

## Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética

Claudia Martínez-Anaya,\* Edgar Balcázar-López,\* Edgar Dantán-González\* Jorge L. Folch-Mallol\*

**RESUMEN.** La actual demanda de gasolinas para uso automotriz y la creciente escasez de combustibles fósiles han provocado una intensa búsqueda de sustitutos energéticos. El bioetanol de primera generación es un compuesto alterno o complementario a las gasolinas que es producido mediante procesos biológicos a partir de la fermentación de sacarosa o almidón provenientes de la caña de azúcar y el maíz, respectivamente. Por otro lado, la biomasa vegetal como materia prima tiene grandes ventajas sobre estos compuestos, sin embargo, debido a su naturaleza altamente recalcitrante se requieren de enzimas con grandes capacidades degradativas que permitan su uso a niveles industriales. Los hongos producen tanto ligninasas como celulasas capaces de degradar todos los componentes de la madera. En esta revisión se analizan los descubrimientos más recientes de los aspectos biológicos de las celulasas de origen fúngico y sus usos en la industria energética, en el campo de la producción de biocombustibles de segunda generación.

**Palabras clave:** Materiales lignocelulósicos, celulasas, hongos, biocombustibles.

### LA CELULOSA

Las maderas están compuestas principalmente de tres polímeros estructurales, la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. La lignina es un heteropolímero fenólico sin una composición estereoquímica regular, con una función protectora de los otros dos componentes polisacáridos, la celulosa y la hemicelulosa (colectivamente llamados holo-celulosa) (Aust, 1995; Masai et al., 2007). La celulosa es el componente más abundante que existe sobre la tierra, es producida por las plantas formando parte de su pared celular (Plomion et al., 2001). En menores proporciones, es sintetizada también por algunos otros organismos como bacterias, como las del género *Acetobacter*, *Agrobacterium*,

**ABSTRACT.** The existing petrol demand for automobile use and the increasing lack of fossil fuels has provoked an intense research for energy substitutes. First-generation bioethanol is an alternative or complementary compound to gasoline which is produced by the biologic fermentation of sucrose and starch, from sugarcane and corn, respectively. On the other hand, vegetal biomass as a feedstock presents several advantages over these compounds, however given its recalcitrant nature it requires hydrolytic enzymes with elevated degradative capabilities to permit its use at industrial level. Fungi produce both, ligninases and cellulases able to degrade all wood components. In this review we will analyze the latest discoveries on the biological aspects of cellulases from fungal origin and their applications for the energy industry, in special in the field of the so-called second-generation biofuels production.

**Key words:** Lignocellulose, cellulases, fungi, biofuels.

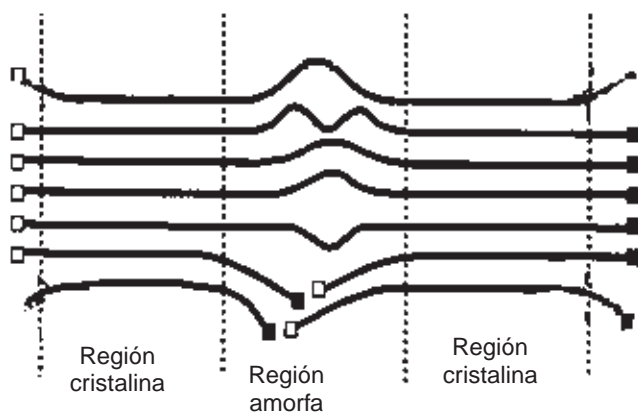
*Rhizobium* y *Sarcina* (entre otras) (Czaja et al., 2007; Ross et al., 1991), y algunos representantes del phylum Chordata (o tunicados), que son un tipo de animales marinos (Sasakura et al., 2005; van den Berg et al., 2007).

La celulosa es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, la pulpa, las maderas, etc. (Eriksson, 1989; Lynd et al., 1999). Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra (Kadla & Gilbert, 2000). El contenido de celulosa en las plantas depende del grupo taxonómico al que pertenezcan y oscila entre 35 y 50% en peso seco. La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de un número de moléculas (pectinas, proteínas, almidón y lípidos), y la hemicelulosa y la lignina que comprenden del 20 al 35%, y del 5 al 30% en peso seco, respectivamente (Peters, 2006).

**Estructura química de la celulosa.** La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo  $\beta$  1-4. Los ex-

\* Laboratorio de Biología Molecular de Hongos. Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB). Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Cuernavaca Morelos, México.

tremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico ( $C_1$ ) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes (como el cobre, etc.), y se conocen como extremos reductores. Mientras que el  $C_4$  con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Pettersen, 1984). El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de van der Waals, y consiste de 30 moléculas lineales, de entre 10,000 y hasta 14,000 moléculas de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd et al., 2002). Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) y hasta las desordenadas (región amorfa) (Figura 1). La característica cristalina de la celulosa se debe a que los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados muy compactamente mediante puentes de hidrógeno. Usando difracción por rayos X se ha determinado que una unidad básica de celulosa cristalina (conocida como tipo I) está formada por ocho moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa) arregladas en capas de moléculas paralelas mediante interacciones débiles (ínter e intramoleculares) entre los átomos de glucosas adyacentes (Pettersen, 1984). Aunque existen otros tipos de celulosas cristalinas, la más importante es la celulosa tipo II, que se obtiene de la regeneración de la celulosa nativa después de haber sido tratada con bases fuertes para solubilizarla (Pettersen, 1984). La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solven-



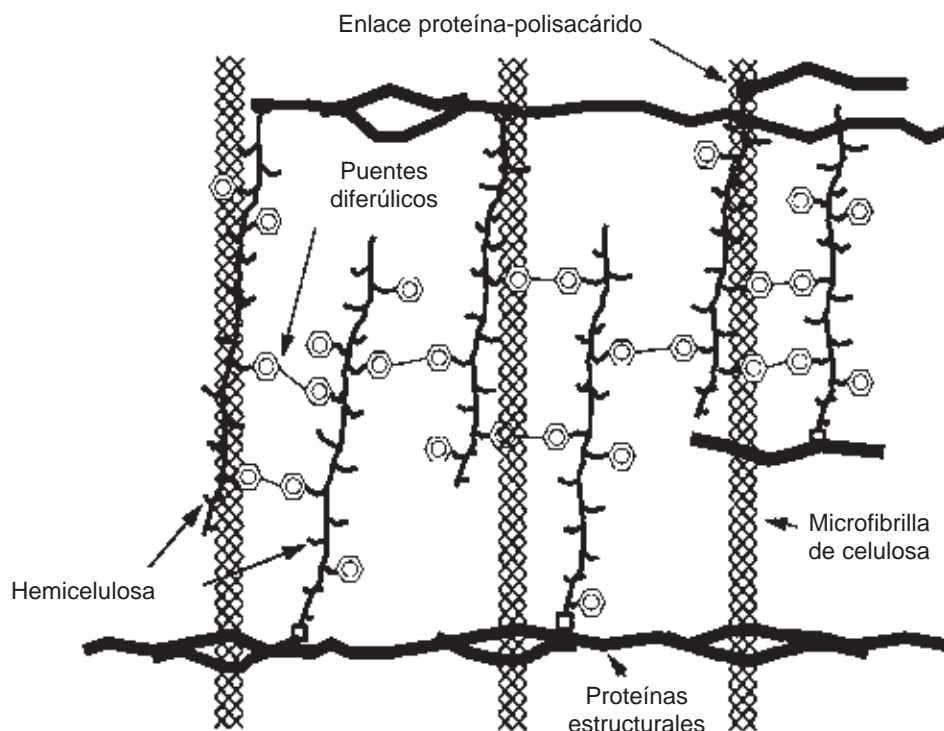
**Figura 1.** Los diferentes tipos de organización de las fibras de celulosa generan dos conformaciones diferentes: ordenadas, que comprenden la región cristalina, y desordenadas, que forman la región amorfa. Modificada con autorización de (Lynd et al., 2002).

tes, incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. A este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel et al., 2007). Las regiones menos ordenadas se conocen como celulosa *para*-cristalina, y las regiones amorfas están compuestas de estructuras secundarias, que se encuentran en menor proporción dentro del arreglo molecular de la celulosa, tales como microfibrillas en formas de rosca o vueltas, o regiones vacías que dan forma a microporos superficiales, grandes hoyos y capilares. La celulosa amorfa por estas razones es menos compacta que la región cristalina, por lo que tiene la capacidad de absorber moléculas de agua que le confieren gran flexibilidad y cierta solubilidad (Cowling, 1975).

