



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**“INNOVACIÓN ENZIMÁTICA EN LA PRODUCCIÓN DE  
BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: REVISIÓN”**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTOR: DIEGO ALEXIS GARCÉS GAMBOA**

**DIRECTORA: Ing. ANA RAFAELA PACURUCU REYES MSc.**

Riobamba - Ecuador

2021

**© 2021, Diego Alexis Garcés Gamboa**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, DIEGO ALEXIS GARCÉS GAMBOA, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 8 de septiembre de 2021



**Diego Alexis Garcés Gamboa**

**180354572-0**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación: Tipo: Proyecto de Investigación, “**INNOVACIÓN ENZIMÁTICA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: REVISIÓN**”, realizado por el señor: **DIEGO ALEXIS GARCÉS GAMBOA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Paúl Gustavo Palmay Paredes MSc. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	 Firmado electrónicamente por: <b>PAUL GUSTAVO PALMAY PAREDES</b>	2021-09-08
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes MSc. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	<b>ANA RAFAELA PACURUC U REYES</b>  Firmado digitalmente por ANA RAFAELA PACURUCU REYES Fecha: 2021.11.08 23:29:21 -05'00'	2021-09-08
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc. <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	 Firmado electrónicamente por: <b>CRISTINA GABRIELA CALDERON TAPIA</b>	2021-09-08

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi madre Mélida Liliana Gamboa Abril por ser mi guía y mi maestra de vida, a mi padre Efraín Marcelo Garcés por ser mi apoyo y sustento para cumplir esta meta, a mi hermana Cintia Garcés por ser mi ejemplo a seguir. A mis compañeros y amigos politécnicos por ser mi familia en la ciudad de Riobamba. Gracias a todos.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Ing. Ana Rafaela Pacurucu por brindarme su tiempo, guía y apoyo en la consecución del presente trabajo, a la Ing. Cristina Calderón por su orientación en la elaboración del anteproyecto y al Ing. Paúl Palmay por sus enseñanzas en las aulas de clase.

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY/ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	1

### CAPÍTULO I

<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Bases teóricas .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1. Biocombustibles .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2. Bioetanol: tendencias mundiales .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2.1. Brasil.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2.2. Argentina .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2.3. Estados Unidos .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2.4. Ecuador.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3. Enzimas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.4. Modelo PRISMA .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Bases conceptuales .....</b>	<b>9</b>

### CAPÍTULO II

<b>2. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Tipo de Investigación.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Diseño de la Investigación .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1. Diseño No experimental .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2.1. Identificación de Variables .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2.2. Planteamiento de la hipótesis .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2.3. Operacionalización de los objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2.4. Localización del estudio .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2.5. Población de estudio.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2.6. Tamaño de la muestra .....</b>	<b>13</b>

2.2.2.7.	<i>Método de muestreo</i> .....	13
2.2.2.8.	<i>Técnicas de recolección de datos</i> .....	14
2.2.2.9.	<i>Análisis Estadístico Descriptivo</i> .....	16

### CAPÍTULO III

<b>3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	17
<b>3.1. Base de datos</b> .....	17
3.1.1. <i>Selección de estudios</i> .....	17
3.1.2. <i>Análisis de estudios realizados por países</i> .....	18
3.1.3. <i>Análisis de estudios realizados según idioma</i> .....	18
3.1.4. <i>Análisis de estudios realizados por año</i> .....	19
3.1.5. <i>Estudios de alto impacto seleccionados</i> .....	20
<b>3.2. Revisión clásica</b> .....	25
3.2.1. <i>Producción de bioetanol</i> .....	25
3.2.2. <i>Bioetanol de segunda generación</i> .....	26
3.2.2.1. <i>Materia prima lignocelulósica</i> .....	26
3.2.2.2. <i>Proceso de producción de bioetanol lignocelulósico</i> .....	31
3.2.2.3. <i>Configuración de procesos</i> .....	35
3.2.3. <i>Enzimas Lignocelulolíticas</i> .....	36
3.2.3.1. <i>Enzimas lignolíticas</i> .....	36
3.2.3.2. <i>Enzimas Hidrolíticas</i> .....	38
3.2.4. <i>Procedimiento general de producción de enzimas recombinantes bacterianas</i> .....	49
3.2.4.1. <i>Identificación de la secuencia</i> .....	49
3.2.4.2. <i>Obtención del gen (método tradicional)</i> .....	51
3.2.4.3. <i>Ligación a un vector de expresión</i> .....	52
3.2.4.4. <i>Transformación</i> .....	53
3.2.4.5. <i>Screening y Selección</i> .....	53
3.2.4.6. <i>Fermentación e inducción</i> .....	54
3.2.4.7. <i>Separación y purificación</i> .....	54
3.2.5. <i>Estrategias actuales para el mejoramiento y descubrimiento de nuevas enzimas</i> ... 55	
3.2.5.1. <i>Mutagénesis y evolución dirigida</i> .....	56
3.2.5.2. <i>Fusión de protoplastos</i> .....	57
3.2.5.3. <i>Biodescubrimiento</i> .....	58
3.2.5.4. <i>Diseño racional</i> .....	59
3.2.5.5. <i>CRISPR-Cas9</i> .....	60
3.2.6. <i>Aplicación de enzimas modificadas en Biorefinería</i> .....	60

<b>CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	64
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Operacionalización de los objetivos .....	13
<b>Tabla 1-3:</b> Resultados de estudios incluidos a la síntesis cualitativa .....	20
<b>Tabla 2-3:</b> Composición de distintos materiales lignocelulósicos.....	37
<b>Tabla 3-3:</b> Enzimas hidrolíticas empleadas en la degradación de lignina.....	38
<b>Tabla 4-3:</b> Enzimas hidrolíticas para la degradación de la biomasa lignocelulósica (celulasa).	41
<b>Tabla 5-3:</b> Enzimas hidrolíticas para la degradación de la biomasa lignocelulósica (xilanasas)	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Clasificación general de enzimas basadas en sus funciones catalíticas .....	8
<b>Figura 2-1:</b> Modelo de flujo para búsqueda bibliográfica y selección de estudios .....	9
<b>Figura 1-3:</b> Producción de etanol a partir de diferentes materias primas.....	25
<b>Figura 2-3:</b> Composición de la lignocelulosa .....	27
<b>Figura 3-3:</b> Estructura esquemática de una fibra de biomasa lignocelulósica .....	27
<b>Figura 4-3:</b> Estructura de las fibras de celulosa .....	28
<b>Figura 5-3:</b> Regiones cristalinas y amorfas en la celulosa .....	28
<b>Figura 6-3:</b> Monómeros de la hemicelulosa .....	29
<b>Figura 7-3:</b> Columna vertebral de la hemicelulosa.....	29
<b>Figura 8-3:</b> Tipo común de hemicelulosas en las paredes celulares de las plantas.....	30
<b>Figura 9-3:</b> Etapas del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación .....	31
<b>Figura 10-3:</b> Proceso bioquímico para la conversión de residuos lignocelulósicos en etanol ...	32
<b>Figura 11-3:</b> Alteración de la lignocelulosa mediante el pretratamiento de la biomasa .....	32
<b>Figura 12-3:</b> Configuraciones del proceso de bioetanol de biomasa lignocelulósica .....	34
<b>Figura 13-3:</b> Varias enzimas lignocelulolíticas agrupadas según sus sistemas enzimáticos .....	36
<b>Figura 14-3:</b> Despolimerización de la celulosa.....	39
<b>Figura 15-3:</b> Acción del celulosoma en la sacarificación de la celulosa .....	40
<b>Figura 16-3:</b> Mecanismo de biodegradación de la celulosa.....	44
<b>Figura 17-3:</b> Estructura química y degradación de hemicelulosa .....	45
<b>Figura 18-3:</b> Funciones hidrolíticas de las xilanasas en la despolimerización del xilano.....	45
<b>Figura 19-3:</b> Procedimiento general de producción de enzimas recombinantes bacterianas .....	49
<b>Figura 20-3:</b> Vías de exportación de proteínas en las bacterias (Lamberzt, 14).....	51
<b>Figura 21-3:</b> Estrategias modernas para descubrir nuevas enzimas.....	56
<b>Figura 22-3:</b> Visión general de evolución dirigida para mejora de las cepas .....	57
<b>Figura 23-3:</b> Bioprospección de enzimas mediante metagenomas de microflora intestinal (insectos) .....	59

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Diagrama de flujo de búsqueda bibliográfica y selección de estudios .....	17
<b>Gráfico 2-3:</b> Análisis de estudios realizados por países .....	18
<b>Gráfico 3-3:</b> Análisis de estudios realizados según idioma .....	18
<b>Gráfico 4-3:</b> Análisis de estudios realizados por año.....	19
<b>Gráfico 5-3:</b> Producción de etanol (g/L) después de 3 días de fermentación .....	62

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A: BITÁCORA DE BÚSQUEDA**

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue realizar una revisión bibliográfica sobre la innovación enzimática para la producción de bioetanol de segunda generación aplicando una revisión clásica y una estrategia de búsqueda estructurada. Se encontraron 108 referencias bibliográficas, documentos enfocados a la producción de bioetanol de segunda generación y el rol protagónico que tienen las enzimas en este proceso. Tras la aplicación del modelo PRISMA de selección y cribado; cincuenta artículos de alto impacto fueron seleccionados por cumplir criterios de idoneidad y estar publicados en revistas indexadas de acuerdo con *SCIMAGO Journal and Country Rank* (SJR); 18 de las 50 publicaciones fueron procedentes de Reino Unido. De acuerdo con el idioma de publicación se detectaron 49 documentos en idioma inglés. Del total de publicaciones seleccionadas, diez corresponden a artículos científicos de 2020. Esta investigación ha permitido recopilar y analizar información actualizada sobre el proceso de producción de bioetanol de segunda generación, las enzimas utilizadas en el proceso y la producción de enzimas recombinantes bacterianas; además, de mostrar la estrecha relación de la biotecnología con la protección ambiental en favor del planeta. Con el fin de obtener una búsqueda más rápida y precisa a través de bases de datos, se recomienda utilizar operadores booleanos y palabras clave que reflejen el contenido de la búsqueda.

**Palabras clave:** <ENZIMAS>, <SACARIFICACIÓN>, <HIDRÓLISIS>, <ETANOL>, <LIGNOCELULOSA>, <HONGOS>, <BACTERIAS>.

LEONARDO  
FABIO MEDINA  
NUSTE

Firmado digitalmente  
por LEONARDO FABIO  
MEDINA NUSTE  
Fecha: 2021.10.06  
08:54:21 -05'00'



1857-DBRA-UTP-2021

## SUMMARY

The aim of this research was to carry out a bibliographic review on enzymatic innovation for the production of second-generation bioethanol, applying a classic review as well as an organized search strategy. 108 bibliographic references and documents focused on the production of second-generation bioethanol were found as well as the role that leading enzymes have in this process. After the use of the PRISMA selection and screening model, fifty high impact articles were selected since they accomplish the suitability criteria and are published in SCIMAGO Journal and Country Rank (SJR) indexed journals; 18 out of 50 publications were from the United Kingdom. According to the publication language, 49 documents were written in English. From the total number of selected publications, ten correspond to scientific articles published in 2020. This research allowed to collect and analyze updated information on the second-generation bioethanol production process, the enzymes used in the process and the production of recombinant bacterial enzymes. In addition, it was possible to demonstrate the close relationship existing between biotechnology and environmental protection for the planet. In order to obtain a faster and precise search through databases, it is recommended to use Boolean operators and keywords that reflect the content of the search.

**Keywords:** <ENZYMES>, <SACCHARIFICACIÓN>, <HYDRÓLYSIS>, <ETHANOL>, <LIGNOCELLULOSE>, <FUNGUS>, <BACTERIA>.



Firmado electrónicamente por:  
**PAUL ROLANDO  
ARMAS PESANTEZ**

## INTRODUCCIÓN

La demanda de fuentes de energía limpia y renovable está aumentando como alternativa frente a los combustibles fósiles tradicionales para satisfacer los desafíos mundiales de energía, medio ambiente y clima. Ecuador ha dependido indudablemente de la explotación de petróleo, desde que se inicia la explotación de crudo en el año de 1973. En la actualidad las reservas de petróleo son limitadas, según datos de Petroecuador a partir del año 2012 la producción de crudo ecuatoriano empezó a declinar, los cálculos dicen que para el 2023 posiblemente pasaremos a ser importadores de hidrocarburos (Márquez, 2014, p.34). Adicional a ello, el impacto ambiental de su fabricación es significativo, en específico por sus efectos directos e indirectos sobre la deforestación y la pérdida inalterable de biodiversidad en la Amazonía. Como alternativa, los biocombustibles podrían tener ventajas sobre los combustibles fósiles con respecto a sus bajos costos y alto contenido energético, así como también podrían tener una ganancia de energía, debido a que se lograrían beneficios ambientales mismos que pueden ser reproducibles en grandes sumas sin impactar el abastecimiento de alimentos (Castro, 2012, p.16).

La finalidad de esta investigación de carácter documental es explorar los últimos avances investigativos sobre el uso de enzimas microbianas para la optimización de la producción de bioetanol de segunda generación a través de la revisión bibliográfica de artículos científicos de primer orden con alto impacto a nivel mundial relacionados con esta área del conocimiento.

Se considera como biocombustibles de segunda generación aquellos combustibles celulósicos que se producen a partir de materias primas no alimentares como lo son los residuos agroindustriales, su producción depende en gran medida de los microorganismos que intervienen en el proceso si hablamos de hidrólisis enzimática y fermentación (Verdecía y Serrat, 2010, párr.3). Las diferentes variedades de microorganismos responsables de la descomposición de la biomasa lignocelulósica ofrecen una cuantiosa fuente de enzimas con la capacidad de fragmentar de forma eficiente la hemicelulosa y la celulosa en azúcares fermentables (Verdecía y Serrat, 2010, p.12). Teniendo en cuenta que las enzimas microbianas son moléculas de proteínas generadas por microorganismos de forma natural o modificadas genéticamente con la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas dependiendo de su especificidad donde la biotecnología microbiana provee los métodos para manipular el metabolismo de los microorganismos cultivados a gran escala cuya mejora de características da lugar a nuevos productos microbianos. Cuando las cuatro transformaciones de la biomasa lignocelulósica ocurren en un paso simple o etapa, esta configuración se denomina bioproceso consolidado esto se distingue porque un mismo microorganismo produce las enzimas hidrolíticas y realiza la fermentación de la biomasa (Liu et al., 2018, párr.8).

La tendencia actual es hacia la hidrólisis enzimática para evitar los costos que conlleva la recuperación y tratamiento de aguas residuales resultantes, un proceso enzimático es más

amigable con el ambiente que los procesos químicos tradicionales, además de ser atractiva porque produciría mejores rendimientos y se reducirían los costos de producción de manera sustancial utilizando la biotecnología. La optimización de enzimas mejorarían el proceso en características como alto rendimiento del etanol, amplia gama de utilización de sustratos, resistencia a los compuestos inhibidores generados durante el curso de la hidrólisis de la lignocelulosa y la fermentación del etanol, la capacidad de soportar altos niveles de azúcar y concentraciones de alcohol, temperaturas más altas, menor pH y formación mínima de subproductos (Vohra et al., 2014, p.17).

Como instrumento de recolección de información se utilizarán bases de datos bibliográficos que contengan investigaciones con los mejores cuartiles y a su vez sean estudios actualizados de alto impacto a nivel global.

### **Justificación**

Una investigación documental es un procedimiento científico, un proceso sistemático de indagación, recolección, organización, análisis e interpretación de información o datos en torno a un determinado tema (Vera, 2018, p.14). Al igual que otros tipos de investigación, este es conducente a la construcción de conocimientos; su finalidad es examinar la bibliografía publicada y situarla en cierta perspectiva proporcionando al lector una actualización sobre conocimientos útiles en áreas en constante desarrollo. Este tipo de revisión tiene una gran utilidad en la enseñanza, y también es de interés de muchas personas de campos conexos, porque leer buenas revisiones es la mejor forma de estar al día en esferas generales de interés (Vera, 2018, p.14).

La clave de la producción de un biocombustible rentable radica en la obtención de una materia prima de bajo costo, ambientalmente sostenible y con favorables facultades fisicoquímicas que brinden la posibilidad de conseguir biocarburantes, de calidad, a partir de esa materia prima mediante un proceso asequible y lo más sencillo posible. Con este antecedente el presente estudio brinda una particular atención al bioetanol de segunda generación, ya que los gastos de fabricación de biocombustibles producidos a base de materias primas de tercera generación son mayores a los de las otras dos generaciones, en casi todos los aspectos, pero sin duda la más grande diferencia se halla en el costo de producción de la materia prima, pudiendo llegar a costar más de 2000 euros el kilogramo de alga seca, siendo este un agente limitante determinante en la actualidad (Vicario, 2016, párr.7).

Al comprender la importancia de las enzimas microbianas en la obtención de bioetanol de segunda generación, se pueden explorar conocimientos sobre los procesos biotecnológicos en la producción de biocombustibles con el fin de planear mejores mecanismos y procesos. Este trabajo permitirá obtener un compendio de información sobre enzimas microbianas clásicas como también aquellas modificadas genéticamente e identificar los aspectos relevantes conocidos, los

desconocidos y los controvertidos sobre la manipulación genética, identificando las aproximaciones teóricas elaboradas sobre la producción de etanol de segunda generación.

Ecuador es un país dependiente del petróleo, no obstante, algunos expertos en el área de energía sostienen que el mundo se encamina hacia una crisis energética global. Se menciona que por motivos sociales, económicos y medio ambientales se necesita una nueva transición energética, lo que motiva cambios radicales (Castro, 2012, p.17). Las investigaciones enfocadas a la optimización e innovación en la producción de biocombustibles como el etanol son de vital importancia para la matriz productiva de un país.

Mediante el uso de la ingeniería genética y metabólica los genes deseados podrían ser sobre expresados y los productos no deseados podrían ser bloqueados o eliminados (Liu et al., 2018). Investigaciones en esta temática muestran que varios factores han incidido en el desarrollo de microorganismos con características específicas para la aplicación rentable a escala industrial. Entre los principales beneficios de la aplicación de nuevas enzimas para la producción de bioetanol estaría un mayor rendimiento del producto de fermentación, tolerancia a altos niveles de azúcar y concentraciones de alcohol, resistencia a temperaturas más altas, menor pH, entre otros. (Liu et al., 2018, párr.13). El rendimiento del etanol como la tolerancia de las cepas podría mejorarse, enzimas y microorganismo están en constante desarrollo de la mano de la biotecnología, enfocados siempre a la rentabilidad económica y a la protección ambiental.

Todos estos conocimientos deberían aplicarse para así lograr un proceso de conversión de biomasa en etanol integrado, eficiente que satisfaga la necesidad energética local y mundial.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Investigar publicaciones científicas relacionadas con innovación enzimática para la producción de bioetanol de segunda generación.

### **Específicos**

- Mostrar el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.
- Identificar enzimas actualmente utilizadas en el proceso de sacarificación de la lignocelulosa.
- Revisar los fundamentos de producción de enzimas recombinantes bacterianas.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1. Antecedentes

La biomasa vegetal es actualmente la más llamativa y prometedora fuente alternativa de energía renovable. Es la unidad estructural mayoritaria de los vegetales maderables y no maderables. La lignocelulosa está formada por tres polímeros estructurales: lignina, celulosa y hemicelulosa. Las características químicas de sus componentes hacen de esta materia prima un sustrato de gran valor biotecnológico. Los materiales vegetales, debido a su alto contenido en azúcares fermentables, han tenido gran atención como sustrato alternativo en la fabricación de bioetanol. La biomasa vegetal muestra una estructura muy compleja, por lo que su transformación a etanol requiere de dos etapas generales: la primera que es el pretratamiento e hidrólisis; donde se generan los azúcares simples (glucosa y xilosa), y también la de fermentación en la cual estos productos son transformados en bioetanol, por la acción de microorganismos (Verdecía y Serrat, 2010, párr.8).

Científicos del Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM realizan una revisión con el fin de mostrar un panorama de los métodos que se han desarrollado para hidrolizar la lignocelulosa y se mencionan que la finalidad del pretratamiento es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa (Cuervo et al., 2015, p.7).

### 1.2. Bases teóricas

#### 1.2.1. *Biocombustibles*

Se denomina biocombustible a aquel que se obtiene a través de un procedimiento físico o químico a base de componentes vegetales o residuos orgánicos, es decir, biomasa o residuos de la misma, no fosilizados. Bien es cierto que su elaboración y uso no puede generalizarse en un único procedimiento, su característica común es que se parte de biomasa como principal materia prima (Romanelli et al., 2020, párr.7).

Comúnmente se asume por costumbre que los biocombustibles son líquidos, sin considerar otras fuentes de biomasa que generalmente se combustión en mayor cantidad; es la situación de los biocombustibles sólidos, carbón vegetal, paja, astilla, leña, entre otros; y resultan ser actualmente la primordial fuente de energía a base de biomasa. Además existen biocombustibles gaseosos como por ejemplo el biogás, que puede obtenerse a base de fuentes múltiples (Romanelli et al., 2020, p.12).

El término primera generación hace referencia a aquellos biocombustibles que se obtienen a partir de biomasa por tecnologías y procesos convencionales, simples y económicos. Estos biocombustibles son producidos a partir de cultivos de alimentos y por ello su obtención puede competir por recursos con los alimentos. Países desarrollados han adoptado estrategias para incentivar al mercado de biocombustibles por cuestiones de seguridad energética y ambiental. (Alejos y Calvo, 2016, p.8) Debido a los problemas que puede generar la utilización de áreas predestinadas a cultivos para alimento humano en la fabricación de biocombustibles, en la última década ha surgido la opción de producir bioetanol a base de materiales lignocelulósicos, siendo esta sin duda la fuente orgánica de energía renovable con más abundancia en el planeta, con aproximadamente 200 billones de toneladas al año (Navarro y Abril, 2015, párr.2).

### ***1.2.2. Bioetanol: tendencias mundiales***

El etanol o alcohol etílico, ha sido uno de los productos más utilizados en procesos de combustión y como potenciador de gasolina el cual brinda varias ventajas; entre ellas una mejor oxidación de los hidrocarburos de la gasolina, otorgando así nuevas alternativas para la solución de problemas globales como el efecto invernadero debido a la reducción del 12% de emisiones a la atmósfera. (Castro, 2012, p.9).

Se ha evidenciado desde la década de 1980's, el uso del etanol como combustible en varios países a nivel global, más sin embargo en la actualidad Estados Unidos y Brasil han encontrado en ella tecnologías eficientes y rentables desde un punto de vista comercial tanto en su producción a escala industrial como en su uso como biocombustible (Alejos y Calvo, 2016, párr.3).

#### ***1.2.2.1. Brasil***

En los últimos 46 años, la manufactura brasilera de biocombustibles progresa en la fabricación de etanol. La caña de azúcar es la materia prima más importante utilizada en la nación para la producción de etanol, que ha tenido considerable éxito en la última década. Hasta no hace mucho, la manufactura del país se reducía a la fermentación de la melaza de la caña de azúcar. No obstante, desde 2007, se han concretado varios planes de financiación de la investigación del etanol de segunda generación, con la implantación de nuevos laboratorios y centros de investigación. Estos proyectos generaron sus resultados con el inicio de la fabricación de etanol de segunda generación a gran escala, cuando en 2014 comenzaron a funcionar las tres primeras fábricas comerciales de etanol de segunda generación. Aparte de todo el fomento científico y tecnológico, la industria brasilera de etanol de segunda generación afrontó algunos problemas, como el precio de las enzimas, para conservar actividades sostenibles y abastecer el mercado local (Ibarra et al., 2019, p.18).

#### *1.2.2.2. Argentina*

En la Argentina, la producción de biocombustibles líquidos para uso automotriz es compacta y eficaz. Desde el 2010, se maneja el corte imperativo, que en la actualidad es de 12 % de bioetanol en nafta y 10 % de biodiesel en gasoil. La industria argentina, produce bioetanol a base de maíz y caña de azúcar; mientras que biodiesel, a partir de aceite de soja. La fabricación de bioetanol de maíz es superior que la de bioetanol de caña de azúcar, no obstante, su elaboración tuvo inicio dos años más tarde que la de este último. Existe una tendencia creciente de producción de bioetanol en Argentina, semejante a lo que sucede en el resto del mundo. La capacidad de producción de biodiesel en Argentina ha crecido a través del tiempo, pero la elaboración no pudo mantener tal tendencia (Romano, 2017,p.17).

#### *1.2.2.3. Estados Unidos*

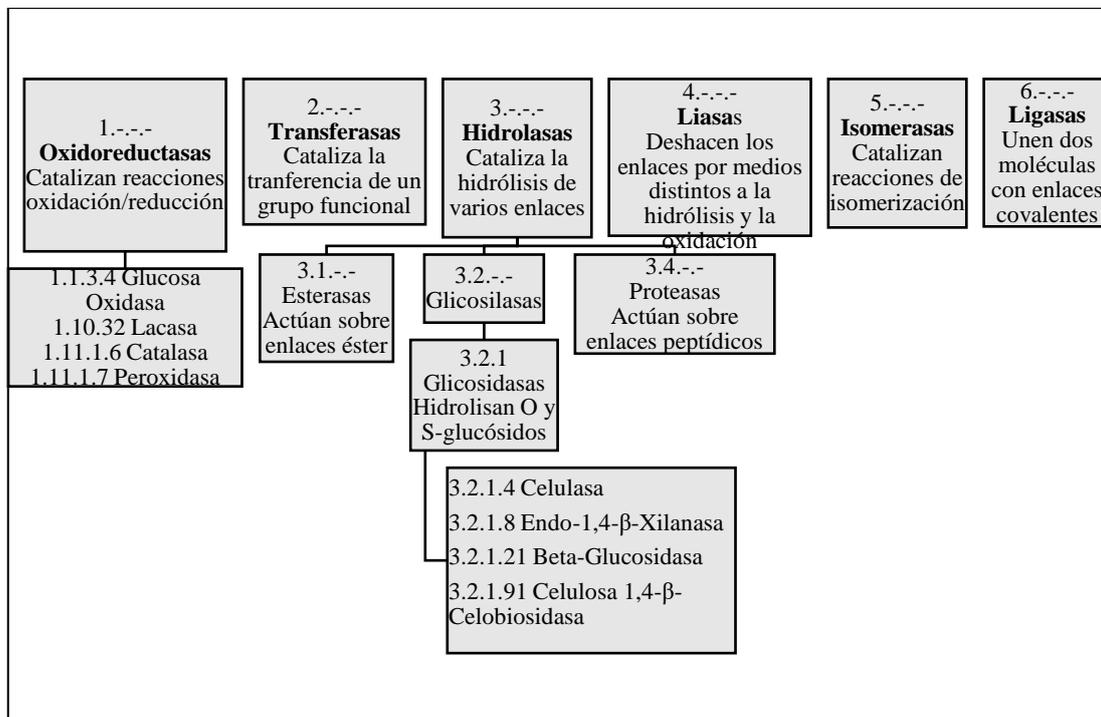
En los Estados Unidos, el gobierno federal ha promulgado leyes para incentivar la producción de bioetanol de segunda generación y limitar la producción de bioetanol de primera generación de almidón de maíz (Osmani y Zhang, 2017). El programa *Renewable Fuel Standard* de los Estados Unidos requiere una producción de 36000 millones de galones por año de biocombustible para el año 2022, fuera del cual solo 15000 millones de galones por año pueden ser bioetanol refinado de almidón de maíz. De los 21000 millones de galones por año restantes, un mínimo de 16000 millones de galones al año debería ser bioetanol de base lignocelulósica (Osmani y Zhang, 2017).

