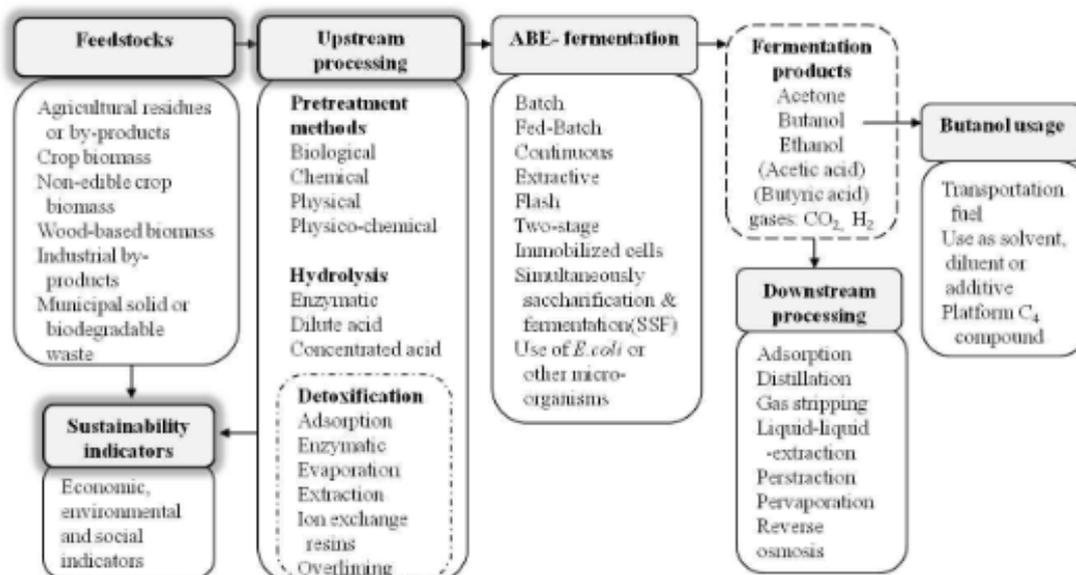


Ilustración 10: esquema del proceso de producción de biobutanol, etapas y opciones de cada una. **Fuente:** Infante C. *Evaluación tecno-económica de la producción de biobutanol a partir de pulpa de remolacha.* 2016;5.

Para evidenciar el efecto positivo de los pretratamientos sobre la biomasa lignocelulósica, han de compararse datos de material lignocelulósico que haya sido pretratado con otro que no, como se muestra en las tablas 1 y 2.

Resultados Hidrólisis Enzimática de Pulpa de Remolacha sin pretratar							
Carga sólido (%)	glucosa (g/L)	fructosa (g/L)	arabinosa (g/L)	Hac (g/L)	HMF (g/L)	furfural (g/L)	HGalac (g/L)
5	2,88	2,12	0,03	0,32	0,00	0,00	0,00
7,5	5,11	3,44	0,11	0,43	0,00	0,00	0,00
10	6,71	4,97	0,19	0,29	0,00	0,00	0,00
Carga sólido (%)	glucosa (g/100g MS)	fructosa (g/100g MS)	arabinosa (g/100g MS)	Hac (g/100g MS)	HMF (g/100g MS)	furfural (g/100g MS)	HGalac (g/100g MS)
5	5,48	4,03	0,07	0,61	0,00	0,00	0,00
7,5	6,30	4,25	0,14	0,53	0,00	0,00	0,00
10	6,04	4,48	0,17	0,26	0,00	0,00	0,00

Tabla 1: resultados de la concentración de los azúcares tras la hidrólisis enzimática de la pulpa de remolacha sin pretratamientos, al 5, 7.5 y 10% de masa sólida. **Fuente:** Infante C. *Evaluación tecno-económica de la producción de biobutanol a partir de pulpa de remolacha.*

2016;5.

Resultados Hidrólisis Enzimática de Pulpa de Remolacha después de Pretratamiento A							
Carga sólido (%)	glucosa (g/L)	fructosa (g/L)	arabinosa (g/L)	Hac (g/L)	HMF (g/L)	furfural (g/L)	HGalac (g/L)
5	16,97	1,30	1,48	0,22	0,00	0,00	4,21
7,5	26,60	2,54	2,75	0,27	0,00	0,00	4,96
10	27,48	3,29	6,20	0,34	0,01	0,00	7,22
Carga sólido (%)	glucosa (g/100g MS)	fructosa (g/100g MS)	arabinosa (g/100g MS)	Hac (g/100g MS)	HMF (g/100g MS)	furfural (g/100g MS)	HGalac (g/100g MS)
5	32,24	2,48	2,82	0,43	0,00	0,00	8,00
7,5	32,81	3,13	3,39	0,33	0,00	0,00	9,42
10	24,73	2,96	5,58	0,30	0,01	0,00	13,72

Tabla 2: resultados de la concentración de los azúcares tras la hidrólisis enzimática de la pulpa de remolacha pretratada con ácido sulfúrico concentrado. **Fuente:** *Infante C. Evaluación tecno-económica de la producción de biobutanol a partir de pulpa de remolacha. 2016;5.*

Pretratamiento	
Agente	Agua
Carga de sólido	6 % (w/w)
Temperatura	120 °C
Tiempo de reacción	5 min
Recuperación de sólido	85,32%
Composición pulpa pretratada y líquido	Tablas 3.2 y 3.4
Ajuste pH previo hidrólisis	
Agente básico	NaOH 6M
pH inicial	4,2
pH final	5
Hidrólisis enzimática	
Carga de sólido	5% (w/w)
Temperatura	50 °C
Tiempo de reacción	72 h
Coctel enzimático	Celluclast 1.5L:15 FPU/g MS Novozyme 188: 0,05 g/g celulosa Pectinex SPL: 60 PGU/g MS
pH	5
Conversiones y Producciones	Tablas 3.6 y 3.7
Ajuste pH previo fermentación	
Agente básico	NaOH 6M
pH inicial	3,3
pH final	6

