

**ULL**

Universidad  
de La Laguna



**VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA**

## **PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION**

### **LA PARED CELULAR VEGETAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE**

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**FACULTAD DE CIENCIAS - SECCIÓN DE BIOLOGÍA**

**Julio 2016**



**FRANCISCO SANTANA ARTILES**

**GRADO EN BIOLOGÍA**

<b>SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO</b> Curso Académico: 2015/2016	<b>ENTRADA</b>  Fecha: Núm:
---	--------------------------------------

**Datos Personales**

Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
43294128-D	Francisco Santana Artiles
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
697902077	franciscosantana.art@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

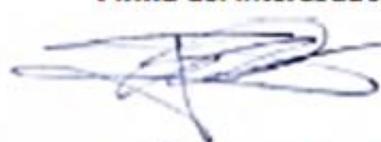
La pared celular vegetal en la producción de biocombustibles
--

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

D./Dña. Emilia Labrador Encinas	
Profesor/a del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal. Univ. Salamanca	
y D./Dña. José Antonio Pérez Pérez	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología celular y Genética	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: José Antonio Pérez	 Fdo.: Emilia Labrador Encinas

La Laguna, a 10 de Junio de 2016

**Firma del interesado/a**



**SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

# PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

## ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. IMPORTANCIA DE APROVECHAR LA ENERGÍA SOLAR CAPTADA POR LAS PLANTAS. ....	1
1.2. IMPORTANCIA DE LA REDUCCIÓN DE EMISIONES DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO <sub>2</sub> ). ....	2
1.3. ¿QUÉ ES UN BIOCOMBUSTIBLE?.....	3
<b>2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....</b>	<b>4</b>
2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR.....	4
<b>3. MATERIA PRIMA DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO, PARA LA OBTECCIÓN DE BIOETANOL.....</b>	<b>9</b>
3.1. PAJAS Y DESECHOS DE CULTIVOS.....	9
3.2. COSECHAS BIOENERGÉTICAS. ....	11
3.2.1. <i>Herbáceas</i> . ....	11
3.2.2. <i>Arbóreas</i> .....	14
<b>4. PROCESAMIENTO PARA OBTENCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>5. UTILIZACIÓN COMO COMBUSTIBLE. VENTAJAS SOBRE EL COMBUSTIBLE FÓSIL.....</b>	<b>17</b>
<b>6. MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR, PARA LA EFICIENCIA DEL PROCESO.....</b>	<b>18</b>
6.1. INCREMENTO DE CELULOSA AMORFA.....	18
6.3. INCREMENTO DE HEXOSAS EN LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR.....	19
<b>7. MEJORAS GENÉTICAS Y DE CULTIVO.....</b>	<b>20</b>
7.1. SÍNTESIS Y ENSAMBLAJE DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR.....	20
7.2. AUMENTO DEL CONTENIDO CELULÓSICO Y DE LA BIOMASA VEGETAL. ....	20
7.3. MEJOR ACCESO DE LAS ENZIMAS A LA CELULOSA.....	21
7.3.1. <i>Incremento de las cadenas de glucano amorfo de la celulosa</i> . ....	21
<b>8. PROBLEMAS ECONÓMICOS, SOCIALES, AMBIENTALES,.....</b>	<b>26</b>
<b>9. CONCLUSIONS.....</b>	<b>27</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>28</b>

# PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

---

Francisco Santana Artilés

## SUMMARY:

At present the demand for fossil fuels is high, while in the coming years, supplies of these fuels will be insufficient. It is therefore necessary to search for alternatives in production for other renewable and inexhaustible energy as long as these resources are managed sustainably. In recent years one of the solutions to this problem has been the production of biofuels.

In this work the production of biofuels is studied, focusing on the production of second generation bioethanol from lignocellulosic material of the cell wall of different plants. The plant biomass from straw, crop waste products and bioenergy crops is need as material.

For this aim, me focus in the knowledge of the structure, composition and proportions of cell wall components in different plants.

**Keywords:** biofuels; cell wall; bioethanol; cell wall modification.

## INTRODUCCIÓN:

En la actualidad la demanda de carburantes de origen fósil es elevada, tanto que en los próximos años, los suministros de estos carburantes serán insuficientes. Es por ello necesario la búsqueda de alternativas en la producción por otras fuentes de energía renovables e inagotables siempre y cuando estos recursos se manejen de forma sostenible. En estos últimos años una de las soluciones a esta problemática ha sido la producción de biocombustibles.

En este trabajo se estudia la obtención de biocarburantes, centrándonos en la producción de bioetanol de segunda generación a partir de material lignocelulósico de la pared celular de distintos vegetales. Se utiliza como materia prima la biomasa vegetal procedente de pajas, productos de desecho vegetal y de cultivos bioenergéticos.

Para ello se recurre al conocimiento de la estructura, composición y proporción de los distintos compuestos que conforman la pared celular de distintos vegetales y se estudian las posibles modificaciones en las paredes celulares vegetales para mejorar la eficiencia del proceso de obtención del bioetanol.

**Palabras clave:** Biocombustibles, pared celular, bioetanol, modificaciones pared celular.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Importancia de aprovechar la Energía solar captada por las plantas.

En la actualidad, los principales compuestos de combustión son aquellos que derivan de fuentes de energía, conocidos como combustibles fósiles. Estos combustibles son recursos limitados y, por ello, son considerados como recursos no renovables, debido a que su tiempo de renovación es a muy largo plazo y, por esto, son considerados fuentes limitantes. Consecuentemente se buscan alternativas a estos carburantes, sustituyéndolos por biocombustibles renovables cuyo tiempo de generación es relativamente más corto. Además, siempre y cuando no exista sobreexplotación de estos recursos constituirán una fuente inagotable, tratándose de manera sostenible (Abramson y col. 2010).

Estos biocombustibles disminuyen la emisión de gases de combustión a la atmósfera, hecho que actualmente con los recursos fósiles utilizados no está estrictamente controlado.

A partir de este punto de inflexión, se empiezan a investigar distintas forma de obtención de combustibles renovables, donde la emisión de los gases de combustión, como los gases emitidos durante la generación de estos biocarburantes se vea reducida. El objetivo final es producir estos recursos renovables, de forma que sean eficaces y sostenibles para el medio ambiente.

Es relevante destacar el papel fundamental que toma el aprovechamiento de la energía solar captada por las plantas en la fotosíntesis. Las plantas realizan la fotosíntesis, de forma que absorben energía solar, la cual es transformada en energía química, que es almacenada en forma de adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADPH) y que se emplean en la formación de compuestos orgánicos. Una importante parte de los compuestos orgánicos formado en la fotosíntesis sirve para la construcción de las paredes celulares vegetales. “Se estima que la producción anual de las paredes celulares de las plantas de la tierra es de 150-170 millones de toneladas” (Loque y col. 2015). Los componentes principales que constituyen la biomasa vegetal de la pared celular son polisacáridos y ligninas. Estos compuestos son los que se utilizan como base en la producción de los biocombustibles. “La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa generada en la fotosíntesis es una fuente de carbono y es una forma prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas” (Alvarez-Castillo y col. 2012). Además se estima que “La biomasa está en el cuarto lugar como fuente

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

de energía y proporciona el 14% de la energía que el mundo necesita” (Alvarez-Castillo y col. 2012). Este dato contrasta con el dato de que la proporción de dicho recurso vegetal utilizado por el ser humano en la actualidad es de un 2% (Pauly y Keesgtra 2008).

### 1.2 . Importancia de la reducción de emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Los biocombustibles como fuente de energía renovable presentan numerosas ventajas en el ámbito medioambiental. Estos son generados para reducir el consumo de energías no renovables en concreto los combustibles de origen fósil, los cuales proporcionan altos niveles de contaminación atmosférica interviniendo de forma activa en el desarrollo del cambio climático.

Por los factores comentados se asume la enorme relevancia que adquieren los biocombustibles, comenzando por la capacidad que tienen los vegetales utilizados como materia prima para este fin. Los vegetales durante todo su desarrollo realizan de forma constitutiva un proceso conocido como “Ciclo del carbono”, (**Figura1**) consistente en los siguientes pasos:

Durante la fotosíntesis las plantas absorben CO<sub>2</sub> atmosférico y lo utilizan para formar los compuestos orgánicos. Esto va a reducir de forma significativa uno de los principales gases responsable del efecto invernadero. A su vez, son estos mismos compuestos orgánicos los que van a constituir la base en la producción de estos biocombustibles que son demandados principalmente en la industria del automóvil. De tal forma que en la combustión de estos biocombustibles se liberan emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera y estas emisiones serán nuevamente absorbidas por futuros cultivos vegetales que serán respectivamente la materia prima de los biocombustibles en la siguiente generación.

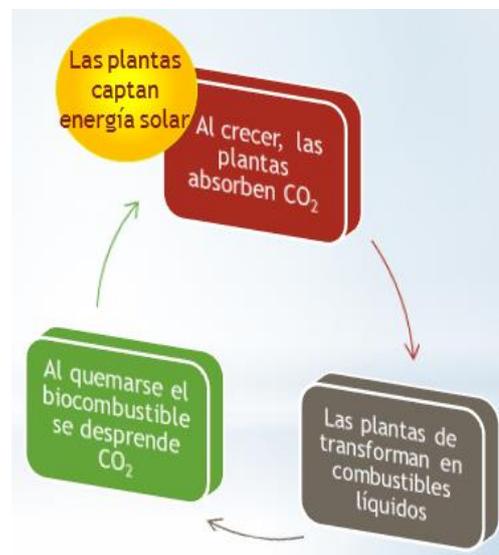


Figura 1. Ciclo del carbono.

Un dato a destacar sobre el secuestro de carbono por parte de las plantas es que se ha estimado que la fijación neta de CO<sub>2</sub> por las plantas terrestres por año es de aproximadamente 56 · 10<sup>9</sup> toneladas (Field y col. 1998; Pauly, Keegstra 2008).