#### *1.2.2.4. Ecuador*

En Ecuador se comercializa la gasolina eco país, la misma que se diferencia de la extra y súper debido a su contenido de un 5% de componentes de origen agrícola. Se la ha denominado con el término eco, en alusión a que no depende totalmente de la explotación de los combustibles no renovables como lo son el petróleo, carbón y gas natural que son recursos fósiles.(Sussmann, 2015) En Ecuador este biocombustible abastece a menos del 50% del territorio nacional y tan solo con 5% de etanol en su composición para ello Petroecuador compra 90 millones de litros anuales de alcohol etílico a pequeños y grandes productores. Para mejorar la calidad del combustible aumentando el contenido de etanol a un 10% y abastecer a todo el territorio nacional se necesitarían 360 millones de litros anuales, lo que implicaría poner en riesgo la seguridad alimentaria del país debido al excesivo cultivo de caña de azúcar con este fin. El 10% de alcohol etílico en la gasolina actualmente utilizada en el país baja en un 30% las emisiones de gases de efecto invernadero de los automotores, mejorando así la calidad del aire (Sussmann, 2015).

### 1.2.3. Enzimas

Las enzimas son macromoléculas originadas por organismos vivos que, cuando se introducen en una reacción o sistema, ayudan con la aceleración de las reacciones biológicas o bioquímicas. Asimismo, ayudan y estimulan la transformación de sustratos en productos finales útiles, ya que proveen las condiciones apropiadas para que se originen las reacciones. Según la Comisión Internacional de Enzimas (CE) y el Comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología (NC-IUBMB) existen seis tipos principales de enzimas: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, las mismas que se encuentra codificadas con números de acuerdo a su función catalítica y sus subtipos. Las enzimas lignolíticas pertenecen al tipo de las oxidorreductasas, mientras que las enzimas hidrolíticas pertenecen a las hidrolasas (Dhiman et al., 2017, p.12).



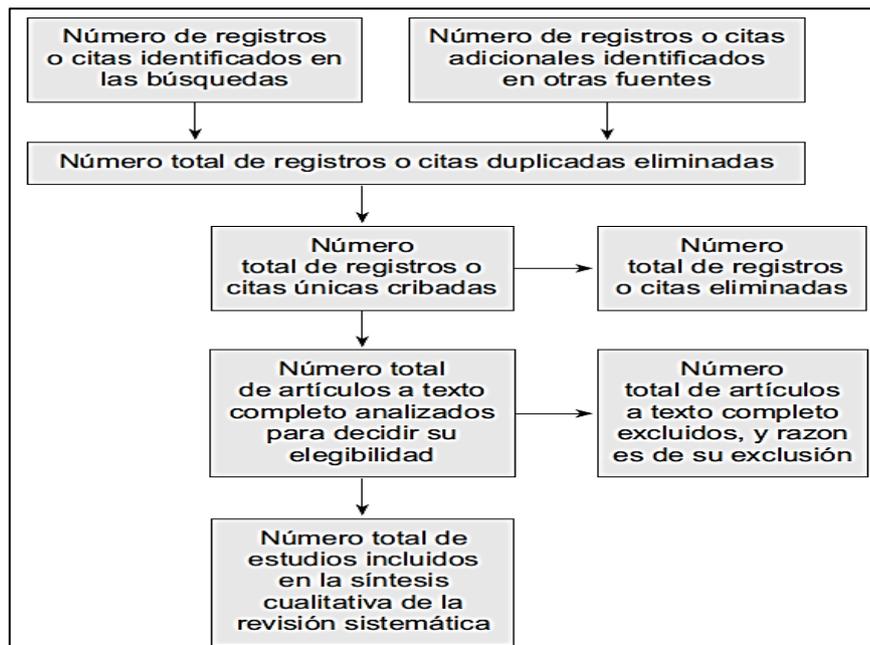
**Figura 1-1:** Clasificación general de enzimas basadas en sus funciones catalíticas

**Fuente:** Sarrrouh, (2012, p.12).

**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 1.2.4. Modelo PRISMA

La declaración PRISMA es una lista de comprobación con 27 puntos y un diagrama de flujo de cuatro fases que deben seguirse cuyo objetivo es mejorar la calidad de la presentación de las revisiones bibliográficas. PRISMA también puede emplearse para la evaluación crítica de todo tipo de revisiones publicadas.



**Figura 2-1.** Modelo de flujo para búsqueda bibliográfica y selección de estudios  
Fuente: Urrútia y Bonfill, (2011, párr.12).

### 1.3. Bases conceptuales

**Polisacáridos:** El un componente polisacárido que comprende carbohidratos de elevado peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que constituyen aproximadamente entre el 60 y el 80 % del peso completo de la materia vegetal (Cripwell et al., 2015, p.13).

**Hemicelulosa:** Es el término general para un complejo grupo de polisacáridos en la pared celular de las plantas, es la segunda más grande categoría de polisacáridos de la pared celular de las plantas. La hemicelulosa está estrechamente unida a la celulosa a través de un vínculo de unión oxígeno-hidrógeno y las fuerzas de van der Waals, que se considera un puente entre las fibras finas (Aditiya et al., 2016, párr.12).

**Lignina:** La lignina es el más complejo y peor caracterizado de los componentes de la madera y representa entre el 20 y el 35 % de ésta. La lignina le da rigidez estructural ya que endurece y sostiene las fibras de los polisacáridos (Di Donato et al., 2019, p.15).

**Proteína recombinante:** Se conoce a una proteína recombinante como aquella que es producida en un organismo o microorganismo que ha sido sometida a cierto tipo de variación genética, el organismo difiere de aquel en el cual la proteína se origina de manera natural (Liu et al., 2018, p.19).

**Ingeniería metabólica:** Su objetivo es la modificación del metabolismo con el fin de aumentar las capacidades de la célula hacia la producción o el fenotipo esperado (Zhang et al., 2019,p.19).

**Biotecnología microbiana:** Provee diferentes técnicas para modificar genéticamente a los microorganismos que son cultivados a gran escala cuya mejora de cualidades da origen a nuevos productos microbianos (Pellegrini et al., 2015, p.17).

**Sacarificación:** Degradación de los polisacáridos a azúcares fermentables (Anindyawati et al., 2020, párr.12).

**Delignificación:** Eliminación total o parcial de la lignina de la madera u otra materia vegetal por tratamientos químicos o enzimáticos para la fabricación de pastas de celulosa química (Ghio et al., 2018,p.20).

**Biomasa residual:** Se conoce como biomasa residual aquella que está formada por residuos orgánicos que tienen un gran potencial para la producción energética. Se puede generar de manera espontánea en el ambiente o como resultado de la actividad del ser humano, industrial, agrícola y forestal (Marcelo et al., 2020, p.17).

**Enzimas intracelulares:** Se denomina enzimas intracelulares a aquellas sintetizadas por las células y conservadas dentro de ellas para las reacciones bioquímicas celulares (Cannella et al., 2012, párr.7).

**Enzimas extracelulares:** Son aquellas enzimas las cuales son secretadas y cumplen su función fuera de la célula (Cannella et al., 2012, p.19).

**Enzimas celulíticas:** Son aquellas enzimas capaces de degradar residuos de fuente vegetal, que contienen celulosa (BarbosaKendrick et al., 2020, párr.9).

**Nafta:** Es un hidrocarburo que se encuentra en estado líquido, no posee color, es volátil y muy inflamable que se deriva al destilar el petróleo o la hulla y se lo emplea generalmente como un disolvente en la industria (Mele et al., 2017, p.29).

**Heteropolímero:** Se denominan heteropolímeros o copolímeros cuando el polímero es resultado de la reacción de dos o más tipos de monómeros (Bandola, 2011,p.12).

**Polimerización:** Es una reacción química donde los reactivos, los compuestos de bajo peso molecular (monómeros) se juntan de forma química (Bandola, 2011, p.18).

**Enzimas lignolíticas:** son enzimas extracelulares que se encargan de la mineralización de la lignina, se incluyen las enzimas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lactasas y otras oxidasas (Calderón, 2016, p.27).

**Xilosa:** Es la pentosa con más abundancia en la naturaleza; se encuentra en la madera, tallos leñosos, cáscaras de cereales y almendras, mazorcas de maíz, paja de cereales y otros tantos residuos agrícolas en forma de polímeros (pentosas) denominados xilanos (Di Donato et al., 2019, p.8).

**Xilano:** Es el principal componente de la hemicelulosa, después de la celulosa, es el polisacárido con más abundancia en la naturaleza; posee una variable composición y depende del origen vegetal que proceda.(Cintra et al., 2020, párr.17).

**Furfurales:** Es un aldehído industrial que procede de varios productos de la agricultura entre los cuales se encuentra el aserrín, el trigo, la avena, el maíz; un compuesto químico heterocíclico y que a su vez es el más simple aldehído derivado del furano (Niphadkar et al., 2018, p.14).

**Furano:** Es aquel compuesto orgánico que se forma en el tratamiento físico de los alimentos con

calor y que también aporta a las características sensoriales del producto. Son el efecto de una reacción denominada de Maillard entre carbohidratos, ácidos grasos insaturados y ácido ascórbico o derivados (Bolívar-Tellería et al., 2018,p.29).

**Expresión heteróloga:** Es un sistema de expresión que brinda la posibilidad de identificar genes de interés que no se expresan por sí mismos en las bacterias que alojan la biblioteca metagenómica, permitiendo así detectar las funciones que codifican, que de lo contrario persistirían silenciadas (Davison et al., 2020, p.26).

**Bioprospección:** Es la búsqueda o exploración de la biodiversidad con fines comerciales (Zhang et al., 2019, párr.18).

**Celobiosa:** A la celobiosa se la conoce como un azúcar doble, es decir un disacárido, que está compuesto por dos glucosas unidas por los grupos hidroxilo del carbono 1 en una posición beta de una glucosa y del carbono número 4 de la glucosa que complementa (Chang et al., 2013, p.9).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación que se empleará para realizar una revisión acerca de enzimas utilizadas en la producción de bioetanol de segunda generación es el modelo documental.

Por el método de investigación: Cualitativa

Según el objetivo: Teórica

Según el nivel de profundización en el objeto de estudio: Exploratoria

Según la manipulación de variables: No experimental

Según el tipo de inferencia: Inductivo

Según el periodo temporal: Transversal

#### 2.2. Diseño de la Investigación

Este tipo de trabajo corresponde a un diseño no experimental.

Investigación exploratoria tipo básica.

##### 2.2.1. *Diseño No experimental*

###### 2.2.2.1. *Identificación de Variables*

Variable dependiente: Enzimas en la producción de bioetanol de segunda generación

Variable independiente: Artículos publicados en revistas con indexación SJR

Variables bibliométricas: Bases de datos bibliográficas, año de publicación, revista, tipo de publicación, autores, institución, país, idioma.

###### 2.2.2.2. *Planteamiento de la hipótesis*

El uso de nuevas enzimas mejora la eficiencia de los procesos de obtención de bioetanol

### 2.2.2.3. Operacionalización de los objetivos

**Tabla 1-2:** Operacionalización de los objetivos.

OBJETIVO GENERAL	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	INDICADOR	INSTRUMENTO
Investigar publicaciones científicas actualizadas relacionadas con innovación enzimática para la producción de bioetanol de segunda generación	<ul style="list-style-type: none"><li>- Mostrar el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica</li><li>- Identificar enzimas actualmente utilizadas en el proceso de sacarificación de la lignocelulosa</li><li>- Revisar fundamentos de producción de enzimas recombinantes bacterianas</li></ul>	Número de Citas Cuartiles Tablas Porcentajes Cuadros resumen	Artículos científicos de revistas con indexación SJR máximo con 10 años de antigüedad.

Realizado por: Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 2.2.2.4. Localización del estudio

La investigación documental se la desarrolló en la ciudad de Ambato, enfocada en la búsqueda de estudios a nivel internacional.

El trabajo de investigación exploratoria se enfocará principalmente en estudios a nivel internacional.

### 2.2.2.5. Población de estudio

Para la elección de la población de estudio se tomaron en cuenta todos los estudios identificados desde el año 2011 hasta el año 2021, investigaciones con máximo 10 años de antigüedad, a través de las bases de datos de búsqueda GOOGLE SCHOLAR, PUB MED, SCIENCE DIRECT.

### 2.2.2.6. Tamaño de la muestra

Después de la búsqueda inicial de los documentos relacionados a la utilización de enzimas en la producción de bioetanol de segunda generación, se eligieron 50 Fuentes documentales para su posterior análisis.

### 2.2.2.7. Método de muestreo

Se utilizó un muestreo no probabilístico, donde la elección de los elementos no dependió de la probabilidad sino más bien de los criterios de selección a través de la ejecución del modelo prisma

ampliamente utilizado en investigaciones de tipo revisión.

#### 2.2.2.8. *Técnicas de recolección de datos*

##### **Búsqueda bibliográfica**

La búsqueda de la literatura para desarrollar la presente investigación se realizó en varios tipos de fuentes.

Fuentes primarias: Las revistas son el más importante vehículo en la comunicación de la búsqueda científica; tienen publicaciones originales de investigaciones científicas e información actual (Vera, 2018,p .18).

Fuentes secundarias: Estas permiten detectar las referencias necesarias, además que hacen posible localizar fuentes primarias y normalmente es la estrategia utilizada con más frecuencia. Son compilaciones, resúmenes en revistas y listados de referencias publicadas en un área del conocimiento en particular, ejemplo de esto son las bases de datos electrónicas (Arrollo, 2012, párr.17).

Fuentes terciarias: son aquellas donde puede obtenerse información para detectar a través de ellas las fuentes primarias o secundarias de interés (Vera, 2018,p.19).

##### **Bases de datos de búsqueda**

Las bases de datos utilizadas en esta investigación fueron GOOGLE SCHOLAR, PUB MED, SCIENCE DIRECT.

##### **Estrategia de búsqueda**

Una vez seleccionada la base de datos, se eligieron los descriptores o palabras clave, es decir, los conceptos principales o las variables del problema o tema de la investigación, mismas que fueron fundamentales para comenzar la búsqueda (Adolf et al., 2008, p.19). En la mayoría de las bases de datos, se utilizaron frases además de las palabras únicas combinadas entre sí por medio de operadores booleanos (AND, OR, NOT, “”, entre otros) con el fin de coleccionar información más precisa acorde a los objetivos planteados, cuando se identificaron los estudios relevantes, se los revisó para encontrar otros términos que se utilizaron como palabras clave; los vocablos alternativos, sinónimos, para los conceptos o variables también se usaron como palabras clave.

Las ecuaciones de búsqueda utilizadas fueron: *intitle:"second generation bioethanol"+"enzymes"* y también *"second generation bioethanol"+"enzymes"+"new approaches"+"recent advances"*

### **Fecha en que se lleva a cabo la búsqueda**

La búsqueda se la realizó desde el 15 de octubre del 2020 hasta la presentación del trabajo de investigación.

### **Selección de estudios (cribado)**

Para la selección de los estudios, se utilizó el método PRISMA para investigaciones de tipo revisión, la cual contó con tres etapas:

- **Fase uno**

Consistió en la exclusión de las investigaciones repetidas en base a su título y todos los estudios realizados antes del 2011.

- **Fase dos**

Consistió en la eliminación de los artículos, en base a su título y la revisión del resumen, de acuerdo a los siguientes criterios de exclusión:

- 1) Estudios escritos en un idioma distinto al hablado o comprendido por el autor de la investigación. Los idiomas considerados fueron: español, inglés y portugués.
- 2) Estudios sin indexación SJR
- 3) Trabajos de grado de especialización
- 4) Capítulos de libro
- 5) Diapositivas (material gris)
- 6) Investigaciones específicas de producción de bioetanol de primera generación
- 7) Investigaciones específicas de producción de bioetanol de tercera generación
- 8) Estudios sobre pretratamiento físicos y químicos de lignocelulosa.
- 9) Artículos sobre fermentación para la producción de bioetanol

- **Fase tres**

Se aplicó cuando se leyó los textos completos y consistió en la selección del estudio de acuerdo con los siguientes criterios de selección mismos que se encuentran determinados por los objetivos de la revisión:

- 1) Artículos científicos referentes al proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica
- 2) Artículos científicos de enzimas utilizadas en el proceso de sacarificación de la lignocelulosa
- 3) Artículos científicos de producción de enzimas recombinantes bacterianas

### **Organización de la información**

Los documentos encontrados fueron agrupados en carpetas codificadas de acuerdo al nombre de la base de datos utilizada y la ecuación de búsqueda empleada; con el fin de tener organizada la información. Ejemplo: Académico-*second generation bioethanol+enzymes*.

Los documentos (*papers*) fueron descargados y codificados de acuerdo a su año de publicación, autor principal y título de la investigación. Ejemplo: 19 Donato *The production of second generation bioethanol*.

A través de un archivo Excel se desarrolló una tabla de análisis donde además se incorporó una bitácora de búsqueda, instrumentos que nos ayudaron a rehacer las búsquedas bibliográficas que habíamos realizado a lo largo de la etapa de búsqueda de la información y además nos permitió almacenar los análisis de los artículos científicos para que la información quede documentada, explícita y no propensa a pérdidas.

En la primera pestaña del archivo se almacenaron los datos del presente trabajo de investigación como título, autor, objetivo general y objetivos específicos.

La segunda parte corresponde a la bitácora de búsqueda la misma que contiene información de nombre de la base de datos, fecha, ecuación de búsqueda utilizada y el número de resultados obtenidos en cada búsqueda y comentarios.

La tercera parte corresponde a la información básica de los documentos, es decir, autor-fecha en formato APA, título de la investigación, tipo de documento (libro, capítulo de libro, trabajo de grado de especialización, artículo científico, entre otros) y comentario.

Después se tiene el análisis general de los documentos que pasaron el primer filtro del método prisma con los siguientes apartados: autor-fecha, título, resumen (*abstract* o parte del *abstract*), problema identificado, objetivos, métodos, resultados, conclusiones y comentarios; finalmente se tiene el análisis específico de los artículos científicos que cumplieron todos los lineamientos y objetivos de la investigación con los siguientes detalles: autor-fecha, país de publicación, base de datos de la búsqueda, revista indexada, idioma, aporte específico, imágenes y comentarios.

Cabe destacar que en particulares ocasiones fue necesario citar información de investigaciones de la región con el fin de mostrar la situación local de esta temática y contrastarla con el resto del mundo.

#### 2.2.2.9. *Análisis Estadístico Descriptivo*

Se realizó el análisis estadístico descriptivo de los 50 artículos seleccionados de acuerdo a las variables bibliométricas de los estudios

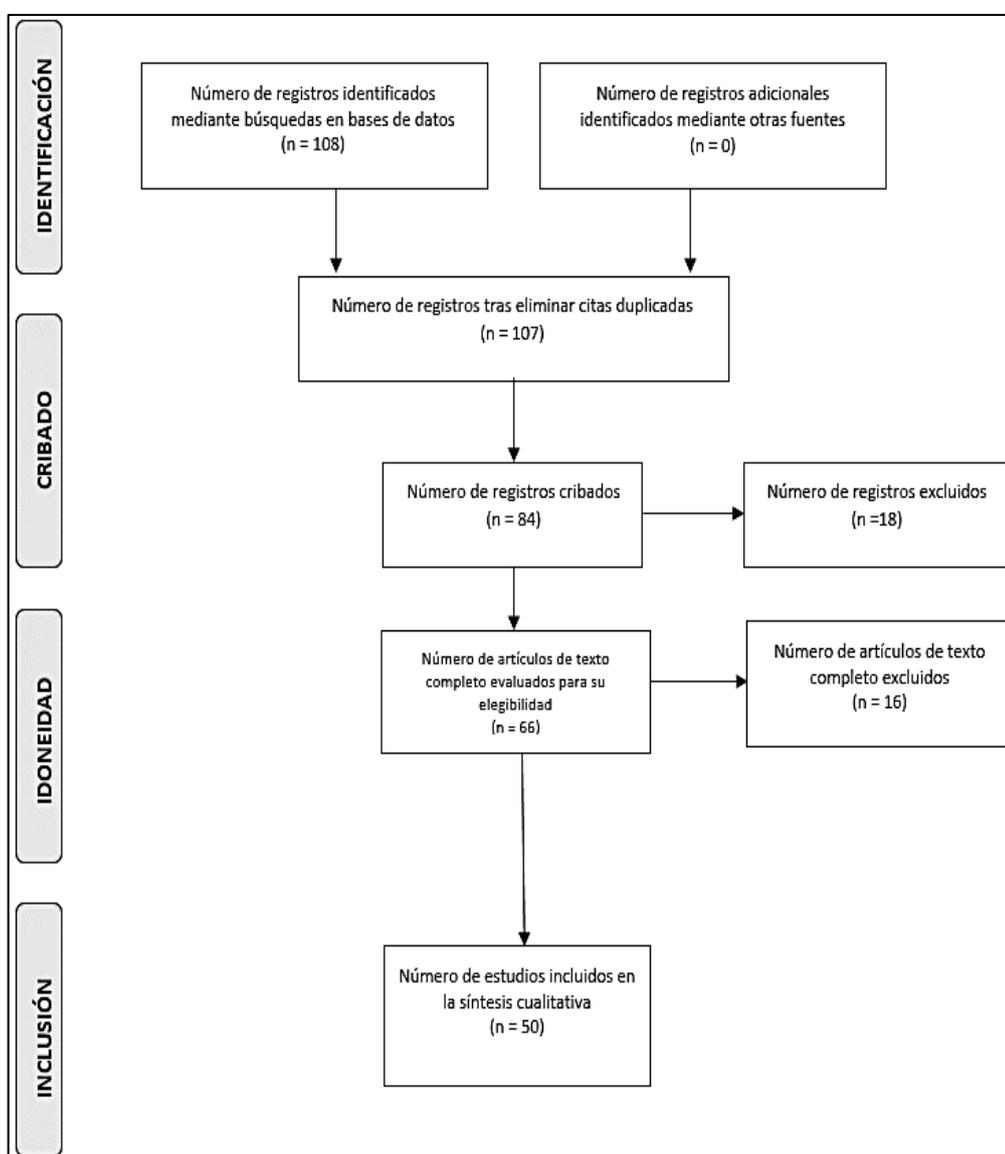
## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 3.1. Base de datos

La totalidad de la información obtenida a través de las investigaciones fue de 108 documentos, de estos 50 cumplían con los parámetros establecidos para el estudio.

##### 3.1.1. Selección de estudios

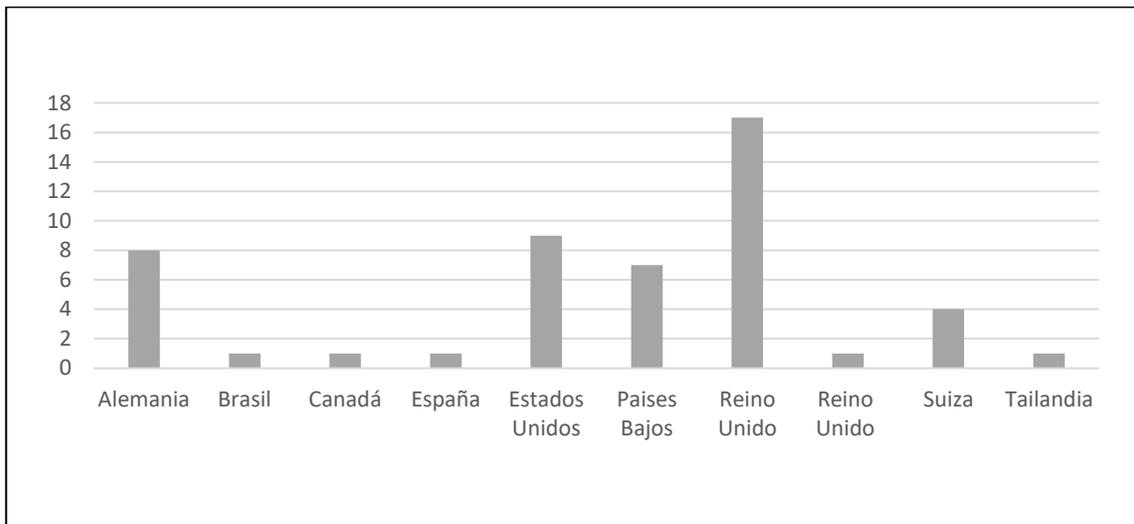


**Gráfico 1-3:** Diagrama de flujo de búsqueda bibliográfica y selección de estudios

Realizado por: Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 3.1.2. Análisis de estudios realizados por países

De los 50 artículos copilados en la data, Reino Unido es el país con más estudios realizados, con un valor de 18 artículos, Estados Unidos es el segundo país con un aporte de 9 artículos, seguido de Alemania con 8 artículos, Países Bajos con 7, Suiza con 4, y Brasil, Canadá, España y Tailandia con 1 artículo cada uno.