Tabla 3: condiciones, reactivos y procedimientos llevados a cabo en la producción de biobutanol a partir de la pulpa de remolacha. **Fuente:** *Infante C. Evaluación tecno-económica de la producción de biobutanol a partir de pulpa de remolacha. 2016;5.*

ANEXO3

TIPO	SUSTANCIA BIOORGÁNICA	EJEMPLOS	
LIPIDOS			
Oleaginosa		Semillas de girasol, soja, maíz, lino, almendro	
HIDRATOS DE CARBONO			
Alcoholígena	Monosacáridos	Glucosa	Pulpa de fruta
		Fructosa	Pulpa de fruta
	Disacáridos	Sacarosa	Caña de azúcar, sorgo dulce, remolacha
Amilácea /Inulínica	Polisacáridos	Insulina	Tubérculo de patata y rizomas de dalia, achicoria
		Almidón	Granos de cereal, Tubérculo de patata
Lignocelulósica	Polisacáridos	Hemicelulosa	Maderas en general
		Celulosa	Residuos lignocelulósicos

Tabla 4: tipos de biomasa según su composición. Fuente: de Lucas Herguedas AI, del Peso Taranco C, Rodríguez García E, Prieto Paniagua P. **BIOMASA, BIOCMBUSTIBLES Y SOSTENIBILIDAD**.Palencia;2012.

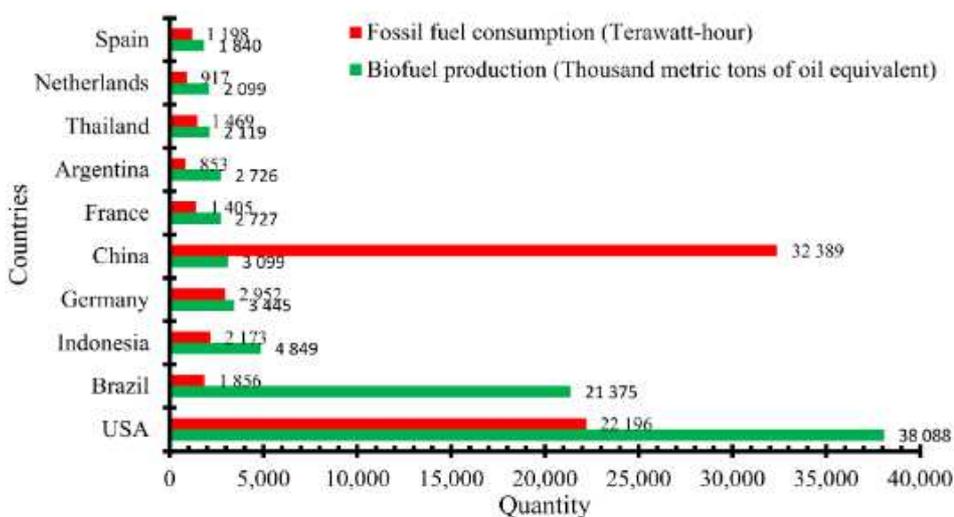


Ilustración 11: imagen con el consumo de combustibles fósiles y la producción de biocombustibles de algunos países. Fuente: Awogbemi O, Von Kallon DV, Onuh EI, Aigbodion VS. *An overview of the classification, production and utilization of biofuels for internal combustion engine applications*. Energies. 2021 Sep 1;14(18).

Biodiesel Production (Thousand Barrels per Day)		Biodiesel Consumption (Thousand Barrels per Day)	
Countries	Volume	Countries	Volume
Indonesia	137.86	US	118.25
US	112.49	Indonesia	106.84
Brazil	99.95	Brazil	99.84
Germany	62.29	Thailand	30.02
Argentina	43.08	China	22.4

Tabla 5: países más productores y consumidores de biodiésel, medido en barriles por día.
Fuente: Awogbemi O, Von Kallon DV, Onuh EI, Aigbodion VS. *An overview of the classification, production and utilization of biofuels for internal combustion engine applications. Energies.* 2021 Sep 1;14(18).

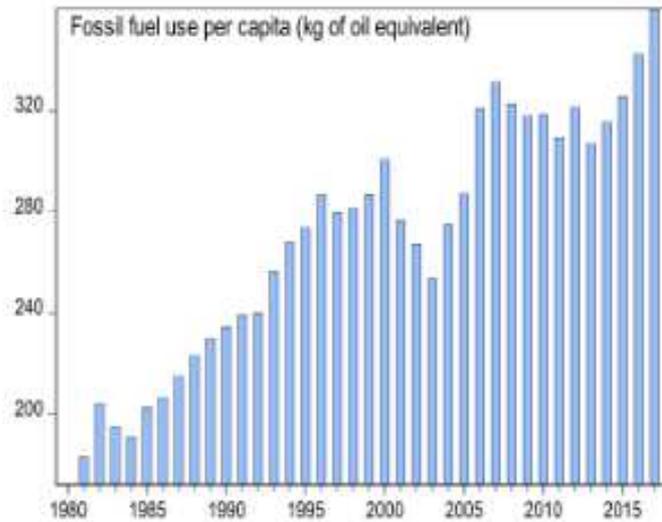


Ilustración 12: consumo de combustibles fósiles por persona (Kg) en Pakistán hasta el año 2017.
Fuente: Baz K, Cheng J, Xu D, Abbas K, Ali H, Fang C. *Asymmetric impact of fossil fuel and renewable energy consumption on economic growth_ A nonlinear technique.* 2021