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

A las emisiones de CO<sub>2</sub> liberadas por la combustión de los biocombustibles ya comentadas, hay que añadir las producidas durante las etapas de cultivo, recolección, transporte,... Teniendo en cuenta todo esto se pretende conseguir, como objetivo final, el establecimiento de un ahorro neto en las emisiones de CO<sub>2</sub> durante todo el procesamiento de los biocombustibles frente a las emisiones generadas en el uso de los combustibles fósiles.

### 1.3. ¿Qué es un Biocombustible?

Los biocombustibles son todos aquellos carburantes, principalmente líquidos, que se han obtenido a partir de vegetales. Estos biocombustibles pueden ser utilizados directamente en estado puro o mezclados con otros productos que derivan de petroleras.

Los biocombustibles pueden ser de primera, segunda o tercera generación.

Existen distintos tipos de biocombustibles como el bioetanol, biodiésel, biogás, diésel verde,...

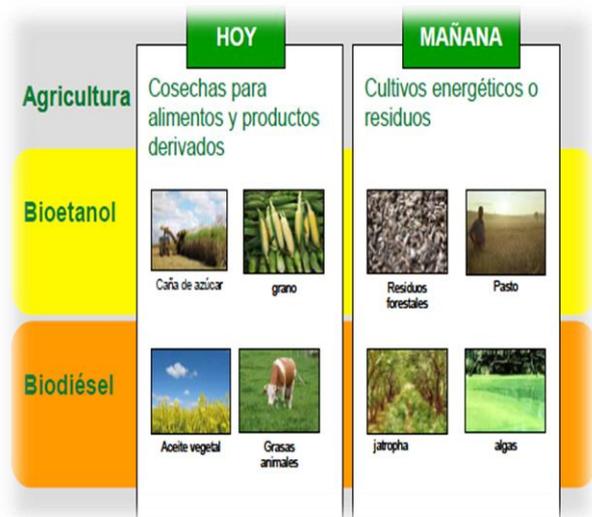


Figura 2. Materias primas en la producción de biocombustibles.

- **Biocombustibles de primera generación**, son aquellos que se producen a partir de cosechas destinadas a la alimentación humana, y son los que se producen mayoritariamente en la actualidad (**Figura 2**). La materia prima principal en la producción de estos biocombustibles es el almidón y la sacarosa en el caso del bioetanol y en el biodiésel los aceites. Es el caso del maíz y el trigo en la producción de bioetanol, y de la soja y la palma aceitera para el biodiésel.
- **Biocombustibles de segunda generación**, se producen a partir de material lignocelulósico procedente de elementos vegetales de desecho como pueden ser residuos de elementos agroindustriales, residuos forestales, pastos, cultivos energéticos...
- **Biocombustibles de tercera generación**, son biocombustibles que se obtienen a partir de algas o microalgas.

En este trabajo, nos centraremos en el bioetanol de segunda generación, procedente del material lignocelulósico de las paredes celulares vegetales.

## 2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

### 2.1. Estructura y composición de la pared celular.

La pared celular regula el volumen celular, determina la forma celular y protege el protoplasto (**Figura 3**). Es esencial para muchos procesos de crecimiento, desarrollo, mantenimiento y reproducción.

Es una mezcla compleja de polisacáridos y otros polímeros, ensamblados en una red tridimensional organizada (matriz). Contiene además proteínas estructurales, enzimas, polímeros fenólicos y otros materiales que modifican las características físicas y químicas de la pared.

Así, la estructura de la pared vegetal puede variar su grosor según el tipo de tejido en el que se encuentre (los tejidos conductores necesitan una pared muy gruesa para soportar la presión del agua que fluye a través de estos; por otra parte, el tejido parenquimático precisa una pared fina para poder realizar un intercambio eficaz de las sustancias de reservas que se encuentran en su interior). También pueden variar en cuanto a su morfología, su composición, las sustancias embebidas en ellas, la frecuencia de punteaduras...

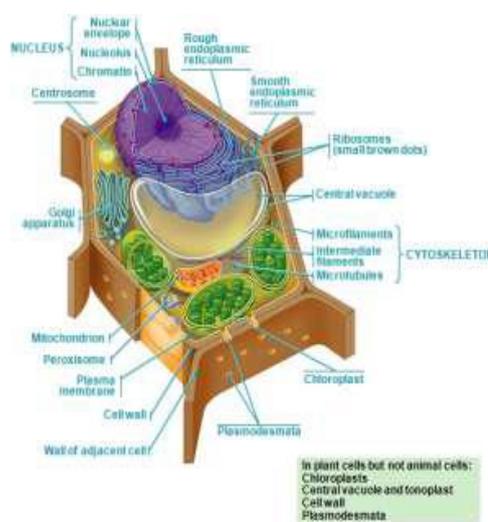
Las distintas funciones de la pared celular requieren de una estructura compleja y dinámica.

Algunas de estas funciones son:

- Soporte mecánico de las estructuras vegetales.
- Cohesión entre células, evitando su deslizamiento.
- Morfogénesis vegetal.
- Exoesqueleto.
- Prevención de colapso en células xilemáticas en respuesta a presiones negativas.
- Barrera de macromoléculas y patógenos.

La pared celular no es una estructura uniforme, sino que está dividida en varias capas:

- **Lámina media:** Es una capa fina de material dispuesto en la unión entre las células vecinas en contacto. Su composición difiere del resto de la pared en que contiene mucha pectina y proteínas diferentes. Se origina durante la división celular al formarse la placa celular.



**Figura 3. Estructura de la célula vegetal.**

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

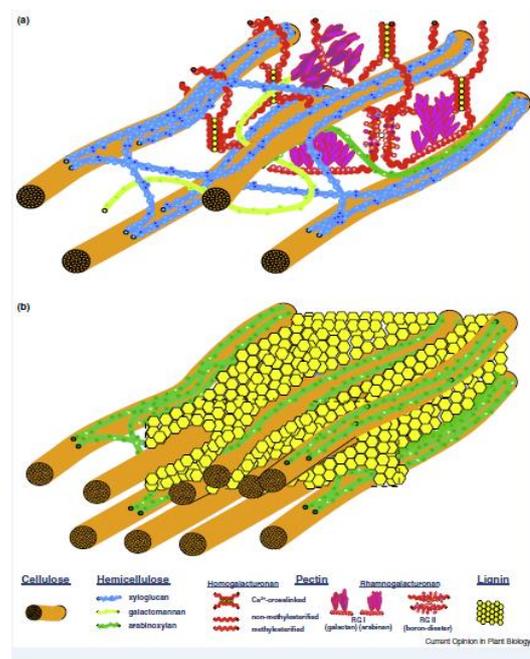
Francisco Santana Artiles

- **Paredes primarias:** Existen en las células en crecimiento y están relativamente poco especializadas
- **Paredes secundarias:** Se forman después de que haya cesado el crecimiento celular (elongación). Pueden llegar a ser altamente especializadas en su estructura y composición. En las células del xilema alcanzan un gran grosor y están reforzadas con lignina. A través de las punteaduras (sector de la pared secundaria poco desarrollada), las células pueden comunicarse entre sí.

La composición de la pared celular vegetal varía en las distintas plantas y en los diferentes tipos celulares, fundamentalmente en los porcentajes de los distintos polímeros que la forman. Los principales componentes son (**Figura 4**):

### ▪ CELULOSA.

La celulosa es la base fibrilar de las paredes celulares y está constituida por cadenas lineales de unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Cada resto presenta una rotación de 180° respecto a los restos contiguos, permitiéndose así una mejor estabilización por puentes de hidrógeno intramoleculares. El grado de polimerización medio en paredes secundarias es alto, aproximadamente  $10^4$ , mientras que en paredes primarias es más bajo, entre 2,6 y  $6 \times 10^3$ . Debido a su estructura, las cadenas de celulosa (40-70) se unen por puentes de hidrógenos intermoleculares formando agregados (microfibrillas), en su mayor parte cristalinos, en los que las cadenas individuales de celulosa se disponen de forma paralela. Esta cadena está embebida en una matriz fuertemente hidratada constituida por polisacáridos y lignina o suberina, las cuales aportan una elevada resistencia mecánica. Cuando realizamos un corte transversal de una microfibrilla observamos una disposición heterogénea; en la parte central se encuentran glucanos muy organizados, unidos entre sí por interacciones no covalentes, mientras que en la parte exterior encontramos cadenas de celulosas amorfas y poco organizadas.



**Figura 4. Estructura y composición de la pared celular vegetal.**

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas por grandes complejos proteicos (en forma de rosetas) que se encuentran embebidas dentro de la membrana plasmática. Estas rosetas están formadas por 6 subunidades, cada una de las cuales contiene múltiples unidades de celulosa sintasa. La celulosa sintasa se encuentra codificada por una familia de genes denominados *CesA*. En estos complejos, el uridín difosfato glucosa (UDP-G) actúa como cebador, cediendo unidades de glucosa para formar la cadena de glucano. Los monómeros de glucosa provienen de la degradación de la sacarosa en el citoplasma, los cuales se incorporan al uridin difosfato (UDP). Las microfibrillas de celulosa son relativamente rígidas y aportan la fuerza y la disposición estructural de la pared celular. Los glucanos, estrechamente alineados y unidos entre sí, forman un cordón muy ordenado que excluye el agua y hace inaccesible el ataque enzimático.

### ▪ HEMICELULOSAS.

Las hemicelulosas son un grupo muy heterogéneo de polisacáridos compuestos por una cadena lineal relativamente larga sobre la que pueden aparecer cadenas laterales cortas. Pueden cambiar en función de los tejidos, el estado de desarrollo y la especie. Pueden unirse a la celulosa mediante puentes de hidrógeno, rodeando a las microfibrillas y entrelazándolas entre sí para formar una red o matriz. Así, forman entramados que mantienen a las microfibrillas de celulosa juntas en una red cohesiva que le confiere rigidez o pueden actuar también como cobertura resbaladiza, de forma que condicionan su capacidad de extensión. Las cadenas laterales de las hemicelulosas interfieren en el alineamiento de las cadenas de glucano, lo que evita su compactación.