**Gráfico 2-3:** Análisis de estudios realizados por países  
Realizado por: Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 3.1.3. Análisis de estudios realizados según idioma

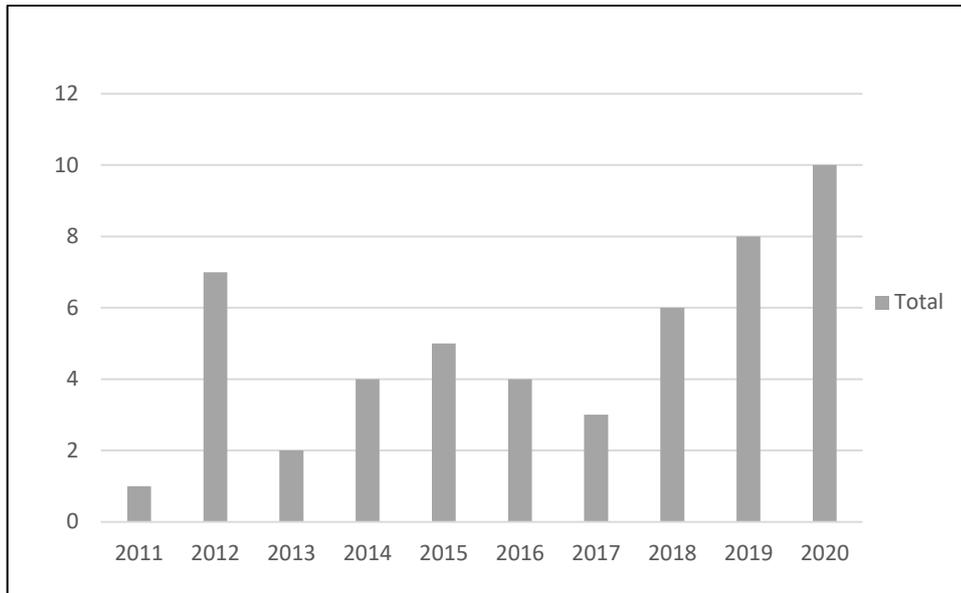
De los 50 artículos copilados, 49 están redactados en idioma inglés mientras que en idioma español solo se encuentra registrado uno.



**Gráfico 3-3:** Análisis de estudios realizados según idioma  
Realizado por: Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 3.1.4. *Análisis de estudios realizados por año*

De los 50 artículos copilados, el 2020 es el año que más artículos aportó a la investigación con un total de 10 documentos, el 2019 con 8, 2012 con 7, 2018 con 6, 2015 con 5, 2014 y 2016 con 4, 2017 con 3, 2013 con 2 y el año 2011 con un solo documento.



**Gráfico 4-3:** Análisis de estudios realizados por año  
**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 3.1.5. Estudios de alto impacto seleccionados

**Tabla 1-3:** Resultados de estudios incluidos a la síntesis cualitativa.

N°	Autor-Fecha	País de Publicación	Base de Datos	Revista	Idioma	Título
1	(Wang et al., 2012)	Alemania	Google Scholar	<i>Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology</i>	Inglés	Producción de enzimas celulolíticas e hidrólisis enzimática para la producción de bioetanol de segunda generación
2	(Lugani et al., 2020)	Canadá	Google Scholar	<i>Biofuel Research Journal</i>	Inglés	Recientes avances en la producción de bioetanol a partir de lignocelulosa: una revisión integral con un enfoque de ingeniería de enzimas y biocatalizadores de diseño
3	(Gutiérrez et al., 2015)	España	Google Scholar	<i>Revista Iberoamericana de Micología</i>	Español	Mecanismos y Regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos Clásicos y Nuevos Modelos
4	(Liu et al., 2018)	Reino Unido	Google Scholar	<i>Critical Reviews in Biotechnology</i>	Inglés	Microbios diseñados para la fermentación directa de la celulosa en bioetanol
5	(Van Dyk y Pletschke, 2012)	Países Bajos	Google Scholar	<i>Biotechnology Advances</i>	Inglés	Una revisión de bioconversión de lignocelulosa mediante hidrólisis enzimática y la cooperación sinérgica entre enzimas. Factores que afectan a las enzimas, la conversión y la sinergia.
6	(Swain et al., 2017)	Estados Unidos	Google Scholar	<i>Advances in Food and Nutrition Research</i>	Inglés	Las enzimas y microorganismos marinos para la producción de bioetanol
7	(Bajaj y Mahajan, 2019)	Alemania	Google Scholar	<i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>	Inglés	Celulosa y xilanas sinergia en la biotecnología industrial
8	(Salazar-Cerezo et al., 2020)	Estados Unidos	Google Scholar	<i>Enzyme and Microbial Technology</i>	Inglés	La tecnología de CRISPR / Cas9 permite el desarrollo del hongo filamentoso <i>Penicillium ascomicete subrubescens</i> como un nuevo productor de enzimas industriales

9	(Binod et al., 2019)	Reino Unido	Google Scholar	<i>Bioresource Technology Reports</i>	Inglés	Enzimas para biocombustibles de segunda generación: evolución reciente y perspectivas futuras
10	(Alves et al., 2019)	Estados Unidos	Google Scholar	<i>Industrial Biotechnology</i>	Inglés	Bioprospección de enzimas y microorganismos en los insectos para mejorar la producción de etanol de segunda generación
11	(Novello et al., 2014)	Reino Unido	Google Scholar	<i>RSC Advances</i>	Inglés	Las enzimas para etanol de segunda generación: la exploración de nuevas estrategias para la utilización de xilosa
12	(Lambertz et al., 2014)	Reino Unido	Google Scholar	<i>Biotechnology for Biofuels</i>	Inglés	Retos y avances en la expresión heteróloga de enzimas celulolíticas: una revisión
13	(Horn et al., 2012)	Reino Unido	Google Scholar	<i>Biotechnology for Biofuels</i>	Inglés	Nuevas enzimas para la degradación de la celulosa
14	(BarbosaSilvello et al., 2020)	Países Bajos	Google Scholar	<i>Biotechnology Letters</i>	Inglés	Celulasas y enzimas oxidativas: nuevos enfoques, desafíos y perspectivas sobre la degradación de la celulosa para la producción de bioetanol
15	(López-Mondéjar et al., 2016)	Reino Unido	Google Scholar	<i>Scientific Reports</i>	Inglés	La descomposición de la celulosa y hemicelulosa por bacterias procedentes del suelo del bosque por la acción de sistemas enzimáticos estructuralmente variables
16	(Vohra et al., 2014)	Reino Unido	Google Scholar	<i>Journal of Environmental Chemical Engineering</i>	Inglés	La producción de bioetanol: materia prima y tecnologías actuales
17	(Elleuche, 2015)	Alemania	Google Scholar	<i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>	Inglés	Unión de funciones con las enzimas de fusión: de los inventos de la naturaleza a las aplicaciones biotecnológicas
18	(Bao et al., 2012)	Estados Unidos	Google Scholar	<i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i>	Inglés	Clonación y caracterización de dos enzimas $\beta$ -glucosidasas xilosidasas del metagenoma del rumen de yak
19	(Jamaldeen et al., 2018)	Estados Unidos	Google Scholar	<i>Preparative Biochemistry &amp; Biotechnology</i>	Inglés	Análisis comparativo de los métodos de pretratamiento de los residuos agrícolas de tallo de sorgo ( <i>Sorghum durra</i> ) para el contenido de holocelulosa
20	(de Lucas et al., 2020)	Alemania	Google Scholar	<i>Biomass Conversion and Biorefinery</i>	Inglés	Efecto del pretratamiento enzimático de bagazo de caña de azúcar con hemicelulasas recombinantes y esterasa antes de la aplicación de la celobiohidrolasa CBH I <i>Megazyme</i>

21	(Ibarra et al., 2019)	Reino Unido	Google Scholar	Scientific Reports	Inglés	La actividad enzimática de una $\beta$ -1,4-endoglucanasa recombinante a partir del <i>Boll Weevil</i> de algodón ( <i>Anthonomus grandis</i> ) con el objetivo de producir bioetanol de segunda generación
22	(Harun y Danquah, 2011)	Países Bajos	Google Scholar	Chemical Engineering Journal	Inglés	La hidrólisis enzimática de la biomasa de microalgas para la producción de bioetanol
23	(Matsakas y Christakopoulos, 2015)	Suiza	Google Scholar	Sustainability	Inglés	La producción de etanol a partir de residuos de alimentos deshidratados enzimáticamente tratados. Uso de enzimas producidas en el sitio.
24	(Lopes et al., 2016)	Brasil	Google Scholar	Brazilian Journal of Microbiology	Inglés	La producción de etanol en Brasil: un puente entre la ciencia y la industria
25	(Dhiman et al., 2017)	Reino Unido	Google Scholar	Applied Energy	Inglés	Producción mejorada de bioetanol de rastrojo de maíz: Papel de enzimas, inductores y simultánea recuperación del producto
26	(Sreena y Sebastian, 2019)	Países Bajos	Google Scholar	Environmental Technology and Innovation	Inglés	Corteza exterior de jaca: Una materia prima sostenible para la producción de azúcares fermentables utilizando endoglucanasa recombinante de <i>Bacillus subtilis</i> MUS1
27	(Schneider et al., 2020)	Reino Unido	Google Scholar	Applied Energy	Inglés	Degradación de la lignina y detoxificación de residuos de eucalipto mediante enzimas fúngicas de fabricación in situ para mejorar el rendimiento del etanol de segunda generación
28	(Das et al., 2013)	Estados Unidos	Google Scholar	BioMed Research International	Inglés	Fermentación lignocelulósica de hierba silvestre empleando enzimas hidrolíticas recombinantes y microbios fermentadores con recuperación efectiva de bioetanol
29	(Adrio y Demain, 2014)	Suiza	Google Scholar	Biomolecules	Inglés	Enzimas microbianas: herramientas para procesos biotecnológicos
30	(Ghio et al., 2018)	Estados Unidos	Google Scholar	Bioenergy Research	Inglés	<i>Paenibacillus</i> sp. A59 GH10 y GH11 Endoxilanasas Extracelulares: Aplicación en la bioconversión de la biomasa
31	(Cannella et al., 2012)	Reino Unido	Google Scholar	Biotechnology for Biofuels	Inglés	Producción y efecto de los ácidos aldónicos durante la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa en alto contenido de materia seca
32	(Pellegrini et al., 2015)	Alemania	Google Scholar	Applied Microbiology and	Inglés	La endoglucanasa I recombinante de <i>Trichoderma harzianum</i> (Cel7B) es una enzima altamente ácida y promiscua que actúa sobre los carbohidratos

				<i>Biotechnology</i>		
33	(Aditiya et al., 2016)	Países Bajos	<i>Google Scholar</i>	<i>Renewable and Sustainable Energy Reviews</i>	Inglés	Producción de bioetanol de segunda generación: Una revisión crítica
34	(Cintra et al., 2020)	Estados Unidos	<i>Google Scholar</i>	<i>Enzyme and Microbial Technology</i>	Inglés	El efecto potenciador de las hemicelulasas recombinantes en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña tratado con vapor
35	(Anindyawati et al., 2020)	Tailandia	<i>Google Scholar</i>	<i>International Journal of Agricultural Technology</i>	Inglés	El proceso enzimático de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol de segunda generación, los beneficios y retos: Una revisión
36	(Cripwell et al., 2015)	Reino Unido	<i>Google Scholar</i>	<i>Applied Energy</i>	Inglés	La utilización de salvado de trigo como un sustrato para la producción de bioetanol a partir de celulasas recombinantes y levadura amilolítica
37	(Di Donato et al., 2019)	Países Bajos	<i>Google Scholar</i>	<i>Journal of Cleaner Production</i>	Inglés	La producción de bioetanol de segunda generación: el potencial de la biotecnología de bacterias termófilas
38	(Zhang et al., 2019)	Alemania	<i>Google Scholar</i>	<i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>	Inglés	Las nuevas tecnologías proporcionan más estrategias de ingeniería metabólicas para la producción de bioetanol en <i>Zymomonas mobilis</i>
39	(Canto, 2020)	Suiza	<i>Google Scholar</i>	<i>Applied Nanoscience</i>	Inglés	Uso de la biomasa agroindustrial para el descubrimiento y la producción de biocombustibles y enzimas
40	(Chang et al., 2013)	Reino Unido	<i>Google Scholar</i>	<i>Biotechnology for Biofuels</i>	Inglés	Montaje de un cóctel de celulasa y un transportador cellodextrin en un huésped de levadura para la producción de etanol CBP
41	(Devarapalli y Atiyeh, 2015)	Canadá	<i>Google Scholar</i>	<i>Biofuel Research Journal</i>	Inglés	Una revisión del proceso de conversión para la producción de bioetanol, con especial atención a la fermentación en fermentación syngas
42	(Jin et al., 2012)	Alemania	<i>Google Scholar</i>	<i>Biotechnology and Bioengineering</i>	Inglés	Bioprocesamiento consolidado (CBP) del rastrojo de maíz tratado con AFEXTM para la producción de etanol utilizando <i>Clostridium phytofermentans</i> con una alta carga de sólidos
43	(Davison et al.,	Alemania	<i>Google</i>	<i>Applied</i>	Inglés	La explotación de la diversidad de cepas y las estrategias racionales de ingeniería para

	2020)		<i>Scholar</i>	<i>Microbiology and Biotechnology</i>		aumentar la secreción de celulasa recombinante mediante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
44	(BarbosaKendrick et al., 2020)	Reino Unido	<i>Google Scholar</i>	<i>Biomass and Bioenergy</i>	Inglés	Optimización de la producción Cello-oligosacáridos por hidrólisis enzimática de paja de la caña de azúcar hidrotérmicamente pretratado usando enzimas celulolíticas y oxidativos
45	(Rastogi y Shrivastava, 2017)	Países Bajos	<i>Google Scholar</i>	<i>Renewable and Sustainable Energy Reviews</i>	Inglés	Los recientes avances en la producción de bioetanol de segunda generación: Una mirada a los procesos de pretratamiento, sacarificación y fermentación
46	(Niphadkar et al., 2018)	Reino Unido	<i>Google Scholar</i>	<i>Biofuels</i>	Inglés	Producción de bioetanol: perspectivas de pasado, presente y futuro
47	(Menon y Rao, 2012)	Reino Unido	<i>Google Scholar</i>	<i>Progress in Energy and Combustion Science</i>	Inglés	Tendencias en la bioconversión de la lignocelulosa: Los biocombustibles, productos químicos plataforma y el concepto de biorrefinería
48	(Bolívar-Tellería et al., 2018)	Estados Unidos	<i>Google Scholar</i>	<i>BioMed Research International</i>	Inglés	Bioetanol de segunda generación a partir de la cáscara del coco
49	(Álvarez et al., 2016)	Reino Unido	<i>Google Scholar</i>	<i>Microbial Biotechnology</i>	Inglés	La hidrólisis enzimática de la biomasa de la madera
50	(Chukwuma et al., 2020)	Suiza	<i>Google Scholar</i>	<i>Sustainability</i>	Inglés	Enzimas lignocelulolíticas en procesos biotecnológicos e industriales: Una revisión

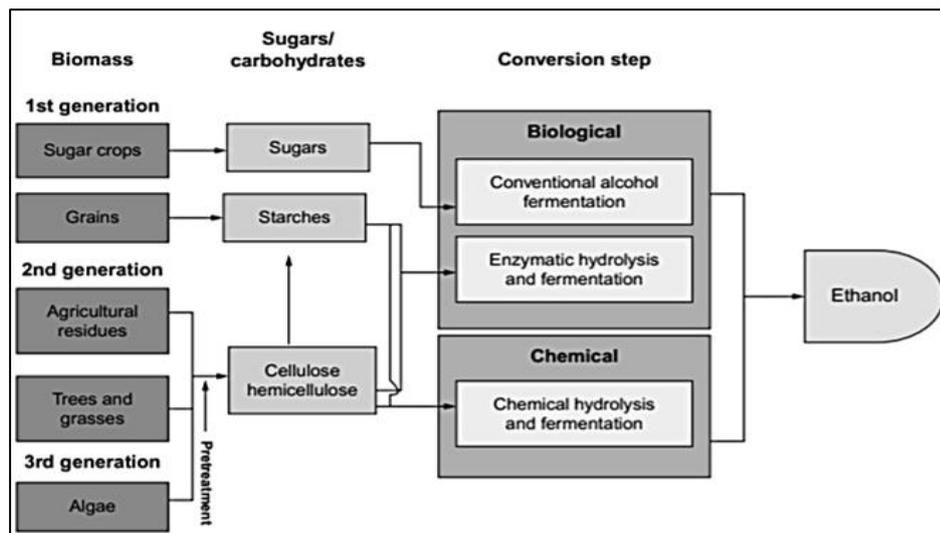
**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

### 3.2. Revisión clásica

#### 3.2.1. Producción de bioetanol

Debido a que las materias primas utilizadas para producir bioetanol son materiales renovables de origen vegetal, no se produce emisión neta alguna de carbono a la atmósfera debido al uso de bioetanol como combustible, la producción de bioetanol de primera generación emplea materias primas de origen alimentario, como el zumo de azúcar y el almidón; el jugo de azúcar se fermenta de forma directa para obtener etanol, mientras que los materiales amiláceos, como por ejemplo los cereales, necesitan la hidrólisis del polisacárido de almidón en glucosa monomérica; el almidón se hidroliza a glucosa mediante las enzimas  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas, el producto hidrolizado que contiene glucosa posteriormente se fermenta en etanol utilizando levaduras (Bajaj y Mahajan, 2019, p.28).

El bioetanol de segunda generación se produce a través de lignocelulosa, que está compuesta de celulosa, hemicelulosa y lignina. Mediante acción enzimática la celulosa y hemicelulosa se hidrolizan a glucosa y pentosas para luego ser fermentadas para obtener bioetanol. Uno de los principales obstáculos se debe a la compleja estructura formada por los polisacáridos y la lignina, que impide que los polisacáridos sean atacados por las enzimas. Por ello, es necesario romper la barrera estructural de la lignocelulosa por medio de un pretratamiento. Las lignocelulosas pretratadas son hidrolizadas por acción enzimática a azúcares simples empleando un coctel de celulasas y hemicelulasas. Posteriormente, los azúcares simples se fermentan a etanol mediante etanógenos adecuados (Swain et al., 2017, párr.8).



**Figura 1-3:** Producción de etanol a partir de diferentes materias primas

Fuente: Swain et al., (2017, p.27).

El bioetanol de tercera generación es producido por la biomasa de algas. La composición de esta biomasa varía de acuerdo a la especie y los principales polisacáridos que se encuentran en la biomasa de algas son los galactanos y los glucanos. La hidrólisis de la biomasa puede ser química o mediante enzimas hasta obtener azúcares más simples, que luego se fermentan a etanol. Al igual que el material lignocelulósico, la biomasa de algas requiere de un pretratamiento para mejorar la hidrólisis enzimática. Debido a la variación en la composición de las materias primas de las algas, la hidrólisis enzimática utiliza diferentes enzimas degradadoras de los polisacáridos dependiendo de la composición de polisacáridos presentes en cada especie de algas (Swain et al., 2017, p.27).

### 3.2.2. Bioetanol de segunda generación

#### 3.2.2.1. Materia prima lignocelulósica

La constitución de la lignocelulosa depende totalmente de la clase de cultivo. Además el rigor del pretratamiento empleado en el proceso de obtención del bioetanol dará lugar a distintas composiciones en función del grado de degradación de hemicelulosa y lignina en la materia prima (Sreena y Sebastian, 2019, p.28).

**Tabla 2-3:** Composición de distintos materiales lignocelulósicos.

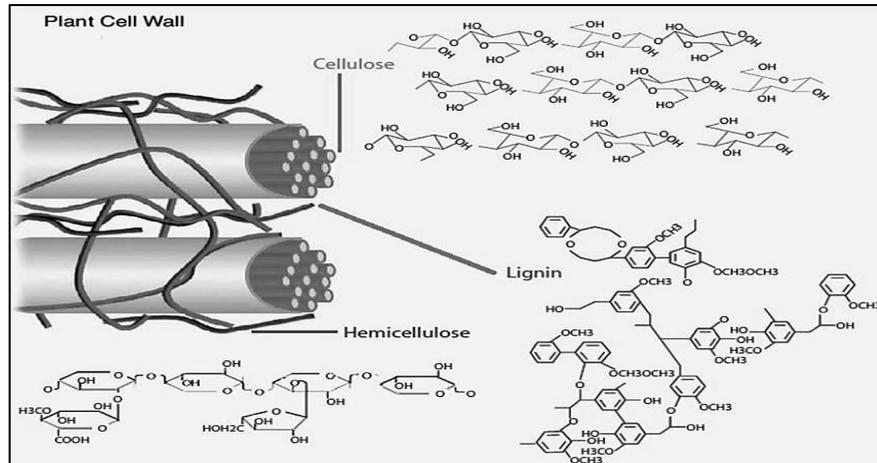
Componente	Rastrojo de maíz pretratado (2)	Bagazo de caña de azúcar pretratado (2)	Paja de trigo pretratada (3)	Paja de cebada (4)
Glucano	35,8	39,6	56,7	33,1
Xilano	5,3	24,1	7,8	20,2
Galactano	0,8	0,0	N/D	0,9
Arabinano	0,7	0,6	0,7	3,8
Manano	0,6	0,2	N/D	-
Lignina	21,1	25,3	23,6	16,1
Cenizas	5,9	3	6,3	-
Acetato	0,8	0,7	N/D	N/D

Fuente: Casanova, (2017, p.28).

### Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica

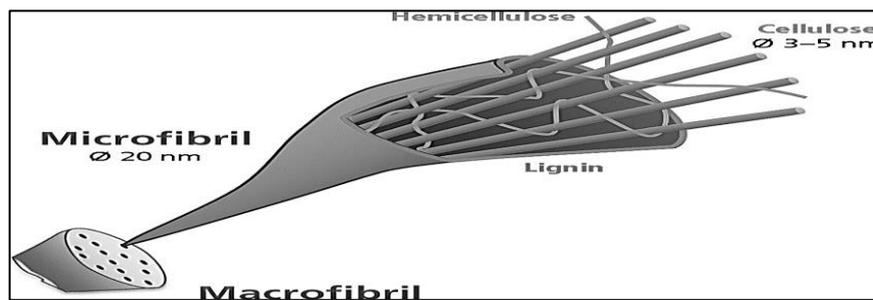
Los materiales vegetales poseen tres componentes principales como son los polisacáridos, la lignina, y demás químicos que no forman se encuentran en la pared celular (Verdecía y Serrat, 2010, párr.12). El componente de polisacárido comprende carbohidratos de elevado peso molecular como la celulosa y hemicelulosa, que son entre el 60 y el 80 % del peso total de los materiales vegetales (Verdecía y Serrat, 2010, p.28). La lignina es el más complejo y peor caracterizado de los componentes

de la madera y representa entre el 20 y el 35 % de ésta. La lignina confiere rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos (Schneider et al., 2020, párr.9).



**Figura 2-3:** Composición de la lignocelulosa

Fuente: Casanova, (2017, p.12).



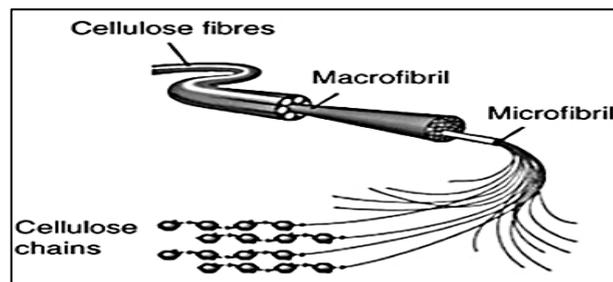
**Figura 3-3:** Estructura esquemática de una fibra de biomasa lignocelulósica

Fuente: Álvarez et al., (2016, p.18).

## Celulosa

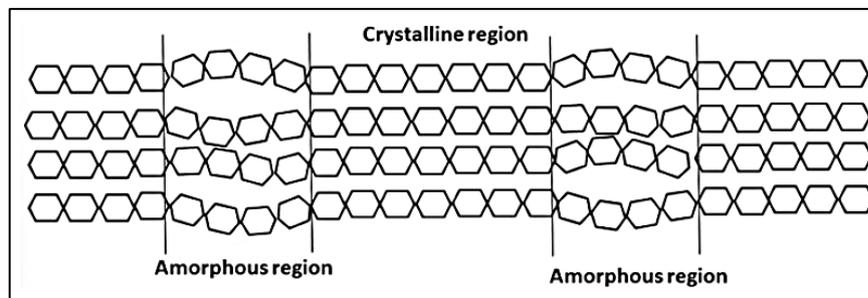
Es un polisacárido sintetizado en gran porción por plantas, constituye aproximadamente entre el 35 y el 50% de su peso seco, y también es sintetizado por microorganismos como bacterias y una gran variedad de algas. Está conformada por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, y son requeridas 8 unidades monoméricas de glucosa para constituir un producto no soluble. Dependiendo de su origen, puede tener aproximadamente entre 8.000 y 15.000 unidades monoméricas por cada cadena. El polisacárido está localizado en la pared celular, donde se lo encuentra como módulos sub microscópicos con una apariencia alargada llamadas micelas. Las micelas forman estructuras más grandes, las microfibrillas, mismas que se empaquetan conformando una estructura cristalina enormemente ordenada, en la cual todos los átomos permanecen fijos en discretos lugares respecto uno del otro; esta forma de ser empaquetado previene el ingreso tanto de enzimas, como de pequeñas moléculas como el  $H_2O$ . Esta estructura está rodeada por polisacáridos hemicelulósicos los cuales se unen a la celulosa por medio de

puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, brindándole aún más resistencia a la hidrólisis química y biológica. Sin embargo, no toda la estructura de la celulosa es cristalina, hay regiones desordenadas, que se denominan regiones amorfas, de composición heterogénea que se caracteriza por una variedad de enlaces. Este ajuste asimétrico propio de las zonas amorfas es primordial para la degradación de la celulosa. A más de las regiones mencionadas anteriormente, las fibras de celulosa tienen diferentes clases de anomalías, entre las cuales se encuentran espacios y torsiones, en las cuales se constituyen miniporos y capilares bastante amplios que permiten el paso de moléculas considerablemente grandes, incluyendo en ciertos casos las enzimas celulolíticas (Gutiérrez et al., 2015, párr.20).



**Figura 4-3:** Estructura de las fibras de celulosa

Fuente: Sharma y Saini, (2020, p.8).