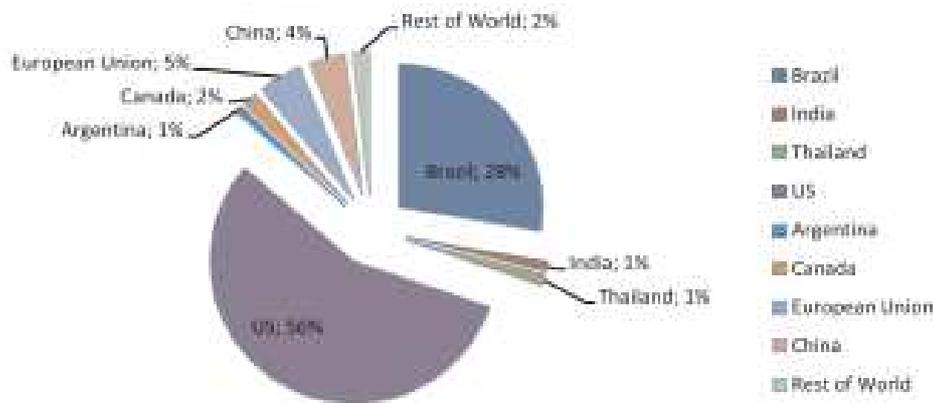


Ilustración 13: países por producción de etanol en 2018. **Fuente:** Sharma B, Larroche C, Dussap CG. *Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. Vol. 313, Bioresource Technology.* 2020.

ANEXO 4

Ahora es necesario estudiar los efectos de la hidrólisis sobre el material lignocelulósico según el tipo de materia prima que se utilice en el proceso, así como los pretratamientos que sufra la misma.

Muestra/tiempo	Concentración de glucosa (g/L)
<i>Bagazo natural (BN)</i>	
Inicial	0
30min	3.5865
1h	4.7665
2h	6.3165
3h	7.8565
4h	8.5065
5h	9.0165
6h	9.4065
7h	9.7865
8h	9.9965
Sobrenadante después del pretratamiento	0
<i>Bagazo hidrolizado (BH)</i>	
Inicial	0
30min	4.3565
1h	5.8965
2h	8.1265
3h	9.7265
4h	10.8965
5h	11.4965
6h	11.9965
7h	12.2965
8h	12.5965
Sobrenadante después del pretratamiento	0

Tabla 6: ejemplo del efecto de la hidrólisis enzimática en el bagazo de caña de azúcar.

Fuente: Araceli Meléndez Hernández P, Ulises Hernández Beltrán J, Hernández-Escoto H, Morales-Rodriguez, R. **ANÁLISIS DEL PRETRATAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES Y**

2G bioethanol production from different feedstocks using different pre-treatment method, microorganism and fermentation conditions.

Feedstock	Pre-treatment	Microorganism	Conditions in the fermenter	Conversion process	Ethanol yield (%) ^a	Ethanol Concentration (g/L)	Ethanol Productivity (g/L.h)
Sugarcane bagasse	SO ₂ (2% w/w moisture) catalyzed steam explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400,	pH-5.0, Temp.-32 °C	5-7.5% WIS/ Batch/SSCF	59	26.70	0.27
Wheat straw	Dilute H ₂ SO ₄ catalyzed steam explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400,	pH-5.0, Temp.-34 °C	9% WIS/ Batch/SSCF	59	33.20	0.33
Wheat straw	Dilute H ₂ SO ₄ catalyzed steam explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400,	pH-5.0, Temp.-34 °C	6-9% WIS/ Fed batch/SSCF	71	38.10	0.38
Sugarcane bagasse	Ammonia Fibre explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 424A LNH-ST	pH-4.8, Temp.-30 °C	18% WIS/ batch/PSSCF	92	33.70	0.28
Sugarcane leaf	Ammonia Fibre explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 424A LNH-ST	pH-4.8, Presaccharification Temp.-50 °C, Fermentation Temp.-30 °C	18% WIS/ batch/PSSCF	92	36.70	0.51
Corn Stover	Ammonia Fibre explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AX101	pH-5.5, Presaccharification Temp.-50 °C Fermentation Temp.-30 °C	18% WIS/ batch/PSSCF	93	47.50	0.77
Brave straw (Paja Brava)	SO ₂ (2% w/w moisture) catalyzed steam explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400,	pH-5.5, Presaccharification Temp.-50 °C Fermentation Temp.-30 °C	7% WIS/ batch/SSCF	80	32.50	0.71
Brave straw (Paja Brava)	SO ₂ (2% w/w moisture) catalyzed steam explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400,	pH-5.5, Temp.-30 °C	6-9% WIS/ Fed batch/SSCF	81	40.40	0.85
Sugarcane bagasse	Dilute acid pretreatment	<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3	pH-4.8, Presaccharification Temp.-50 °C Fermentation Temp-42 °C	8% WIS/ Batch/PSSF	45	14.36	1.79
Wheat straw	Dilute H ₂ SO ₄ catalyzed steam explosion pre-treatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TMB3400,	pH-5.0, Temp.-30 °C	8-11% WIS/ Fed batch/SSCF	69	38.00	0.38
Sugarcane bagasse	Alkaline pretreatment	<i>Cellulase</i>	pH-4.5, Temp-34 °C	24% WIS Fed- batch/SSF	84	72.04	1.80
Banana waste	Acid-catalyzed steam explosion	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ethanol Red	pH-4.8, Temp-38 °C	17.6% WIS PSSF	85	42.00	0.40
Hardwod Vetiver grass	Hydroperoxide acetic acid pretreatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia stipites</i>	pH-5, Temp-37 °C	5 %WIS SSF	80.7	14.8	0.32
	Alkaline-acid pretreatment	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5339	pH-5.0, Temp-30 °C	5 %WIS SSF		3.70	