En la mayoría de las plantas, excepto gramíneas, el xiloglucano es el polisacárido hemicelulósico más abundante, aunque dependiendo de las especies y de los tejidos presenta porcentajes diferentes. Está constituido por un eje central de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glucano idéntico al de la celulosa, pero bastante más corto. Además, a diferencia de esta, gran parte de los restos de glucosa están unidos a restos de xilosa mediante un enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6).

Una de las hemicelulosas más abundante es el xilano, el cual está constituido por una cadena lineal de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-D-xilosa con sustituciones de arabinosa, ácido glucurónico y ácido metilglucurónico mediante enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) o  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3). El tipo y la distribución de los sustituyentes son muy variables, dependiendo de su origen. Se encuentra en grandes cantidades en gramíneas y en las paredes secundarias de plantas leñosas, si bien es poco frecuente en las paredes primarias de las no gramíneas.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

Otros polisacáridos hemicelulósicos presentes en las paredes celulares son los mananos, que constituyen un grupo muy heterogéneo en el que la manosa es el componente mayoritario. Su cadena central puede estar formada únicamente por restos de D-manosa unidos por enlace  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) o presentar restos de D-glucosa intercalados (glucomananos).

Aunque su presencia es muy escasa en paredes celulares primarias, los mananos tienen importancia cuantitativa como componentes de reserva de algunas semillas, mientras que los glucomananos están presentes en cantidades significativas en paredes secundarias de tejidos lignificados de coníferas y, en menor cantidad, de angiospermas.

### ▪ PECTINAS.

Grupo de polisacáridos heterogéneos complejos, constituidos por una mezcla de azúcares ácidos (ácido galacturónico) y neutros (ramnosa, galactosa y arabinosa).

Están presentes en las paredes celulares de todas las plantas, aunque su importancia cuantitativa varía desde alrededor del 35% en paredes primarias de dicotiledóneas hasta el 5% en las de gramíneas.

Se caracterizan por su capacidad de constituir una fase gelatinosa muy hidratada en la que está embebida la red celulosa-hemicelulosa. Se considera que su presencia en las paredes celulares determina su porosidad, proporciona superficies cargadas que modulan el pH y el balance iónico y sirven como moléculas de reconocimiento a señales tales como organismos simbióticos, patógenos e insectos.

Las pectinas ácidas están constituidas por una alta proporción de restos de ácido D-galacturónico unidos mediante un enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). Las cadenas constituidas únicamente por ácido galacturónico reciben el nombre de homogalacturonanos y su longitud es muy variable. Los grupos carboxilo de los restos galacturonosil pueden encontrarse esterificados con metanol o libres. Los grupos carboxilo libres pueden estar disociados y dar lugar a la formación de puentes de calcio, que constituyen la estructura conocida como *caja de huevos*.

Sin embargo, las cadenas de homogalacturonano no son muy frecuentes en las paredes celulares ya que normalmente presentan restos de L-ramnosa intercalados en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2), formando así *ramnogalacturonano*. Los *arabinanos* están formados por restos de L-arabinosa unidos por un enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 5), algunos unidos en 2 y 3 a otros restos de arabinosa. Los *galactanos* están formados por una cadena de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) D galactano enlazados por el carbono 6. Puede haber sustituciones de arabinano en el carbono 3 de los restos de galactosa, formando así los *arabinogalactanos*.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

### ▪ **PROTEÍNAS.**

Las paredes celulares contienen diferentes proteínas, tanto estructurales como enzimáticas, que en las paredes primarias llegan a constituir el 10% de su peso. La mayoría corresponde a glicoproteínas, aunque el grado de glicosilación es muy variable.

Entre las proteínas estructurales destacan:

- Proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) o extensinas.
- Proteínas ricas en prolina (PRP).
- Proteínas ricas en glicina (GRP).

HRGP debe su nombre a la presencia de hidroxiprolina como aminoácido mayoritario. Está formado por numerosas secuencias repetidas de serina-(Hyp) 4 y tirosina-lisina. La molécula de extensina contiene estos restos de isoditirosina unidos por puentes difenil-éter, para formar isoditirosina capaz de establecer enlaces inter e intramoleculares responsables de su estructura secundaria y terciaria, que aumentan la rigidez y el carácter hidrófobo de la molécula.

Además de estas proteínas, la pared celular contiene proteínas arabinogalactano (AGP), hidrófilas y fuertemente glicosiladas. Más del 90% de la masa de las AGP son residuos de azúcares, principalmente galactosa y arabinosa. Actúan en la formación de la raíz, en la promoción de la embriogénesis somática y en la diferenciación del floema. Las paredes celulares contienen también diferentes tipos de enzimas que les confieren una alta actividad metabólica. Todas estas enzimas actúan sobre sustratos sencillos, tales como oxígeno ( $O_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), agua ( $H_2O$ )... y llevan a cabo reacciones como la formación de NADH, formación de  $H_2O_2$ , lignificación, despolimerización... Destaca, sin embargo, la reacción de extensión de pared celular de la transglicosilasa, como la xiloglucano endotransglicosilasa hidrolasa (XTH), la cual tiene la habilidad de cortar el esqueleto de xiloglucanos e integrar más moléculas de xiloglucano en la pared celular. Tiene también la capacidad de degradar la cadena de xiloglucano, por lo que puede actuar como hidrolasa. Las expansinas son proteínas de pequeño tamaño que controlan la extensión celular, la disgregación de la pared celular y la separación celular.

### ▪ **LIGNINA.**

La lignina es un polímero complejo constituido a partir de fenilpropanoides y los alcoholes aromáticos p-cumarílico, coniferílico y sinapílico. La polimerización tiene lugar mientras estén activos los precursores y exista capacidad espacial en la pared celular, de manera que la molécula tiende a llenar todo el espacio en la pared celular no ocupado por otras moléculas, desplazando el agua. (Barceló y col. 2000; Azcón y Talón 2008; Taiz y col. 2015).

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

El resultado es una red hidrofóbica que rodea los demás componentes de la pared celular, a la que confiere una mayor resistencia tanto física como química, además de una gran rigidez. Es especialmente abundante en células conductoras y estructurales con engrosamiento secundario; solo se encuentra en la pared secundaria. La lignina se encuentra clasificada en tres tipos p-hidroxifenil (H), guaiacil (G), y siringil (S) unidades que derivan de un proceso de polimerización aleatoria de los alcoholes p-cumaril, coniferílico y sinapílico, respectivamente (Loque y col. 2015).

### 3. MATERIA PRIMA DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO, PARA LA OBTECCIÓN DE BIOETANOL.

#### 3.1. Pajas y desechos de cultivos.

Una de las materias primas utilizada en la producción de bioetanol de segunda generación, es obtenida de los desechos, pajas y rastrojos vegetales sobrantes tras la recolección de los cultivos, en aprovechamiento de la biomasa restante.

***Triticum sativum* (Trigo).** Pertenece a la familia de las Gramíneas. Vegetal del que se demanda el grano tras la cosecha y es utilizado mayormente como alimento. La planta es anual y de carácter herbáceo; el crecimiento del tallo se debe al estiramiento de los tejidos en la parte superior de los nudos del mismo. El cuerpo de la planta se encuentra dividido en dos partes una que abarca y protege el meristemo (zona de crecimiento) y al peciolo se trata de la vaina y por otra parte se encuentra el limbo alargado y presenta nervios paraleliformes. Las hojas del trigo derivan de los nudos. En cuanto a las flores estas se encuentran reunidas en espigas, las cuales de forma individual se encuentran constituidas por el raquis o eje central, del cual parten las espiguillas. Estas espiguillas a su vez constan de un eje principal del que salen unos filamentos finalizados en glumas, las cuales se encargan de mantener las flores cerradas hasta el proceso de maduración de las mismas junto a estas glumas se encuentran un conjunto de brácteas que también protegen a la flor una interior (palea) y otra exterior (lema), esta última con una terminación en forma de barba que le confiere el aspecto plumoso a la espiga.



Figura 5. Paja de trigo

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artilles

La semilla es un grano (cariópide), que presenta distintas capas la gluma, envolturas externas (pericarpio, mesocarpio y epicarpio) y las capas internas (testa, albumen y el germen). Una vez recolectados estos granos, la paja sobrante (**Figura 5**) es utilizada en la producción de bioetanol de segunda generación.

**Zea mays** (**Maíz**). Familia de las Gramíneas, es un cereal, de producción anual. Su tallo es erecto y robusto pudiendo alcanzar los cuatro metros de altura, no presenta ramificaciones (forma de caña). Su inflorescencia, es monoica, los sexos masculinos y femeninos separadas en la misma planta. La flor femenina, conocida como mazorca, contiene los granos de maíz (semillas), que se desarrollan en unas estructuras vegetativas denominadas espádices, dispuestas lateralmente. Mientras que la masculina, presenta una panícula, donde cada flor de esa panícula presenta tres



**Figura 6.** Paja de maíz.

estambres. En relación a sus hojas, estas se caracterizan por ser alargadas, lanceoladas, alternas y paralelinervias, se encuentran abrazadas al tallo y por el haz presentan vellosidades. En este caso se utiliza como biomasa las hojas y tallos de la paja de maíz (**Figura 6**), así como las mazorcas una vez recolectado el grano.

**Saccharum officinarum L.** (**Caña de Azúcar**). Pertenece a la familia de las Gramíneas (Poáceas). Es una planta perenne. Su tallo es macizo y puede alcanzar entre 2-8 centímetros de diámetro y los seis metros de alto, se encuentra segmentado por nudos y entrenudos. Su flor es una inflorescencia con forma de panícula de pequeñas espigas (largas, sedosas y vellosas), cada inflorescencia presenta un raquis o eje central que presenta una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas. Su fruto en caso de que se produzca es de pequeño tamaño. Sus hojas presentan estomas, típicamente vellosas, largas, laminadas, delgadas y planas, se encuentran pegadas al tallo en el nudo mediante la vaina de la hoja.