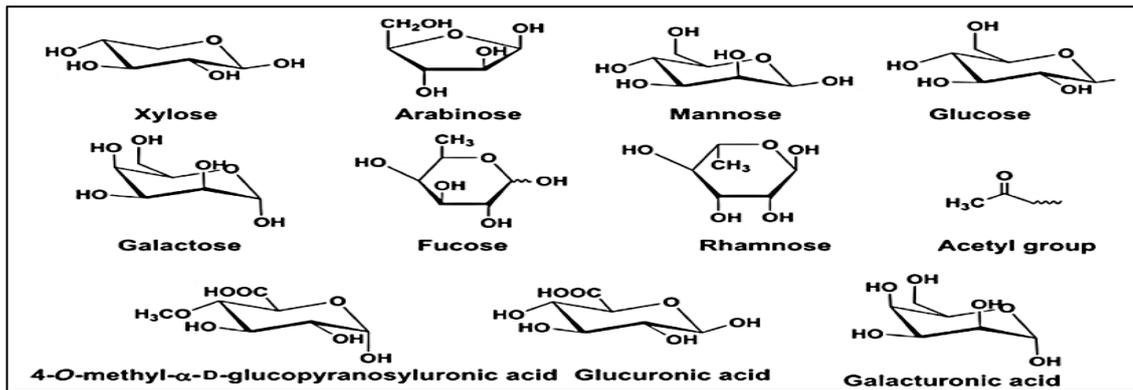


**Figura 5-3:** Regiones cristalinas y amorfas en la celulosa

Fuente: Sharma y Saini, (2020, p.25).

## Hemicelulosa

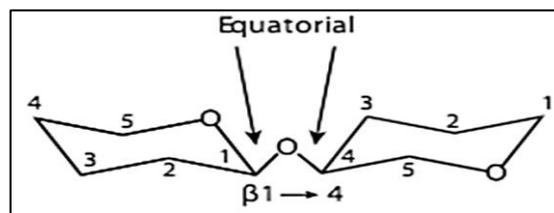
La hemicelulosa es el segundo polímero mayoritario de la lignocelulosa, un heteropolímero con complejidad mayor que el primero debido a sus sustituciones y ramificaciones, pero un grado menor de polimerización (Casanova, 2017, párr.29). Está conformada por pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (manosa, galactosa y glucosa), grupos acetilo y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico).



**Figura 6-3:** Monómeros de la hemicelulosa

Fuente: Sharma y Saini, (2020, p.18).

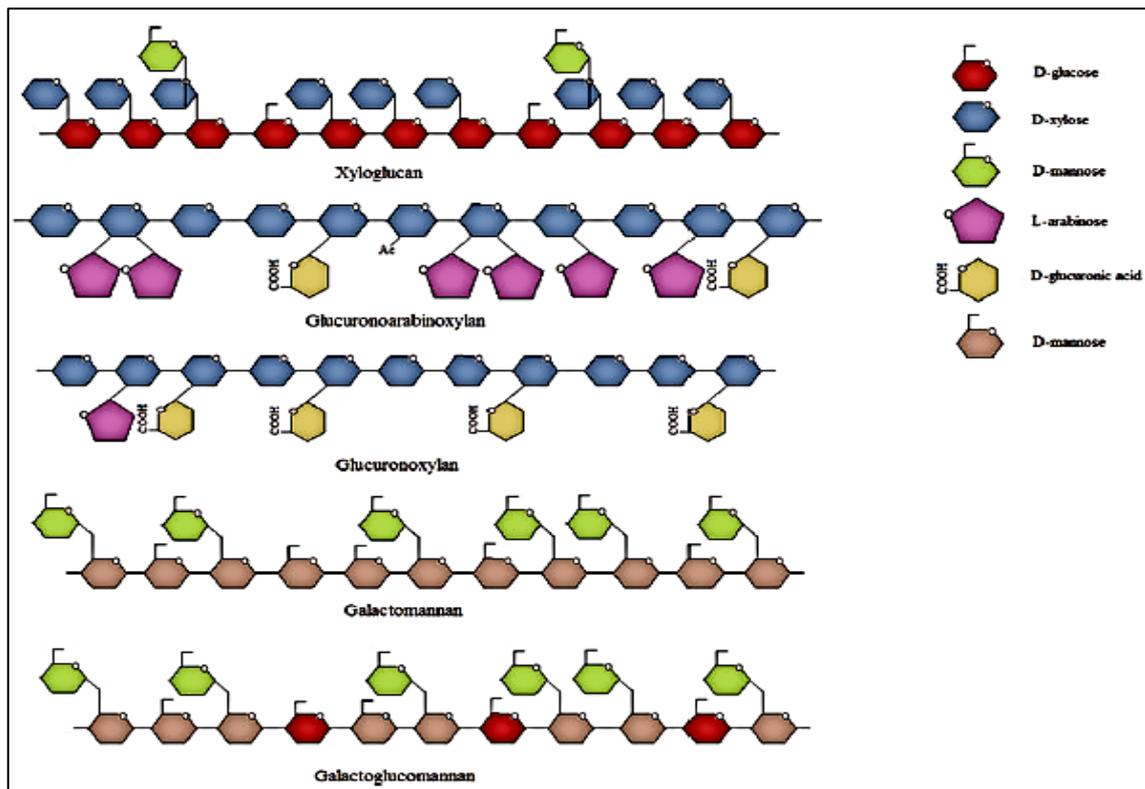
El tipo de polímero de hemicelulosa y la composición dependen de la especie. Su estructura se compone de una cadena principal de azúcares conformada por uno o dos clases de monosacáridos, con diferentes ramificaciones de azúcares y sustituciones. La categorización de los distintos polímeros de hemicelulosa se basa en el mayoritario contenido de azúcares en su principal cadena. Aproximadamente el 70% de la hemicelulosa está compuesta por el xilano. Es un polímero de residuos de D-xilosa con enlaces  $\beta$  (1,4), usualmente sustituido por residuos de D-galactosa, L-arabinosa, ácido glucurónico, grupos acetilo y ácido ferúlico (Novello et al., 2014, p.29).



**Figura 7-3:** Columna vertebral de la hemicelulosa

Fuente: Sharma y Saini, (2020, p.28).

Los polímeros conformados por un único tipo de azúcares en su principal cadena son el manano, el arabinano o el galactano. Entre los polímeros cuya cadena principal está conformada por dos tipos de azúcares están el xiloglucano, arabinoxilano o galacto(gluco)manano entre otros. De los tres tipos de polímeros que componen el material lignocelulósico, la hemicelulosa es la más sensible a los procesos termo-químicos, logrando ser solubilizada en las condiciones de temperatura y pH apropiados. La hemicelulosa está entrelazada entre las fibras de celulosa ligadas por puentes de hidrogeno, operando como nexo de unión entre la celulosa y la lignina (Casanova, 2017, p.32).



**Figura 8-3:** Tipo común de hemicelulosas en las paredes celulares de las plantas  
Fuente: Sharma y Saini, (2020, p.26).

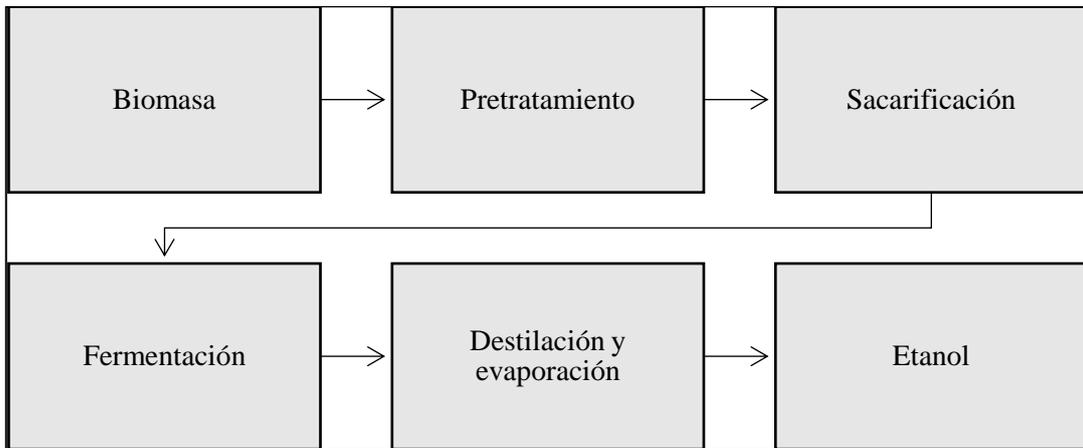
## Lignina

Es el tercer principal componente de la lignocelulosa. Este polímero está caracterizado por dar rigidez a la pared celular y servir como barrera ante el ataque de químicos o patógenos. Su constitución le da una característica hidrofóbica que genera impermeabilidad a la planta. Se trata de uniones éter o carbono-carbono entre unidades de alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico generando un polímero de variada composición y ramificaciones distintas en función de la especie (Casanova, 2017, p.27).

La composición de la lignocelulosa es depende totalmente del tipo de cultivo. Además el rigor del pretratamiento utilizado en el proceso de generación del bioetanol a base de biomasa lignocelulósica dará lugar a variadas composiciones en función del nivel de degradación de la hemicelulosa y lignina en el material (Casanova, 2017, párr.19).

### 3.2.2.2. Proceso de producción de bioetanol lignocelulósico

Para la obtención de bioetanol lignocelulósico se necesitan varias etapas, para empezar la recolección de los desechos vegetales seguido por un pretratamiento de los mismos con el fin de romper la estructura de la central lignocelulósica, ya sea químico, físico o térmico, consecutivamente se realiza una hidrólisis a través de una mezcla de enzimas celulolíticas. A continuación, el proceso de fermentación de los azúcares en etanol a través de cepas en su mayoría de levaduras que metabolizan la glucosa al etanol. Finalmente está la destilación-rectificación-deshidratación, que consiste en la separación y purificación de etanol de acuerdo a las especificaciones del combustible (Castro, 2012, p.17).

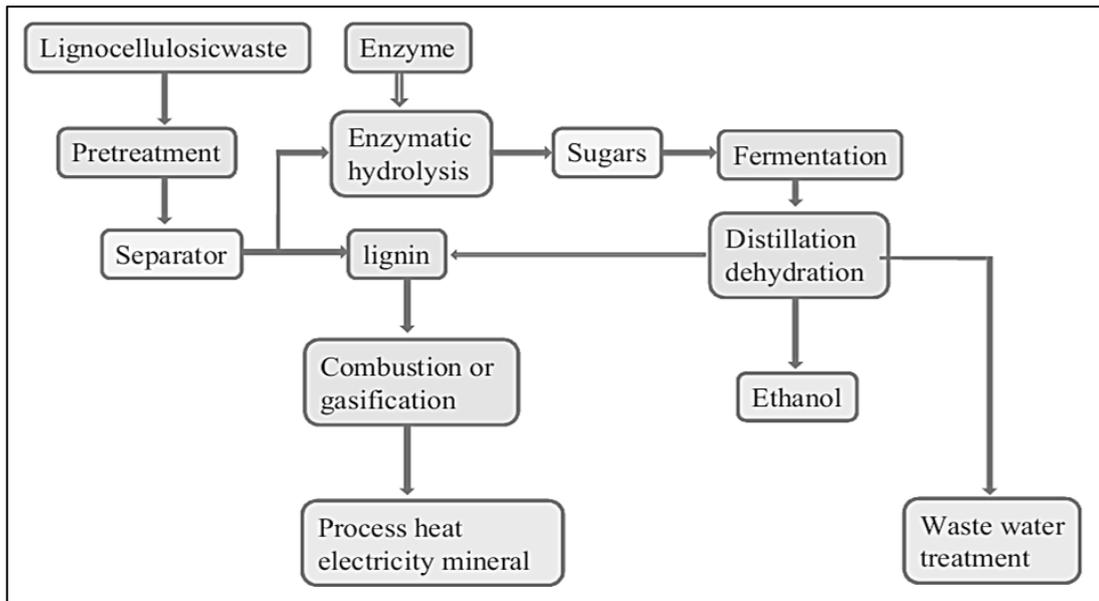


**Figura 9-3:** Etapas del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación

**Fuente:** Vohra et al., (2014, p.17).

**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

El futuro del material lignocelulósico está relacionado con la mejora de la biomasa de las plantas, ingeniería metabólica para la fabricación de bioetanol y microorganismos generadores de enzimas celulolíticas, así como el mejoramiento de la infraestructura tecnológica para la elaboración del biocombustible a escala industrial (Vohra et al., 2014, p.18).

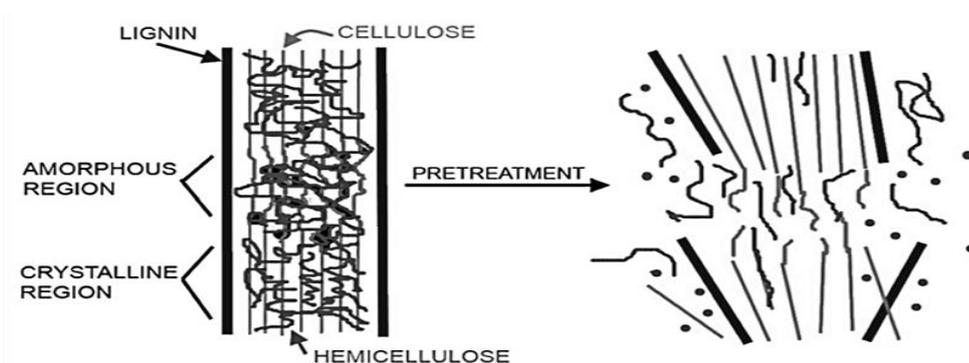


**Figura 10-3:** Proceso bioquímico para la conversión de residuos lignocelulósicos en etanol  
**Fuente:** Vohra et al., (2014, p.26).

#### a. Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos

El término pretratamiento es ampliamente usado en la literatura de los procesos ingenieriles, para referirse a las etapas del proceso en las cuales se convierte la biomasa lignocelulósica de su forma nativa, (la cual es muy recalcitrante a la acción hidrolítica del sistema enzimático celulasa), a una forma en la cual la hidrólisis enzimática es efectiva (Verdecía y Serrat, 2010, p.21).

El propósito del pretratamiento es eliminar parcialmente la lignina y la hemicelulosa además de reducir el nivel de cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad de la biomasa. Este proceso transforma la estructura nativa de las fibras con el fin de facilitar el acceso de las enzimas que degradan lignocelulosa, necesarias en la etapa posterior de hidrólisis (Casanova, 2017, p.28).



**Figura 11-3:** Alteración de la lignocelulosa mediante el pretratamiento de la biomasa  
**Fuente:** Sharma y Saini, (2020, p.12).

Existen varios métodos para ejecutar el pretratamiento, que se los pueden denominar químicos, aquellos en los que se emplean ácidos, bases o solventes con el fin de modificar la estructura de

la lignocelulosa; físicos, que incluye la molienda, presión y temperatura con el fin de disminuir el tamaño de partícula y aumentar el área accesible; físico-químicos donde se integran cambios de temperatura y presión con el uso de ácidos o bases, donde la explosión de vapor es el más comúnmente utilizado; o biológicos en los que se utilizan las enzimas lignolíticas de algunos microorganismos, especialmente hongos basidiomicetos, con el fin de eliminar la lignina siendo el componente más dificultoso de degradar, siendo este mecanismo el menos agresivo y con menor coste energético, pero también el que menos se lo puede controlar (Casanova, 2017). Tanto el tipo de material lignocelulósico como las características del pretratamiento utilizado establecen las propiedades del material, modificando la accesibilidad de la celulosa, el nivel de polimerización y su composición, lo que puede repercutir en la formulación del cóctel enzimático y la dosis del mismo para una favorable degradación de la biomasa (Casanova, 2017, p.27).

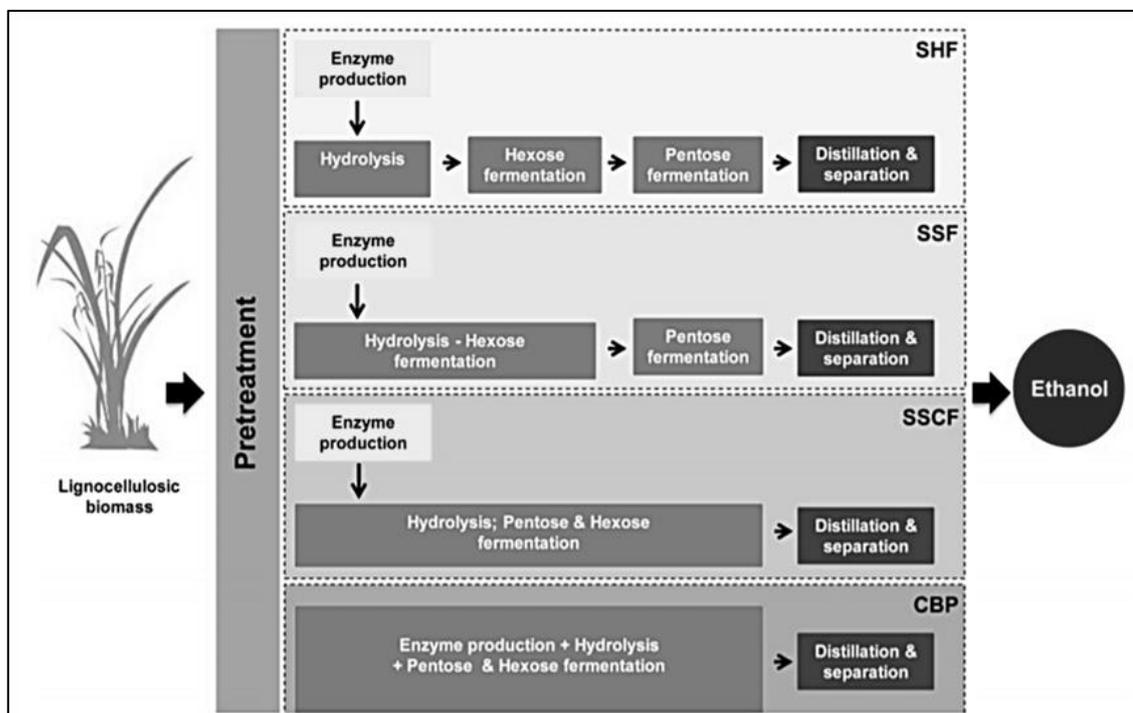
### **b. Hidrólisis enzimática**

Después del pretratamiento el paso siguiente es la transformación de la celulosa y hemicelulosa a monómeros de hexosas y pentosas a través de la acción combinada de celulasas, hemicelulasas y enzimas complementaria.(Casanova, 2017, p.12) Basándose en la complejidad y variabilidad de los materiales, con el fin de lograr una completa degradación de los polímeros es necesaria una óptima combinación de las distintas actividades enzimáticas de acuerdo con el material y el pretratamiento utilizado (Casanova, 2017, p.13). En la naturaleza esta labor ha sido desarrollada por diversos microorganismos que emplean materia lignocelulósica como fuente de carbono. Comenzando con bacterias anaeróbicas que se encuentran en el rumen y tracto intestinal de los animales herbívoros e insectos como por ejemplo escarabajos y termitas, bacterias aerobias que se encuentran en aguas residuales hasta hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca u hongos filamentosos, existe una gran diversidad de organismos capaces de generar enzimas hidrolíticas necesarias en la industria para lograr la sacarificación de los polímeros de hemicelulosa y celulosa Para ello es necesario fijar unas condiciones de proceso en las que las enzimas logren actuar de forma eficiente, que es usualmente el rango de 45°a 55°C y pH entre 4.8 a 5.8. Las mencionadas condiciones de temperatura ayudan a solubilizar los componentes de la lignocelulosa debido a que reducen la viscosidad de la materia prima y con ello hacen más fácil la licuefacción (Casanova, 2017, p.13). Con el fin de incrementar las concentraciones de etanol al final del proceso, la hidrólisis usualmente se lleva a cabo a concentraciones altas de sólidos totales entre 15 y el 22% durante 24 a 80 horas. La sacarificación ha sido durante algunos años la principal limitación para la rentabilidad de la fabricación de etanol de masa vegetal, teniendo en cuenta factores que limitan tanto a nivel de sustrato como de la enzima. Como factores limitantes que dependen del sustrato, tenemos la cristalinidad de la celulosa, el nivel de polimerización, la superficie disponible, el porcentaje de humedad y el contenido de lignina. Entre las causas

limitantes que son dependientes de los mecanismos de acción de las enzimas se tiene la desnaturalización o estabilidad de las enzimas, las uniones no específicas y la inhibición por producto o por otros compuestos que se presentan en la hidrólisis (Casanova, 2017,p.13).

### c. Fermentaciones

Los monosacáridos producidos de la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico se convierten en etanol por fermentación alcohólica regulada por cepas industriales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En el tema de las hexosas, la levadura agrega la glucosa del medio y la transforma en piruvato por medio de la glucólisis. Dicho piruvato es llevado a acetaldehído y este posteriormente a etanol debido a la acción catalítica en secuencia de la enzima piruvato descarboxilasa y la enzima alcohol deshidrogenasa (Das et al., 2013, p.27).



**Figura 12-3:** Configuraciones del proceso de bioetanol de biomasa lignocelulósica

Fuente: Vohra et al., (2014, p.12).

La aplicación industrial de la levadura *S. cerevisiae* para la obtención de bioetanol se ve favorecida por el alto grado de producción que logra del mismo modo, su tolerancia al etanol y a los productos inhibidores que se encuentran en la biomasa, además de un buen crecimiento a pH relativamente bajos lo que previene el proceso de la contaminación por bacterias. No obstante, está limitado a la fermentación de glucosa, debido a que *S. cerevisiae* no está apta para metabolizar la xilosa, que representa aproximadamente 40% de los azúcares provenientes de la hidrólisis de la lignocelulosa. Con el fin de aprovechar la xilosa que se libera se están creando cepas

modificadas genéticamente con el objetivo de fermentar este azúcar (Casanova, 2017, p.15).

### 3.2.2.3. Configuración de procesos

#### a. Hidrólisis y fermentación en secuencia SHF

En el proceso Hidrólisis y Fermentación por Separado, la producción de enzimas, la hidrólisis de la biomasa, la fermentación de hexosas y pentosas son llevadas a cabo en reactores separados. En SHF, la hidrólisis y fermentación pueden ocurrir a sus condiciones óptimas. Sin embargo, la acumulación de glucosa y celobiosa durante la hidrólisis inhiben las celulasas y reducen sus eficiencias. Las desventajas de SHF conducen al desarrollo del proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (Van Dyk y Pletschke, 2012, párr.12).

#### b. Hidrólisis y fermentación simultáneas SSF

En SSF, tanto la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la hexosa ocurre en el mismo reactor. Esto mitiga la inhibición de las celulasas, ya que los azúcares son inmediatamente consumidos por el microorganismo fermentador. Sin embargo, el proceso SSF tiene algunas limitaciones. Existe una contrapartida entre el costo de producción de las enzimas y el proceso de hidrólisis fermentación (Van Dyk y Pletschke, 2012, p.25).

En SSF, la tasa de producción de enzimas limita la tasa de producción de alcohol. Además, las celulasas usadas para la hidrólisis y los microorganismos fermentadores usualmente tienen un diferente pH y temperatura óptimos. Es importante tener condiciones compatibles tanto para enzimas como para microorganismos. Otro inconveniente con SSF es que la mayor parte de microorganismos usados para la fermentación de glucosa no pueden utilizar xilosa, un producto de hidrólisis de la hemicelulosa (Devarapalli y Atiyeh, 2015).

#### c. Hidrólisis y fermentación simultáneas SSCF

En el proceso de Sacarificación y Co-fermentación simultánea, la glucosa y xilosa son co-fermentadas en el mismo reactor. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* son diseñadas genéticamente para co-fermentar tanto glucosa como xilosa. (Van Dyk y Pletschke, 2012, p.14).

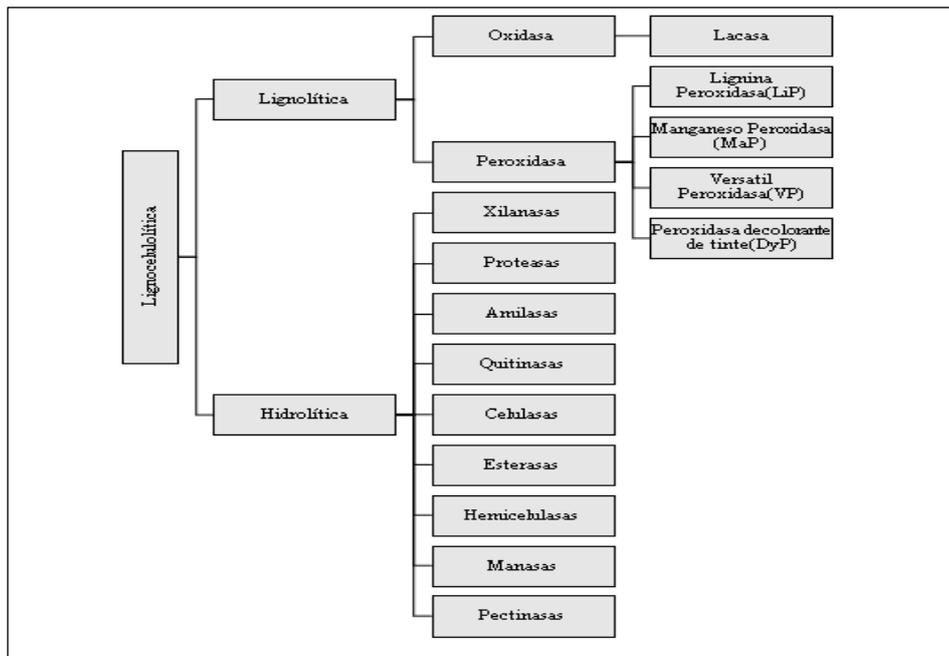
#### d. Bioproceso consolidado CBP

En este proceso un mismo microorganismo es usado para las etapas de hidrólisis y fermentación.

Esto potencialmente reduce los costos de capital e incrementa la eficiencia del proceso. Sin embargo, los microorganismos los cuales pueden tanto producir enzimas para la hidrólisis de la biomasa y luego fermentar los azúcares liberados aún están en una etapa temprana de desarrollo (Vohra et al., 2014, párr.14).

### 3.2.3. *Enzimas Lignocelulolíticas*

Las enzimas lignocelulolíticas son biocatalizadores que participan en la desintegración de la lignina y los materiales celulósicos en sus componentes para su posterior hidrólisis en productos aprovechables. Las enzimas lignocelulolíticas son un gran conjunto de proteínas extracelulares primordialmente, que contienen enzimas lignolíticas (peroxidasas y oxidasas) y enzimas hidrolíticas (celulasas, hemicelulasas, pectinasas, quitinasas amilasas, proteasas, estereras y mananasas) (Chukwuma et al., 2020, p.31).