Tabla 7: muestra la producción de bioetanol de segunda generación a partir de diferentes sustratos y con diferentes pretratamientos o enzimas utilizados. **Fuente:** Ayodele BV, Alsaffar MA, Mustapa SI. *An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. Vol. 245, Journal of*

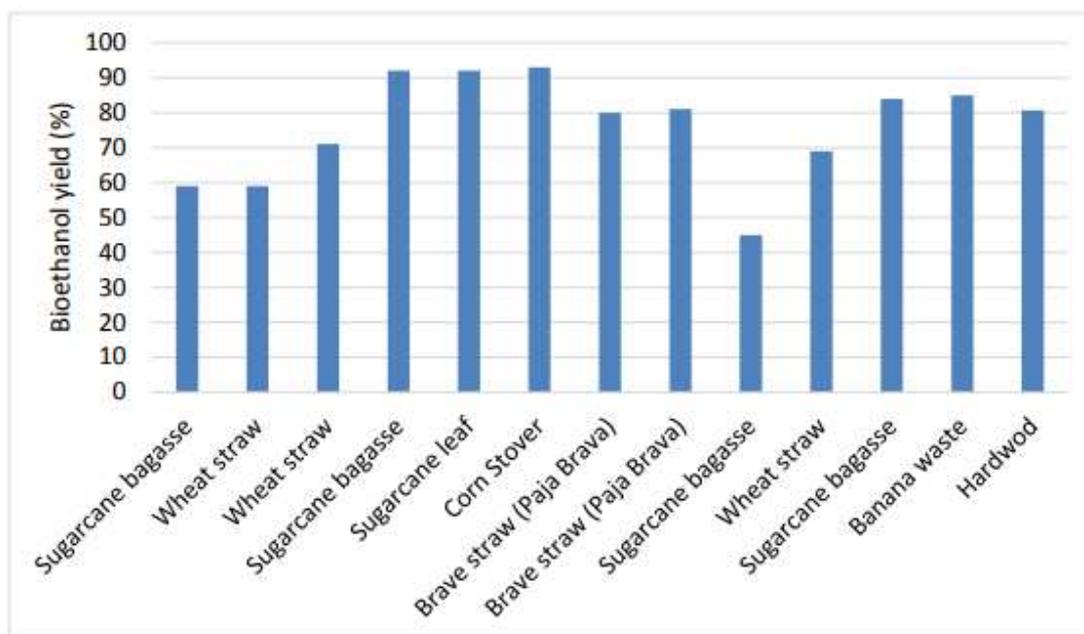


Ilustración 14: gráfica de comparación de los rendimientos del proceso de producción de bioetanol de segunda generación dependiendo de la materia prima utilizada. **Fuente:** Ayodele BV, Alsaffar MA, Mustapa SI. *An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks*. Vol. 245, *Journal of Cleaner Production*. 2020.

Pre-treatment methods	Advantages	Disadvantages
Mechanical pre-treatment	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce cellulose crystallinity - Increase surface area - Reduction of polymerization degree - Easy handling 	<ul style="list-style-type: none"> - High energy input - No lignin removal
Physico-chemical pre-treatment	<ul style="list-style-type: none"> - Increase pore volume - Removal of hemicellulose - Improved enzyme accessibility - Reduction of particle size 	<ul style="list-style-type: none"> - Little lignin removal - Decomposition of sugars - High energy demand
Chemical pre-treatment	<ul style="list-style-type: none"> - Increase surface area - High reaction rate - Removal of hemicellulose - Alteration in lignin structure 	<ul style="list-style-type: none"> - Little lignin removal - Formation of inhibitors - Require neutralization - Require disposal of neutralization salts
Biological pre-treatment	<ul style="list-style-type: none"> - Lignin degradation - Reduction in the degree of polymerization of cellulose and hemicellulose - No chemical required - Mild environmental conditions - Low capital costs - Low energy demand - Low inhibitor formation 	<ul style="list-style-type: none"> - Very slow rate of degradation and delignification - Loss of carbohydrates as consumed by microbes - Long residence times (10–14 days) - Delignification ratio dependent on the microbial strains

Tabla 8: ventajas y desventajas de los 4 grandes tipos de pretratamientos posibles para la biomasa lignocelulósica. **Fuente:** Abo BO, Gao M, Wang Y, Wu C, Ma H, Wang Q. *Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes*. Vol. 34, *Reviews on Environmental Health*. 2019.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lupi V, Marsiglio S. Population growth and climate change_ A dynamic integrated climate-economy-demography model. 2021;
2. Marzo Carpio M. dendra_nov_2014_03_energia_desarrollo_demografia_y_recursos_naturales. 2014;
3. Baz K, Cheng J, Xu D, Abbas K, Ali H, Fang C. Asymmetric impact of fossil fuel and renewable energy consumption on economic growth_ A nonlinear technique. 2021;
4. Guo M, Song W, Buhain J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. Vol. 42, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015.
5. Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. Energy Convers Manag. 2008;49(8).
6. Rodionova M V., Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, et al. Biofuel production: Challenges and opportunities. Vol. 42, International Journal of Hydrogen Energy. 2017.
7. Mohr A, Raman S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. Effic Sustain Biofuel Prod Environ Land-Use Res. 2015;
8. Infante C. Evaluación tecno-económica de la producción de biobutanol a partir de pulpa de remolacha. 2016;5. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/211102072.pdf>
9. de Lucas Herguedas AI, del Peso Taranco C, Rodríguez García E, Prieto Paniagua P. BIOMASA, BIOCOMBUSTIBLES Y SOSTENIBILIDAD. Palencia; 2012.
10. Susmozas A, Martín-Sampedro R, Ibarra D, Eugenio ME, Iglesias R, Manzanares P, et al. Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. Vol. 8, Processes. 2020.
11. Ayodele BV, Alsaffar MA, Mustapa SI. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. Vol. 245, Journal of Cleaner Production. 2020.
12. Malode SJ, Prabhu KK, Mascarenhas RJ, Shetti NP, Aminabhavi TM. Recent advances and viability in biofuel production. Energy Convers Manag X. 2021;10.
13. Gracia C. Biocombustibles: ¿Energía o alimento? Biocombustibles ¿Energía o Aliment. 2004;
14. Pandey R, Kumar G. A Comprehensive Review on Generations of Biofuels: Current Trends, Development and Scope. Int J Emerg Technol (Special Issue NCETST-2017) [Internet]. 2017;8(1):561–5. Available from: www.researchtrend.net
15. Salinas Callejas E, Gasca Quezada V. El Cotidiano: los biocombustibles. 2009; Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32512739009>
16. Awogbemi O, Von Kallon DV, Onuh EI, Aigbodion VS. An overview of the classification, production and utilization of biofuels for internal combustion engine applications. Energies. 2021 Sep 1;14(18).
17. Lee RA, Lavoie JM. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. Anim Front. 2013;3(2).