**Figura 7.** Paja caña de azúcar.

Existen otras especies de cañas de azúcar, que son cultivadas principalmente para el aprovechamiento de su biomasa, como es el caso de la caña energética, puesto que a diferencia de otras especies sus azúcares son de baja calidad.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

Tras la recolección del cultivo se utiliza la biomasa sobrante en la producción de bioetanol, restos de hojas, cañizos,... (**Figura 7**).

**Sorghum bicolor L.** (**Sorgo**). Pertenece a la familia de las Gramíneas o (Poáceas), cereal. Se trata de una planta anual, perenne. Su tallo es cilíndrico, erecto, puede alcanzar los cinco metros de altura dependiendo de la especie. Se encuentra dividido por macollos o nudos, en la parte terminal del tallo se encuentran las inflorescencias en forma de panícula compacta, inflorescencias en espiguillas o panojas. Sus flores son hermafroditas. Su semilla o fruto (cariópside) esférico y oblongo. En cuanto a sus hojas, alargadas, estrechas, lanceolada o glabras, con disposición alterna y nervadura paraleliforme.



**Figura 8.** Rastrojo de Sorgo.

Finalizada la cosecha se utiliza la biomasa restante como en los casos anteriormente comentados, hojas, tallos,... (**Figura 8**) que serán utilizados como materia prima en la producción de bioetanol de segunda generación.

### 3.2. Cosechas bioenergéticas.

Se conocen como cosechas bioenergéticas, determinadas plantas que presentan un gran rendimiento referido a la elevada producción de biomasa que generan, la cual será utilizada para la obtención de bioetanol. Sobre todo, cabe destacar el importante papel que toman algunas herbáceas como *Miscanthus* o Switchgrass, entre otras. Plantas no muy conocidas y de gran utilidad en la actualidad para la obtención de biocombustibles, principalmente por la capacidad de adaptación que presentan, en condiciones de estrés.

#### 3.2.1. Herbáceas.

**Miscanthus spp.** (**Pasto de Elefante**). Pertenece a la familia de las Poáceas. Es una planta nativa del este o sureste de Asia, su distribución geográfica natural se encuentra desde el noreste de Siberia hasta zonas templadas de la Polinesia, por lo que presenta una gran gama de zonas climáticas para su desarrollo. Se trata de una planta perenne, con unos tallos similares a los de la caña de bambú (**Figura 9**). Su crecimiento es originado



**Figura 9.** *Miscanthus* spp.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artilles

mediante yemas en los rizomas y puede alcanzar entre 3 – 3.5 metros de altura dependiendo de cada especie. Sus hojas son estrechas y largas, con sus puntas agudas y con los márgenes ásperos, presenta una nervadura central plateada que en otoño varía a un color amarillento. Sus flores se agrupan en inflorescencias terminales en panícula (racimo de racimos), las flores tienen un color entre plateado y púrpura y se encuentran rodeadas por pelos sedosos. Se encuentran distintas especies, que se caracterizan por ser buenos productores de biomasa como es el caso de *Miscanthus x giganteus*, híbrido entre *Miscanthus sinensis* (diploide) con *Miscanthus sacchariflorus* (tetradiploide), donde su cruce origina un triploide, incapaz de producir semillas y que solo se reproduce mediante rizomas. Esta especie es la más utilizada en el campo de cosechas bioenergéticas. Las otras dos especies con gran potencial en producción de biomasa son *M. sacchariflorus* y *M. sinensis*.

Otra de las características más importantes que presentan estas especies es su metabolismo C<sub>4</sub>, lo que hace que estas plantas presenten una mayor tolerancia a las sequías que las plantas de tipo C<sub>3</sub>, que en condiciones de largas sequías, presentan una producción de biomasa limitada, y en casos extremos pueden inducir a la muerte del individuo. Respecto al tiempo de floración de estas especies, existe una variedad genotípica relacionada con el tiempo de floración, donde una floración temprana reduce el crecimiento, y por lo tanto también el rendimiento. En el caso de *M. x giganteus*, florece en épocas anteriores a las heladas de otoño. De forma natural, el género *Miscanthus* se propaga por rizomas y se reproduce mediante semillas. En lo referente al cultivo de este vegetal, podemos determinar que presenta facilidades a la hora de ser cultivado debido a la amplia gama de suelos que se pueden utilizar, incluyéndose tierras marginales. Pero donde más rendimiento genera es en suelos que presenten un pH determinado, que retengan cierta humedad y con buen drenaje. La cosecha se produce en invierno. Por otro lado, la temperatura óptima para estos cultivos es amplia. A temperaturas inferiores a los 6 grados centígrados (°C) su crecimiento se ve disminuido, puesto que el complejo fotosintético se ve afectado; las heladas intervienen en la destrucción de nuevos brotes, reduciendo además su período de crecimiento. Sus rizomas presentan dormición invernal, de la cual salen cuando la temperatura del suelo se encuentra entre 10° y 12°C. En aspectos generales, *Miscanthus* soporta tanto las temperaturas extremas como los cambios climáticos. Es posible cultivarla en un amplio rango climático, aunque las regiones óptimas para su cultivo son las templado-frías y que presenten una temperatura media entre 10° y 20°C. La cosecha de *Miscanthus*, puede ser almacenada a la intemperie durante un período de hasta cinco años manteniendo sus condiciones intactas.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

***Panicum virgatum*, Switchgrass (pasto varilla, pasto aguja, panizo de pradera).** Pertenece a la familia de las Poáceas. Se trata de una planta perenne de estaciones cálidas y porte erecto (**Figura 10**). Es nativa de América del Norte. Es una especie muy resistente, considerada en casos como mala hierba. Además es considerada con alto valor en la obtención de biomasa para su posterior producción en bioetanol, puesto que está compuesta por carbohidratos complejos, entre los que se encuentra la celulosa en un 70% del total de estos carbohidratos. Se trata de una gramínea que presenta unas raíces muy desarrolladas y un rizoma corto. La planta puede alcanzar los 3 metros de altura. Sus hojas tienen una lígula marcada. Sus flores se agrupan en inflorescencias en panícula, las cuales producen un elevado número de semillas que pueden variar de coloración en distintas estaciones. Una característica muy importante es que es una planta de tipo C4, por lo que presenta gran resistencia en condiciones de elevadas temperaturas y en condiciones de sequía. Se reproducen por fecundación cruzada. En las espiguillas que encontramos en sus inflorescencias hay dos flores, una que se caracteriza por producir semillas (fértil) y la otra que es estéril. También diferenciamos distintos genotipos en estas plantas donde los tetraploides y octoploides son los más comunes en la naturaleza, aunque también se han identificado hexaploides y aneuploides. En cuanto a las variedades y ecotipos, las principales diferencias existentes se deben a las características presentadas por el clima y el suelo. De modo que por selección natural han surgido dos ecotipos distintos. El ecotipo *UPLAND*, agrupa plantas con un genotipo octoploide y también algún tetraploide y se caracterizan por crecer en suelos secos y presentan un mejor desarrollo en climas semiáridos; esta variedad es de porte menor y tiene menos biomasa. Las plantas del ecotipo *LOWLAND* son tetraploides generalmente, crecen de forma óptima en suelos con mayor disponibilidad de agua, se encuentran en zonas húmedas y con inviernos moderados, y a diferencia del ecotipo anterior, presentan un gran rendimiento a nivel de biomasa y un mayor grosor y porte. En lo referente al cultivo de esta planta, es un vegetal que se adapta muy bien a distintas condiciones, sin que esto interfiera en su crecimiento de forma negativa. Estas variaciones se pueden dar sobre el clima, el suelo y la variación temporal de las estaciones. Su crecimiento se produce desde el final de la primavera hasta el comienzo del otoño, mientras que durante los meses fríos la planta está en dormición y es improductiva. Además, este tipo de plantas no presenta requerimientos de agua



Figura 10. *Switchgrass*.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

especiales y menos aún de fertilizantes químicos (en algún caso el requerimiento de fertilizantes es nulo). Estas cualidades son importantísimas a la hora de potenciar el cultivo de este vegetal. Para controlar las nuevas plantaciones de Switchgrass, durante la fase de crecimiento se siega dos o tres veces. También es de destacar, que la explotación de los cultivos de Switchgrass no es productiva hasta el tercer año tras su plantación.

### 3.2.2. Arbóreas.

**Populus ssp. (Álamo).** Pertenece a la familia de las Salicáceas, es un árbol caducifolio, erguido, de 20 - 25 metros de altura (**Figura 11**). El tronco es robusto con corteza blanquecina o gris claro, casi liso al tacto. Sus hojas son simples, alternas, tomentosas, borde dentado y forma variable, existe una diferencia de color entre el haz que es más oscuro y más lampiño que el envés, que es más claro y mucho más peloso. Sus flores se encuentran en amentos colgantes y son dioicas y presentan un largo pedúnculo. Su fruto presenta forma de cápsula cubierta por una borra blanquecina.



Figura 11. *Populus ssp.*

**Eucalyptus globulus (Eucalipto).** Pertenece a la familia de las Mirtáceas. Se caracteriza por ser un árbol perenne, presentar un tronco erecto con una corteza que se deshace de una tonalidad grisácea – azulada, alcanza una altura de 45 - 65 metros (**Figura 12**). Presenta heterofilia en sus hojas, las adultas son alternas, lanceoladas, con peciolo, nervio central marcado, de color verde oscuro, textura endurecida, mientras que las jóvenes tienen disposición opuesta, color verde-grisáceo y sin peciolo. Sus flores son solitarias o en umbelas de tres con muchos estambres y sin pétalos. Su fruto es una cápsula leñosa, gruesa y abotonada de hasta cuatro celdas donde se encuentran las semillas.