**La hemicelulosa.** La hemicelulosa por su parte, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea. Está formada de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y *p*-cumárico) (Wilder & Albersheim, 1973). Las hemicelulosas son polidispersas (lo que significa que tienen un grado de polimerización variable) y altamente ramificadas, con sustituyentes de diferentes tipos (Saha, 2003; Wong et al., 1988). La frecuencia y composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas (Puls et al., 2005). Se han identificado dos tipos de hemicelulosa: en las maderas duras ésta existe mayormente en forma de xilanos, en las que los esqueletos homopoliméricos del xilano son cadenas de residuos de  $\beta$ -D-xilopiranososa con uniones 1,4. Mientras que las maderas suaves contienen principalmente glucomanano. Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa (Figura 2), al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura (Bidlack et al., 1992). Estas propiedades, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos.

#### ORGANISMOS DEGRADADORES DE CELULOSA

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia. Sin embargo, debido a su carácter recalcitrante solamente ciertos organismos (como bacterias y hongos) producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Béguin & Aubert, 1994). Se han identificado dos importantes grupos con capacidades celulolíticas. El primero de ellos es el grupo anaeróbico, que comprende especies bacterianas y fúngicas habitantes de aguas residua-



**Figura 2.** Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular. Las barras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa (unida entre sí por puentes diferúlicos) y proteínas estructurales (líneas negras). Modificado de (Saha, 2003).

les y el rumen y tracto intestinal de los animales herbívoros y algunos insectos como escarabajos y termitas (Cazemier et al., 2003; Warnecke et al., 2007). Como ejemplos bacterianos pertenecientes a este grupo, entre otros, se encuentran los géneros *Clostridium* y *Ruminococcus*. Mientras que algunos hongos identificados son: *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllumyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces* sp. y *Piromyces* sp. (Doi, 2007; Teunissen & Op den Camp, 1993). El segundo grupo incluye especies aeróbicas habitantes de los suelos, especialmente los boscosos, tales como las bacterias *Cellulomonas* (Elberson et al., 2000) y *Streptomyces* (Alani et al., 2008), y los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian & Valaskova, 2008; Martínez et al., 2005).

La pudrición blanca de la madera la llevan a cabo en el 96% de los casos hongos de la familia *Polyporaceae*, tales como *Panus*, *Polyporus*, *Pycnoporus* y *Trametes* (Martínez et al., 2005). Consiste en la muy eficaz degradación de la lignina que como consecuencia, en algunos casos, resulta en una apariencia blanquecina de la madera. En la pudrición blanca la descomposición de la lignina es llevada a cabo por sistemas enzimáticos de fenol-oxidasas, peroxidadasas y lacasas, que permiten el fácil acceso a la holocelulosa que constituye una excelente fuente de carbono (Aust, 1995). Por otra parte, el mecanismo de degradación y los sistemas enzimáticos de los hongos de la pudrición café (o marrón), son menos conocidos e incluso controver-

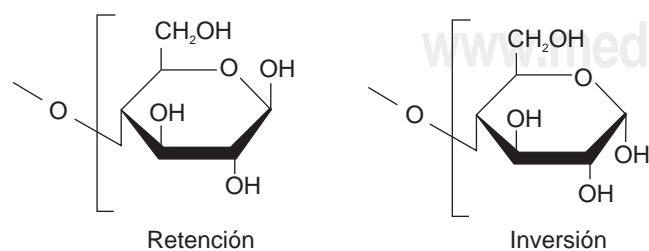
tidos. Se sabe que estos hongos no contienen sistemas de peroxidadasas para la degradación extensiva de la lignina y que el ataque inicial es directamente sobre la holocelulosa. Los modelos más recientes consideran que el agente despolimerizante inicial son radicales libres hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) generados no enzimáticamente mediante una reacción de Fenton con  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracelular (Ander & Marzullo, 1997). Algunas enzimas identificadas en este proceso son: celobiosa deshidrogenasa, alcohol oxidasa y un sistema de quinonas formado por la 2,5-dimetoxihidroquinona (2,5-DMHQ) y el 4,5-dimetoxicatecol (4,5-DMC) (Ander & Marzullo, 1997; Daniel et al., 2007; Hyde & Wood, 1997; Suzuki et al., 2006).

*Trichoderma reesei* es un ascomiceto del que históricamente se han aislado celulasas y xilanasas con aplicaciones industriales (en las industrias de los alimentos –humana y animal, farmacéutica, textil, del papel y la pulpa, y energética), por lo que sus enzimas han sido ampliamente estudiadas y han servido como modelo de la degradación de la celulosa (Druzhinina et al., 2006; Esposito & da Silva, 1998; Nevalainen et al., 1994).

**Sistemas celulolíticos.** Los microorganismos encargados de la degradación de sustratos celulósicos producen múltiples enzimas que actúan en sinergismo directamente sobre la celulosa (Murashima et al., 2003; Nidetzky et al., 1994). Un tipo de enzimas de bacterias anaeróbicas actúan a través de un complejo multimérico asociado a la célula, en el que una proteína no catalítica sirve de andamio a las

varias subunidades enzimáticas mediante interacciones proteína-proteína de tipo cohesina-dockerina. A este complejo se le conoce como celulosota (Bayer et al., 2004). Por otra parte, las celulasas de muchas otras bacterias aeróbicas y las fúngicas, son solubles y actúan de forma independiente (Ng, 2004).

Las celulasas son glicosil hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales (Figura 3). Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición  $\beta$  (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Withers, 2001). Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos ([www.cazy.org/fam/acc\\_GH.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html)). Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Henrissat & Romeu, 1995). De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos. *Endocelulasas*. También denominadas endoglucanasas. Éstas son 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas (Baldrian & Valaskova, 2008; Goedegebuur et al., 2002; Henrissat & Bairoch, 1993). Las endocelulasas actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales. *Exocelulasas*. Son también conocidas como exoglucanasas, y actúan procesivamente en los extremos terminales del polímero liberando ya sea moléculas de glucosa, las glucohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91) (Baldrian & Valaskova, 2008).  *$\beta$ -glucosidasas*. Son enzimas  $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecientes a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas y se encargan de degradar la celobiosa a monómeros de glu-

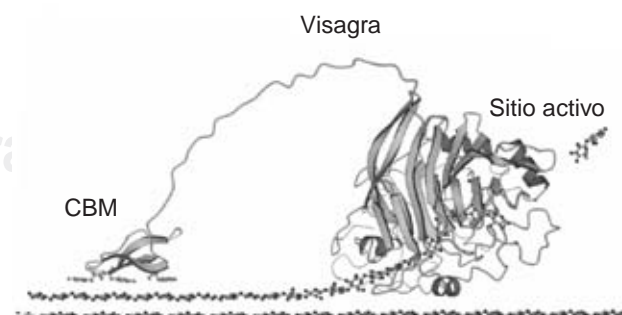


**Figura 3.** Las dos posibles configuraciones de carbono anomérico de la glucosa después de la hidrólisis de celulosa:  $\beta$  (a la izquierda), lo que indica un mecanismo de retención, y  $\alpha$  (a la derecha) indica inversión.

cosa (Baldrian & Valaskova, 2008; Lynd et al., 2002; Schmid & Wandrey, 1987).

Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas fúngicas han evolucionado mecanismos sinérgicos que les permiten contender con su recalcitrancia (Henrissat et al., 1985). Este fenómeno se refiere a la observación de que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Nidetzky et al., 1994).