18. Datta A, Hossain A, Roy S. An overview on biofuels and their advantages and disadvantages. *Asian J Chem.* 2019;31(8).
19. Mat Aron NS, Khoo KS, Chew KW, Show PL, Chen WH, Nguyen THP. Sustainability of the four generations of biofuels – A review. *Int J Energy Res.* 2020;44(12).
20. Priya, Deora PS, Verma Y, Muhal RA, Goswami C, Singh T. Biofuels: An alternative to conventional fuel and energy source. *Mater Today Proc.* 2021 Sep;
21. Sharma B, Larroche C, Dussap CG. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. Vol. 313, *Bioresource Technology.* 2020.
22. Alejos C, Calvo E. Biocombustibles de primera generación First-generation biofuels. Vol. 18, *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* 2015.
23. Dolores Cortés-Sánchez M, Macarena Gata-Montero E, Pipió-Ternero A, Rodríguez-Rivas Juan Manuel Sánchez-Santos Á. *Biocombustibles: tipos y estrategias de producción.* 2010.
24. Urien Pinedo A. Obtención de biocarbones y biocombustibles mediante pirólisis de biomasa residual. Tesis De Máster. 2013;
25. Carmona R. Caracterización física, química y energética de biomasa leñosa como materia prima biocombustible. Sierra. 2015.
26. Fernández-Puratich H, Oliver-Vilanova JV, Valiente M, Verdú S, Albert N. Desarrollo de pellets a partir de tres especies leñosas bajo condiciones mediterráneas. *Madera y Bosques.* 2014;20(3).
27. Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D. Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. 2006;
28. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Vol. 14, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2010. p. 217–32.
29. Castellanos IC, González-Peralta K, Pinzón-Torres SJ. Microalgas como alternativa sostenible para la producción de biodiesel. *Rev Ontare.* 2020;6.
30. Arias DM, Ortíz-Sánchez E, Okoye PU, Rodríguez-Rangel H, Balbuena Ortega A, Longoria A, et al. A review on cyanobacteria cultivation for carbohydrate-based biofuels: Cultivation aspects, polysaccharides accumulation strategies, and biofuels production scenarios. Vol. 794, *Science of the Total Environment.* Elsevier B.V.; 2021.
31. Johnny Jiménez-Jiménez WI, Leonor Valdez-López LI, Matilde Duque-Mariño III M. Fuentes alternativas para la producción de biocombustibles Alternative sources for biofuel production Fontes alternativas para produção de biocombustíveis. 2020;5:200–14. Available from: <http://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es>
32. Garibay Hernández A, Vázquez-Duhalt R, Del Pilar M, Saavedra S, Carreón LS, Jiménez AM. Biodiesel a Partir de Microalgas. *BioTecnología.* 2009;13(3).
33. J. Ragauskas A, Cairney J, Britovsek G, Templer R, ... The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. 2006;
34. Fivga A, Speranza LG, Branco CM, Ouadi M, Hornung A. A review on the current state of the art for the production of advanced liquid biofuels. Vol. 7, *AIMS Energy.* AIMS Press; 2019. p. 46–76.