Figura 12. *Eucalyptus globulus*.

Estas son las principales especies utilizadas como fuente de material lignocelulósico, entre otras muchas que son utilizadas para este fin y que no mencionamos en este apartado.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artilles

### 4. PROCESAMIENTO PARA OBTENCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.

Para la obtención del bioetanol de segunda generación, la biomasa procedente del material lignocelulósico de la pared celular vegetal tiene que ser procesada por distintas fases: (1) pretratamiento, (2) hidrólisis enzimática, (3) fermentación y (4) destilación y secado (**Figura 13**). El coste del manejo y procesamiento de la materia lignocelulósica es de gran importancia para que la obtención final del biocombustible sea factible. Consecuentemente lo que se pretende es reducir los costes de producción mediante técnicas de manejo y modificación de estructuras celulares para que presenten mejores características, para la degradación, fermentación... También hacer uso de materias primas con una mayor producción de biomasa, que no sean destinadas a la alimentación humana,...

Fases de producción del bioetanol de segunda generación:

- **Preparación de la biomasa vegetal.**

Fraccionamiento del material, si es necesario.

- **Pretratamiento.**

El objetivo de este paso es mejorar la degradación del material lignocelulósico y facilitar el acceso de las enzimas hidrolíticas. Esto se consigue principalmente por la degradación de hemicelulosas y lignina que rodean a la celulosa junto a modificaciones en las microfibrillas de celulosa.

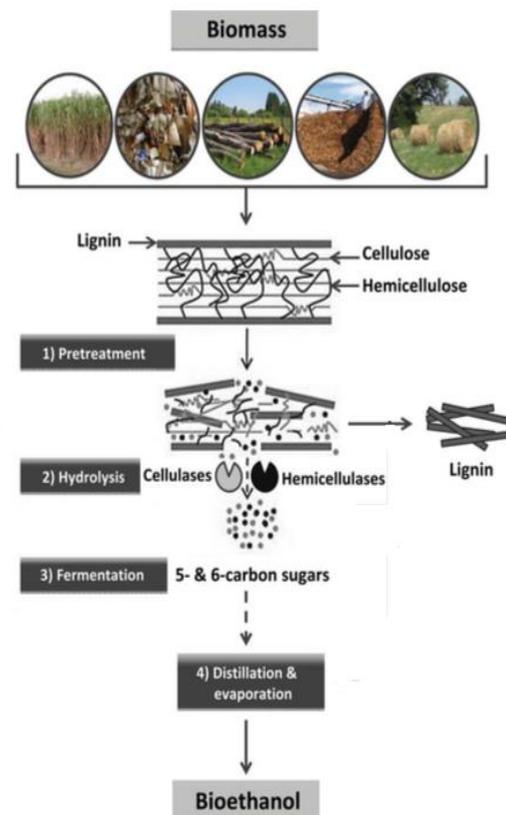
Los pretratamientos pueden variar, los más utilizados son:

- **Ácidos diluidos y vapor.**
- **Agua caliente y alta presión.**

El objetivo de estos dos tipos de pretratamientos es la degradación de las hemicelulosas.

- **Pretratamientos alcalinos.**

Facilitan la solubilidad de la lignina.



**Figura 13. Proceso de producción del bioetanol de segunda generación.**

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

Tras el pretratamiento se obtiene una solución de azúcares resultante de la ruptura de las hemicelulosas y un residuo sólido constituido por celulosa, mayoritariamente (Dobbelaere y col. 2014).

- **Hidrólisis enzimática.**

La hidrólisis, es un proceso que produce la ruptura de una molécula en dos, por acción del agua. En el caso de los polisacáridos de la pared celular vegetal se conoce también como **sacarificación**, cuyo objetivo es producir la despolimerización de la celulosa y hemicelulosas en monómeros solubles como hexosas y pentosas (Dobbelaere y col. 2014).

Existen distintos métodos hidrolíticos:

- **Hidrólisis enzimática**, es la técnica más utilizada, se basa en la ruptura de la biomasa lignocelulósica por enzimas. Las celulasas y hemicelulasas degradan la biomasa en azúcares sencillos que pueden ser fermentados por bacterias o levaduras y obtener así etanol.
- **Hidrólisis con ácidos diluidos**, Consiste en mezclar 0.7% de ácido sulfúrico con las hemicelulosas de la biomasa, para que se lleve a cabo su hidrólisis a una temperatura de 190°C. A este paso le precede la optimización referida al rendimiento de la reacción por parte de las celulasas que presentan mayor resistencia, de forma que se utiliza una proporción de 0.4% de ácido sulfúrico a una temperatura de 215°C. Tras esto, los azucares hidrolizados son neutralizados y recuperados, por percolación. Este tipo de hidrólisis es simple y eficiente para la obtención del alcohol.
- **Hidólisis con ácidos concentrados**, se aplica sobre la biomasa seca, con una humedad menor al 10%, se le añade ácido sulfúrico en 70 – 77% y se mantiene a una temperatura de 50°C. Luego se le añade agua para diluir el ácido y se aumenta la temperatura hasta los 100°C. El producto final es un gel que es prensado para obtener la mezcla del ácido y del azúcar, que finalmente serán separados.

Existen diferencias entre la hidrólisis química y enzimática. Son estas diferencias las que han determinado que el presente y el futuro de los procesos hidrolíticos se realicen principalmente por catálisis mediante enzimas, puesto que son menos costosas, presentan un mayor rendimiento, no requieren de agentes químicos, son bastante estables y actúan de forma específica.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artilles

### ▪ Fermentación.

El procesado continúa con la fermentación por levaduras, bacterias u hongos de la glucosa liberada de la celulosa y de los azúcares derivados de las hemicelulosas (glucosa, manosa, xilosa,...) en los tratamientos anteriores. En la naturaleza existe una mayor cantidad de azúcares de 6 carbonos que de 5, como es el caso de la glucosa (celulosa), al igual que una mayor diversidad de microorganismos que fermentan mejor las hexosas que las pentosas. Es por ello que existe un mejor rendimiento fermentativo de las hexosas frente al de las pentosas (hemicelulosas), aunque ambas son utilizadas en la producción de biocombustibles.

Para la optimización de la fermentación, se han desarrollado técnicas en las que se produce de forma simultánea la sacarificación y fermentación de los azúcares tanto hexosas como pentosas (Dobbelaere y col. 2014).

### ▪ Destilación y secado.

Para finalizar el procesamiento se lleva a cabo la destilación, proceso en el cual se separan los líquidos de la mezcla, mediados por el calor. El alcohol que es obtenido por fermentación (etanol) presenta cierta cantidad de agua que debe ser eliminada para poder ser usado como biocombustible, mediante un proceso de destilación determinado, el etanol tiene un punto de ebullición 78.3°C menor a la del agua 100°C, la mezcla se calienta hasta alcanzar el punto de ebullición del alcohol, donde se evapora y posteriormente por condensación se procede a la separación.

## 5. UTILIZACIÓN COMO COMBUSTIBLE. VENTAJAS SOBRE EL COMBUSTIBLE FÓSIL.

El bioetanol es un biocombustible con grandes planes de futuro, debido a la elevada demanda de combustibles no renovables de origen fósil, los cuales presentan reservas limitadas y cuyo proceso de generación es a muy largo plazo. Por ello la búsqueda de otros tipos de combustibles renovables, que puedan generarse y cuyo tiempo de generación no se vea limitada por la demanda, siempre y cuando se obtengan de forma sostenible es una prioridad mundial.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

El bioetanol puede ser utilizado mezclado con gasolina convencional (5%), en los motores de los vehículos, donde cada vez más la industria del automóvil avanza en la creación de motores con mayor capacidad y rendimiento en la utilización de este biocombustible, los vehículos conocidos como “flexi-fuel” (pueden usar mezclas de bioetanol de hasta 90%). Otra de las aplicaciones que se llevan a cabo con la utilización del bioetanol es la obtención de bioetanol más isobutireno (ETBE), por parte de las petroleras, que es un componente oxigenado de las gasolinas, el cual se adiciona a estas para aumentar sus niveles de octanos. Además estos compuestos ETBE, son menos volátiles y mejores para su transporte y almacenamiento en las gasolinas que contenga este componente.

Otra de las ventajas que caracterizan a estos biocombustibles, como el bioetanol, es que proceden de vegetales, y esto hace que se reduzca la cantidad de gases liberados a la atmósfera, que intervienen en el aumento del efecto invernadero, todo lo contrario de lo que ocurre con los carburantes no renovables. Este papel beneficioso a nivel medioambiental se debe a que durante toda la vida del vegetal que es utilizado para la obtención de los biocombustible, éste actúa como “sumidero” de dióxido de carbono, mediante el proceso conocido como “Ciclo del carbono”, explicado previamente en este trabajo. Por otra parte, actúan también frente a otros gases liberados por los vehículos, que son compensados de forma parcial por la absorción de la materia orgánica durante su crecimiento. Más ventajas de los biocombustible son la reducción de la dependencia de petróleo extranjero, reducir la formación de la lluvia ácida, una menor producción de residuos,...

### 6. MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR, PARA LA EFICIENCIA DEL PROCESO.

#### 6.1. Incremento de celulosa amorfa.

El principal problema en la obtención de biocombustibles líquidos como el bioetanol, de origen vegetal, es la gran resistencia que ofrece el material lignocelulósico de las paredes celulares a procesos tanto mecánicos como enzimáticos para ser degradados. Por lo cual, uno de los principios experimentales que permiten disminuir esa resistencia es el aumento de la solubilidad de los polisacáridos de la pared, favoreciendo de esta forma el acceso enzimático. Por tanto se busca aumentar la cantidad de glucanos amorfos en la celulosa ya que, como se ha comentado, uno de los problemas principales en la degradación de la pared vegetal es la

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

gran presencia de microfibrillas de celulosa cristalinas, que son muy difícilmente degradables, a diferencia de los glucanos amorfos más fácilmente degradables.