*Sinergismo modular*. Muchas celulasas presentan una estructura modular. Típicamente, un péptido no catalítico comprende el módulo con la función de unión a carbohidratos (conocido como CBM). Éste se une mediante una bisagra flexible de aminoácidos hidroxilados (Ser y Tre) y altamente glicosilados, al siguiente módulo en donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima, aproximándolo íntima y prolongadamente al sustrato y potenciando su acción (Figura 4) (Linder & Teeri, 1996). También se conocen enzimas compuestas de varios CBM y módulos catalíticos. Los CBM se clasifican a su vez, en familias según su secuencia de aminoácidos, y los fúngicos mayoritariamente constituyen la familia 1 ([www.cazy.org/fam/acc\\_CBM.html](http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html)). Los CBM contienen desde 30 y hasta 200 aminoácidos, localizados hacia los extremos carboxilo o aminoterminal, aunque ocasionalmente se encuentran posicionados en el centro de la cadena polipeptídica. A pesar de que cada familia de CBMs tiene características únicas se sabe que su afinidad por la celulosa se debe en parte a su superficie planar compuesta de aminoácidos aromáticos que le proporcionan cualidades hidrofóbicas (Hilden & Johansson, 2004). Se sabe también que mediante un mecanismo no catalítico el CBM de la endoglucanasa III de *T. reesei* altera la estructura de la celulosa cristalina (Xiao et al., 2001). Otra evidencia del papel del CBM en la modificación de la estructura de la celulosa, es que sus homólogos en plantas, las expansinas (involucradas en la expansión de la pared celular durante



**Figura 4.** Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa. Se muestra el módulo catalítico en forma de túnel (liberando una molécula de celobiosa), la visagra flexible y el CBM unido a la celulosa. Modificado con autorización de C. Divne.



el crecimiento), tienen actividades no hidrolíticas sobre las interacciones entre la celulosa y la hemicelulosa (Cosgrove, 2000).

El siguiente nivel de sinergismo ocurre entre las diferentes enzimas secretadas al medio externo. Aunque los mecanismos que estas enzimas utilizan para potenciar su acción son controvertidos se han propuesto diferentes modelos (Valjamae et al., 1998), de los que sobresalen los siguientes: *Sinergismo exo-endo*. En éste las endoglucanasas inician el ataque de la molécula en los múltiples sitios internos de las regiones amorfas de la fibrilla y crean extremos terminales para el subsecuente ataque de las exoglucanasas. Las endoglucanasas también modifican la estructura de la celulosa al reducir las fuerzas de cohesión entre las fibrillas, lo que resulta en el hinchamiento de la estructura que permite un mejor acceso a las celobiohidrolasas (Josefsson et al., 2008). *Sinergismo exo-exo*. Se descubrió al analizar dos celobiohidrolasas de *T. reesei* (Cel7A/CBHI y CBHII), y observar que las actividades de las dos era mayor que la suma de las actividades individuales (Barr et al., 1996). Se ha descubierto que estas enzimas tienen al sitio catalítico embebido en un túnel con sitios (desde 6 hasta 10) de unión para glucósidos. Estos sitios de unión permiten que la enzima siga en contacto con la hebra de glucano, aun después de la hidrólisis de la celobiosa (que es liberada del extremo más lejano del túnel; Figura 4) lo que resulta en una alta procesividad (Kipper et al., 2005). El pretratamiento de celulosa con Cel7A/CBHI (que degrada el extremo reductor), con CBHII (que actúa sobre el no reductor), la hace más susceptible que si se tratara con cada enzima individualmente, debido a que la acción de la primera enzima expone cadenas ocultas que son sustrato de la siguiente (Eveleigh, 1987). La combinación de estas dos enzimas es tan potente que llevan a cabo la solubilización de cristales de celulosa, a baja velocidad, aun en ausencia de endoglucanasas (Teeri, 1997).

Inicialmente, los sistemas celulolíticos que recibieron mayor atención fueron los de organismos productores de grandes cantidades de enzima, tales como *T. reesei* y *Phanerochaete chrysosporium*. Este último degrada la celulosa y la hemicelulosa y es uno de los pocos basidiomicetos que se han utilizado como modelo para el estudio de la degradación de celulosa. Del análisis de la secuencia de su genoma se han predicho 240 enzimas que actúan sobre carbohidratos, de las que 40 son probables endoglucanasas, 7 celobiohidrolasas y 9  $\beta$ -glucosidasas (Martínez et al., 2004). En *P. chrysosporium* también ha sido detectado el sinergismo de tipo endo-exo, en el que la endoglucanasa 28 y la celobiohidrolasa II actúan sinérgicamente para degradar microcelulosa cristalina comercial (Henriksson et al., 1999). Actividades celulolíticas hacia la celulosa amorfa y la cristalina, y dos tipos de xilanos han sido ob-

servadas también en otros dos basidiomicetos de la pudrición blanca (*Bjerkandera adusta* y *Pycnoporus sanguineus*) (Quiroz-Castañeda, enviado).

## REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CELULASAS

El estudio de la regulación de los promotores de los genes que codifican para estas enzimas se ha realizado en algunos hongos, e incluye celobiohidrolasas, endoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas, endoxylanasas y  $\beta$ -xylosidasas. Su expresión es regulada por tres mecanismos principales, *i*) la regulación por activadores específicos, *ii*) por activadores universales que controlan la expresión de más de un gen, y *iii*) mediante la regulación integradora (Suto & Tomita, 2001).

Se ha determinado que la expresión de celulasas y hemicelulasas está controlada principalmente por fuentes de carbono. En presencia de D-glucosa la transcripción se encuentra reprimida, mientras que en ausencia de ésta y en la presencia de celulosa la transcripción es fuertemente inducida. Aún más, las enzimas celulolíticas pueden co-inducirse por diversos mono y disacáridos, como soforosa, xylobiosa, lactosa, D-xylosa y L-sorbosa (Suto & Tomita, 2001).

Por otro lado, la represión de la expresión por glucosa en especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* está mediada por los represores catabólicos Cre1 y CreA, respectivamente, similares a Mig1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Hou et al., 2007; Murray et al., 2003). Este represor reconoce específicamente la secuencia 5'-SYGGRG-3' en los promotores de los genes regulando negativamente la transcripción (Suto & Tomita, 2001). Sin embargo, en *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) sólo algunas de las principales hidrolasas (Cel7A/CBHI y XYN1) están bajo el control directo de Cre1, y otros genes como CBHII, XYN2 y Bgl1 se regulan de forma independiente de Cre1. En *Aspergillus niger*, el sistema xylanolítico se encuentra bajo el control de XlnR, que es un regulador transcripcional central de tipo GAL4 (Wurleitner et al., 2003; Zeilinger et al., 2003) que, presumiblemente, no sólo es el regulador de la expresión de más de 20 genes involucrados en la degradación de xilano, sino también de la expresión de genes de la degradación de celulosa (Rauscher et al., 2006). En *H. jecorina*, se ha descrito que Xyr1 es un ortólogo de XlnR, con funciones similares pero con mecanismos diferentes (Stricker et al., 2006). En un trabajo desarrollado con el sistema de un-híbrido, se determinó que ACE II es un activador esencial y universal para el control de la transcripción de celulasas y hemicelulasas (Liu et al., 2004). XlnR y Xyr1, trabajan en coordinación con por lo menos tres activadores, Ace1, Ace2 y Hap2/3/5, sin embargo los mecanismos de activación no son del todo claros (Schmoll et al., 2004; Wurleitner et al., 2003). Se ha propuesto un mecanismo coordinado de XlnR y Xyr1 y los

activadores, en el que la acción combinada de los mismos regula la expresión de genes como Xyn2, que presenta una expresión basal mediada por Hap2/3/5 y XlnR. Aunque Xyn2 es expresado por Ace2 en condiciones de inducción, al parecer sin asociación con XlnR (Wurleitner et al., 2003). En el caso de la expresión de Xyn1, la actividad del complejo Xyr1/Ace1 reprime la expresión de Xyn1 en concentraciones de glucosa y presencia de Aip (*Ace1-interacting protein*). Por otro lado, en presencia de celulosa se forma el complejo Xyr1/Xyr1 activador de Xyn1 (Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2008).