**Figura 13-3:** Varias enzimas lignocelulolíticas agrupadas según sus sistemas enzimáticos

**Fuente:** Chukwuma et al., (2020, p.12).

**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

#### 3.2.3.1. *Enzimas lignolíticas*

La lignina posee un alto peso molecular y a su vez es insoluble, por lo que se la considera estructuralmente compleja y difícil de descomponer. Debido a su estructura, la lignina es químicamente recalcitrante a la degradación por la gran mayoría de organismos y, debido a sus enlaces heterogéneos, la lignina no puede ser dividida por enzimas hidrolíticas, como si sucede

en la degradación de los otros componentes de la pared celular de la materia lignocelulósica. La lignina es un polímero no carbohidrato formado a partir del emparejamiento oxidativo de dispositivos o bloques de construcción llamados monolignoles que generalmente están enlazados de varias formas que varían de especie a especie, de ahí la denominación de heterogeneidad de enlaces (Chukwuma et al., 2020, p.14).

La descomposición de la lignina a través de microorganismos puede ser muy complicada, ya que el microorganismo debe superar varios obstáculos para considerarse un buen candidato para la degradación de la lignina como ser un sistema extracelular de enzimas, tener un mecanismo oxidativo de degradación enzimática y no hidrolítico debido a que la lignina posee una estructura que contiene enlaces carbono-carbono y enlaces éter, poseer menos especificidad en comparación con las enzimas hidrolíticas debido a la irregular estereoquímica de la lignina.(Chukwuma et al., 2020, p.13) En conclusión, las enzimas lignolíticas son enzimas extracelulares, oxidativas e inespecíficas cuyas reacciones provocan la generación de productos que demandan varias reacciones oxidativas, ya que son inmensamente inestables pero vitales para iniciar la despolimerización de la lignina (Chukwuma et al., 2020, p.41).

**Tabla 3-3:** Enzimas hidrolíticas empleadas en la degradación de lignina.

Fracción de Lignocelulosa	Enzimas	Lugar de acción	Modo de acción	Número E.C	Fuente
Lignina	Esterasa del ácido ferúlico*	Grupo feruloil en el lado del arabinofuranosilo cadena lateral del arabinofuranosilo unido al terminal no reductor de la xilosa	Hidrolizar los enlaces entre la cadena lateral de la cadena lateral de arabinosa residuos de la cadena lateral de la arabinosa y los ácidos (ácido ferúlico)	3.1.1.1	(Ghati et al., 2018)
	Lacasa (fenol oxidasa)	Los compuestos fenólicos que se encuentran en la estructura de la lignina	Oxida las subunidades fenólicas subunidades de la lignina	1.10.3.2	(Janeiro, 2018)
	Lignina peroxidasa	Compuestos aromáticos que se encuentran en la estructura de la lignina	Oxidación de alcoholes bencílicos, escisión de enlaces C-C, escisión de los enlaces C-O	1.11.1.7	(Wu et al., 2018)
	Manganasa peroxidasa	Compuestos fenólicos que se encuentran en la estructura de la lignina	La oxidación de Mn <sup>2+</sup> -Mn <sup>3+</sup> , que luego se une a un ligando apropiado, se difunde desde la enzima, y, a su vez oxida los sustratos fenólicos	1.11.1.13	(Sani y Krishnaraj, 2017)

**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

**Fuente:** Adebami y Adebayo-Tayo, (2020, p.13).

### 3.2.3.2. Enzimas Hidrolíticas

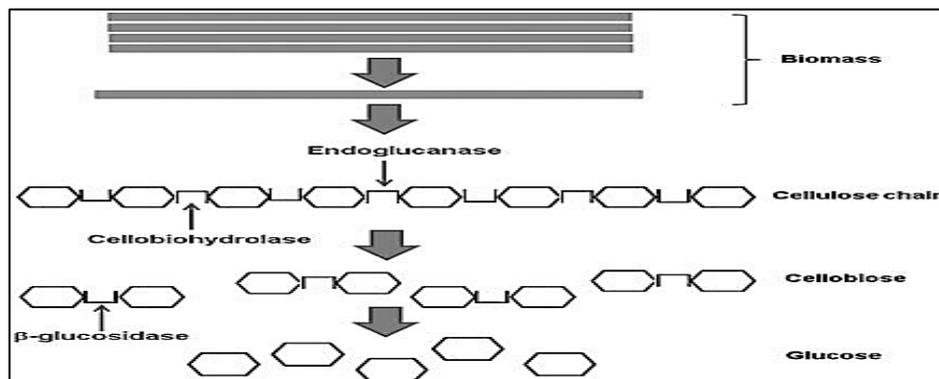
También son conocidas como hidrolasas, su función es descomponer biomoléculas como por ejemplo péptidos, ésteres, glucósidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y moléculas de grasa en sus unidades más simples. Las hidrolasas alteran los principales enlaces químicos de las moléculas tóxicas, lo que provoca que su toxicidad se reduzca notablemente. Fácilmente se encuentran disponibles, no poseen selectividad de cofactor y soportan la adición de disolventes miscibles en agua. Las hidrolasas están implicadas en la degradación lignocelulósica, y son celulasas, hemicelulasas, pectinasas quitinasas, amilasas, proteasas, esterases y mananasas. Este tipo de enzimas catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces C-O, C-N, O-P, C-C entre otros

enlaces simples (Chukwuma et al., 2020).

### a. Celulasas

Las celulasas cumplen un rol fundamental en el proceso enzimático al catalizar la hidrólisis de la celulosa en azúcares fermentables solubles. Hongos, bacterias y plantas sintetizan las celulasas. El esquema de degradación clásico de la celulosa implica la acción sinérgica de tres clases de enzimas: las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), las exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y las  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.91). Estas enzimas trabajan de una forma sinérgica porque las enzimas endo-activas generan nuevos extremos de cadena reductores y no reductores para las enzimas exo-activas, las cuales liberan celobiosa que es transformada en glucosa por las  $\beta$ -glucosidasas (Horn et al., 2012, p.14).

Las celulasas son enzimas sintetizadas por una gran variedad de organismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. La principal función de estas enzimas en el ambiente ha sido el uso del material celulósico como fuente de carbono. (BarbosaKendrick et al., 2020, párr.23). Dichas enzimas pueden ser inducibles debido al crecimiento de microorganismos en materiales celulósicos. Entre los géneros principalmente estudiados para la producción de celulasas están *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus*. (Casanova, 2017, p.14) De todos los organismos degradadores de celulosa, los hongos filamentosos son los más grandes responsables de la degradación de materia vegetal en la naturaleza. Los hongos han colonizado diferentes ecosistemas tanto terrestres como marinos y son de transcendental importancia para el reciclaje del carbono del planeta, una facultad con implicaciones ecológicas, bioquímicas, agrónomas y actualmente como aplicación industrial. La utilidad de estos microorganismos en la industria se debe a que pueden llegar a generar una batería de enzimas con niveles altos de producción y eficiencia catalítica que secretan al medio de cultivo, facilitando su recuperación para los diferentes usos industriales.



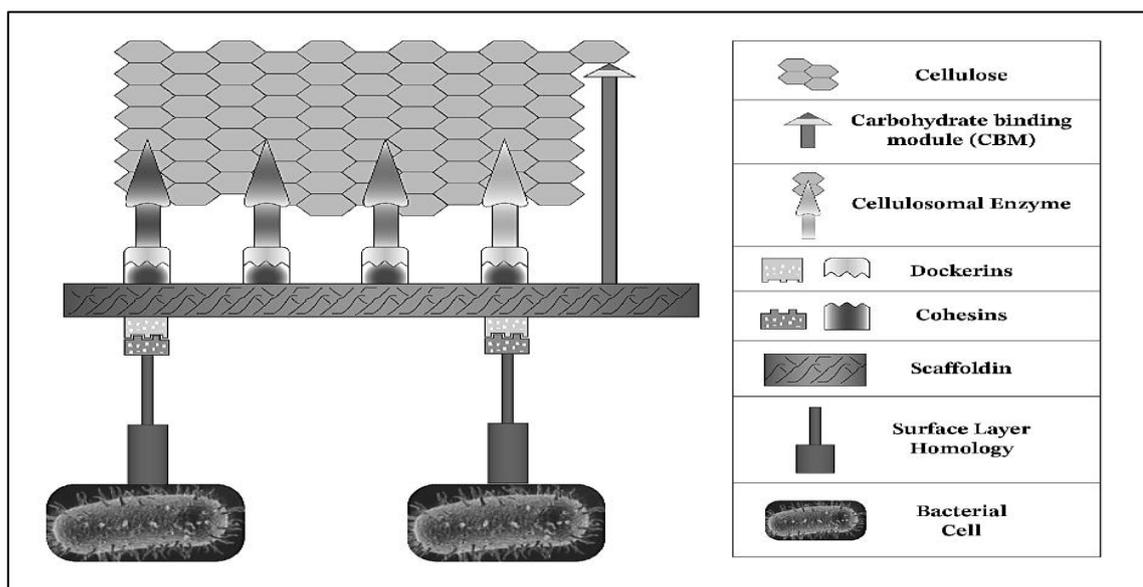
**Figura 14-3:** Despolimerización de la celulosa

Fuente: Adebami y Adebayo-Tayo, (2020).

Los sistemas celulolíticos pueden estar asociados en complejos multienzimáticos (denominados celulosomas) o no asociados como enzimas individuales. Según (Lugani et al., 2020, p.43) existen dos sistemas celulolíticos representativos: enzimas extracelulares en hongos filamentosos y bacterias anaerobias y complejos multienzimáticos llamados celulosomas en cepas bacterianas y fúngicas anaerobias. En los dos casos, las enzimas poseen una estructura modular. Las enzimas no asociadas constan de forma general de un dominio catalítico el cual es el responsable de la reacción de hidrólisis y de un dominio de unión a la celulosa (CBD) que media el nexo de las enzimas al sustrato. Los dos dominios están unidos por un péptido enlazador (rico en Pro/Ser/Thr), que debe ser largo y flexible para permitir la orientación y el funcionamiento eficientes de los dos dominios. Las enzimas celulosomales se unen de una forma no covalente a la proteína integradora del celulosoma, que lleva un CBD (Menon y Rao, 2012, p.15).

Es muy importante tomar en cuenta que los sistemas enzimáticos celulolíticos naturales suelen contener varias enzimas exo y endo actuantes que pueden tener distintas preferencias por distintas formas de celulosa (cristalina frente a amorfa). La diferenciación en la afinidad por las distintas formas de celulosa puede deberse, en parte, a la variación en la presencia de módulos de unión a carbohidratos (CBM) que están unidos covalentemente a los dominios catalíticos de las enzimas en cuestión (Menon y Rao, 2012, p.17).

El término CBM se ha desarrollado para reflejar la variada especificidad del ligando de estos módulos. Actualmente se han identificado muchos CBMs de forma experimental, y varios cientos de CBMs putativos pueden ser reconocidos además sobre la base de la similitud de aminoácidos (Horn et al., 2012, p.19).



**Figura 15-3:** Acción del celulosoma en la sacarificación de la celulosa

Fuente: Lugani et al., (2020).

En general las CBM tienen tres funciones con respecto a la función de sus módulos catalíticos afines: un efecto de proximidad, una función de orientación y una función de interrupción. Se ha considerado al CBM como el factor que limita la hidrólisis. La comprensión de la base estructural por la que las CBMs se unen a sus ligandos de destino generan ideas nuevas acerca de los mecanismos de reconocimiento de carbohidratos y proteínas. Pese a la información disponible sobre este tipo de sistemas enzimáticos y también sobre la estructura de las paredes celulares de las plantas, la aplicación de estos conocimientos a la degradación de la celulosa ha tenido un éxito limitado. Esto puede atribuirse factores como: la complejidad y heterogeneidad inherentes a la celulosa nativa, y limitada comprensión de los procesos básicos de hidrólisis por parte nuestra. Por esta razón, la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la degradación de la celulosa en combinación con enzimas nuevas y superiores puede promover un mayor uso de este importante recurso renovable (Menon y Rao, 2012, p.26).

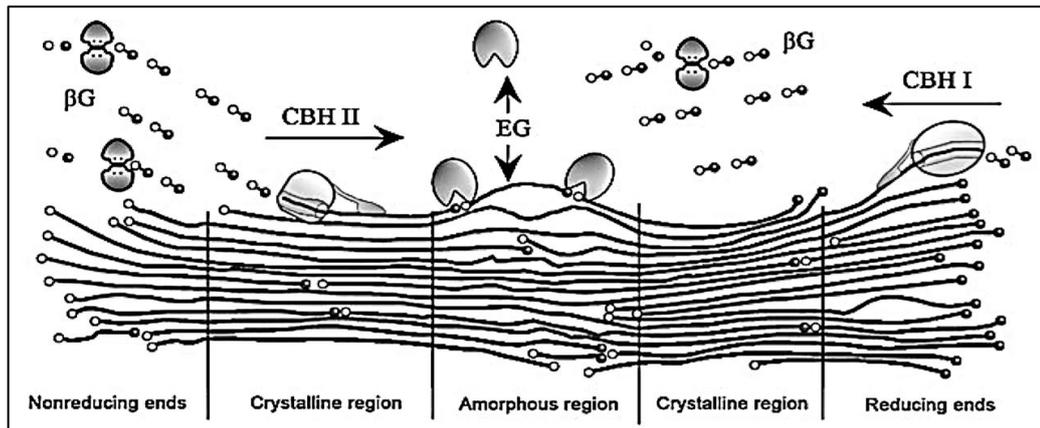
**Tabla 4-3:** Enzimas hidrolíticas para la degradación de la biomasa lignocelulósica (celulosa).

Enzima	Subtipo	Nombre	Otros nombres comunes	Localización	Función	Fuente
Endoglucanasas (EC 3.2.1.4)		4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucano 4-glucanohidrolasa	Celulasa; endo- $\beta$ -1,4-glucanasas; 1,4- $\beta$ -D-glucano-4-glucanohidrolasa; endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa; endo- $\beta$ -1,4-D-glucano 4-glucanohidrolasa $\beta$ -1,4-glucanasa; $\beta$ -1,4 endoglucano hidrolasa; celulasa A; celulosina AP; endoglucanasa D; celulasa alcalina; celudextrinasa avicelasa; pancelasa SS	Regiones amorfas de la celulosa	Hidroliza los enlaces $\beta$ -1,4 internos de las cadenas de celulosa y crea nuevos extremos reductores y no reductores. También puede hidrolizar enlaces 1,4 en $\beta$ -D-glucanos que contienen enlaces 1,3	(Feijo et al., 2021)
Exoglucanasa	Exo-1,4- $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.74)	4- $\beta$ -D-Glucano glucohidrolasa	Glucan-1,4- $\beta$ -glucosidasa; exocelulasa; exo- $\beta$ -1,4 glucosidasa; exo- $\beta$ -1,4-glucanasa; $\beta$ -1,4- $\beta$ -glucanasa; exo-1,4- $\beta$ - glucanasa; 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasa	Regiones cristalinas de la celulosa	Hidrólisis de los enlaces 1,4 en los 1,4- $\beta$ -D-glucanos, para eliminar las unidades de glucosa sucesivas de la celobiosa y otros oligosacáridos relacionados. También tiene la capacidad de liberar la glucosa directamente de la celulosa	(Casas y Barrera, 2020)

	Celulosa 1,4- $\beta$ -celobiosidasa (extremo reductor) (EC 3.2.1.176)	4- $\beta$ -D-Glucano celobiohidrolasa (extremo reductor)	Exo- $\beta$ -1-4-cellobiosidase; CelS; CelSS; endoglucanasa SS; celulasa SS; cellobiohidrolase CelS; Cel48A	Regiones cristalinas de la celulosa	Hidrólisis de los enlaces 1,4- $\beta$ -D glucosídicos en la celulosa y sustratos similares, liberando celobiosa de los extremos reductores de las cadenas mediante el mecanismo de reacción inversa	(Boontanom y Chantarasiri, 2021)
	Celulosa 1,4- $\beta$ -celobiosidasa( extremo no reductores) (EC3.2.1.91)	4- $\beta$ -D Glucanocelobiohidrolasa(extremo no reductor)	Celobiohidrolasa;celobiosidasa; exocelobiohidrolasa; $\beta$ -1,4-glucano celobiohidrolasa; $\beta$ -1,4 glucano celobiosilhidrolasa; 1,4- $\beta$ -glucano celobiosidasa;exoglucanasa;avicelasa;CBH 1; celulasa C1;celobiohidrolasa I; exo- $\beta$ -1,4 glucanocelobiohidrolasa	Regiones cristalinas de la celulosa	La hidrólisis de los enlaces 1,4- $\beta$ -D-glucosídicos en la celulosa y la celotetraosa, liberando celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas	(Guan, 2021)
$\beta$ -Glucosidasa (EC 3.2.1.21)		$\beta$ -D-Glucósido glucohidrolasa	Gentiobiase, cellobiase, emulsin, elaterase, aryl- $\beta$ - glucosidase, $\beta$ -D-glucosidase, $\beta$ -glucosideglucohidrolase, arbutinase, amygdalinase, p-nitrofenil $\beta$ -glucosidase, primeverosidase, amygdalase, linamarase, and salicilinase	Despolimeriza celulosa, celodextrinas y celobiosa	Hidrólisis de los residuos terminales, no reductores $\beta$ -D-glucosil de las unidades de celobiosa y de las celodextrinas de cadena corta en unidades monoméricas individuales de glucosa	(Alvarez, 2021)

**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

**Fuente:** Adebami y Adebayo-Tayo, (2020, p.12).

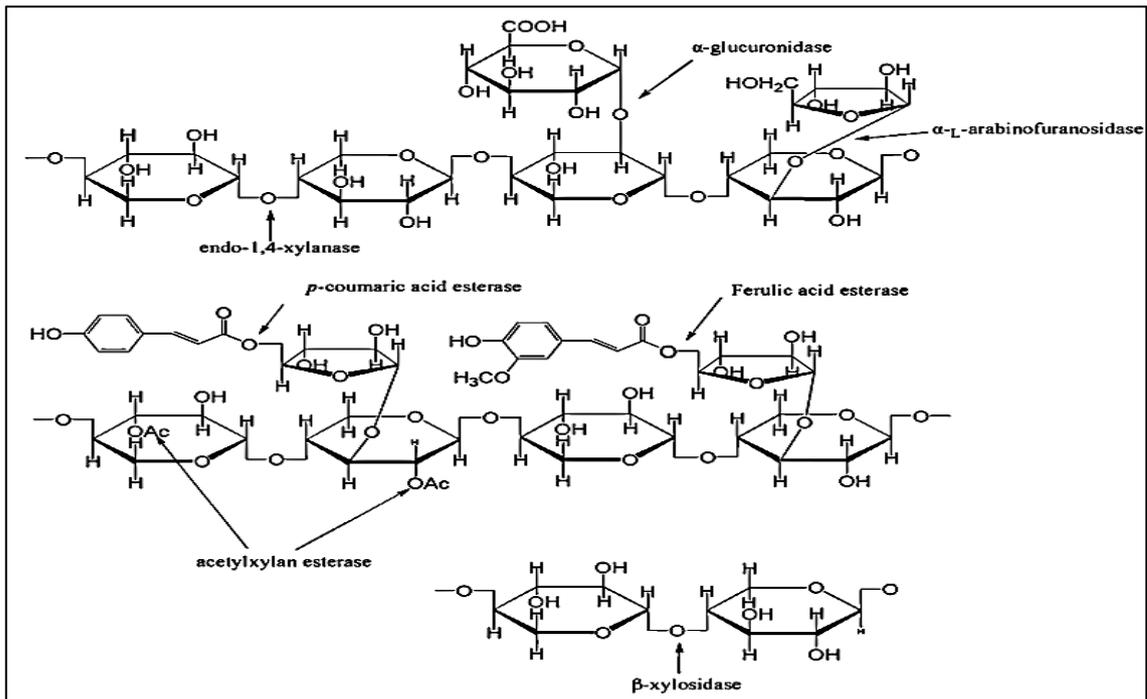


**Figura 16-3:** Mecanismo de biodegradación de la celulosa

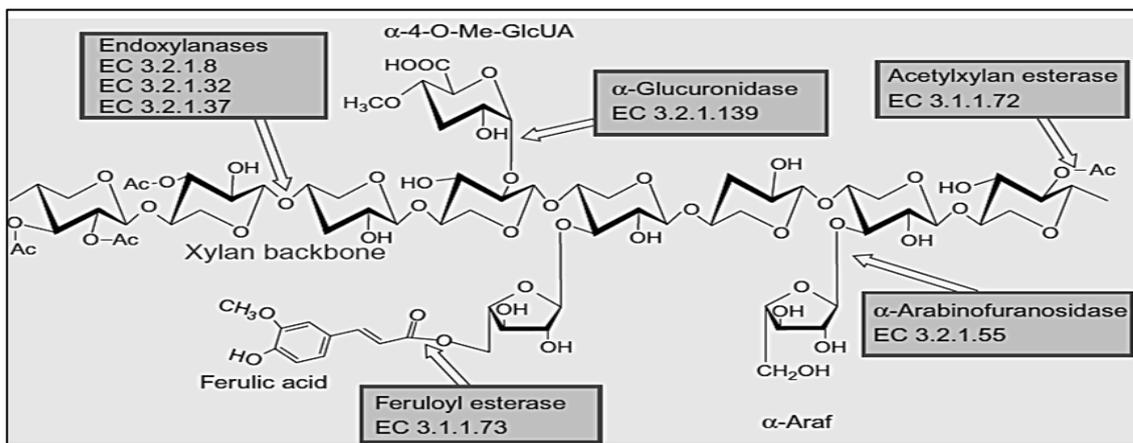
Fuente: Wang et al., (2012, p.17).

## b. Xilanasas

Las hemicelulosas se descomponen en azúcares monoméricos y ácido acético, además se congregan según la forma en que actúan sobre sustratos específicos. En correlación con las hemicelulosas, existen varios tipos de hemicelulasas, cada una específica para cada clase de hemicelulosa. Estas enzimas pueden congregarse en dos grupos: las hemicelulasas que atacan a la columna vertebral del polisacárido y las que atacan a las cadenas laterales. El xilano, cuya estructura difiere de una planta a otra, es el componente principal de las hemicelulosas. Es un polisacárido formado por xilosa, un azúcar pentosa. Las xilanasas son las enzimas encargadas de la hidrólisis del xilano. La eliminación de los componentes hemicelulósicos de la materia lignocelulósica mediante el uso de xilanasas es una estrategia ecológica para incrementar la sacarificación enzimática de la celulosa. En vista de que el xilano no es una estructura cristalina fuertemente empaquetada como la celulosa, es mucho más susceptible a la sacarificación enzimática en comparación con la celulosa. La hidrólisis completa del xilano demanda la acción de enzimas xilanolíticas que contienen un solo dominio, ya sea catalítico o no catalítico. La mayor parte de las xilanasas disponibles en el mercado se originan a partir de *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens* o *Bacillus* y su temperatura idónea fluctúa entre 40-60 C. El complejo de la xilanasas consiste en varias enzimas que actúan de forma sinérgica para generar azúcares a partir del xilano. En virtud de la naturaleza heterogénea del xilano, la descomposición completa tiene lugar por la acción de varias enzimas hidrolíticas que incluyen endo-b xilanasas (EC 3.2.1.8), b-xilosidasa (EC 3.2.1.37), a-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) a-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55), y acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.6). Todas estas enzimas actúan sinérgicamente para transformar el xilano en azúcares constituyentes (Binod et al., 2019, párr.25).



**Figura 17-3:** Estructura química y degradación de hemicelulosa  
 Fuente: Wang et al., (2012, p.13).



**Figura 18-3:** Funciones hidrolíticas de las xilanasas en la despolimerización del xilano  
 Fuente: Adebami y Adebayo-Tayo, (2020, p.17).