### 6.2. Reducción de lignina.

Otro de los objetivos que se investigan y experimentan en la actualidad, tratan la posibilidad de generar paredes celulares vegetales con menor cantidad de lignina, para favorecer la degradación de las paredes celulares. Este hecho es muy importante no solo en el campo de la biorefinería, también en la industria forrajera, de papel,...

La lignina es un polímero complejo cuya unión a cualquier otro componente de la pared celular genera una trama difícilmente degradable. Otro aspecto importante se encuentra relacionado con la biosíntesis de este polímero: se trata de manipular la vía de síntesis de la lignina, que en última instancia puede generar un tipo de lignina u otro, puesto que existen tres variedades, que se sintetizan por rutas alternativas. Por manipulación de estas rutas y de las enzimas que intervienen en las mismas podemos favorecer la generación del tipo de lignina más fácilmente degradable, o que se caracterice por tener unas cualidades mejores para el procesamiento, a la vez que se inhibe o se reduce la biosíntesis de otro tipo de lignina que presente una mayor dificultad y aumente el gasto económico del proceso (Nookaraju y col. 2013).

### 6.3. Incremento de hexosas en los polisacáridos de la pared celular.

Uno de los principales problemas que se encuentran en el procesamiento de este recurso renovable, se centra en la fermentación de los azúcares, los cuales ofrecen resistencia a ser fermentados dependiendo de sus características. Los azúcares con estructura hexosa son fácilmente fermentables, en cambio las pentosas presentan mayor dificultad, aunque se han encontrado cepas bacterianas y de levaduras capaces de fermentar estas pentosas con gran eficacia. Así, uno de los objetivos principales en la mejora del proceso es que las paredes celulares, en concreto las hemicelulosas presenten mayor cantidad de hexosas que de pentosas en su constitución. Estos avances se podrían lograr con modificaciones a nivel de las rutas de biosíntesis de los polímeros como también por alteración del metabolismo del vegetal.

Tras el conocimiento de los distintas dificultades que se presentan en el proceso de obtención de bioetanol comentados anteriormente, se analizan una variedad de procesos de mejora que tratan de minimizar o disminuir estos problemas, de forma que se favorezca el proceso de obtención.

# PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Ariles

## 7. MEJORAS GENÉTICAS Y DE CULTIVO.

### 7.1. Síntesis y ensamblaje de los polisacáridos de la pared celular.

Una de las áreas mayormente estudiadas para el aumento del rendimiento y optimización en la producción de bioetanol, es el conocimiento de la variedad estructural de las celulosas en distintas especies, el tipo de pared celular, su grado de polimerización, la distribución de las microfibrillas, el grado de cristalización,... Características que pueden verter un mejor entendimiento en el aprovechamiento de esta fuente como materia prima.

El conocimiento sobre la ruta sintética de la celulosa es un hecho fundamental para que pueda ser manipulada correctamente. Tras la síntesis de la celulosa se genera una red de microfibrillas que permiten la deposición de otros componentes de la pared celular (hemicelulosas y pectinas) cuya síntesis se produce en el aparato de Golgi.

La interacción celulosa-hemicelulosa es mayor en la pared celular secundaria, debido al menor número de cadenas laterales en la hemicelulosa. El objetivo es, con respecto a la celulosa disminuir el número de enlaces de hidrógeno que unen a las microfibrillas de celulosa entre sí y en relación a las hemicelulosas aumentar el número de cadenas laterales que se unen a la cadena principal, de manera que se dificulte y reduzca las uniones de la hemicelulosa (de sus radicales laterales libres) con la celulosa, de forma que optimice el proceso de degradación de la pared (Akin 2007).

### 7.2. Aumento del contenido celulósico y de la biomasa vegetal.

El conocimiento de la vía de síntesis de la celulosa (**Figura 14**) y del genoma de *Arabidopsis*, han permitido descubrir factores de transcripción que regulan la síntesis de la pared celular de las plantas (Abramson y col. 2010). Estos factores de transcripción pueden ser utilizados para aumentar la velocidad de síntesis de la celulosa. Además la sobreexpresión de enzimas citosólicas y transmembrana pueden incrementar de forma adicional el proceso de síntesis.

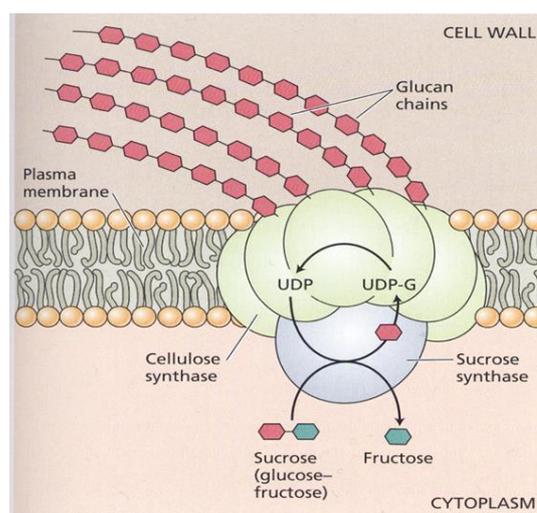


Figura 14. Síntesis de celulosa.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

Los principales modelos determinan que se puede acelerar la síntesis de celulosa por modulación de los sustratos. Esto ocurre por ejemplo en el caso de la UDP glucosa que es el sustrato para la síntesis de celulosa, que es canalizada por el complejo celulosa sintasa y regulada por la enzima sacarosa sintasa (SuSy). Aumentando la cantidad de UDP-glucosa por escisión de la sacarosa por (SuSy), se va liberar UDP-glucosa y fructosa. La invertasa es una hidrolasa que cataliza la escisión de la sacarosa en fructosa y glucosa, pudiendo variar los niveles de UDP-glucosa. La fructosa actúa como inhibidor competitivo de (SuSy), por lo que una disminución en los niveles de fructosa va a promover la actividad de (SuSy). La enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), se encarga de reciclar la fructosa para proporcionar el sustrato a (SuSy) de forma que reduce la cantidad del inhibidor de la síntesis de celulosa y recicla el sustrato para sintetizar celulosa (Abramson y col. 2010).

La sobreexpresión de los genes (SuSy) y UGPasa incrementa el crecimiento de la planta, el contenido en celulosa y la biomasa total (Pauly y Keegstra 2010).

### 7.3. Mejor acceso de las enzimas a la celulosa.

El principal inconveniente que tiene el uso del material lignocelulósico como materia prima de los biocombustibles, se basa en la difícil degradación e hidrólisis de la celulosa enzimáticamente. Como solución a esta problemática, se investigan mecanismos que faciliten la accesibilidad de las enzimas hasta la celulosa, lo que facilitará una mejor degradación del polisacárido.

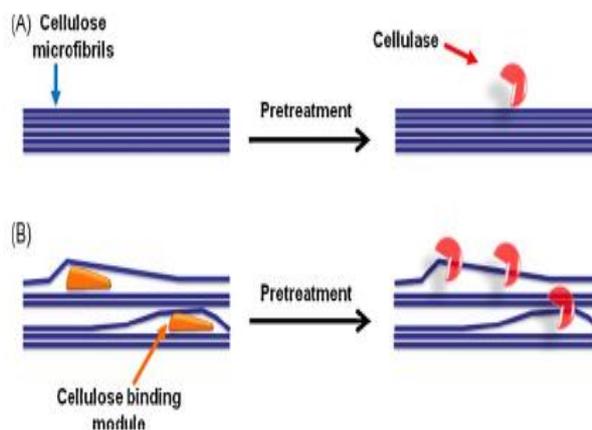
#### 7.3.1. Incremento de las cadenas de glucano amorfo de la celulosa.

La estructura de la celulosa es constituida por celulosa cristalina insoluble junto a elementos amorfos solubles, estos últimos son los más sensibles al proceso de hidrólisis enzimático. Lo que se quiere conseguir es interrumpir o disminuir la constitución de la celulosa cristalina. Para ello se han desarrollado distintas técnicas que cumplen en mayor o menor grado estos objetivos.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

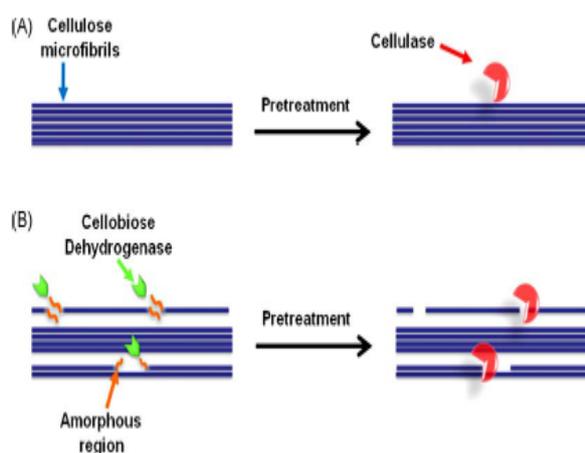
- Una de estas técnicas se basa en la expresión heteróloga de unos módulos de unión a carbohidratos microbianos (CBM) (**Figura 15**), que interrumpen la cristalización de la celulosa (Abramson y col. 2010). Tras este descubrimiento se planteó la hipótesis de que el CBM, actúa deslizando sobre las microfibrillas de celulosa, promoviendo la dispersión de la celulosa cristalina, de forma que permite un mejor acceso de las enzimas hidrolizantes (endoglucanasas, celulasas,...). La expresión de CBM en plantas transgénicas ha sido realizada en tabaco, álamo, patata, arroz y *Arabidopsis thaliana*.