La búsqueda de fuentes de carbono alternas que permitan una alta expresión de celulasas es esencial para la industria y en la expresión heteróloga de estos genes. La lactosa es muy utilizada debido a su bajo costo y abundancia; y los mecanismos de regulación por lactosa han comenzado a esclarecerse. Se ha caracterizado el papel de GAL1, una galactocinasa de *Hypocrea jecorina*, como activador esencial de los genes celulolíticos en presencia de lactosa (Hartl et al., 2007; Seiboth et al., 2004). La sobreexpresión de BGA1, un gen que codifica para una galactosidasa extracelular, reprime la expresión de genes celulolíticos, sin embargo, su delección no tiene efectos en la expresión de celulasas (Seiboth et al., 2005). Mediante bancos sustraídos de cDNA se ha determinado que algunos genes son expresados únicamente en presencia de celulosa, pero no con soforosa o lactosa (Schmoll et al., 2004). Al analizar el transcriptoma de enzimas involucradas en la degradación de biomasa, (Foreman et al., 2003), describieron un número importante de genes que codifican para enzimas degradadoras, pero también un conjunto de proteínas relacionadas con el transporte, secreción y modificación de estas enzimas, demostrando así mismo que la soforosa es mejor inductor que la lactosa (Foreman et al., 2003).

Debido a la importancia económica de las celulasas, su regulación durante la degradación de la biomasa ha tenido más atención. Sin embargo, se sabe que eventos bióticos y abióticos afectan también la expresión de estos genes. El gen *Env1* es expresado en condiciones de inducción por celulosa. *Env1* codifica una proteína pequeña miembro de la familia de dominios PAS/LOV, relacionadas con la regulación en respuesta a la luz. Se ha observado que mutantes de *H. jecorina* en *env1* son incapaces de expresar celulasas, aun en condiciones de inducción (Schmoll et al., 2005; Schmoll & Kubicek, 2005).

### CELULASAS EN LA INDUSTRIA ENERGÉTICA: BIOCOMBUSTIBLES

El reto principal de la industria y la biotecnología en la producción de combustibles es la bioconversión de la celulosa, por lo que las celulasas han adquirido una importancia enorme en estos procesos. Para contender con los grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos requeridos en la producción de etanol a niveles industriales, se hacen necesarias enzimas con altas actividades en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH (Sun & Cheng, 2002). En la Figura 5 se muestra un resumen del proceso de obtención de etanol, y a continuación se detallan algunos pasos del proceso.

*Sustratos celulósicos.* La producción mundial de bioetanol en 2007 fue de  $50 \times 10^9$  millones de litros, lo que equivale a más de cuatro veces de lo que se produjo en 2003 (Tollefson, 2008). Sin embargo, este aumento cubre solamente el 1% de las necesidades totales de combustible. Algunos estudios han demostrado la no sustentabilidad de la tecnología actual que emplea maíz y caña de azúcar como materias primas en los principales países productores (Esta-

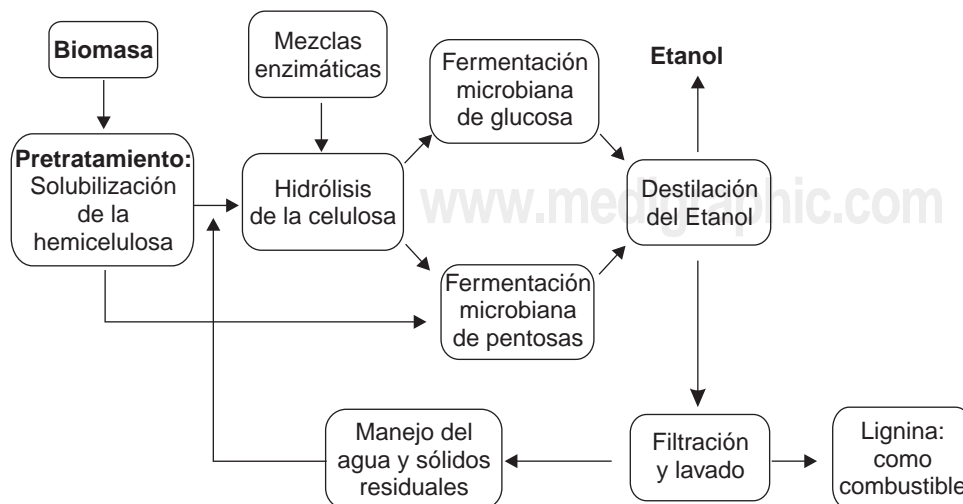


Figura 5. Pasos del proceso de producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos.

dos Unidos de América y Brasil, respectivamente) (Hill et al., 2006). Además de que las prácticas agrícolas actuales son dañinas al medio ambiente debido a la erosión de los suelos (privándolos de N y P), y la contaminación del agua que generan, lo que reduce los beneficios asociados a la limpieza del uso de etanol (Simpson et al., 2008).

El concepto de la utilización de celulosa como materia prima de azúcares que puedan ser bio-convertidos a combustibles mediante el empleo de microorganismos, ha retomado gran importancia en los últimos años debido a los altos precios del petróleo y a las inconveniencias de los cultivos mencionados (Sun & Cheng, 2002; Wackett, 2008a). Las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera (en forma de aserrín), los agrícolas (bagazos), y los domésticos (jardinería) (Lin & Tanaka, 2006). Sin embargo, una variedad de pastos de crecimiento rápido podrían ser una posibilidad más real mientras se desarrollan las tecnologías que permitan el uso de otros sustratos. Las especies estudiadas hasta el momento son: *Panicum virgatum* (Sarath et al., 2008; Schmer et al., 2008), *Pennisetum purpureum* (Anderson et al., 2008), y *Miscanthus x giganteus* (Murnen et al., 2007), este último originario del Este de Asia, ha podido sembrarse en América y Norte y Sur de Europa. *Miscanthus x giganteus* un tipo de pasto alto perenne que presenta grandes ventajas, crece con altos rendimientos (7.41 kg/m<sup>2</sup> [es decir, aproximadamente 30 toneladas/acre] en el Sur de Europa) en suelos poco fértiles y con mínimos requerimientos de fertilizantes, nitrógeno, herbicidas y agua. Su contenido de celulosa es mayor al de muchos residuos agrícolas y semejante al de las maderas duras. Se han logrado rendimientos de sacarificación de glucano y xilano de *Miscanthus*, tan altos como 90-95 y 80-85%, respectivamente, mediante el tratamiento químico conocido como AFEX (ver adelante), seguido de mezclas comerciales de celulasas, xilanasas, pectinasas y Tween-80 (Murnen et al., 2007). Estrategias de cultivos mixtos de pastos nativos de Norteamérica han demostrado ser más limpios, ya que la liberación de CO<sub>2</sub> por la combustión de biocombustibles es menor que la cantidad secuestrada por estos cultivos (0.32 vs 4.4 Mg hectárea<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), y dado que estos pastizales son nativos, la biodiversidad de la zona no se verá grandemente afectada (Tilman et al., 2006).