**Tabla 5-3:** Enzimas hidrolíticas para la degradación de la biomasa lignocelulósica (xilanas)

Enzima	Nombre	Otros nombres comunes	Localización	Función	Fuente
Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (EC3.2.1.8)	4- $\beta$ -D-Xilano xilano hidrolasa	Endo-1,4- $\beta$ -xilano 4-xilano hidrolasa; endo-1,4-xilanasas; xilanasas; $\beta$ -1,4-xilanasas; endo-1,4-xilanasas; endo- $\beta$ -1,4-xilanasas; endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas; 1,4- $\beta$ -xilano hidrolasa; $\beta$ -xilanasas; $\beta$ -D-xilanasas	Xilano cadena principal de hemicelulosa	Cataliza la endohidrólisis de los enlaces 1,4- $\beta$ -xilósido en los xilanos. Funciona principalmente en los enlaces $\beta$ -1,4-xilosa interiores de la columna vertebral del xilano liberando xiloligosacáridos cortos	(Guan, 2021)
Endo-1,3- $\beta$ -xilanasas (EC3.2.1.32)	3- $\beta$ -D-Xilano xilano hidrolasa	Endo-1,3- $\beta$ -xilósidas; 1,3- $\beta$ -xilanasas; 1,3-xilanasas; $\beta$ -1,3-xilanasas endo- $\beta$ -1,3-xilanasas; 1,3- $\beta$ -D-xilano xilano hidrolasa; xilano endo-1,3- $\beta$ -xilanasas	Xilano cadena principal de hemicelulosa	Lleva a cabo la endohidrólisis de los enlaces 1,3- $\beta$ -D-glucosídicos en los 1,3- $\beta$ -D-xilanos	(Cai et al., 2021)
Xilano-1,4- $\beta$ -xilósidas (EC3.2.1.37)	4- $\beta$ -D-Xilano xilano hidrolasa	$\beta$ -Xilósidas; xilobiasas; exo-1,4- $\beta$ -xilósidas; $\beta$ -D-xilopiranosidas; $\beta$ -xilósidas; exo-1,4-xilósidas; exo-1,4- $\beta$ -D-xilósidas; 1,4- $\beta$ -D-xilano xilano hidrolasa	Xiloligosacáridos de hemicelulosa	Hidroliza los 1,4- $\beta$ -D-xilanos eliminando sucesivos residuos de D-xilosa de los extremos no reductores de los xiloligosacáridos	(Chadha et al., 2017)
$\alpha$ -Glucuronidasas (EC 3.2.1.139)	$\alpha$ -D-Glucosiduronato glucuronohidrolasa	$\alpha$ -D-Glucosiduronato	Enlaces $\alpha$ -1,2-glucurónicos o 4-O-metil sustituyentes del ácido glucurónico	Cataliza la hidrólisis de los enlaces $\alpha$ -1,2-glicosídicos entre la xilosa y el ácido D-glucurónico o su enlace 4-O-	(Liao et al., 2021)

			unidos a la cadena principal del xilano de la hemicelulosa	metil éter	
$\alpha$ -Arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	$\alpha$ -L-Arabinofuranosido extremo no reductor y $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasa	Arabinosidasa; $\alpha$ -arabinosidasa; $\alpha$ -L-arabinosidasa; $\alpha$ -L-arabinanasa; $\alpha$ -arabinofuranosidasa; polisacarido $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa; $\alpha$ -L-arabinofuranoside hidrolasa; L-arabinosidasa (ambiguos)	$\alpha$ -L-Arabinofuranosil compuestos unidos a la cadena principal de xilano de la hemicelulosa	Hidroliza el terminal, no reductores grupos $\alpha$ -L-arabinofuranosido de los $\alpha$ -L-arabinósidos (arabinanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos)	(Jana et al., 2021)
Arabinan-endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanasa (EC 3.2.1.99)	5- $\alpha$ -L-Arabinan 5- $\alpha$ -L-Arabinanohidrolasa	Endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinasa; endo- $\alpha$ -1,5-arabanasa; endoarabanasa; 1,5- $\alpha$ -L-arabinanohidrolasa; 1,5- $\alpha$ -L-arabinano	Endohidrolisis de enlaces 1,5- $\alpha$ -arabinofuranosídicos en 1,5- arabinanos	Hidroliza el 1,5- $\alpha$ -L-arabinan lineal. También actúa sobre el arabinano, pero más lentamente	(Thakur et al., 2020)
Acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72)	Acetilxilano esterasa	Acetilxilano esterasa	Grupos O-acetilo unidos a los extremos laterales de la cadena principal de xilano de la hemicelulosa	Provoca la desacetilación de xilanos y xiloligosacáridos. También hidroliza los enlaces de ésteres de acetilo en los xilanos de acetilo, liberando ácido acético	(Xu et al., 2021)

<p>Feruloil esterasa (EC 3.1.1.73)</p>	<p>4-Hidroxi-3-metoxicinamoil azúcar hidrolasa</p>	<p>Esterasa del ácido ferúlico, hidroxycinamoil esterasa, hemicelulasa enzimas accesorias; FAEIII, cinamoil ester hidrolasa, FAEA, cinnAE, FAE-I, FAE-II</p>	<p>El grupo Feruloil en el lado del arabinofuranosilo cadena lateral del arabinofuranosilo unido al terminal no reductor de la xilosa de la hemicelulosa</p>	<p>Hidroliza los enlaces de éster entre la cadena lateral de arabinosa residuos de la cadena lateral de la arabinosa y los ácidos (ácido ferúlico). Se denomina a veces hemicelulasa accesorias ya que ayudan a las xilanasas y pectinasas a descomponer la hemicelulosa de las células vegetales.</p>	<p>(Bran, 2021)</p>
----------------------------------------	----------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------

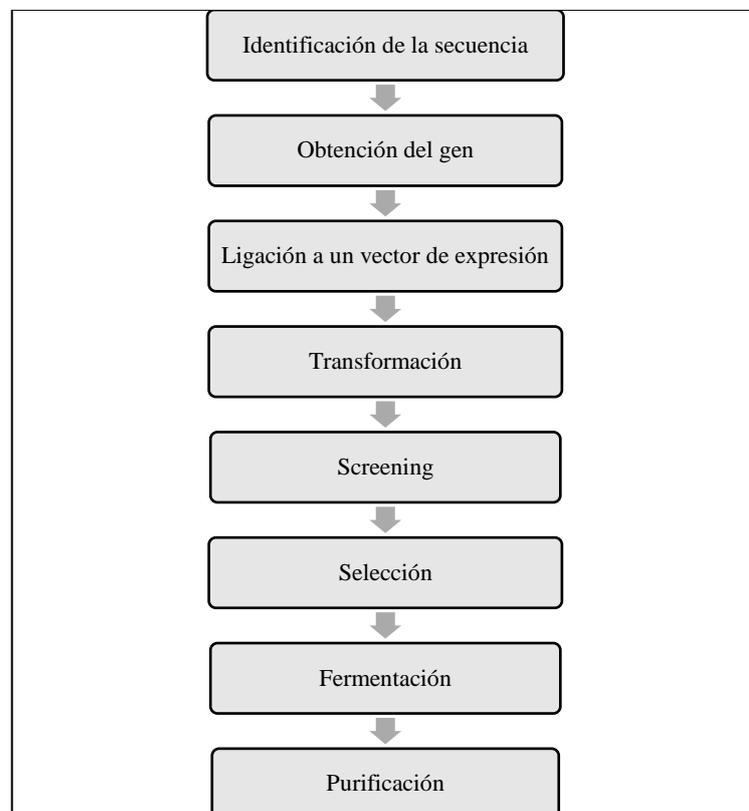
**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

**Fuente:** Adebami y Adebayo-Tayo, (2020, p.27).

### 3.2.4. Procedimiento general de producción de enzimas recombinantes bacterianas

La mejora de biocombustibles de segunda generación depende cada vez más de la expresión heteróloga de enzimas (Lambertz et al., 2014, párr.8).

Esta práctica podría ser muy valiosa para reducir el precio de fabricación de las enzimas, como también para desarrollar enzimas específicas para este fin. Metodológicamente, esta técnica implica el aislamiento del gen de interés de un organismo objetivo, la inclusión del gen aislado en un vector apropiado para formar ADN recombinante (ADNr) y la transferencia del ADNr al huésped de expresión. Además, existen varios informes en los que se han empleado estrategias recombinantes para la bioconversión eficaz de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables mediante la expresión heteróloga de la celulasa funcional, la hemicelulasa y las proteínas de actividad auxiliar (Lugani et al., 2020, p.28).



**Figura 19-3:** Procedimiento general de producción de enzimas recombinantes bacterianas

**Realizado por:** Garcés Gamboa, Diego, 2021.

#### 3.2.4.1. Identificación de la secuencia

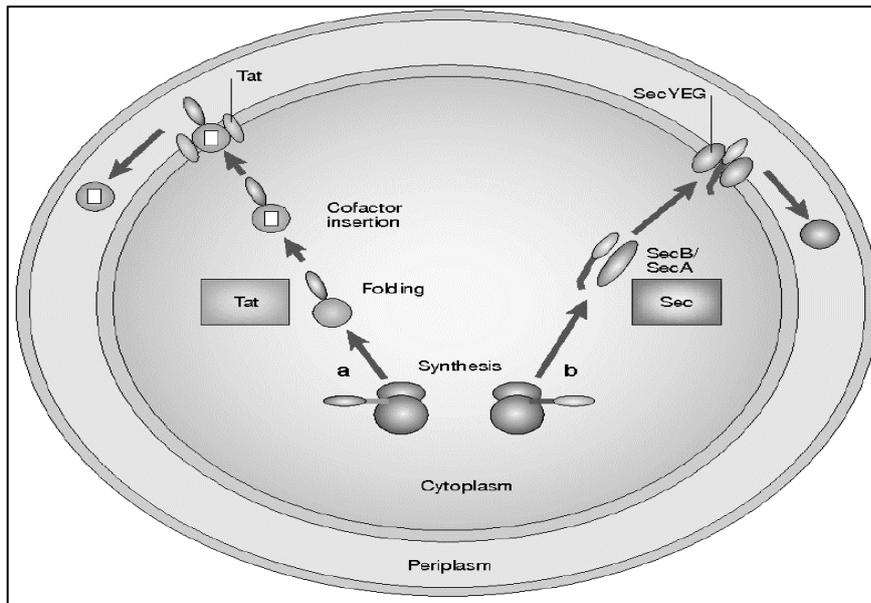
##### a. Uso de base de datos y análisis de secuencias

Las bases de datos biológicas son una colección de información sobre ciencias la vida, colectada

de ensayos científicos, publicaciones, tecnología de experimentación de alto rendimiento, y análisis computacional. Posee información de sectores de investigación como genómica, proteómica, expresión génica y filogenética. En la actualidad existen varias bases de datos biológicas sin embargo las más confiables y más utilizadas a nivel mundial son el NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) de los Estados Unidos, el UniProt específicamente para búsqueda de proteínas, el EMBL-EBI de Europa y el PDB (*Protein Data Bank*) que almacena exclusivamente estructuras tridimensionales de proteínas. Para identificar la secuencia de una enzima se tiene dos caminos, el primero es realizar una búsqueda *in silico* es decir realizar una búsqueda en la web de la secuencia de un gen de interés mediante una búsqueda simple, una búsqueda refinada, un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) o un diseño racional de proteínas. La segunda opción que es la más complicada, pero a su vez la más confiable es la parte experimental. Donde generalmente se busca un microorganismo de interés, se secuencian el genoma y con ello se analiza que tipo de enzimas podrían estar participando en cierta actividad enzimática de acuerdo al análisis de su comportamiento. Para producir una enzima recombinante el primer paso es identificar la enzima de interés, la enzima tiene que ser producida por un gen y el gen debe tener su secuencia de ADN (Jin et al., 2021, p.17).

#### **b. Análisis de péptido señal**

Antes de comenzar la etapa de expresión es de vital importancia realizar un análisis de señal de péptido. La secuencia señal (péptido señal) es una secuencia corta entre 16 a 30 aminoácidos, una extensión aminoterminal de la proteína secretora que es necesaria para una correcta orientación hacia la vía de translocación de la proteína, se encuentra al inicio de la misma. En bacterias, existen dos rutas principales para secretar proteínas a través de la membrana citoplasmática. La primera es la vía general de secreción llamada vía Sec, cataliza la translocación transmembrana de las proteínas en su conformación desplegada, tras lo cual se pliegan en su estructura nativa en el sitio transversal de la membrana. La segunda es la ruta de translocación *Twin-arginina*, denominada vía Tat, esta cataliza la translocación de las proteínas secretoras en su estado plegado. Para efectos prácticos normalmente se retira la señal de péptido porque causa problemas en la etapa de expresión (Lambertz et al., 2014, p.28).



**Figura 20-3:** Vías de exportación de proteínas en las bacterias  
**Fuente:** Lambertz et al., (2014).

### c. Clonación

La clonación de ADN es un procedimiento de biología molecular que consiste en hacer varias copias idénticas de un fragmento específico de ADN. Para clonar un fragmento de ADN se lo tiene que insertar en un vector, normalmente un plásmido que puede replicarse en una célula huésped. La inserción se realiza con enzimas de restricción y ADN ligasas, mismos que cortan y pegan ADN para obtener una molécula de ADN recombinante, ADN ensamblado de fragmentos originarios de fuentes exógenas. Posteriormente, se implanta el plásmido recombinante en bacterias. Se eligen las bacterias que contengan el plásmido y se cultivan. Al reproducirse, estas replican el plásmido y lo transfieren a su descendencia, y de esta manera hacen copias del ADN que contienen (Amid, 2015, p.12).

#### 3.2.4.2. Obtención del gen (método tradicional)

Una vez que se conoce la secuencia, se debe obtener el gen para lo cual existen varias técnicas para hacerlo entre ellas el método tradicional, el método TOPO (*kits*) y el método sintético. Para la técnica tradicional se debe tener acceso al genoma de la bacteria, extraer el ADN y realizar una PCR para poder amplificar el gen de interés. Una vez que se obtiene el gen, se lo debe ingresar en un vector. Un vector de clonación no es lo mismo que un vector de expresión, los vectores son de clonación si su propósito es el almacenamiento de secuencias y la obtención de grandes cantidades del ADN insertado o de la molécula recombinante, en contraste, los vectores de expresión son aquellos cuyo objetivo o fin es producir un transcrito ARN o la proteína producto de ese transcrito. Generalmente, un vector plasmídico contiene tres elementos principales: un sitio

de clonación en el que se puede insertarse el ADN exógeno, un gen de resistencia a fármacos que destruye antibióticos con el fin de permitir el crecimiento selectivo de la célula huésped y un origen de replicación que permite que el plásmido se replique en la célula huésped. Es muy importante que un vector de expresión tenga un promotor fuerte que promueva la transcripción del gen, una secuencia de iniciación para que el gen que es transcrito a ARN mensajero se una al ribosoma y pueda darse la producción de proteínas, un codón de inicio y uno de terminación, además de una secuencia de finalización de la transcripción. Para facilitar la purificación de la proteína objetivo es necesario que el vector de expresión posea una etiqueta de purificación generalmente una etiqueta de polihistidina que consiste en 6 histidinas en el extremo N o C terminal de una proteína. Los vectores de expresión más usados son los vectores de la serie Pet. Para insertar ADN exógeno primero se debe utilizar enzimas de restricción para cortar el vector en el sitio de clonación aquí la enzima corta la secuencia palindrómica para producir extremos monocatenarios llamados *sticky ends* que pueden hibridarse con cualquier trozo de ADN que también haya sido cortado con la misma enzima de restricción (Fadwa et al., 2015, p.17).

Una vez que se sabe que enzimas de restricción se van a utilizar se realiza el diseño del *primer*. Para diseñar un cebador, el final 3' es muy importante y muy crítico a la vez, debido a que la polimerasa es direccional y se pega al hidroxilo que queda libre en el extremo 3' de la cadena de ADN. El *primer* no debe tener más de 3 G o C al final porque puede desencadenar una auto complementariedad es decir que el cebador se una consigo mismo en la reacción. Además, no debe existir una T al final, debido a que la timina es más propensa a producir inconvenientes moviendo todo el marco de lectura. El final 5' es menos crítico, es posible añadir estructuras adicionales. Normalmente un cebador tiene entre 18 a 30 pares de bases, la temperatura de *melting* debe ser similar para el *forward* y el *reverse* además de estar alrededor de los 60 °C y mantener un contenido de GC de 40 a 60 %. Los iniciadores siempre deben estar en sentido 5' 3' al momento del diseño de los mismos. Después del diseño de los *primeros*, se necesita que el gen que se va a amplificar también se corte con las mismas enzimas de restricción que cortan el plásmido para así generar extremos cohesivos (*sticky ends*) para hacer posible su unión. Para ello es necesario adicionar en el diseño de *primer* la secuencia de corte para poder utilizar la enzima de restricción seleccionada además de añadir una secuencia de extensión debido a que para una nucleada o enzima de restricción es difícil cortar justo al final de una cadena, es decir necesita un punto de prolongación donde pueda apoyarse. Finalmente se realiza la amplificación por PCR generando el producto a utilizarse en la etapa de ligación (Oliveira et al., 2017, p.19).

#### 3.2.4.3. Ligación a un vector de expresión

La ligación de un fragmento de ADN exógeno a un vector implica la formación de enlaces fosfodiéster entre los residuos fosfato que se encuentran localizados en los extremos 5' de la

cadena de ADN y los residuos hidroxilo localizados en los extremos 3' (Amid, 2015, p.29). Dicha unión cataliza in vitro la enzima llamada ADN ligasa, creando un plásmido recombinante cada uno de estos contiene el fragmento de ADN insertado, un gen de resistencia a la ampicilina y un origen de replicación. A nivel de laboratorio, a los plásmidos generalmente se los tiene alojados en el interior de bacterias o también se los puede conseguir listos para utilizar. Si el plásmido se encuentra en la bacteria se la puede seguir replicando y va a existir siempre disponibilidad del mismo. Dicho esto, se empieza por el cultivo de las bacterias con el plásmido, después se procede a la extracción y purificación del plásmido, generalmente con la ayuda de *kits* comerciales, posterior a ello se realiza la doble digestión con las enzimas de restricción seleccionadas y finalmente la purificación del plásmido. Por otro lado, de forma paralela se debe realizar la PCR con el gen objetivo seguido por la doble digestión con las mismas enzimas de restricción y la purificación de los fragmentos. Con ambos fragmentos puros se procede a la reacción de ligación. Para ello se utiliza el vector y producto de PCR ya digeridos con las enzimas de restricción y la ligasa (Schmidt et al., 2017, p.28).

#### 3.2.4.4. Transformación

La transformación bacteriana reside en la adquisición de ADN exógeno, que le otorga un nuevo fenotipo a la célula huésped. Entre las técnicas más comunes están la transformación química y la transformación por electroporación (Amid, 2015). En la transformación química las células bacterianas y el ADN plasmídico se incuban en un medio hipotónico de  $\text{CaCl}_2$ , que da lugar a un complejo con el ADN que facilita su ingreso por endocitosis a una célula competente; adicional a ello, se aplica un pequeño choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  por 90 segundos aproximadamente que aumenta la permeabilidad de la membrana celular. Es un método práctico y proporciona una considerable eficiencia de transformación, aunque puede aumentar utilizando otros cationes divalentes, como por ejemplo el rubidio y el manganeso. La transformación por electroporación hace referencia a la aplicación de cortos pulsos eléctricos de alto voltaje ( $> 1500 \text{ V}/5 \text{ ms}$ ) a las células receptoras, con el objetivo de formar poros en la pared celular en bacterias. Los componentes de la membrana se desestabilizan, lo que da lugar a la entrada del vector al citoplasma de la célula. Esta es la técnica de transformación bacteriana más común y eficiente, es la mejor elección para plásmidos grandes de hasta 50 kb, la electroporación no es solo para bacterias, debido a que puede utilizarse en células eucariotas (Green y Sambrook, 2020, p.28).

#### 3.2.4.5. Screening y Selección

Para identificar las bacterias transformadas se usan marcadores de selección otorgados por los vectores. Los más empleados son los genes de resistencia a antibióticos, como por ejemplo la

ampicilina, la tetraciclina, el cloranfenicol y la kanamicina Posterior a la transformación, las bacterias se cultivan en cajas Petri con agar y con el antibiótico, para el cual el plásmido presenta resistencia. Si la transformación ha dado resultado las bacterias tendrán la capacidad de metabolizar el antibiótico y sobrevivirán, lo que demuestra que incorporaron el vector; cada una de las colonias representan un solo evento de transformación. Otros marcadores de selección se fundamentan en la producción de moléculas fluorescentes o bien en la generación de enzimas que, al reaccionar con un sustrato, originan coloración en la colonia de células transformadas. Se selecciona dos o tres colonias, se cultiva las células, se purifica los plásmidos, se envía a secuenciar o realizar una PCR diseñando nuevos *primeros* un poco más arriba y más abajo del gen, se analiza la secuencia que tenga todos los sitios activos, a la colonia que se elija se la pone en crio vial y se la almacena. Para expresar el gen se purifica los plásmidos y se transforma en una cepa para expresión de proteínas, generalmente se utiliza la cepa BL21 (Adibah y Majid, 2015, p.18).

#### 3.2.4.6. Fermentación e inducción

Para la etapa de fermentación es necesario conocer la curva de crecimiento bacteriano con todas sus fases como son la fase lag, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte celular (Krishnamurthi et al., 2021, p.12). El momento óptimo para inocular es cuando las células se encuentren en fase exponencial debido a que en esta etapa de la curva de crecimiento bacteriano las células se encuentran con su actividad metabólica a máxima capacidad. Al igual que la inoculación, para inducir la expresión de proteínas es fundamental que se lo realice en la etapa exponencial con el fin de aprovechar la capacidad metabólica de las células en ese período. El inóculo debe ser el 10% del volumen final que se quiere producir. Se debe medir la densidad óptica del inóculo hasta que llegue a 0.6 medido a 600 nm lo que indica que las bacterias se encuentran en fase exponencial. Generalmente la inducción en vectores de serie pET se realiza con IPTG que es una molécula que imita a la lactosa para que salga la represión e inicie la producción de la proteína. Uno de los problemas que se da con frecuencia en producción de *E.coli* es que se pueden generar cuerpos de inclusión, la solución a ello es bajar la temperatura antes de añadir el IPTG para disminuir la velocidad con la que están creciendo la bacteria (Fadwa et al., 2015, p.18).

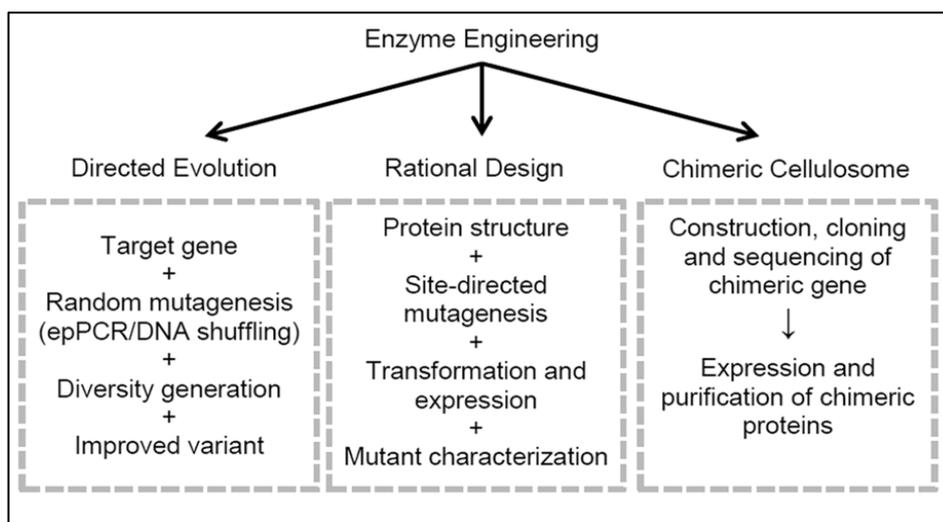
#### 3.2.4.7. Separación y purificación

El proceso de extracción depende básicamente de si la proteína es extracelular o intracelular. A diferencia de las levaduras, en *E.coli* generalmente la proteína se encuentra en el interior de la célula por lo cual se necesitan procedimientos de disrupción celular para poder acceder a la proteína que se ha producido (Amid, 2015, p.27). En esta etapa es fundamental mantener una cadena

de frío debido que al proceder con la disrupción celular se pueden desprender diferentes componentes como por ejemplo proteasas que pueden poner en riesgo a la proteína objetivo; la mejor manera de conservarla es manteniendo la cadena de frío, esto disminuye la velocidad de reacción y mantiene a la proteína estable. Se procede a la centrifugación a 6000 o 7000 rpm de 15 a 25 minutos, después de obtener las células se lava en buffer o agua destilada, se re suspende el *pellet* y se procede a la disrupción celular por medio de ultrasonificación o por homogenización por alta presión. En esta etapa es recomendable no utilizar métodos químicos de tipo ácido o alcalino debido a la labilidad de las enzimas, estos métodos podrían echar a perder la proteína objetivo. Una vez que las células se rompen se puede añadir inhibidores de proteasas para evitar que las proteínas se desnaturalicen. Finalmente se realiza una purificación de proteínas por IMAC aprovechando las colas de histidina de la proteína generada. Las histidinas son muy afines del níquel y el método IMAC utiliza la afinidad que tiene el níquel con las histidinas para purificar la proteína y obtener el producto final. Para analizar la presencia de la proteína, se puede verificar la actividad de la enzima en el sustrato o a su vez si se desea observar la proteína y saber si es la que se quiso expresar se debe aplicar la técnica de SDS PAGE que es una técnica similar a la electroforesis exclusiva para proteínas (Yusof, 2015, p.29).

### ***3.2.5. Estrategias actuales para el mejoramiento y descubrimiento de nuevas enzimas***

El precio de las enzimas lignocelulolíticas es uno de los principales factores limitantes de las biorrefinerías, por lo que se están efectuando incesantes esfuerzos tanto para minimizar el precio de las enzimas como para incrementar el rendimiento global de las enzimas con la productividad que se desea. Con el fin de que la producción de bioetanol de segunda generación sea económicamente viable, actualmente se están utilizando varios enfoques como la mutagénesis aleatoria, la mutagénesis dirigida al sitio, la expresión heteróloga de proteínas, el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR-Cas) y la ingeniería genómica y metabólica con el fin de mejorar la expresión enzimática de las diferentes cepas microbianas (Lugani et al., 2020, p.12).



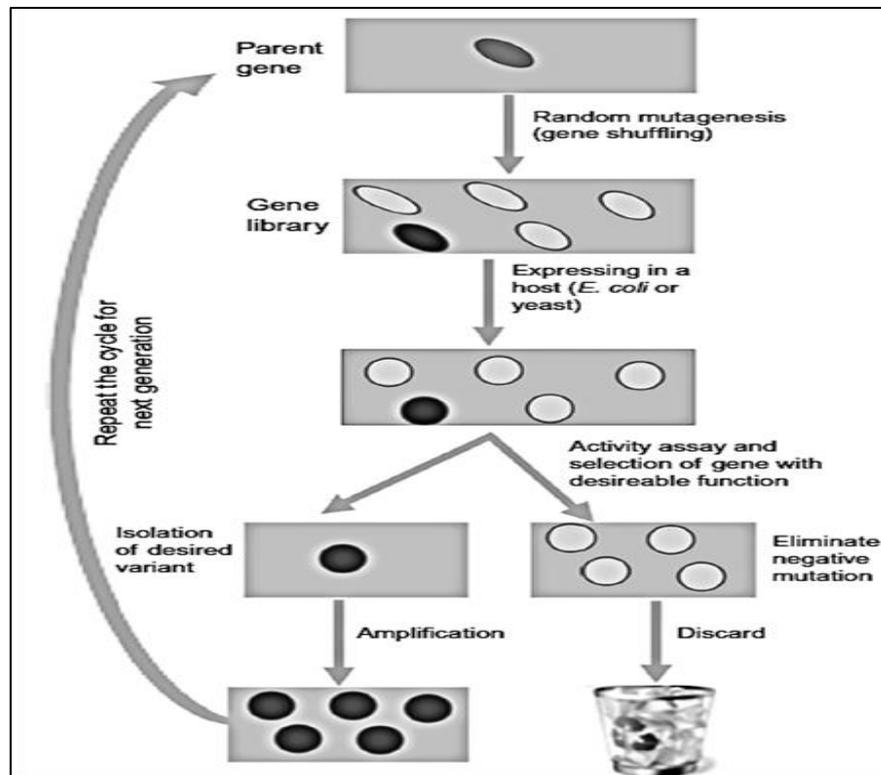
**Figura 21-3:** Rutas para el avance de la tecnología de las enzimas celulasa  
**Fuente:** Cuesta, (2016, p.14).