**Figura 15. Módulos de unión a carbohidratos microbianos a la celulosa.**

Se ha observado que el grado de cristalización de la celulosa puede variar entre especies, (Harris y col. 2009) y la disminución en el grado de cristalización relativa aumenta la eficacia de liberación de azúcares, como se observó en distintos mutantes de *Arabidopsis* (Harris y col. 2012; Nookaraju y col. 2013), lo que facilita la posterior fermentación de los azúcares.

- En otras investigaciones se ha demostrado la actividad de una enzima extracelular que posee alta especificidad por la celulosa, la celobiosa deshidrogenasa (CDH), producida por ascomicetos y basidiomicetos (Abramson y col. 2010). Esta enzima favorece la acción de las celulasas en la degradación de la celulosa cristalina y previene la recondensación de los enlaces glicosídicos de la fibra de celulosa mellada por endoglucanasas. La expresión de CDH (**Figura 16**) produce la alteración de la red cristalina, debido a la modificación de la celobiosa a celobion- $(1,5)$



**Figura 16. Modelo de expresión de (CDH), para reducir la cristalización de la celulosa.**

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

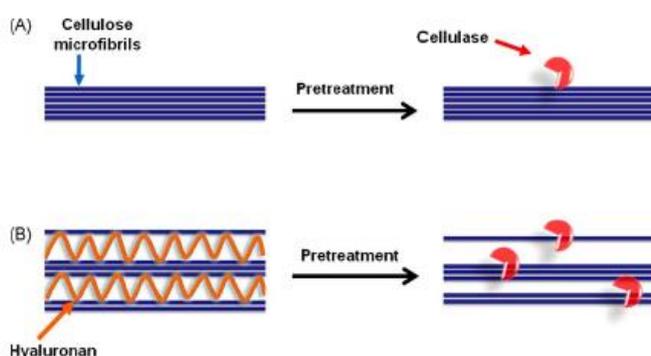
Francisco Santana Artiles

lactona por reducción de los enlaces de hidrógeno responsables de la estructura cristalina de la celulosa. En resumen, la expresión de la enzima celobiosa deshidrogenasa aumenta las regiones amorfas de la celulosa, facilitando la actividad de las enzimas hidrolíticas y favoreciendo que los tratamientos previos de extracción del biocombustible sean más suave.

Todas estas modificaciones a nivel celular pueden ocasionar efectos perjudiciales sobre el vegetal, afectando a su desarrollo, crecimiento, susceptibilidad a enfermedades, entre otros muchos efectos.

- Existe otro modelo novedoso cuyo objetivo es el aumento de polisacáridos solubles en agua.

En estos últimos años se descubrió esta técnica conocida como “Caballo de Troya” (**Figura 17**), desarrollada por obtención de plantas transgénicas a las cuales se le introducen genes exógenos que codifican enzimas responsables de la síntesis de polímeros solubles en agua.



**Figura 17. Modelo de expresión de polímeros exógenos en planta, “Caballo de Troya”.**

Estos polímeros son propios de la pared celular de algas o exopolisacáridos bacterianos como: hialuronano, quitosano, acetano, alginato, carragenina y levano, de los cuales se desconoce gran parte de sus rutas metabólicas y genéticas (Abramson y col. 2010).

Los polímeros son introducidos en la pared celular de las plantas. Estos polisacáridos deben presentar ciertas características como gran solubilidad en agua, que induzcan la formación de canales y que puedan diseñarse para ser excretados durante el desarrollo celular y para intercalarse en las fibras de celulosa, lo que permite una mayor penetración de las enzimas hidrolíticas y una mejor digestión durante la fase de extracción, siendo más sensibles a tratamientos alcalinos o ácidos, generando así mejores rendimientos durante la sacarificación.

Como resultado se obtuvieron plantas transgénicas con paredes celulares altamente porosas, pero con menor crecimiento a diferencia de las silvestres.

# PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

## 7.4. Alteración de la composición y abundancia de lignina en la pared celular.

La lignina es otro de los principales problemas existentes durante el procesamiento en la producción de bioetanol. En consecuencia lo que se intenta es disminuir su biosíntesis o que su degradación sea más fácil, sin que esto perjudique el desarrollo de la planta. Actualmente la ruta de síntesis de la lignina es bien conocida, los tres tipos de ligninas se sintetizan por rutas e intermediarios diferentes.

Las primeras técnicas realizadas para cumplir los objetivos se centraron en el silenciamiento o regulación de genes que codifican enzimas que intervienen en la síntesis de lignina. La regulación de un solo gen puede o no afectar la estructura de la lignina y aumentar o no su digestibilidad (revisado por Baucher y col. 2003).

Asociado a esta idea se podría limitar la actividad de la enzima hydroxycinnamoyl CoA shikimate una enzima clave en la ruta de síntesis de la lignina reduciendo o limitando la disponibilidad de shikimato necesario para que esta enzima actúe o de cualquier otra enzima participante en la ruta sintética de la lignina (Loque y col. 2015; Abramson y col. 2010; Carpita 2012).

Otros experimentos, se fundamentaron en la modificación de la síntesis o actividad de distintas enzimas que intervienen en la ruta sintética de la lignina (**Figura 17**), donde se concluyó que la modificación de estas enzimas facilita el proceso de sacarificación en distintos vegetales (Nookaraju y col. 2013).

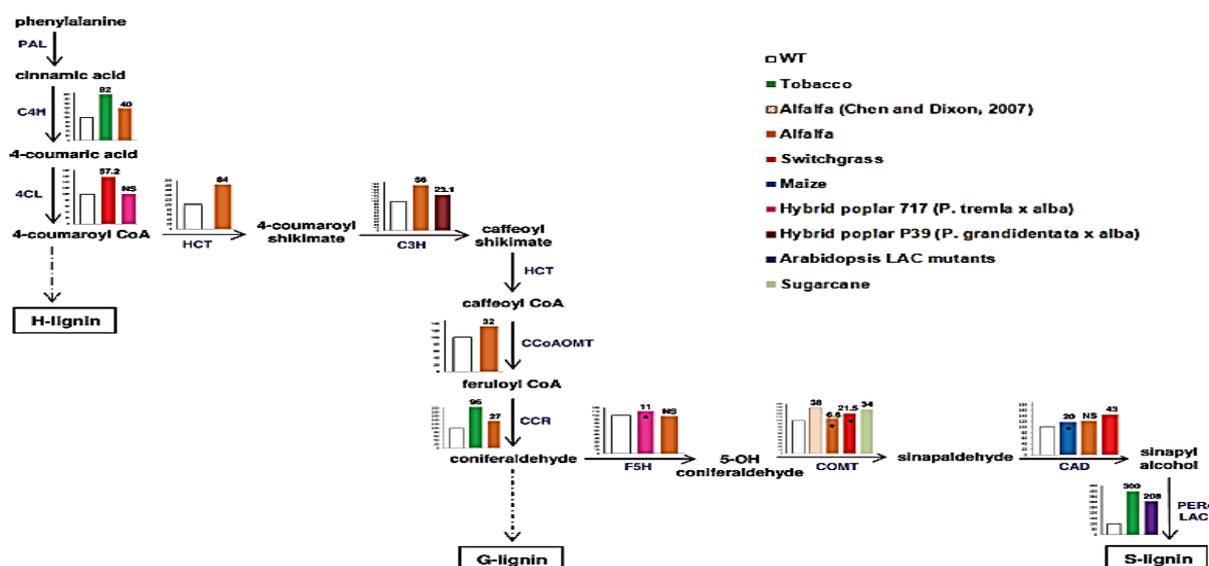


Figura 17. Manipulación de los genes de la lignina en diferentes especies de plantas, donde se demuestra mayor eficiencia en la sacarificación. Las barras representan la eficiencia expresada como porcentaje. Tipo salvaje (WT), la eficiencia de sacarificación en tallos WT se fijó en un 100% para facilitar la comparación. Valores no significativo (NS).

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

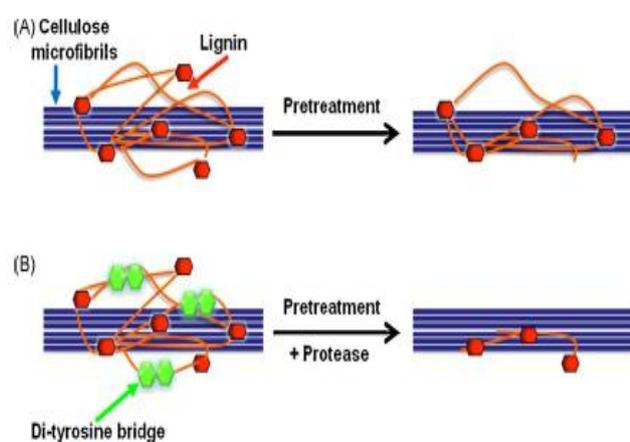
Francisco Santana Artilles

En otros experimentos el silenciamiento de genes que intervienen en la vía de síntesis de la lignina puede ocasionar efectos pleiotrópicos en los vegetales. Como ocurrió en determinados ensayos realizados en *Pinus radiata* y en plantas de tabaco, que provocaron enanismo y colapsos xilemáticos en las plantas. (Abramson y col. 2010).

Existen otros campos de investigación que se centran en la variación de la composición de la lignina. Esto se ha realizado en varias especies vegetales; por ejemplo, produciendo sustituciones de los promotores. En otros casos, se han incorporado nuevos monolignoles a la lignina que favorecen la degradación de este polímero en pretratamientos alcalinos suaves y también intervienen en una mejor sacarificación. La manipulación monomérica de la lignina permite reducir el grado de polimerización de la misma y favorecer su degradación, como ocurre cuando se unen a la lignina unidades de hidrógeno, que reducen el grado de polimerización y facilitan su extracción (Loque y col. 2015).

Se piensa también que la difícil degradación de la lignina puede deberse a las proporciones de unidades de siringil, guaiacil y P-hidroxifenil en la lignina. Por ello se busca variar las proporciones de estos alcoholes, de tal forma que la constitución final de la lignina modificada permita una mejor degradación.