35. Chanta V. PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE SORGO DULCE (Sorghum bicolor Var . Sugar Drip) POR EXTRACCIÓN CON VAPOR. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial e Industrias Alimentarias. 2015.
36. Branco RHR, Serafim LS, Xavier AMRB. Second generation bioethanol production: On the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. Vol. 5, Fermentation. 2019.
37. Su T, Zhao D, Khodadadi M, Len C. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. Vol. 24, Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. 2020.
38. Hemansi, Gupta R, Yadav G, Kumar G, Yadav A, Saini JK, et al. Second Generation Bioethanol Production: The State of Art. In 2019.
39. Muñoz Muñoz D, Pantoja Matta A, Cuatin Guarín M. Aprovechamiento de residuos agroindustriales como biocombustible y biorefinería. INGRESAR A LA Rev. 2014;12(2).
40. Paredes G. Aprovechamiento de los residuos del café molido y pasado para elaborar un biocombustible de segunda generación. Universidad Central Del Ecuador. 2019.
41. Giovanni W, Ortiz C. MATERIALES LIGNOCELULOSICOS COMO FUENTE DE BIOCOMBUSTIBLES Y PRODUCTOS QUÍMICOS LIGNOCELULOSIC MATERIALS AS SOURCE OF BIOFUELS AND CHEMICAL PRODUCTS. 2011.
42. Robak K, Balcerek M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. Vol. 56, Food Technology and Biotechnology. 2018.
43. Rezaia S, Oryani B, Cho J, Talaiekhosani A, Sabbagh F, Hashemi B, et al. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. Energy. 2020;199.
44. Shrestha S, Fonoll X, Khanal SK, Raskin L. Biological strategies for enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass during anaerobic digestion: Current status and future perspectives. Vol. 245, Bioresource Technology. 2017.
45. Peciulyte A, Karlström K, Larsson PT, Olsson L. Impact of the supramolecular structure of cellulose on the efficiency of enzymatic hydrolysis. Biotechnol Biofuels. 2015;8(1).
46. Paul S, Dutta A. Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. Vol. 130, Resources, Conservation and Recycling. Elsevier B.V.; 2018. p. 164–74.
47. Baig KS, Wu J, Turcotte G. Future prospects of delignification pretreatments for the lignocellulosic materials to produce second generation bioethanol. International Journal of Energy Research. 2019.
48. Taheri ME, Salimi E, Saragas K, Novakovic J, Barampouti EM, Mai S, et al. Effect of pretreatment techniques on enzymatic hydrolysis of food waste. Biomass Convers Biorefinery. 2021;11(2).
49. Araceli Meléndez Hernández P, Ulises Hernández Beltrán J, Hernández-Escoto H, Morales-Rodríguez R. ANÁLISIS DEL PRETRATAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES Y BIOPRODUCTOS DE ALTO VALOR AGREGADO. Vol. 1. 2015.
50. Jeong SY, Lee EJ, Ban SE, Lee JW. Structural characterization of the lignin-

carbohydrate complex in biomass pretreated with Fenton oxidation and hydrothermal treatment and consequences on enzymatic hydrolysis efficiency. *Carbohydr Polym.* 2021 Oct 15;270.

51. Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis [Internet]. 2010. Available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4>
52. Hosseini Koupaie E, Dahadha S, Bazyar Lakeh AA, Azizi A, Elbeshbishy E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production. Vol. 233, *Journal of Environmental Management.* 2019.
53. Saini JK, Saini R, Tewari L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. Vol. 5, 3 *Biotech.* 2015.
54. Chávez Altamirano CE, López Calvopiña FG, Palate Chicaiza XM, Jacome Pilco CR. Potencialidad de Biocombustibles a partir de Residuos Orgánicos. *Rev Sci.* 2021;6(21).
55. Vasic K, Knez zeljko, Leitgeb M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. 2021;
56. Nuñez JL. MICROPLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL COMBUSTIBLE A PARTIR DE LIGNOCELULOSAS. *Télématique.* 2017;16(1).
57. Han W, Liu Y, Xu X, Huang J, He H, Chen L, et al. Bioethanol production from waste hamburger by enzymatic hydrolysis and fermentation. *J Clean Prod.* 2020;264.
58. Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. Vol. 26, *Molecules.* 2021.
59. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers Manag.* 2011;52(2).
60. Kandhola G, Djiroleu A, Carrier DJ, Kim JW. Pretreatments for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Pinewood: a Review. Vol. 10, *Bioenergy Research.* Springer New York LLC; 2017. p. 1138–54.
61. Cortes W. Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. *Rev Tecnol.* 2015;13.
62. Ab Rasid NS, Shamjuddin A, Abdul Rahman AZ, Amin NAS. Recent advances in green pre-treatment methods of lignocellulosic biomass for enhanced biofuel production. Vol. 321, *Journal of Cleaner Production.* Elsevier Ltd; 2021.
63. Huang C, Jiang X, Shen X, Hu J, Tang W, Wu X, et al. Lignin-enzyme interaction_ A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. 2021;
64. Sun S, Sun S, Cao X, Sun R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Vol. 199, *Bioresource Technology.* 2016.
65. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol.* 2010;101(13).
66. Zhang Q, Zhang P, Pei ZJ, Wang D. Relationships between cellulosic biomass particle size and enzymatic hydrolysis sugar yield_ Analysis of inconsistent reports in the literature. 2013;

67. De Guilherme AA, Dantas PVF, Soares JCJ, Dos Santos ES, Fernandes FAN, De Macedo GR. Pretreatments and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse aiming at the enhancement of the yield of glucose and xylose. *Brazilian J Chem Eng.* 2017;34(4).
68. Utekar PG, Kininge MM, Gogate PR. Intensification of delignification and enzymatic hydrolysis of orange peel waste using ultrasound for enhanced fermentable sugar production. *Chem Eng Process - Process Intensif.* 2021 Nov 1;168.
69. Wahlström R, Suurnäkki A. Enzymatic Hydrolysis Intensification of Lignocellulolytic Enzymes Through Ultrasonic Treatment. 2021;
70. Hidayat BJ, Felby C, Johansen KS, Thygesen LG. Cellulose is not just cellulose: A review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils. *Cellulose.* 2012 Oct;19(5):1481–93.
71. Sharma HK, Xu C, Qin W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. Vol. 10, *Waste and Biomass Valorization.* 2019.
72. Candido RG, Mori NR, Gonçalves AR. Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod.* 2019;142.
73. Banvillet G, Depres G, Belgacem N, Bras J. Alkaline treatment combined with enzymatic hydrolysis for efficient cellulose nanofibrils production. *Carbohydr Polym.* 2021 Mar 1;255.
74. Chen X, Zhai R, Li Y, Yuan X, Liu ZH, Jin M. Understanding the structural characteristics of water-soluble phenolic compounds from four pretreatments of corn stover and their inhibitory effects on enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnol Biofuels.* 2020;13(1).
75. Cheah WY, Sankaran R, Show PL, Ibrahim TNBT, Chew KW, Culaba A, et al. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: Current advances, challenges and future prospects. Vol. 7, *Biofuel Research Journal.* 2020.
76. Zhao X, Cheng K, Liu D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. Vol. 82, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2009.
77. Stamogiannou I, Van Camp J, Smagghe G, Van de Walle D, Dewettinck K, Raes K. Impact of phenolic compound as activators or inhibitors on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Int J Biol Macromol.* 2021 Sep 1;186:174–80.
78. Espirito Santo M, Rezende CA, Bernardinelli OD, Pereira N, Curvelo AAS, deAzevedo ER, et al. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod.* 2018;113.
79. Sun S, Sun S, Cao X, Sun R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials _ Elsevier Enhanced Reader. 2015;
80. Yuan Y, Jiang B, Chen H, Wu W, Wu S, Jin Y, et al. Recent advances in understanding the effects of lignin structural characteristics on enzymatic hydrolysis. Vol. 14, *Biotechnology for Biofuels.* BioMed Central Ltd; 2021.
81. Amit K, Nakachew M, Yilikal B, Mukesh Y. A review of factors affecting enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic Biomass. Vol. 22, *Research Journal of Chemistry and Environment.* 2018.