### 3.2.5.1. Mutagénesis y evolución dirigida

La mutagénesis aleatoria in vitro, conjuntamente con la selección genética o el cribado de alto rendimiento, es un método para desarrollar enzimas con nuevas características. Existen diferentes técnicas utilizadas para la mutagénesis aleatoria, entre ellas la PCR propensa a errores, las cepas mutantes bacterianas y la amplificación en círculo rodante (RCA). La amplificación en círculo rodante es una técnica isotérmica que amplifica el ADN circular a través de un mecanismo de círculo rodante, produciendo ADN lineal compuesto por repeticiones en tándem de la secuencia de ADN circular. Esta técnica tiene varios beneficios respecto a las técnicas convencionales de amplificación de ADN, entre ellas la facilidad para amplificar el ADN circular y la oportunidad de transformar directamente el producto del RCA en células huésped. La mutagénesis con amplificación de círculo rodante y la mutagénesis dirigida al sitio son técnicas poderosas para el desarrollo de nuevas enzimas, y se ha desarrollado un método de RCA perfeccionado y más conveniente, el RCA propenso a errores. Esta técnica consiste en un solo paso de RCA seguido de la transformación directa de la cepa huésped, y origina mutantes con una frecuencia de mutación apropiada para los experimentos de evolución in vitro (Vu y Kim, 2012, p.20).

La mejora de la actividad de la endoglucanasa se puede lograr mediante la amplificación en círculo rodante con riesgo de error, complementada con 1,7 mM de MnCl<sub>2</sub>. Esto provocó mutaciones aleatorias en el gen de la endoglucanasa de *Bacillus amyloliquefaciens* teniendo una frecuencia de 10 mutaciones por kilobase. Los seis genes de endoglucanasa mutados y recuperados de seis colonias, tenían una actividad de endoglucanasa entre 2,50 y 3,12 veces mayor a la del tipo salvaje. Se secuenciaron estos mutantes y se identificaron los sitios de nucleótidos mutados. Las secuencias mutadas de la endoglucanasa poseían cinco aminoácidos mutados P26Q, G27A E289V, A15T, P24A. De estas cinco sustituciones, se estableció que la E289V era la

responsable de la mejora en la actividad enzimática. Este análisis se confirmó con la mutagénesis dirigida al sitio; la introducción de una única mutación (E289V) en el gen de la endoglucanasa de tipo salvaje generó un incremento de 7,93 veces (5,55 U/mg de proteína) en su actividad enzimática en contraste con la del tipo silvestre (0,7 U/mg de proteína) (Vu y Kim, 2012, párr.19).



**Figura 22-3:** Visión general de evolución dirigida para mejora de las cepas  
Fuente: Adebami y Adebayo-Tayo, (2020).

Hasta la fecha sólo se ha informado de que unas pocas células modificadas por mutagénesis dirigida al sitio poseen una actividad significativamente mayor en sustratos insolubles. Un ejemplo significativo fue el uso de una EG Cel5A modificada de *Acidothermus cellulolyticus* para informar de una mejora del 20% en su actividad contra la celulosa microcristalina al disminuir la inhibición del producto. En algunos casos, las enzimas mutantes con mayor actividad no aumentan la actividad de una mezcla sinérgica que contiene varias células (Cuesta, 2016, p.24).

### 3.2.5.2. Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos es otra técnica en la cual los protoplastos aislados de dos células somáticas genotípicamente versátiles se fusionan en células protoplásticas híbridas las mismas que contienen modificaciones genéticas. La presente técnica es comparativamente barata y sencilla, y posee un gran potencial para desarrollar cepas de hipercelulasa industrialmente competentes sin causar numerosas alteraciones en su fisiología. Este método funciona a través del

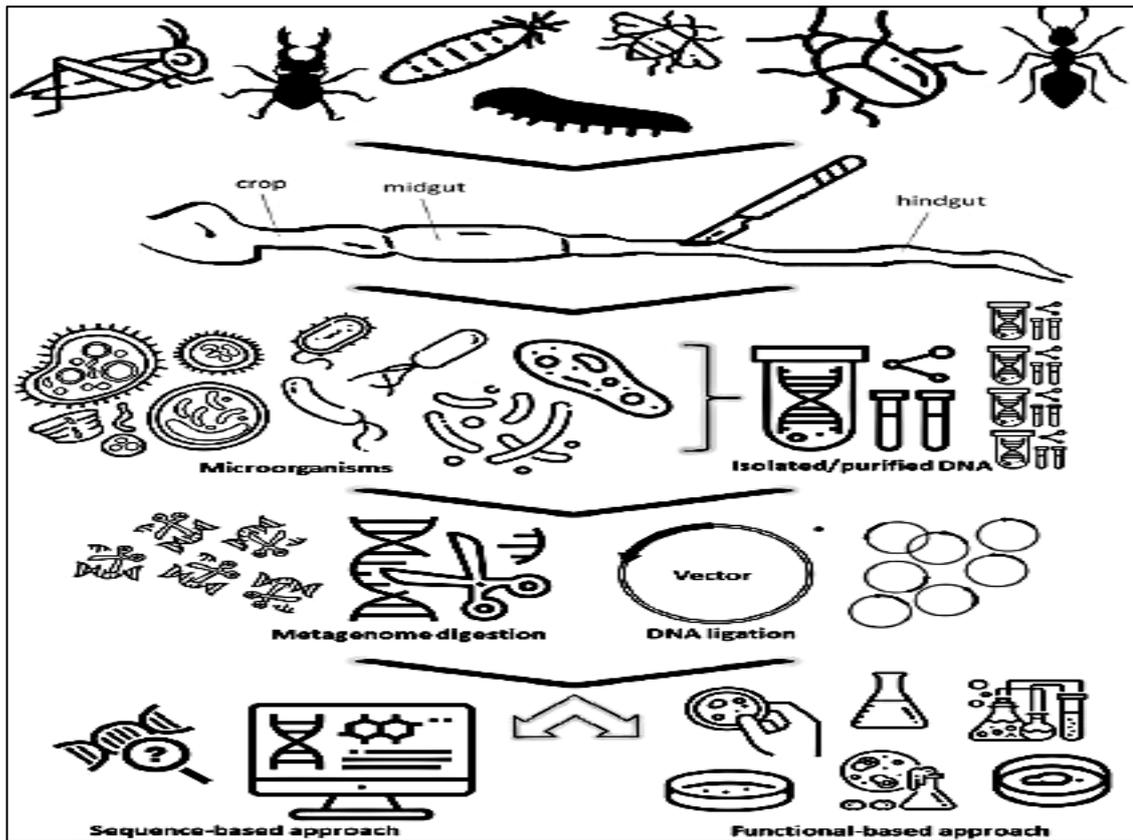
aislamiento de protoplastos mediante de la digestión de la pared celular utilizando carbohidrasas (quitinasa, glucanasa, lisozimas); la fusión de protoplastos aislados (a nivel interespecífico, intraespecífico e intergenérico) utilizando el electro fusión o sustancias químicas como el polietilenglicol (PEG), los iones de calcio y el nitrato de sodio; la reconstitución de protoplastos transformados y el cribado de los transformantes reconstituidos. La fusión de protoplastos se ha usado para incrementar la producción de celulasas en *T. reesei*. Asimismo, (Lugani et al., 2020, p.17), menciona que la técnica de transformación de protoplastos provee otra muy buena plataforma para aumentar los rendimientos de celulasas y hemicelulasas mediante la interferencia de ARN (ARNi) de la expresión del gen *cre1/creA*. En este estudio se investigó el rol del gen *cre1* en *M. thermophila* ATCC42464, donde el silenciamiento del gen *cre1* mediante la interferencia de ARN dio paso a que la cepa C88 mostrara un incremento de hasta 5,59 veces en las actividades de celulasa en comparación con la cepa madre.

Además se reporta que se utilizó esta técnica para mejorar la producción de celulasa mediante fusiones repetidas de protoplastos, y las fusantes GS2-15, GS2 21 y GS2-22 obtenidas mostraron un aumento del 100, 109 y 94% en la actividad de la celulasa de filtro en comparación con su cepa madre (Wang et al., 2012, p.18).

### 3.2.5.3. Biodescubrimiento

Los insectos herbívoros cumplen un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos gracias a su enorme capacidad de degradación de la biomasa vegetal. A lo largo de la evolución, varios insectos herbívoros han desarrollado la capacidad de fabricar enzimas endógenas capaces de hidrolizar la biomasa vegetal. La evolución de las enzimas endógenas de los insectos puede ser un resultado de la transferencia horizontal de genes o inclusive de procesos coevolutivos entre estos invertebrados y sus microorganismos simbióticos (Alves et al., 2019, p.29)., mencionan que partiendo de una biblioteca de ADNc de protistas del intestino de las termitas, se clonaron 11 celulasas con un rendimiento equivalente o hasta 2,6 veces superior que la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (acceso al Genbank en M15665), una enzima referente en la hidrólisis de la celulosa.

A pesar de este tipo de estudios que demuestran el enorme potencial de estas enzimas en la elaboración industrial de bioetanol, la bioprospección de enzimas de interés biotecnológico a partir de los microbiomas de los insectos se ha visto mejorada en los últimos diez años debido a la aplicación de herramientas metagenómicas. Al posibilitar el acceso al material genético inclusive de microorganismos no cultivados, la metagenómica permite la selección de un número de especies microbianas hasta 100 veces mayor (Alves et al., 2019, p.19).



**Figura 23-3:** Bioprospección de enzimas mediante metagenomas de microflora intestinal (insectos)

Fuente: Alves et al., (2019, p.12).

#### 3.2.5.4. Diseño racional

Este método incluye la mutagénesis dirigida al sitio para buscar sustituciones de aminoácidos, por lo que es necesario conocer información detallada acerca de la estructura tridimensional y el mecanismo químico de la reacción enzimática, algunos de los cuales pueden no estar disponibles. No obstante, el constante crecimiento de las bases de datos que contienen estructuras y secuencias de proteínas está ayudando a superar esta falta de información. La comparación de la secuencia de un nuevo biocatalizador reconocido en un programa de cribado con los miles almacenados en las bases de datos puede identificar proteínas que se relacionen cuyas funciones y estructuras ya se conocen. Debido a que las nuevas enzimas han evolucionado en la naturaleza por una modificación relativamente menor de las estructuras del sitio activo, los objetivos de los experimentos basados en la homología incluyen la ingeniería de los sitios de unión para adaptarse a diferentes tipos de sustratos, como también la construcción de nuevos residuos catalíticos para modificar los mecanismos y las funciones. Se produce un pequeño número de variantes que luego son examinadas. Aunque en varios casos los resultados son pobres en comparación con enzimas naturales, han existido éxitos (Adrio y Demain, 2014, p.31).

Por ejemplo recientemente, se ha mejorado la termo estabilidad de las  $\beta$ Gs de *Trichoderma reesei*

mediante un diseño racional, en este estudio se mutaron los aminoácidos del canal exterior del sitio activo, tres mutantes (L167W, P172L y P172L/F250A) mostraron valores de T<sub>m</sub> de 54,9, 54,0 y 56,98 °C, respectivamente, superiores a los 50,28°C del tipo salvaje (Lee et al., 2012, p.28).

#### 3.2.5.5. CRISPR-Cas9

*Penicillium subrubescens* es un hongo ascomiceto que posee un rico contenido de familias de enzimas especializadas activas en carbohidratos que contribuyen en la degradación de la biomasa lignocelulósica, lo que transforma a esta cepa en una competente fábrica celular industrial para la elaboración de enzimas. La mejora de herramientas que posibiliten la manipulación genética es decisiva para el perfeccionamiento de la cepa y la caracterización funcional de sus genes. En este sentido, el método CRISPR/Cas9 representa una magnífica opción para la edición del genoma gracias a su elevada eficiencia y versatilidad. Para fundar la edición del genoma CRISPR/Cas9 en *P. subrubescens*, (Salazar-Cerezo et al., 2020, p.25) menciona que primero se desarrolló un procedimiento para la generación y transformación de protoplastos, empleando higromicina como marcador de selección. Luego, se implantó el sistema CRISPR/Cas9 en *P. subrubescens* suprimiendo exitosamente el gen *ku70*, que está involucrado en el mecanismo de reparación de extremos no homólogos del ADN, con el propósito de generar cepas de *P. subrubescens* deficientes de este mecanismo con una frecuencia de recombinación homóloga mejorada que podría emplearse como cepa parental para posteriores alteraciones genéticas con una recombinación eficaz de sitios concretos. La caracterización fenotípica de los mutantes expuso que la mutación *ku70* no incidía en el crecimiento de *P. subrubescens* a la temperatura óptima y las cepas *ku70* revelaban un patrón de producción de proteínas equivalente al del tipo salvaje. Estos métodos pueden aplicarse a la producción de bioetanol para modificar la especificidad de las celulasas. Por ejemplo, una modificación en uno o más aminoácidos de las celulasas aumentó la tolerancia al calor en microorganismos como *C. cellulovorans* (E116D y V192A), *Bacillus sp.* cepa KSM-64 (N179K y D194K), *Humicola insolens* (C313S), *C. phytofermentans* (N144I, N291K, E158V y V245G), *C. thermocellum* (S329G) y *Melanocarpus albomyces* (S290T, G4C/M70C/S290T) (Javed et al., 2019, p.18).

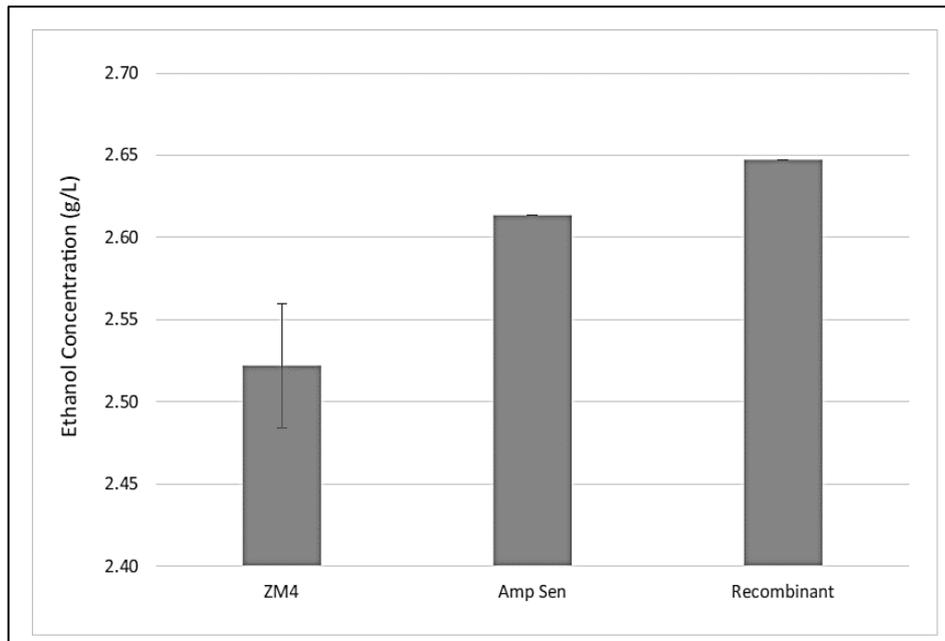
#### 3.2.6. Aplicación de enzimas modificadas en Biorefinería

Aunque la elaboración de productos químicos a gran escala y de biocombustibles basada en la deconstrucción enzimática de la biomasa lignocelulósica se ha estudiado fuertemente en las dos últimas décadas, pocos estudios han analizado explícitamente el costo de producción de las enzimas implicadas. Prácticamente, no se ha llevado a cabo ningún análisis tecno económico de una enzima de este tipo, principalmente si se produce in situ. De hecho, hay sorprendentemente

escasos análisis tecno-económicos de los procesos microbianos utilizados para producir proteínas de valor añadido bajo o intermedio que no sean celulasas fúngicas. Al mismo tiempo, teniendo en cuenta que cerca del 90% de todas las enzimas industriales son originadas por organismos recombinantes, hay muy pocos análisis de la producción de proteínas por microorganismos recombinantes, especialmente en el caso de las enzimas de alto volumen y bajo valor (Ferreira et al., 2018, p.28).

Sin embargo, se encontró una evaluación económica donde se simuló la producción en *E.coli* de una proteína recombinante,  $\beta$ -glucosidasa (BGL), para ser utilizada como enzima suplementaria en la hidrólisis de lignocelulosa; en el escenario base, se estimó una tasa de producción anual de enzimas de 88 t de enzimas/año, considerando una planta promedio de caña de azúcar en Brasil que procesa 2 millones de t de caña/año, misma que sería suficiente para ser utilizada en la hidrólisis de aproximadamente 39% de todo el bagazo de caña producido anualmente. En el escenario propuesto aquí, una producción in situ de  $\beta$ -glucosidasa para complementar las celulasas fúngicas, un BGL tan costoso aumentaría el coste final del cóctel fúngico en un 137%. Este aumento de coste no sería justificable a la vista del efecto observado de la suplementación con BGL en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. El coste de producción unitario global obtenido para el escenario de la línea base fue de aproximadamente 316 US\$/kg de enzima. Este valor es aproximadamente 32 veces superior al coste estimado de la mezcla de enzimas fúngicas (10 US\$/kg de proteína). Este aumento de coste no sería justificable a la vista del efecto observado de la suplementación con BGL en el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, los resultados también indican que el coste final de la enzima podría reducirse en muchos frentes, por ejemplo, sustituyendo la fuente de carbono por alternativas más baratas, cambiando la estrategia de inducción o mejorando el proceso de inoculación y la productividad volumétrica. La combinación del escenario optimizado conduciría en última instancia a un coste final de 37 US\$/kg de proteína (Ferreira et al., 2018, p.31).

Desde el punto de vista de productividad o eficiencia en la obtención de etanol, *Z. mobilis* es un microorganismo prometedor para la producción a gran escala de bioetanol a partir de sustratos ricos en azúcares o de materiales lignocelulósicos; se reporta que una *Z. mobilis* recombinante fue capaz de producir más etanol que las cepas de tipo salvaje cuando se utilizó paja de arroz pretratada como fuente de carbono en condiciones anaeróbicas, *Z. mobilis* ZM4 posee un gen (zmo1086, celA) que codifica para una endo-glucanasa, también tiene la capacidad de hidrolizar el material celulósico tratado en glucosa. Por lo tanto, complementar el gen de la xilanasa para hidrolizar sinérgicamente las hemicelulosas del material lignocelulósico hará de *Z. mobilis* un microorganismo CBP más práctico, ya que sería capaz de hidrolizar aún más las hemicelulosas en azúcares C5, el objetivo de esta investigación fue construir la co-expresión de la endo-glucanasa CelA y la endo-xilanasa Xyn11 de *Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821) dando como resultado un mayor rendimiento de etanol en la cepa recombinante (Todhanakasem et al., 2019, p.27).



**Gráfico 5-3:** Producción de etanol (g/L) después de 3 días de fermentación

Fuente: Todhanakasem et al., (2019, p.13).

El celulosoma de diseño también es una herramienta eficaz utilizada en la biorrefinería. Para ilustrar, se reporta que se desarrolló un minicelulosoma en la superficie de una levadura que podía fermentar PASC (celulosa amorfa regenerada), y la levadura recombinante obtuvo un rendimiento de 1,8 g/L de bioetanol. Además, se conoce que la *T. saccharolyticum* recombinante, pudo hidrolizar y fermentar 10 g/L de celulosa cristalina para producir 8,2 g/L de etanol. A pesar de algunas investigaciones sobre la aplicación del celulosoma a la biorrefinería, la producción de biocombustible a gran escala no ha sido posible, el coste de producción sigue siendo elevado, lo que dificulta la aplicación de esta tecnología en la industria en la actualidad (Hu y Zhu, 2019, p.26).

## CONCLUSIONES

Se expuso el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica con sus distintas etapas, demostrando que este procedimiento es beneficioso desde el ámbito industrial, debido a que los residuos agrícolas y forestales poseen prácticamente un valor nulo tanto para la industria como para la alimentación, lo que ayuda a reducir el valor de la materia prima en el precio total de producción, además de ser un recurso alentador para resolver la crisis energética y ambiental. Se identificaron algunas de las enzimas más utilizadas en la actualidad en el proceso de producción de etanol de segunda generación, especialmente en la sacarificación de la lignocelulosa, mostrando una gran variedad y diferentes sitios de acción debido a la compleja estructura formada por los polisacáridos y la lignina, que impide que los polisacáridos sean atacados con facilidad.

Se revisaron los fundamentos de producción de enzimas recombinantes bacterianas y estrategias innovadoras para el mejoramiento y descubrimiento de nuevas enzimas a través de avances en genómica y metagenómica, aunque se han generado varios progresos en la producción comercial, se ha reducido el costo de las enzimas y se mejorado la eficiencia del proceso, siguen existiendo varios desafíos que aún no se han topado creando varias oportunidades de investigación en este campo, empezando por la exploración de nuevas Fuentes de enzimas, la mejora del proceso, la disminución de costes, la elaboración de cócteles adecuados para la biomasa y la formulación final.

A pesar de los avances científicos y los esfuerzos por buscar nuevas rutas en la producción de bioetanol de segunda generación, el aumento del coste de la producción de enzimas modificadas no sería justificado lo que dificulta la aplicación de estas nuevas tecnologías en la industria a gran escala en la actualidad.

## RECOMENDACIONES

Con el fin de obtener una búsqueda más rápida y precisa a través de bases de datos, se recomienda utilizar operadores booleanos y palabras clave que reflejen el contenido de la búsqueda, además, verificar la calidad de los artículos científicos a través de la página de *Scimago Journal & Country Rank*, tener una idea previa general del contenido de la revisión para generar una búsqueda más eficiente y almacenar la información lo más organizada posible para poder encontrarla a medida que la necesitemos.

Se recomienda seguir investigando para descubrir comunidades microbianas desconocidas que resulten atractivas para la descomposición de la lignina y el potencial celulolítico. Ya descubiertas, los adelantos tecnológicos pueden ayudar a reproducir los entornos ideales para que puedan cultivarse en el laboratorio, estudiarse más detalladamente y emplearse para lograr avances en biotecnología, a medida que se recolecten nuevos conocimientos sobre las enzimas lignocelulolíticas, se descubrirán nuevos mecanismos de aplicación. Además, existen otras oportunidades de investigación en este campo como la mejora del proceso, la disminución de costes, la elaboración de cócteles adecuados para la biomasa y la formulación final. La utilización de enzimas para la sacarificación completa de la biomasa sin ninguna clase de pretratamiento será una realidad en un futuro cercano.

Es necesario emular los esfuerzos de países como Estados Unidos, China y Brasil que, en la actualidad, sus gobiernos, universidades, instituciones y empresas han iniciado y conseguido buscar protocolos factibles y económicos en la hidrólisis enzimática de las lignocelulosas. Se tiene el optimismo en cuanto a que pronto en Ecuador se logrará la producción a escala industrial de bioetanol de segunda generación a un costo moderadamente bajo, lo que se espera que conduzca a un mañana sostenible y mejor.

## BIBLIOGRAFÍA

**ADEBAMI, Gboyega E. & ADEBAYO-TAYO, Bukola C.**, Development of cellulolytic strain by genetic engineering approach for enhanced cellulase production [en línea]. S.l.: Elsevier Inc., 2020. ISBN 9780128179536. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817953-6.00008-7>.

**ADIBAH, Fadzilah. & MAJID, Abdul.** "Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization". *Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization*, 2015, pp. 115-127., DOI 10.1007/978-3-319-12397-4.

**ADITIYA, H.B. et al.** "Second generation bioethanol production: A critical review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [en línea], 2016, vol. 66, pp. 631-653., ISSN 18790690. DOI 10.1016/j.rser.2016.07.015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>.

**ADOLF, Josep. et al.** "El artículo de revisión". , 2008, pp. 1-25.,

**ADRIO, Jose L. & DEMAINE, Arnold L.** "Microbial enzymes: tools for biotechnological processes". *Biomolecules*, 2014, vol. 4, no 1, pp. 117-139., ISSN 2218273X. DOI 10.3390/biom4010117.

**ALEJOS, C. & CALVO, E.** "Biocombustibles de primera generación". *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 2016, vol. 18, no 2, pp. 19-30., ISSN 1609-7599.

**ÁLVAREZ, Consolación. et al.** "Enzymatic hydrolysis of biomass from wood". *Microbial Biotechnology*, 2016, vol. 9, no 2, pp. 149-156., ISSN 17517915. DOI 10.1111/1751-7915.12346.

**ALVAREZ, Ignacio.** "HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA-Fundamentos del Diseño de Biorreactores". , 2021, no June, DOI 10.13140/RG.2.2.31000.72968.

**ALVES, Sérgio L. et al.** "Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production". *Industrial Biotechnology*, 2019, vol. 15, no 6, pp. 336-349., ISSN 15509087. DOI 10.1089/ind.2019.0019.

**AMID, Azura.**, Recombinant Enzymes-From Basic Science to Commercialization. S.l.: s.n. 2015. ISBN 9783319123967.

**ANINDYAWATI, T. et al.** "The enzymatic process of lignocellulosic biomass for second generation bioethanol production, the benefits and challenges: A review". *International Journal of Agricultural Technology*, 2020, vol. 16, no 3, pp. 529-544., ISSN 26300192.

**ARROLLO, Alonso.** "Fuentes de información bibliográfica ( XIV ). Sobre « fuentes », « pirámides » y « revoluciones » en la gestión del conocimiento en pediatría". , 2012, no July,

**BAJAJ, Priyanka. & MAHAJAN, Ritu.** "Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology". *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línea], 2019, vol. 103, no 21-22, pp. 8711-8724., ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-019-10146-0. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>.

**BANDOLA, Edson Mauricio Limón Bandola.** "Õ Universidad Õ Veracruzana Õ". [en línea], 2011, pp. 1-60., Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46427/QuirozCortesMCCarmen.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.

**BAO, Lei. et al.** "Cloning and characterization of two  $\beta$ -glucosidase/xylosidase enzymes from yak rumen metagenome". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, vol. 166, no 1, pp. 72-86., ISSN 02732289. DOI 10.1007/s12010-011-9405-x.