**Pretratamiento.** Una vez elegidos los materiales celulósicos es necesario tratarlos mediante métodos fisicoquímicos y biológicos (Galbe & Zacchi, 2007; Lee et al., 2007). Se ha determinado que la insolubilidad de la celulosa cristalina, responsable de su resistencia ante la hidrólisis, no es un criterio absoluto ni indicativo de la susceptibilidad a la digestión enzimática, sino que más bien el grado de hinchamiento y la estructura fibrilar son los parámetros importantes. Un mayor número de poros formados durante tratamien-

tos previos a la acción enzimática permite un mejor acceso de las enzimas a las microfibrillas, al aumentar el área superficial del sustrato (Mosier et al., 2005). Los pretratamientos se llevan a cabo en medios líquidos, lo que resulta en una fracción líquida compuesta entre otros compuestos, de carbohidratos monoméricos y poliméricos, y una fracción de material sólido (Galbe & Zacchi, 2007; Mosier et al., 2005). Para obtener los máximos rendimientos de la biomasa el pretratamiento debe ser muy eficiente, y permitir una alta recuperación de los carbohidratos y la lignina (sin descomponerlos). Y para permitir una alta eficiencia de la subsiguiente hidrólisis enzimática de la celulosa, el líquido debe contener pocos o nulos inhibidores de la fermentación (ej. fenol, proveniente de la lignina, y ácido acético y 5-hidroximetilfurfural –que son compuestos derivados de la degradación de hexosas y pentosas) evitando un paso extra para su eliminación, y mantener bajos los costos de operación (Klinke et al., 2004). Diferentes tipos de pretratamientos han sido usados buscando satisfacer las necesidades anteriores, y en general son una combinación de condiciones físicas y químicas (Mosier et al., 2005). En primer lugar la biomasa es cortada o pulverizada mediante trituración, astillamiento o molienda para aumentar la superficie de celulosa. El método usado a escalas casi industriales es el de explosión de vapor en presencia de un catalizador que puede ser H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o SO<sub>2</sub> (Ewanick et al., 2007). A pH ácido la hemicelulosa se descompone en sus azúcares componentes, evitando de esta manera el uso subsecuente de hemicelulasas (Nguyen et al., 2000). A pH neutro la hemicelulosa es sólo parcialmente hidrolizada debido a los ácidos (como el acético) liberados en la reacción. Otro tipo de pretratamiento se lleva a pH básico y consiste en la explosión de las fibras en presencia de amonio (conocido como AFEX, *ammonia fiber expansion*) (Kim et al., 2008), o la percolación de amonio acuoso a través de la biomasa (conocido como ARP, de *ammonia recycle percolation*) (Kim & Lee, 2005). En este tipo de medios alcalinos la estructura de la hemicelulosa queda íntegra, pero tienen la ventaja de no producir inhibidores de la fermentación. Todas las reacciones anteriores son llevadas a cabo a presiones altas y temperaturas de moderadas (100 °C) a altas (160-240 °C) (Galbe & Zacchi, 2007). Los pretratamientos biológicos, por otro lado, implican el uso de los hongos directamente sobre la biomasa (Lee et al., 2007; Zhang et al., 2007). Estos métodos son más limpios, baratos y no requieren de infraestructura especializada, pero tienen la desventaja de ser poco eficientes y muy lentos comparados con los métodos fisicoquímicos. Por ejemplo, mediante pretratamiento biológico, la sacarificación del 35% de los azúcares de paja de trigo se produce en cinco semanas (Taniguchi et al., 2005), en comparación con las pocas horas que requieren los métodos fisicoquímicos.

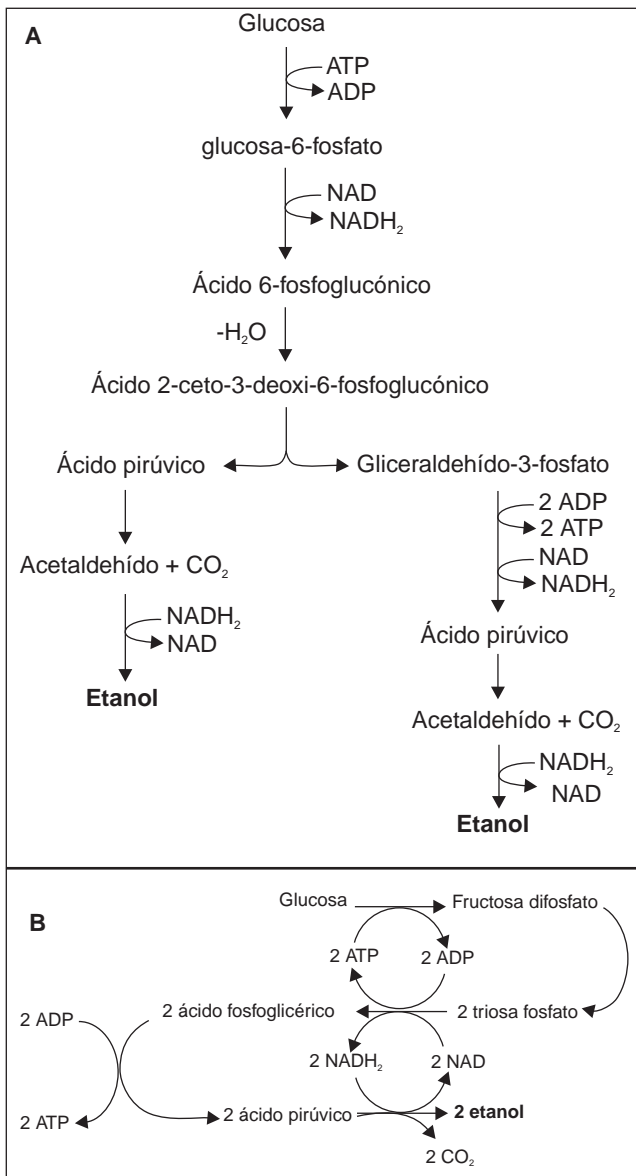
*Hidrólisis y expresión heteróloga de celulasas.* La hidrólisis de la celulosa con celulasas de origen fúngico se lleva a cabo en un rango de 50 a 55 °C y alrededor de pH 5. Comercialmente se encuentra disponible una mezcla de celulasas conocida como Accellerase™ (de Genencor®) producida por una cepa recombinante de *Trichoderma reesei*. Sin embargo, otras enzimas necesitan ser estudiadas para el desarrollo de nuevas formulaciones comerciales. Para generar organismos recombinantes productores de grandes cantidades de enzimas, o para estudiar y mejorar su función enzimática se llevan a cabo experimentos de expresión heteróloga de celulasas. Mediante estas técnicas también se pretenden generar cepas de *Saccharomyces* capaces de usar celulosa para la producción de etanol. Para el caso de organismos superproductores, existen reportes de expresión heteróloga en varios sistemas, tanto bacterianos como fúngicos e incluso en células de animales (Boer et al., 2000; Laymon et al., 1996; Penttila et al., 1988; von Ossowski et al., 1997). Los sistemas bacterianos no suelen ser eficientes para expresar celulasas de hongos debido a que la formación de puentes disulfuro no se lleva a cabo y el plegamiento no es el correcto, o porque las proteínas quedan atrapadas formando cuerpos de inclusión (Boer et al., 2000). Aunque existen algunos casos de éxito, como el de dos  $\beta$ -glucosidasas (BGL1A y BGL1B) de *Phanerochaete chrysosporium* expresadas con actividad en *E. coli* (Tsukada et al., 2006). Se han expresado celulasas bacterianas en otras bacterias con un éxito razonable (Yao et al., 2007). Los sistemas fúngicos ofrecen mejores perspectivas de obtener enzimas con actividad y propiedades similares a las originales. Sistemas como *Trichoderma* y *Aspergillus* suelen ser buenos productores pero no son apropiados para estudios de la estructura-función dadas las bajas frecuencias de transformación en estos hongos (Boer et al., 2000). Como una alternativa a este problema, se han usado distintas especies de levaduras para la expresión heteróloga de celulasas entre las que destacan *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis* (Kawai et al., 2006; Park et al., 2000; Penttila et al., 1988; Wamalwa et al., 2007). En levaduras se obtienen buenos niveles de producción (alrededor de 100-150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pero con la desventaja de que estos organismos llevan a cabo la hiperglicosilación de las proteínas, en algunas ocasiones alterando sus actividades y parámetros cinéticos. Otros grupos han intentado resolver este problema usando mutantes de *S. cerevisiae*, por ejemplo, alteradas en sus rutas de O-glicosilación aunque se han obtenido resultados similares (Gorka-Niec et al., 2007).