82. Da Silva ASA, Espinheira RP, Teixeira RSS, De Souza MF, Ferreira-Leitão V, Bon EPS. Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: A critical review. Vol. 13, *Biotechnology for Biofuels*. 2020.
83. Abo BO, Gao M, Wang Y, Wu C, Ma H, Wang Q. Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. Vol. 34, *Reviews on Environmental Health*. 2019.
84. Zhang H, Han L, Dong H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. Vol. 140, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021.
85. Li WC, Han LJ, Peng TB, Xie YY, Zou Y, Li LZ, et al. Structural and behavior changes of herbaceous and hardwood biomass during steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis. *BioResources*. 2020;15(1).
86. Heller D, Einfalt D. Wildflower mixtures for bioethanol production - Pretreatment and enzymatic hydrolysis. Vol. 141, *Biomass and Bioenergy*. 2020.
87. Ambaye TG, Vaccari M, Bonilla-Petriciolet A, Prasad S, van Hullebusch ED, Rtimi S. Emerging technologies for biofuel production: A critical review on recent progress, challenges and perspectives. Vol. 290, *Journal of Environmental Management*. Academic Press; 2021.
88. Wu R, Liu W, Li L, Ren Q, Jiang C, Hou Q. Combination of hydrothermal and chemi-mechanical pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis of poplar branches and insights on cellulase adsorption. 2021;
89. Tian X, Fang Z, Guo F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. 2012;
90. Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Montoya D. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos_ casos clásicos y nuevos modelos. 2013;
91. Zoghalmi A, Paës G. Lignocellulosic Biomass_ Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. 2019;
92. Aktas-Akyildiz E, Masatcioglu MT, Köksel H. Effect of extrusion treatment on enzymatic hydrolysis of wheat bran. *J Cereal Sci*. 2020;93.
93. Park J, Shin H, Yoo S, Zoppe JO, Park S. Delignification of lignocellulosic biomass and its effect on subsequent enzymatic hydrolysis. *BioResources*. 2015;10(2).
94. Oh YK, Hwang KR, Kim C, Kim JR, Lee JS. Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. Vol. 257, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 320–33.
95. Lopes AM, Ferreira Filho EX, Moreira LR. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown _ Enhanced Reader. *J Appl Microbiol*. 2018;632–45.
96. Bernardes Costa BE, Da Cruz RS, Rangel FC, Plentz Meneghetti SM. Comparison between chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production: A review. Vol. 13, *Revista Virtual de Química*. 2021.
97. Karim Z, Afrin S, Husain Q, Danish R. Necessity of enzymatic hydrolysis for production and functionalization of nanocelluloses. Vol. 37, *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017.

98. Álvarez C, Reyes-Sosa FM, Díez B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. 2016;
99. Ribeiro RSA, Pohlmann BC, Calado V, Bojorge N, Pereira N. Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. Vol. 19, *Engineering in Life Sciences*. 2019.
100. Chen HZ, Liu ZH. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. Vol. 17, *Engineering in Life Sciences*. 2017.
101. Bertacchi S, Jayaprakash P, Branduardi P, P.Morrissey J. Interdependence between lignocellulosic biomasses, enzymatic hydrolysis and yeast cell factories in biorefineries. 2021;
102. García Sanz A. Recuperación de bioetanol de disoluciones acuosas para la obtención de biocombustibles mediante ciclos de adsorción-desorción. Madrid; 2017. p. 1–231.
103. Zhang H, Wu S, Xie J. Evaluation of the effects of isolated lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Enzyme Microb Technol*. 2017;101.
104. Flávia A, de Oliva P, Fernandes D, Maria G. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials_ Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. 2012;
105. Percival Zhang Y-H, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose_ Noncomplexed cellulase systems. 2004;
106. Gong Z, Yang G, Song J, Zheng P, Liu J, Zhu W, et al. Understanding the promoting effect of non-catalytic protein on enzymatic hydrolysis efficiency of lignocelluloses. *Bioresour Bioprocess*. 2021;8(1).
107. Barbosa FC, Silvello MA, Goldbeck R. Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. Vol. 42, *Biotechnology Letters*. 2020.
108. Kashcheyeva EI, Gladysheva EK, Skiba EA, Budaeva V V. A study of properties and enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. *Cellulose*. 2019;26(4).
109. Wang X, Cheng S, Li Z, Men Y, Wu J. Impacts of cellulase and amylase on enzymatic hydrolysis and methane production in the anaerobic digestion of corn straw. *Sustain*. 2020;12(13).
110. Scheiblbrandner S, Csarman F, Ludwig R. Cellobiose dehydrogenase in biofuel cells. Vol. 73, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2022. p. 205–12.
111. Rocha-Martín J, Martínez-Bernal C, Pérez-Cobas Y, Reyes-Sosa FM, García BD. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2017;244.
112. Kim IJ, Lee HJ, Choi IG, Kim KH. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. Vol. 98, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag; 2014. p. 8469–80.
113. Xu C, Asraful Alam M, Wang Z, Chen H, Zhang J, Huang S, et al. Mechanisms of bio-additives on boosting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2021;337.
114. Rozenfelde L, Puíe M, Krûma I, Poppele I, Matjuškova N, Vederòikovs N, et al. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose for bioethanol production. *Proc Latv Acad Sci*

Sect B Nat Exact, Appl Sci. 2017;71(4).