**BARBOSA, Fernando Cesar.SILVELLO, Maria Augusta.et al.** "Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production". *Biotechnology Letters* [en línea], 2020, vol. 42, no 6, pp. 875-884., ISSN 15736776. DOI 10.1007/s10529-020-02875-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02875-4>.

**BARBOSA, Fernando Cesar.KENDRICK, Emanuele.et al.** "Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes". *Biomass and Bioenergy*, 2020, vol. 141, no February, ISSN 18732909. DOI 10.1016/j.biombioe.2020.105697.

**BINOD, Parameswaran. et al.** "Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives". *Bioresource Technology Reports* [en línea], 2019, vol. 5, pp. 317-325., ISSN 2589014X. DOI 10.1016/j.biteb.2018.06.005. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.005>.

**BOLIVAR-TELLERIA, Maria. et al.** "Second-Generation Bioethanol from Coconut Husk".

*BioMed Research International*, 2018, vol. 2018, ISSN 23146141. DOI 10.1155/2018/4916497.

**BOONTANOM, Parima. & CHANTARASIRI, Aiya.** "Diversity and cellulolytic activity of culturable bacteria isolated from the gut of higher termites (*Odontotermes* sp.) in eastern thailand". *Biodiversitas*, 2021, vol. 22, no 8, pp. 3349-3357., ISSN 20854722. DOI 10.13057/biodiv/d220831.

**BRAN, De-starched Wheat.** "SK52 . 001 and Its Application in Ferulic Acid Production from". , 2021,

**CAI, Lixi. et al.** "A novel all-in-one strategy for purification and immobilization of  $\beta$ -1,3-xylanase directly from cell lysate as active and recyclable nanobiocatalyst". *Microbial Cell Factories* [en línea], 2021, vol. 20, no 1, pp. 1-11., ISSN 14752859. DOI 10.1186/s12934-021-01530-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01530-5>.

**CALDERÓN, Christian D.** "Producción de enzimas lignolíticas y biodegradación de herbicida diuron por hongos de la pudrición blanca.". , 2016, pp. 1-23.,

**CANNELLA, David. et al.** "Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content". *Biotechnology for Biofuels*, 2012, vol. 5, pp. 1-10., ISSN 17546834. DOI 10.1186/1754-6834-5-26.

**CANTO, Pablo.,** Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery. S.l.: s.n. 2020. ISBN 9783030513573.

**CASANOVA, Laura Benítez.** "Caracterización de las principales enzimas celulolíticas de *Myceliophthora thermophila* implicadas en la degradación de biomasa lignocelulósica y mejora de la hidrólisis de hemicelulosa para la producción de bioetanol de segunda generación". , 2017, pp. 171.,

**CASAS, Leticia. & BARRERA, Iliana.** "Revalorización de residuo de malta de cerveza para producir celulasas con hongos aislados en playas del estado de Jalisco". , 2020, vol. 5, no 2, pp. 556-564.,

**CASTRO, Claudia.** "Ra Ximhai". , 2012, vol. 8, pp. 93-100.,

**CHADHA, Bhupinder Singh. et al.** " $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from an efficient hemicellulolytic

fungus *Penicillium janthinellum* capable of hydrolyzing wheat and rye arabinoxylan to arabinose". *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2017, vol. 6, no 5, pp. 1132-1139., ISSN 13385178. DOI 10.15414/jmbfs.2017.6.5.1132-1139.

**CHANG, Jui Jen. et al.** "Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production". *Biotechnology for Biofuels*, 2013, vol. 6, no 1, pp. 1-13., ISSN 17546834. DOI 10.1186/1754-6834-6-19.

**CHUKWUMA, Ogechukwu Bose. et al.** "Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: A review". *Sustainability (Switzerland)*, 2020, vol. 12, no 18, pp. 1-31., ISSN 20711050. DOI 10.3390/su12187282.

**CINTRA, Lorena Cardoso. et al.** "The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse". *Enzyme and Microbial Technology* [en línea], 2020, vol. 133, no October 2019, pp. 109447., ISSN 18790909. DOI 10.1016/j.enzmictec.2019.109447. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109447>.

**CRIPWELL, Rosemary. et al.** "Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast". *Applied Energy* [en línea], 2015, vol. 160, pp. 610-617., ISSN 03062619. DOI 10.1016/j.apenergy.2015.09.062. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.09.062>.

**CUERVO, Laura. et al.** "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol". *Bio Tecnología* [en línea], 2015, vol. 13, no 3, pp. 11-25., Disponible en: [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2009\\_3/Lignocelulosa.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf).

**CUESTA, Ines.** "ScholarWorks at University of Montana A Review of natural and engineered enzymes involved in bioethanol production Let us know how access to this document benefits you .". , 2016,

**DAS, Saprativ P. et al.** "Lignocellulosic fermentation of wild grass employing recombinant hydrolytic enzymes and fermentative microbes with effective bioethanol recovery". *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013, ISSN 23146133. DOI 10.1155/2013/386063.

**DAVISON, S.A. et al.** "Exploiting strain diversity and rational engineering strategies to enhance recombinant cellulase secretion by *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied Microbiology and*

*Biotechnology*, 2020, vol. 104, no 12, pp. 5163-5184., ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-020-10602-2.

**DE LUCAS, Rosymar Coutinho. et al.** "Effect of enzymatic pretreatment of sugarcane bagasse with recombinant hemicellulases and esterase prior to the application of the cellobiohydrolase CBH I Megazyme®". *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020, ISSN 21906823. DOI 10.1007/s13399-020-00719-9.

**DEVARAPALLI, Mamatha. & ATIYEH, Hasan K.** "A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation". *Biofuel Research Journal*, 2015, vol. 2, no 3, pp. 268-280., ISSN 22928782. DOI 10.18331/BRJ2015.2.3.5.

**DHIMAN, Saurabh Sudha. et al.** "Improved bioethanol production from corn stover: Role of enzymes, inducers and simultaneous product recovery". *Applied Energy* [en línea], 2017, vol. 208, no August, pp. 1420-1429., ISSN 03062619. DOI 10.1016/j.apenergy.2017.09.013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.09.013>.

**DI DONATO, Paola. et al.** "The production of second generation bioethanol: The biotechnology potential of thermophilic bacteria". *Journal of Cleaner Production* [en línea], 2019, vol. 233, pp. 1410-1417., ISSN 09596526. DOI 10.1016/j.jclepro.2019.06.152. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.152>.

**ELLEUCHE, Skander.** "Bringing functions together with fusion enzymes—from nature's inventions to biotechnological applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, vol. 99, no 4, pp. 1545-1556., ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-014-6315-1.

**FADWA, Farah. et al.** "Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization". *Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization*, 2015, DOI 10.1007/978-3-319-12397-4.

**FEIJO, Kevin. et al.** "Fungal mycelium-bioproducts development: A new material culture and its impact on the transition to a sustainable economy". *Revista Bionatura*, 2021, vol. 6, no 1, pp. 1637-1652., ISSN 13909355. DOI 10.21931/RB/2021.06.01.29.

**FERREIRA, Rafael Da Gama. et al.** "Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: The case of recombinant  $\beta$ -glucosidase". *Biotechnology for Biofuels* [en línea], 2018, vol. 11, no 1, pp. 1-13., ISSN 17546834. DOI 10.1186/s13068-018-

1077-0. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1077-0>.

**GHATI, Amit. et al.** "Production and Characterization of an Alkalothermostable, Organic Solvent Tolerant and Surfactant Tolerant Esterase Produced By a Thermophilic Bacterium *Geobacillus* Sp. Agp-04, Isolated From Bakreshwar Hot Spring, India". *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2018, vol. 8, no 2, pp. 155-162., ISSN 1338-5178.

**GHIO, Silvina. et al.** "Paenibacillus sp. A59 GH10 and GH11 Extracellular Endoxylanases: Application in Biomass Bioconversion". *Bioenergy Research*, 2018, vol. 11, no 1, pp. 174-190., ISSN 19391242. DOI 10.1007/s12155-017-9887-7.

**GREEN, Michael R. & SAMBROOK, Joseph.** "Transformation of *Escherichia coli* by Electroporation". *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020, vol. 2020, no 6, pp. 232-238., ISSN 15596095. DOI 10.1101/pdb.prot101220.

**GUAN, Yunpeng.** "Significant Improvement of Straw Lignocellulose Degradation Rate by Subordination Consortium Composed of *Cellulomonas* ZJW-6 and *Acinetobacter* DA-25". , 2021, pp. 1-18.,

**GUTIÉRREZ, Ivonne. et al.** "Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: Classical cases and new models". *Revista Iberoamericana de Micología* [en línea], 2015, vol. 32, no 1, pp. 1-12., ISSN 21739188. DOI 10.1016/j.riam.2013.10.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>.

**HARUN, Razif. & DANQUAH, Michael K.** "Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production". *Chemical Engineering Journal* [en línea], 2011, vol. 168, no 3, pp. 1079-1084., ISSN 13858947. DOI 10.1016/j.cej.2011.01.088. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088>.

**HORN, Svein Jarle. et al.** "Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*". *Biotechnology for Biofuels*, 2012, vol. 5, pp. 45.,

**HU, Bin Bin. & ZHU, Ming Jun.** "Reconstitution of cellulosome: Research progress and its application in biorefinery". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, vol. 66, no 5, pp. 720-730., ISSN 14708744. DOI 10.1002/bab.1804.

**IBARRA, Liz Nathalia. et al.** "Enzymatic activity of a recombinant  $\beta$ -1,4-endoglucanase from

the Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*) aiming second generation ethanol production". *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no 1, pp. 1-10., ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-019-56070-1.

**JAMALDHEEN, Sumitha Banu. et al.** "Comparative analysis of pretreatment methods on sorghum (*Sorghum durra*) stalk agrowaste for holocellulose content". *Preparative Biochemistry and Biotechnology* [en línea], 2018, vol. 48, no 6, pp. 457-464., ISSN 15322297. DOI 10.1080/10826068.2018.1466148. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2018.1466148>.

**JANA, Uttam Kumar. et al.** "Hemicellulose-Derived Oligosaccharides: Emerging Prebiotics in Disease Alleviation". *Frontiers in Nutrition*, 2021, vol. 8, no July, pp. 1-13., ISSN 2296861X. DOI 10.3389/fnut.2021.670817.

**JANEIRO, D.O.R.I.O.D.E.** "CHEMICAL STABILITY OF LACCASES FROM MONO AND CO-CULTURE OF *Pleurotus ostreatus* AND *Trametes pubescens* FOR PHENOL DEGRADATION". , 2018, no 21, pp. 1-9.,

**JAVED, Muhammad Rizwan. et al.** "Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells". *Microbiological Research* [en línea], 2019, vol. 219, pp. 1-11., ISSN 09445013. DOI 10.1016/j.micres.2018.10.010. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.010>.

**JIN, Mingjie. et al.** "Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEX™-pretreated corn stover for ethanol production using *Clostridium phytofermentans* at a high solids loading". *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, vol. 109, no 8, pp. 1929-1936., ISSN 00063592. DOI 10.1002/bit.24458.

**JIN, Shuting. et al.** "Application of deep learning methods in biological networks". *Briefings in Bioinformatics*, 2021, vol. 22, no 2, pp. 1902-1917., ISSN 14774054. DOI 10.1093/bib/bbaa043.

**KRISHNAMURTHI, Venkata Rao. et al.** "A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers". *PLoS ONE* [en línea], 2021, vol. 16, no 1 January, pp. 1-19., ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0245205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>.

**LAMBERTZ, Camilla. et al.** "Challenges and advances in the heterologous expression of

cellulolytic enzymes: A review". *Biotechnology for Biofuels*, 2014, vol. 7, no 1, pp. 1-15., ISSN 17546834. DOI 10.1186/s13068-014-0135-5.

**LEE, Hsiao Lin. et al.** "Mutations in the substrate entrance region of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability". *Protein Engineering, Design and Selection*, 2012, vol. 25, no 11, pp. 733-740., ISSN 17410126. DOI 10.1093/protein/gzs073.

**LIAO, Wan Yu. et al.** "Properties of *Thermobifida fusca* Peroxidase Tfu-1649 and its Combined Synergistic Effects with Xylanase on Lignocellulose Degradation". *BioResources*, 2021, vol. 16, no 1, pp. 942-953., ISSN 19302126. DOI 10.15376/biores.16.1.942-953.

**LIU, Hao. et al.** "Engineering microbes for direct fermentation of cellulose to bioethanol". *Critical Reviews in Biotechnology* [en línea], 2018, vol. 38, no 7, pp. 1089-1105., ISSN 15497801. DOI 10.1080/07388551.2018.1452891. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1452891>.

**LOPES, Mario Lucio. et al.** "Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry". *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea], 2016, vol. 47, pp. 64-76., ISSN 16784405. DOI 10.1016/j.bjm.2016.10.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>.

**LÓPEZ-MONDÉJAR, Rubén. et al.** "Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems". *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no April, pp. 1-12., ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep25279.

**LUGANI, Yogita. et al.** "Recent advances in bioethanol production from lignocelluloses: a comprehensive review with a focus on enzyme engineering and designer biocatalysts". *Biofuel Research Journal*, 2020, vol. 7, no 4, pp. 1267-1295., ISSN 22928782. DOI 10.18331/BRJ2020.7.4.5.

**MARCELO, Jorge. et al.** "Estimación del potencial de producción de bioetanol para los residuos de la corteza del cacao en Ecuador". , 2020, vol. 21, no 3, pp. 1-20.,

**MÁRQUEZ, José.** "El sector petrolero en Ecuador. 2000-2010". *Problemas del Desarrollo* [en línea], 2014, vol. 45, no 177, pp. 113-139., ISSN 03017036. DOI 10.1016/S0301-7036(14)70865-X. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-7036\(14\)70865-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-7036(14)70865-X).

**MATSAKAS, Leonidas. & CHRISTAKOPOULOS, Paul.** "Ethanol production from

enzymatically treated dried food waste using enzymes produced on-site". *Sustainability (Switzerland)*, 2015, vol. 7, no 2, pp. 1446-1458., ISSN 20711050. DOI 10.3390/su7021446.

**MELE, Fernando. et al.** "Estudio comparativo de diferentes mezclas nafta/etanol de caña de azúcar usando el enfoque de Ciclo de Vida". *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 2017, vol. 94, no 2, pp. 47-58., ISSN 1851-3018.

**MENON, Vishnu. & RAO, Mala.** "Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept". *Progress in Energy and Combustion Science* [en línea], 2012, vol. 38, no 4, pp. 522-550., ISSN 03601285. DOI 10.1016/j.pecs.2012.02.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>.

**NAVARRO, Enrique. & ABRIL, Alejandro.** Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. S.l.: s.n. 2015. ISBN 1098-1136 (Electronic)r0894-1491 (Linking).

**NIPHADKAR, Shreyas. et al.** "Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives". *Biofuels* [en línea], 2018, vol. 9, no 2, pp. 229-238., ISSN 17597277. DOI 10.1080/17597269.2017.1334338. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338>.

**NOVELLO, Márcia. et al.** "Enzymes for second generation ethanol: Exploring new strategies for the use of xylose". *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no 41, pp. 21361-21368., ISSN 20462069. DOI 10.1039/c4ra00909f.

**OLIVEIRA, C. et al.**, Principles of Genetic Engineering [en línea]. S.l.: Elsevier B.V., 2017. ISBN 9780444636799. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63668-3.00004-4>.

**OSMANI, Atif. & ZHANG, Jun.** "Multi-period stochastic optimization of a sustainable multi-feedstock second generation bioethanol supply chain – A logistic case study in Midwestern United States". *Land Use Policy* [en línea], 2017, vol. 61, pp. 420-450., ISSN 02648377. DOI 10.1016/j.landusepol.2016.10.028. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.landusepol.2016.10.028>.

**PELLEGRINI, Vanessa O.A. et al.** "Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, vol. 99, no 22, pp. 9591-9604., ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-015-6772-1.

**RASTOGI, Meenal. & SHRIVASTAVA, Smriti.** "Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [en línea], 2017, vol. 80, no May, pp. 330-340., ISSN 18790690. DOI 10.1016/j.rser.2017.05.225. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>.

**ROMANELLI, Gustavo Pablo. et al.** "Química de la biomasa y los biocombustibles". *Química de la biomasa y los biocombustibles*, 2020, DOI 10.35537/10915/59392.

**ROMANO, Silvia.** "Iocombustibles líquidos en la". , 2017, vol. 850, no 1063, pp. 19-32.,

**SALAZAR-CEREZO, Sonia. et al.** "CRISPR/Cas9 technology enables the development of the filamentous ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* as a new industrial enzyme producer". *Enzyme and Microbial Technology* [en línea], 2020, vol. 133, pp. 109463., ISSN 18790909. DOI 10.1016/j.enzmictec.2019.109463. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109463>.

**SANI, Rajesh K. & KRISHNARAJ, R. Navanietha.** "Extremophilic enzymatic processing of lignocellulosic feedstocks to bioenergy". *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, 2017, pp. 1-308., DOI 10.1007/978-3-319-54684-1.

**SARROUH, Boutros.** "Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market". *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 2012, vol. s1, no 01, DOI 10.4172/2155-9821.s4-002.

**SCHMIDT, Marcel. et al.** "Enzyme-mediated ligation technologies for peptides and proteins". *Current Opinion in Chemical Biology* [en línea], 2017, vol. 38, pp. 1-7., ISSN 18790402. DOI 10.1016/j.cbpa.2017.01.017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.017>.

**SCHNEIDER, Willian Daniel Hahn. et al.** "Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing fungal enzymes to enhance second-generation ethanol yield". *Applied Energy* [en línea], 2020, vol. 262, no December 2019, pp. 114493., ISSN 03062619. DOI 10.1016/j.apenergy.2020.114493. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114493>.

**SHARMA, Deepansh. & SAINI, Anita.,** Lignocellulosic Ethanol Production from a Biorefinery

Perspective. S.l.: s.n. 2020. ISBN 9789811545726.

**SREENA, C.P. & SEBASTIAN, Denoj.** "Jackfruit outer rind: A sustainable feedstock for fermentable sugar production using recombinant endoglucanase from *Bacillus subtilis* MU S1". *Environmental Technology and Innovation* [en línea], 2019, vol. 16, pp. 100448., ISSN 23521864. DOI 10.1016/j.eti.2019.100448. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100448>.

**SUSSMANN, Javier.** "Universidad Espiritu Santo Plan De Negocio Para La Creación De Una Planta Productora De Etanol Anhidro En El Canton Milagro Proyecto De Grado Previo a La Obtención Del Título De: Contaduría Pública Presentado Por: Javier Alberto Sussmann Lazo". [en línea], 2015, Disponible en: [http://repositorio.uees.edu.ec/bitstream/123456789/716/1/Sussmann Javier Plan de negocios 20150530.pdf](http://repositorio.uees.edu.ec/bitstream/123456789/716/1/Sussmann%20Javier%20Plan%20de%20negocios%2020150530.pdf).

**SWAIN, M.R. et al.**, *Marine Enzymes and Microorganisms for Bioethanol Production* [en línea]. 1. S.l.: Elsevier Inc., 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.003>.

**THAKUR, Abhijeet. et al.** "Molecular Characterization, Regioselective and Synergistic Action of First Recombinant Type III  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of Family 43 Glycoside Hydrolase (PsGH43\_12) from *Pseudopedobacter saltans*". *Molecular Biotechnology* [en línea], 2020, vol. 62, no 9, pp. 443-455., ISSN 15590305. DOI 10.1007/s12033-020-00263-x. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00263-x>.

**TODHANAKASEM, Tatsaporn. et al.** "Expression and Extracellular Secretion of Endoglucanase and Xylanase by *Zymomonas mobilis*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, vol. 187, no 1, pp. 239-252., ISSN 15590291. DOI 10.1007/s12010-018-2821-4.

**URRÚTIA, Gerard. & BONFILL, Xavier.** "PRISMA declaration: A proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses". *Medicina Clinica*, 2011, vol. 135, no 11, pp. 507-511., ISSN 15788989. DOI 10.1016/j.medcli.2010.01.015.

**VAN DYK, J.S. & PLETSCHKE, B.I.** "A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy". *Biotechnology Advances* [en línea], 2012, vol. 30, no 6, pp. 1458-1480., ISSN 07349750. DOI 10.1016/j.biotechadv.2012.03.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>.

**VERA, Oscar.** "Cómo escribir artículos de revisión". *Vlakna a Textil*, 2018, vol. 25, no 3, pp. 57-62., ISSN 13350617.

**VERDECÍA, J.M. & SERRAT, M.** "General technological aspects for the conversion to ethanol of the lignocellulosic biomass". *Tecnología Química*, 2010, vol. 28, no 3, pp. 63-70.,

**VICARIO.** "Estudio De Viabilidad Técnico- Económica De Una Planta De Producción De Biodiesel". , 2016,

**VOHRA, Mustafa. et al.** "Bioethanol production: Feedstock and current technologies". *Journal of Environmental Chemical Engineering* [en línea], 2014, vol. 2, no 1, pp. 573-584., ISSN 22133437. DOI 10.1016/j.jece.2013.10.013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>.

**VU, Van Hanh. & KIM, Keun.** "Improvement of cellulase activity using error-prone rolling circle amplification and site-directed mutagenesis". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, vol. 22, no 5, pp. 607-613., ISSN 10177825. DOI 10.4014/jmb.1107.07033.

**WANG, Mingyu. et al.** "Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production". *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2012, vol. 128, no January, pp. 1-24., ISSN 07246145. DOI 10.1007/10\_2011\_131.

**WU, Jianqiang. et al.** "Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots". *Plant Physiology and Biochemistry* [en línea], 2018, vol. 128, pp. 152-162., ISSN 09819428. DOI 10.1016/j.plaphy.2018.05.002. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.002>.

**XU, Jin. et al.** "Cloning, characterization of a novel acetyl xylan esterase, and its potential application on wheat straw utilization". *All Life* [en línea], 2021, vol. 14, no 1, pp. 622-635., ISSN 26895307. DOI 10.1080/26895293.2021.1947393. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/26895293.2021.1947393>.

**YUSOF, Faridah.** "Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization". *Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization*, 2015, pp. 61-80., DOI 10.1007/978-3-319-12397-4.

**ZHANG, Kun. et al.** "New technologies provide more metabolic engineering strategies for

bioethanol production in *Zymomonas mobilis*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, vol. 103, no 5, pp. 2087-2099., ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-019-09620-6.

## ANEXOS

### ANEXO A: BITÁCORA DE BÚSQUEDA

Base de datos	Fecha de Búsqueda	Ecuación de búsqueda	No. de resultados
Scopus	10-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"	86
<i>Web of Science</i>	11-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"-"pretratamientos"	80
Google Académico	15-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"	335
Google Académico	17-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"-"pretratamientos"	143
Google Académico	18-nov-20	<i>intitle:"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"</i>	17
Google Académico	19-nov-20	<i>intitle:"second generation bioethanol"+"consolidated bioprocessing"</i>	43
<i>ScienceDirect</i>	20-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"	2
<i>ScienceDirect</i>	21-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"-"pretratamientos"	1
<i>ScienceDirect</i>	23-nov-20	<i>intitle:"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"</i>	0
Google Académico	25-nov-20	"bioetanol de segunda generación"	499
Google Académico	26-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"+"hidrólisis enzimática"	255
Google Académico	28-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas"-"a partir de"	2
Google Académico	29-nov-20	"bioetanol de segunda generación"+"enzimas celulolíticas"	88
Google Académico	29-dic-20	<i>intitle:"bioetanol de segunda generación"+"enzimas celulolíticas"</i>	3
Google Académico	1-dic-20	<i>"second generation bioethanol"</i>	8040
Google Académico	2-dic-20	<i>"second generation ethanol"</i>	6830
Google Académico	4-dic-20	<i>"second generation bioethanol"+"enzymes"</i>	5070
Google Académico	5-dic-20	<i>intitle:"second generation bioethanol"+"enzymes"</i>	135
Google Académico	7-dic-20	<i>intitle:"second generation bioethanol"</i>	239

Google Académico	8-dic-20	<i>"second generation bioethanol"+"enzymes"+"new approaches"+"recent advances"</i>	35
Google Académico	10-dic-20	<i>"second generation ethanol"+"enzymatic saccharification"+"new approaches"</i>	42
Google Académico	12-dic-20	<i>"second generation ethanol"+"enzymatic saccharification"</i>	1700
Google Académico	13-dic-20	<i>intitle:"second generation ethanol"+"enzymatic saccharification"</i>	62
PubMed	15-dic-20	<i>second generation bioetanol</i>	256
PubMed	16-dic-20	<i>"second generation bioethanol"</i>	136
PubMed	18-dic-20	<i>"second generation bioethanol"+"enzymes"</i>	39
PubMed	22-dic-20	<i>intitle:"second generation bioethanol"+"enzymes"</i>	39
Pubmed	30-dic-20	<i>second generation bioethanol+enzymes</i>	120035
ResearchGate	2-ene-21	<i>enzymes AND bioetanol</i>	no da numero
Redalyc	3-ene-21	<i>Bioetanol</i>	307
Google Académico	2-mar-21	<i>"second generation bioethanol"+"enzymes"+"new approaches"+"recent advances"</i>	43
Google Académico	2-mar-21	<i>intitle:"enzymatic hydrolysis"+"new approaches"</i>	23
Google Académico	3-mar-21	<i>in title: "recombinant enzyme production" AND "second generation bioethanol"</i>	3
Google Académico	3-mar-21	<i>intitle:"Lignocellulolytic Enzymes production"</i>	43
Google Académico	3-mar-21	<i>intitle:"Lignocellulolytic Enzymes production"</i>	27

**Realizado por:** Diego Garcés.



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE  
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

**Fecha de entrega:** 03 / 01 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> <i>Diego Alexis Garcés Gamboa</i>
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> <i>Ciencias</i>
<b>Carrera:</b> <i>Ingeniería en Biotecnología Ambiental</i>
<b>Título a optar:</b> <i>Ingeniero en Biotecnología Ambiental</i>
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

**LEONARDO  
FABIO MEDINA  
NUSTE**

Firmado digitalmente por LEONARDO  
FABIO MEDINA NUSTE  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=EC, o=BANCO CENTRAL DEL  
ECUADOR, ou=ENTIDAD DE  
CERTIFICACION DE INFORMACION-  
ECIBCE, l=QUITO,  
serialNumber=0000621485,  
cn=LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE  
Fecha: 2022.01.03 18:18:37 -05'00'



**1857-DBRA-UTP-2021**