Se ha desarrollado una técnica novedosa que permite un mejor acceso de las enzimas a la celulosa (Abramson y col. 2010), sin que se produzcan modificaciones en la morfología de la pared celular ni en el contenido en lignina (**Figura 18**). Este método se fundamenta en la introducción de péptidos ricos en tirosina unidos por puentes de di-tirosina, de tal forma que los radicales libres de los péptidos de tirosina se acoplan a la reticulación de la lignina siendo más sensible a procesos proteolíticos, permitiendo un mejor acceso a la celulosa, lo que facilita una mayor liberación de azúcares y en consecuencia una mejor extracción del biocombustible.



**Figura 18. Modelo de acoplamiento de péptidos ricos en tirosina en la estructura de la lignina.**

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artilles

### 8. PROBLEMAS ECONÓMICOS, SOCIALES, AMBIENTALES,...

En este tema de los biocombustibles no todo son ventajas. Los biocarburantes, sobre todo a nivel económico, presentan muchos inconvenientes principalmente en el procesamiento para su obtención. Y sí, es cierto que es un tipo de energía renovable de origen vegetal, y que tanto a nivel ecológico como ambiental es muy atractivo, pero el aspecto económico presenta una relevancia mayor. Los ciudadanos y, sobre todo, las empresas que comercializan y que producen estos biocarburantes no anteponen la salud medioambiental frente los objetivos económico de la empresa.

La producción de bioetanol de primera generación presenta un elevado coste económico; en primer lugar por el coste de las materias primas que se necesitan para su producción, debido a que estos cultivos están destinados a la alimentación humana y presentan gran demanda en el sector. Además estos cultivos requieren grandes superficies de suelo cuyo uso será sustituido por la explotación masiva de este tipo de vegetales afectando a la biodiversidad y al uso de los suelos. Otro aspecto negativo asociado a estas superficies de cultivo es la demanda de grandes cantidades de agua para su sustento, la disponibilidad de agua disponible debe ser adecuada; en caso contrario este factor va a afectar negativamente al rendimiento de los cultivos, así como al coste económico del proceso.

En cambio, con la obtención de bioetanol de segunda generación se consigue contrarrestar estos costos; las materias primas utilizadas son productos de desechos de los cultivos comentados anteriormente o cultivos bioenergéticos que no van a comprometer la alimentación humana y a su vez, permiten aprovechar estos restos vegetales con el fin de producir bioetanol. Asimismo, no se requieren de grandes extensiones de suelo y tampoco excesivas cantidades de agua para su mantenimiento. De forma que influye positivamente en la conservación de la biodiversidad y del uso de los suelos.

En la actualidad, y en particular en el estado Español, no es rentable económicamente la producción de biocombustibles, puesto que no se encuentran subvencionadas, lo que influye en los elevados precios de los biocombustibles a diferencia de los biocarburantes de origen fósil que son mucho más baratos, imposibilitando la competencia económica entre estos dos tipos de productos.

A nivel ambiental los biocombustibles presentan aspectos negativos, que se fundamentan en la liberación de gases a la atmósfera como el dióxido de carbono. Se debe tener en cuenta la

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artiles

cantidad de dióxido de carbono emitido no solo en el proceso de combustión en sí, sino la cantidad liberada en su producción, transporte y combustión. También se aumenta la emisión de óxidos de nitrógeno y otros muchos compuestos volátiles que pueden ocasionar la formación de ozono.

Por todos estos factores detallados y con el objetivo de impulsar la producción de los biocombustibles, se deben mejorar las técnicas y optimización de los recursos y procesos utilizados en la obtención de estos biocombustibles mejorando su rendimiento, influyendo positivamente en el aspecto económico de las empresas implicadas y también en beneficio medio ambiental y ecológico (Abramson y col. 2010). Estos deben ser los principales avances a realizar para reforzar y potenciar el uso de estos recursos renovables frente a los de origen fósil, en los próximos años, (Nookaraju y col. 2013).

### 9. CONCLUSIONS.

In view of the limitations on fossil fuels and demand for fuel, the production of second generation biofuels is one of the most appropriate measures to eradicate this global problem solutions, being important the search for improved raw materials, referring to the cell walls vegetables. This is essential to gain a better understanding of the routes of synthesis of the various components of the cell wall, genetically engineered to improve facilitate the production of these biofuels.

The main improvements generated to reduce the cost in the process of biofuel production focus on (1) increase in plant biomass, (2) increase in glucan chains amorphous cellulose, (3) increase in hexoses of cell wall polysaccharides, (4) lignin reduction or modification to make it degradable. Thus, it is possible to improve saccharification of sugars and to reduce the cost generated in the previous treatments.

Thus, if the objectives are reached and new manipulation techniques that improve are generated, biofuels, will gradually replace the fossil fuels in the future.

## 10. REFERENCIAS.

### ▪ Artículos y libros.

1. ABC de los biocarburantes. Asociación española de operadores de productos petrolíferos.
2. **Abramson, M.; Shosejov, O.; Shari, Z. (2010).** Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. *Plant Science*. 178, 61 - 72.
3. **Akin, D.E. (2007).** Grass lignocellulose – strategies to overcome recalcitrance. *Application Biochemical Biotechnology* 137, 3 - 15.
4. **Alvarez–Castillo, A.; Salgado–Delgado, R.; García–Hernández, E.; Domínguez–Domínguez, M.M.; Granandos–Baeza, J.M.; Aguirre–Cruz, A.; Carmona–García, R.; Morales–Cepeda, A.; Herrera–Franco, P.J.; Licea–Claverie, A.; Mendoza–Martínez A.M. (2012).** Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Revista iberoamericana de polímeros*. 13, 140 - 150.
5. **Azcón, J.; Talón, M. (2008).** *Fundamentos De Fisiología Vegetal*. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
6. **Barceló, J.C.; Sabater, B.G.; Sánchez, R.T.; Nicolás, G.R. (2000).** *Fisiología Vegetal*. Editorial Pirámide.
7. **Baucher, M.; Halpin, C.; Petit-Conil, M.; Boerjan, W. (2003).** Lignin: genetic engineering and impact on pulping, *Critical Review Biochemical Molecular Biology* 38, 305 - 350.
8. **Carpita, N.C. (2012).** Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: new ideas for improving biomass for bioenergy. *Current Opinion in Biotechnology*. 23, 330 - 337.
9. **Dobbelaere, S.; Anthonis, T.; Soetaert, W. (2014).** Conversion technologies for the production of liquid fuels and biochemical. *Cellulosic Energy Cropping Systems*, Primera Edición. Ed: Douglas L. Karlen. John Wiley & Sons, Ltd.
10. **Field, C.B.; Behrenfeld, M.J.; Randerson, J.T.; Falkowski, P. (1998).** Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*. 281, 237 - 240.
11. **Harris, D.; Stork, J.; DeBolt, S. (2009).** Genetic modification in cellulose-synthase reduces crystallinity and improves biochemical conversion to fermentable sugar. *Global Change Biology Bioenergy*. 1, 51– 61.

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

Francisco Santana Artilles

12. Harris, D.M.; Corbin, K.; Wang, T.; Gutierrez, R.; Bertolo, A.L.; Petti, C.; Smilgies, D.M.; Estevez, J.M.; Bonetta, D.; Urbanowicz, B.R.; Ehrhardt, D.W.; Somerville, C.R.; Rose, J.K.; Hong, M.; Debolt, S. (2012). Cellulose microfibril crystallinity is reduced by mutating C-terminal transmembrane region residues CESA<sup>1A903V</sup> and CESA<sup>3T942I</sup> of cellulose synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. 109, 4098 – 4103.
13. Loque, D.; Scheller V.H.; Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. Current Opinion in Plant Biology. 25,151 – 161.
14. Nookaraju, A.; Pandey K.S.; Bae, H.; Joshi P.C. (2013). Designing Cell Walls for Improved Bioenergy Production. Molecular Plant 6, 8 – 10.
15. Pauly, M.; Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. The Plant Journal 54, 559 – 568.
16. Pauly, M.; Keegstra, K. (2010). Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. Current Opinion in Plant Biology 13, 1 – 8.
17. Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.M.; Murphy, A. (2015). Plant Physiology and development. (6ª Edición). Ed: Sinauer Associates, Inc (U.S.A.)

- Páginas webs.

<https://bibliotecadeamag.wikispaces.com> [Consultado: 04/03/2016].

<http://www.bivica.org/upload/biocombustibles-situacion.pdf> [Consultado: 04/03/2016].

<http://blog.udlap.mx/blog/2013/06/bioetanol/> [Consultado: 04/03/2016].

<http://www.botanical-online.com/maiz.htm> [Consultado: 10/03/2016].

<http://www.botanical-online.com/medicinalseucalipto.htm> [Consultado: 10/03/2016].

<http://www.botanical-online.com/medicinalscanadeazucar.htm> [Consultado: 10/03/2016].

<http://www.botanical-online.com/sorgo.htm> [Consultado: 10/03/2016].

<http://www.botanical-online.com/tiposdealamos.htm> [Consultado: 10/03/2016].

<http://www.botanical-online.com/trigo.htm> [Consultado: 10/03/2016].

<http://f10freddy10.blogspot.com.es/2008/09/botanica.html> [Consultado: 10/03/2016].

<http://www.maderas.com/eucalip-car.htm> [Consultado: 10/03/2016].

## PLANT CELL WALL IN BIOFUEL PRODUCTION

---

**Francisco Santana Artiles**

[http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1982\\_07.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1982_07.pdf)

[Consultado: 15/03/2016].

<http://www.miliarium.com/Bibliografia/Monografias/Biocombustibles/EtapasProcesoproduccionBioetanol.asp> [Consultado: 30/03/2016].

<http://www.parquebotanicodejaulin.com/ficha/21/alamo-blanco-o-chopo-blanco.html>

[Consultado: 30/03/2016].

<http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=58>

[Consultado: 05/04/2016].