Por último, con miras a la producción de etanol a partir de material celulósico se han reportado trabajos de cepas transgénicas de *S. cerevisiae*. Se han clonado enzimas de diferentes orígenes (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Streptomy-*

*ces*, etc.) y de varias clases (endo y exoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas, glucoamilasas, etc.) (Ito et al., 2004; Shigechi et al., 2004). Por ejemplo, (Fujita et al., 2002) expresaron celulasas de *Trichoderma reesei* con resultados aceptables (aunque algo lejanos de los máximos teóricos posibles) para la producción de etanol usando como sustrato  $\beta$ -glucano (Fujita et al., 2002). En otro reporte se logró la expresión eficiente y la degradación sinérgica de celulosa amorfa al expresar una exoglucanasa, una endoglucanasa y una  $\beta$ -glucosidasa (Fujita et al., 2004). Usando este tipo de cepas transgénicas de levadura, pocos trabajos han abordado el problema de la degradación de sustratos naturales (rastros o bagazos) nativos o pretratados, aunque existe un reporte interesante en donde se logró la degradación de xylosa y celooligosacáridos de un hidrolizado de aserrín de madera por una cepa de *S. cerevisiae* transformada con genes de *Pichia stipitis* para la asimilación de xylosa (xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa) y una  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* (Katahira et al., 2006).

*Fermentación.* Una vez liberados los azúcares de la hemicelulosa, el siguiente paso es la fermentación microbiana para la producción de etanol que ha sido el primer biocombustible de uso industrial. La fermentación puede llevarse a cabo de dos maneras: simultánea a la sacarificación de los materiales celulósicos (*SSF-simultaneous saccharification and fermentation*) (Wingren et al., 2005), o de manera independiente a la hidrólisis (*SHF-separate hydrolysis and fermentation*) (Tomás-Pejó et al., 2008). Los microorganismos tradicionalmente usados en la industria del alcohol son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que llega a crecer hasta en 146 g/l de etanol (van Maris et al., 2006), y la bacteria *Zymomonas mobilis* que tiene una resistencia 2.5 veces más que la primera (Rogers et al., 2007). Las dos especies derivan su energía de la glucosa, y el etanol es el último producto de las vías Embden-Meyerhof (en *S. cerevisiae*) (Wills, 1990), y Entner-Doudoroff (en *Z. mobilis*) (Figura 6) (Sprenger, 1996). Otras levaduras, tales como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida utilis* han mostrado fermentaciones con rendimientos máximos de entre 40 y 50 g/l de etanol (Lin & Tanaka, 2006). *Pachysolen tannophilus* es otra levadura que aunque menos eficiente (7.8 g/l) puede utilizar también xilosa como fuente de carbono, a diferencia de las anteriores. En este sentido *Pichia stipitis*, es una levadura naturalmente fermentadora de xilosa de la que su genoma ha sido secuenciado (Jeffries et al., 2007), permitiendo identificar las vías fermentativas para la posterior manipulación de *S. cerevisiae*, por ejemplo, que le permita el metabolismo de xilosa (Saleh et al., 2006; Watanabe et al., 2007). También han sido estudiadas diversas bacterias fermentadoras, entre ellas algunas del género *Clostridium*, *Spirochaeta* y *Klebsiella*, y las especies *Leuconostoc me-*





**Figura 6.** Vías fermentativas de (A) *Saccharomyces cerevisiae* y (B) *Zymomonas mobilis*.

*senteroides* y *Streptococcus lactis* (Lin & Tanaka, 2006). Además se han introducido vías fermentativas en *Escherichia coli* obteniendo rendimientos comparables a los de cepas naturalmente productoras de etanol (Dien et al., 1998; Lawford & Rousseau, 1991).

**Otros biocombustibles.** La biomasa puede también usarse para producir otros biocombustibles además del etanol (Wackett, 2008a). El *n*-butanol por ejemplo, presenta una buena densidad energética y es menos higroscópico que el etanol, aunque es más viscoso. En la naturale-

za, *Clostridium acetobutylicum* es una bacteria que sintetiza butanol a través de reacciones que involucran a la acetil CoA (Ezeji et al., 2007). Algunas de las enzimas de esta ruta han sido clonadas en *E. coli* para generar bacterias productoras de butanol, con la ventaja de que éstas no sintetizan acetona como la cepa original de *Clostridium* (Atsumi et al., 2007).

Otro biocombustible derivado de la biomasa que ha despertado gran interés es el biodiesel, que consiste en ésteres metílicos de ácidos grasos (Hill et al., 2006). Sin embargo, no se ha reportado que estos compuestos sean sintetizados por microorganismos. Por lo general, los lípidos naturales más abundantes son ésteres de glicerol y ácidos grasos que pueden transesterificarse con metanol para obtener el biodiesel, y el glicerol como producto secundario. En un trabajo prometedor (Kalscheuer & Steinbuechel, 2003), se encontró una acil transferasa capaz de usar etanol como aceptor y al expresarla en *E. coli*, en conjunto con genes de *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol, se logró obtener una cepa que sintetiza ésteres etílicos denominados "microdiesel" (Kalscheuer et al., 2006). El campo promete pero aún hace falta resolver algunos problemas, por ejemplo que la síntesis de estos compuestos es intracelular, lo que plantea problemas de recuperación.

Los hidrocarburos han sido los combustibles por excelencia, ya que tienen una gran densidad energética y son de fácil transporte, además de que no se requiere de adecuaciones a la infraestructura actual para su uso. Algunos microorganismos son capaces de producir otros alcanos además del metano, que es el más estudiado. Se ha descrito la producción de etano, propano e isopreno, especialmente en bacterias del género *Bacillus* (Kuzma et al., 1995). Tanto en plantas, animales y microorganismos se ha reportado la síntesis de ceras cuyas cadenas de carbono son largas y con potencial para la obtención de hidrocarburos de mayor peso molecular (Wackett, 2008b). Los hidrocarburos en microorganismos se producen por la descarboxilación de ácidos alkyl carboxílicos, pero requieren estar activados, como con la presencia de un grupo *p*-hidroxifenilacético, por ejemplo. Una ruta alternativa de este proceso involucra al citocromo P450, aunque por lo general con eficiencias de producción bastante bajas (Coon & Vaz, 1988). En la bacteria *Vibrio furnissii*, se ha descrito una vía de síntesis de hidrocarburos a través de la reducción de ácidos grasos a sus alcanos a partir de sus alcoholes correspondientes. Esto implica que no se perdería un átomo de carbono en el proceso (Park, 2005). Sin embargo, hay que tomar estos resultados con cuidado, ya que no han podido ser reproducidos por otros grupos (Wackett et al., 2007).

Como se ha visto, existen múltiples opciones para obtener biocombustibles. Probablemente el camino a largo

plazo contemple también sistemas híbridos en donde se obtengan precursores biológicos que después sean químicamente modificados para su uso final. Cualquiera que sea el biocombustible, está claro que debe cumplir con ciertas características: debe ser relativamente barato, con una buena densidad energética, fácilmente transportable (en este sentido preferentemente un líquido) e inflamable pero no explosivo.

### COROLARIO

Como se ha visto, el estudio de los sistemas de degradación de lignocelulosa es complejo y aún falta mucho por hacer y descubrir en el campo de las celulasas, en especial las de origen fúngico. Sin embargo, el potencial de los materiales lignocelulósicos para la industria de los biocombustibles es importantísimo ya que representan una fuente renovable y su uso es más amigable con el medio ambiente. La producción de bioetanol a partir de cultivos agrícolas ha generado problemas tales como el desplazamiento de áreas cultivables de alimentos y el encarecimiento de los mismos, lo que pone en riesgo la seguridad alimentaria a nivel mundial. Los materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles son una mejor alternativa, aunque se tienen que mejorar y desarrollar tecnologías eficientes que permitan su aprovechamiento.

### AGRADECIMIENTO

C. Martínez-Anaya agradece la beca postdoctoral recibida del CONACYT (Exp. 050272) para el estudio de celulasas fúngicas.