115. Cintra LC, da Costa IC, de Oliveira ICM, Fernandes AG, Faria SP, Jesuino RSA, et al. The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Technol.* 2020;133.
116. Dutta SK, Chakraborty S. Mixing effects on the kinetics and the dynamics of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose for biofuel production. *Bioresour Technol.* 2018 Jul 1;259:276–85.
117. Penttilä PA, Imai T, Hemming J, Willför S, Sugiyama J. Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose–hemicellulose composites. *Carbohydr Polym.* 2018;190.
118. Li X, Li M, Pu Y, Ragauskas AJ, Klett AS, Thies M, et al. Inhibitory effects of lignin on enzymatic hydrolysis: The role of lignin chemistry and molecular weight. *Renew Energy.* 2018;123.
119. Jang JH, Hayashi N, Han SY, Park CW, Febrianto F, Lee SH, et al. Changes in the dimensions of lignocellulose nanofibrils with different lignin contents by enzymatic hydrolysis. *Polymers (Basel).* 2020;12(10).
120. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. Vol. 410, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* Springer Verlag; 2018. p. 3407–23.
121. Pino MS, Rodríguez-Jasso RM, Michelin M, Flores-Gallegos AC, Morales-Rodríguez R, Teixeira JA, et al. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. Vol. 347, *Chemical Engineering Journal.* 2018.
122. Candido RG, Mori NR, Gonçalves AR. Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod.* 2019 Dec 15;142.
123. Modenbach AA, Nokes SE. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. Vol. 56, *Biomass and Bioenergy.* 2013.
124. Shabrina A, Suryadi H. Effects of Beta Glucosidase Inhibitor on Cellulase Enzyme Activity for Preparation of Microcrystalline Cellulose from Water Hyacinth. 2019;
125. Baksi S, Ball AK, Sarkar U, Banerjee D, Wentzel A, Preisig HA, et al. Efficacy of a novel sequential enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass and inhibition characteristics of monosugars. *Int J Biol Macromol.* 2019;129.
126. Huang Y, Sun S, Huang C, Yong Q, Elder T, Tu M. Stimulation and inhibition of enzymatic hydrolysis by organosolv lignins as determined by zeta potential and hydrophobicity. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10(1).
127. Culebro J. Cosechado de microalgas cultivadas en lagunas de alta carga para el tratamiento de aguas residuales: efecto del almidón sobre la floculación y la producción de biogás. *Grupo De Ingeniería Ambiental Y Microbiología.* 2015.
128. Gómez Gato G. Hidrólisis enzimática en biomasa microalgal procedente del tratamiento de aguas residuales con purines [Internet]. Valladolid; 2016 [cited 2021 Oct 19]. Available from: https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/18242/TFG_-I-418.pdf;jsessionid=0ADB3261A89FFDDF2F1CC5847E3FD842?sequence=1
129. Márquez Coronel AJ, Salazar Román EJ. Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible. *Acta*

Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 2015.

130. Shokrkar H, Ebrahimi S, Zamani M. Enzymatic hydrolysis of microalgal cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis. *Fuel*. 2018;228.
131. Araujo J, Sica P, Costa C, Márquez MC. Enzymatic Hydrolysis of Fish Waste as an Alternative to Produce High Value-Added Products. *Waste and Biomass Valorization*. 2021;12(2).
132. Liu Y, Han W, Xu X, Chen L, Tang J, Hou P. Ethanol production from waste pizza by enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biochem Eng J*. 2020;156.
133. Wang L, Templer R, Murphy RJ. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Appl Energy*. 2012;99:23–31.
134. Rajnish KN, Samuel MS, John J A, Datta S, Chandrasekar N, Balaji R, et al. Immobilization of cellulase enzymes on nano and micro-materials for breakdown of cellulose for biofuel production-a narrative review. Vol. 182, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2021. p. 1793–802.
135. Pankratova G, Bollella P, Pankratov D, Gorton L. Supercapacitive biofuel cells. Vol. 73, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2022. p. 179–87.
136. Javed MR, Noman M, Shahid M, Ahmed T, Khurshid M, Rashid MH, et al. Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. Vol. 219, *Microbiological Research*. 2019.
137. Riaz S, Rhee KY, Park SJ. Polyhydroxyalkanoates (Phas): Biopolymers for biofuel and biorefineries. Vol. 13, *Polymers*. 2021.
138. Amoozegar MA, Safarpour A, Noghabi KA, Bakhtiary T, Ventosa A. Halophiles and their vast potential in biofuel production. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. 2019.
139. Sekoai PT, Ouma CNM, du Preez SP, Modisha P, Engelbrecht N, Bessarabov DG, et al. Application of nanoparticles in biofuels: An overview. Vol. 237, *Fuel*. 2019.
140. Podolsky IA, Schauer EE, Seppälä S, O'Malley MA. Identification of novel membrane proteins for improved lignocellulose conversion. Vol. 73, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2022. p. 198–204.