### REFERENCIAS

- Alani, F., Anderson, W. & Moo-Young, M. 2008. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett.* 30, 123-126.
- Ander, P. & Marzullo, L. 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J Biotechnol.* 53, 115-31.
- Anderson, W., Dien, B., Brandon, S. & Peterson, J. 2008. Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 145, 13-21.
- Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., Chou, K. J., Hanai, T. & Liao, J. C. 2007. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng.* Epub ahead of print, doi:10.1016/j.ymben.2007.08.003.
- Aust, S. D. 1995. Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environ Health Perspect.* 103, 59-61.
- Baldrian, P. & Valaskova, V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.
- Barr, B. K., Hsieh, Y. L., Ganem, B. & Wilson, D. B. 1996. Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochem.* 35, 586-92.
- Bayer, E. A., Belaich, J. P., Shoham, Y. & Lamed, R. 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 58, 521-54.
- Béguin, P. & Aubert, J.-P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13, 25-58.
- Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc Okla Acad Sci.* 71, 51-56.
- Boer, H., Teeri, T. T. & Koivula, A. 2000. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnol Bioeng.* 69, 486-94.
- Cazemier, A. E., Verdoes, J. C., Reubsact, F. A., Hackstein, J. H., van der Drift, C. & Op den Camp, H. J. 2003. *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 83, 135-48.
- Coon, M. J. & Vaz, A. D. 1988. Role of cytochrome P-450 in hydrocarbon formation from xenobiotic and lipid hydroperoxides. *Prog Clin Biol Res.* 274, 497-507.
- Cosgrove, D. J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 407, 321-326.
- Cowling, E. B. 1975. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotechnol Bioeng Symp.* 163-81.
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kaweck, M. & Brown, R. M., Jr. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules.* 8, 1-12.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubatova, E. & Halada, P. 2007. Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. *Appl Environ Microbiol.* 73, 6241-6253.
- Dien, B. S., Hespell, R. B., Wyckoff, H. A. & Bothast, R. J. 1998. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme Microb Technol.* 23, 366-371.
- Doi, R. H. 2007. Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & non-cellulosome producers. *Doi* 0:14190021.
- Druzhinina, I. S., Schmoll, M., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. 2006. Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol.* 72, 2126-2133.
- Elberon, M., Malekzadeh, F., Yazdi, M., Kameranpour, N., Noori-Dalooi, M., Matte, M., Shahamat, M., Colwell, R. & Sowers, K. 2000. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 993-996.
- Eriksson, K.-E. L. 1989. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wodd Sci Technol.* 24, 79-101.
- Esposito, E. & da Silva, M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit Rev Microbiol.* 24, 89-98.
- Eveleigh, D. E. 1987. Cellulase: a perspective. *Phil Trans R Soc Lond A.* 321, 435-447.
- Ewanick, S. M., Bura, R. & Saddler, J. N. 2007. Acid-catalyzed steam pretreatment of lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. *Biotechnol Bioeng.* 98, 737-746.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N. & Blaschek, H. P. 2007. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr Opin Biotechnol.* 18, 220-7.
- Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T. D., Englund, G. J., Kelley, A. S. et al. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem.* 278, 31988-97.

28. Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M., Fukuda, H. & Kondo, A. 2004. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain co-displaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 70, 1207-12.
29. Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H. & Kondo, A. 2002. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 68, 5136-41.
30. Galbe, M. & Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108, 41-65.
31. Goedegebuur, F., Fowler, T., Phillips, J., van der Kley, P., van Solingen, P., Dankmeyer, L. & Power, S. 2002. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Current Genetics.* 41, 89-98.
32. Gorka-Niec, W., Bankowska, R., Palamarczyk, G., Krotkiewski, H. & Kruszewska, J. S. 2007. Protein glycosylation in pmt mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of heterologously expressed cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* and elevated levels of GDP-mannose and cis-prenyltransferase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1770, 774-80.
33. Hartl, L., Kubicek, C. P. & Seiboth, B. 2007. Induction of the gal pathway and cellulase genes involves no transcriptional inducer function of the galactokinase in *Hypocrea jecorina*. *J Biol Chem.* 282, 18654-9.
34. Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Stahlberg, J., Johansson, G. & Pettersson, G. 1999. Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur J Biochem.* 259, 88-95.
35. Henrissat, B. & Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293 ( Pt 3), 781-8.
36. Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. & Schulein, M. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nat Biotech.* 3, 722-726.
37. Henrissat, B. & Romeu, A. 1995. Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 311 ( Pt 1), 350-1.
38. Hilden, L. & Johansson, G. 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol Lett.* 26, 1683-93.
39. Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. & Tiffany, D. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Nat Acad Sci USA.* 103, 11206-11210.
40. Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science.* 315, 804-7.
41. Hou, Y., Wang, T., Long, H. & Zhu, H. 2007. Cloning, sequencing and expression analysis of the first cellulase gene encoding cellobiohydrolase I from a cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 39, 101-7.
42. Hyde, S. & Wood, P. 1997. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. *Microbiol.* 143, 259-266.
43. Ito, J., Fujita, Y., Ueda, M., Fukuda, H. & Kondo, A. 2004. Improvement of cellulose-degrading ability of a yeast strain displaying *Trichoderma reesei* endoglucanase II by recombination of cellulose-binding domains. *Biotechnol Prog.* 20, 688-91.
44. Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H. et al. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotech.* 25, 319-326.
45. Josefsson, P., Henriksson, G., W&#xe5 & gberg, L. 2008. The physical action of cellulases revealed by a quartz crystal microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases. *Biomacromol.* 9, 249-254.
46. Kadla, J. F. & Gilbert, R. D. 2000. Cellulose structure : A review. *Cellul Chem Technol.* 34, 197-216.
47. Kalscheuer, R. & Steinbuechel, A. 2003. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *J Biol Chem.* 278, 8075-82.
48. Kalscheuer, R., Stolting, T. & Steinbuechel, A. 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiol.* 152, 2529-36.
49. Katahira, S., Mizuike, A., Fukuda, H. & Kondo, A. 2006. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellobiooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72, 1136-43.
50. Kawai, R., Igarashi, K. & Samejima, M. 2006. Gene cloning and heterologous expression of glycoside hydrolase family 55 beta-1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Lett.* 28, 365-71.
51. Kim, T. H. & Lee, Y. Y. 2005. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioreour Technol.* 96, 2007-2013.
52. Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N. S., Ladisch, M. R., Bals, B., Balan, V. & Dale, B. E. 2008. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings. *Bioresour Technol.* 99, 5206-5215.
53. Kipper, K., Valjamae, P. & Johansson, G. 2005. Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as 'burst' kinetics on fluorescent polymeric model substrates. *Biochem J.* 385, 527-35.
54. Klinke, H. B., Thomsen, A. B. & Ahring, B. K. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66, 10-26.
55. Kuzma, J., Nemecek-Marshall, M., Pollock, W. H. & Fall, R. 1995. Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Curr Microbiol.* 30, 97-103.
56. Lawford, H. G. & Rousseau, J. D. 1991. Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* carrying genes from *Zymomonas mobilis*. *Appl Biochem Biotechnol.* 28-29, 221-36.
57. Laymon, R. A., Adney, W. S., Mohagheghi, A., Himmel, M. E. & Thomas, S. R. 1996. Cloning and expression of full-length *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I cDNAs in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 57-58, 389-97.
58. Lee, J.-W., Gwak, K.-S., Park, J.-Y., Park, M.-J., Choi, D.-H., Kwon, M. & Choi, I.-G. 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J Microbiol.* 45, 485-491.
59. Lin, Y. & Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69, 627-642.
60. Linder, M. & Teeri, T. T. 1996. The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc Nat Acad Sci USA.* 93, 12251-12255.
61. Liu, J., Sun, S.-Y. & Wang, T.-H. 2004. Construction of a yeast one-hybrid system with the xylanase2 promoter from *Tri-*



- choderma reesei* to isolate transcriptional activators. Lett Appl Microbiol. 38, 277-282.
62. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev. 66, 506-577.
  63. Lynd, L. R., Wyman, C. E. & Gerngross, T. U. 1999. Biocommodity engineering. Biotechnol Prog. 15, 777-793.
  64. Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. & del Río, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int Microbiol. 8, 195-204.
  65. Martínez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F. et al. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. Nat Biotechnol. 22, 695-700.
  66. Masai, E., Katayama, Y. & Fukuda, M. 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. Biosci Biotechnol Biochem. 71, 1-15.
  67. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. & Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 96, 673-86.
  68. Murashima, K., Kosugi, A. & Doi, R. H. 2003. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. J Bacteriol. 185, 1518-24.
  69. Murnen, H. K., Balan, V., Chundawat, S. P. S., Bals, B., daCosta Sousa, L. & Dale, B. E. 2007. Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to Fermentable Sugars. Biotechnol Prog. 23, 846-850.
  70. Murray, P. G., Collins, C. M., Grassick, A. & Tuohy, M. G. 2003. Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (cbh2), encoding cellobiohydrolase II, from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* and structure prediction of the gene product. Biochem Biophys Res Commun. 301, 280-6.
  71. Nevalainen, H., Suominen, P. & Taimisto, K. 1994. On the safety of *Trichoderma reesei*. J Biotechnol. 37, 193-200.
  72. Ng, T. B. 2004. Peptides and proteins from fungi. Peptides. 25, 1055-1073.
  73. Nguyen, Q. A., Tucker, M. P., Keller, F. A. & Eddy, F. P. 2000. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. Appl Biochem Biotechnol. 84-86, 561-76.
  74. Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M. & Claeysens, M. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. Biochem J. 298 Pt 3, 705-10.
  75. Park, C. S., Chang, C. C. & Ryu, D. D. 2000. Expression and high-level secretion of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Yarrowia lipolytica*. Appl Biochem Biotechnol. 87, 1-15.
  76. Park, M. O. 2005. New pathway for long-chain n-alkane synthesis via 1-alcohol in *Vibrio furnissii* M1. J Bacteriol. 187, 1426-9.
  77. Penttila, M. E., Andre, L., Lehtovaara, P., Bailey, M., Teeri, T. T. & Knowles, J. K. 1988. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 63, 103-12.
  78. Peters, D. 2006. Carbohydrates for fermentation. Biotechnol J. 1, 806-814.
  79. Pettersen, R. C. (1984). The chemical composition of wood. In The chemistry of solid wood Advances in chemistry series, (ed. R. M. Rowell). Washington, D.C.: American Chemical Society.
  80. Plomion, C., Leprovost, G. & Stokes, A. 2001. Wood Formation in Trees. Plant Physiol. 127, 1513-1523.
  81. Puls, J., Schröder, N., Stein, A., Janzon, R. & Saake, B. 2005. Xylans from Oat Spelts and Birch Kraft Pulp. Macromol Symp. 232, 85-92.
  82. Rauscher, R., Wurleitner, E., Wacenovský, C., Aro, N., Stricker, A. R., Zeilinger, S., Kubicek, C. P., Penttila, M. & Mach, R. L. 2006. Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. Eukaryot Cell. 5, 447-56.
  83. Rogers, P., Jeon, Y., Lee, K. & Lawford, H. 2007. *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. In Biofuels, pp. 263-288.
  84. Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 55, 35-58.
  85. Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol. 30, 279-91.
  86. Saleh, A. A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T. & Maki-no, K. 2006. Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 279-80.
  87. Sarath, G., Akin, D., Mitchell, R. & Vogel, K. 2008. Cell-wall composition and accessibility to hydrolytic enzymes is differentially altered in divergently bred switchgrass (*Panicum virgatum* L.) genotypes. Appl Biochem Biotechnol. Epub ahead of print, doi:10.1007/s12010-008-8168-5.
  88. Sasakura, Y., Nakashima, K., Awazu, S., Matsuoka, T., Nakayama, A., Azuma, J.-i. & Satoh, N. 2005. Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*. Proc Nat Acad Sci USA. 102, 15134-15139.
  89. Schmer, M. R., Vogel, K. P., Mitchell, R. B. & Perrin, R. K. 2008. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 464-469.
  90. Schmid, G. & Wandrey, C. 1987. Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase ( $\beta$ -glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414. Biotechnol Bioeng. 30, 571-585.
  91. Schmoll, M., Franchi, L. & Kubicek, C. P. 2005. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. Eukaryot Cell. 4, 1998-2007.
  92. Schmoll, M. & Kubicek, C. P. 2005. *oocl1*, a unique gene expressed only during growth of *Hypocrea jecorina* (anamorph: *Trichoderma reesei*) on cellulose. Curr Genet. 48, 126-33.
  93. Schmoll, M., Zeilinger, S., Mach, R. L. & Kubicek, C. P. 2004. Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach. Fungal Genet Biol. 41, 877-87.
  94. Seiboth, B., Hartl, L., Pail, M., Fekete, E., Karaffa, L. & Kubicek, C. P. 2004. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. Mol Microbiol. 51, 1015-25.
  95. Seiboth, B., Hartl, L., Salovuori, N., Lanthaler, K., Robson, G. D., Vehmaanpera, J., Penttila, M. E. & Kubicek, C. P. 2005. Role of the *bgal*-encoded extracellular  $\beta$ -galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. Appl Environ Microbiol. 71, 851-7.
  96. Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H. & Kondo, A. 2004. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and alpha-amylase. Appl Environ Microbiol. 70, 5037-40.
  97. Simpson, T. W., Sharpley, A. N., Howarth, R. W., Paerl, H. W. & Mankin, K. R. 2008. The new gold rush: fueling ethanol production while protecting water quality. J Environ Qual. 37, 318-324.
  98. Sprenger, G. A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol Lett. 145, 301-307.



99. Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Wurleitner, E. & Mach, R. L. 2006. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*. 5, 2128-37.
100. Stricker, A. R., Mach, R. L. & de Graaff, L. H. 2008. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol*. 78, 211-20.
101. Sun, Y. & Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 83, 1-11.
102. Suto, M. & Tomita, F. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J Bioscience Bioengineering*. 92, 305-311.
103. Suzuki, M. R., Hunt, C. G., Houtman, C. J., Dalebroux, Z. D. & Hammel, K. E. 2006. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. *Environ Microbiol*. 8, 2214-2223.
104. Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K. & Tanaka, T. 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J Bioscience Bioengineering*. 100, 637-643.
105. Teeri, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol*. 15, 160-167.
106. Teunissen, M. J. & Op den Camp, H. J. 1993. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 63, 63-76.
107. Tilman, D., Hill, J. & Lehman, C. 2006. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. *Science*. 314, 1598-600.
108. Tollefson, J. 2008. Energy: not your father's biofuels. *Nature*. 451, 880-3.
109. Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., Ballesteros, M. & Olsson, L. 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol Bioeng*. Epub ahead of print, doi:10.1002/bit.21849.
110. Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshida, M. & Samejima, M. 2006. Molecular cloning and characterization of two intracellular  $\beta$ -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73, 807-14.
111. Valjamae, P., Sild, V., Pettersson, G. & Johansson, G. 1998. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. *Eur J Biochem*. 253, 469-75.
112. van den Berg, O., Capadona, J. R. & Weder, C. 2007. Preparation of homogeneous dispersions of tunicate cellulose whiskers in organic solvents. *Biomacromol*. 8, 1353-1357.
113. van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., van Dijken, J. & Pronk, J. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 90, 391-418.
114. von Ossowski, I., Teeri, T., Kalkkinen, N. & Oker-Blom, C. 1997. Expression of a fungal cellobiohydrolase in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 233, 25-9.
115. Wackett, L. P. 2008a. Biomass to fuels via microbial transformations. *Curr Opin Chem Biol*. Epub ahead of print, doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.025.
116. Wackett, L. P. 2008b. Microbial-based motor fuels: science and technology. *Microb Biotechnol*. Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1751-7915.2007.00020.x.
117. Wackett, L. P., Frias, J. A., Seffernick, J. L., Sukovich, D. J. & Cameron, S. M. 2007. Genomic and biochemical studies demonstrating the absence of an alkane-producing phenotype in *Vibrio furnissii* M1. *Appl Environ Microbiol*. 73, 7192-8.
118. Wamalwa, B. M., Zhao, G., Sakka, M., Shiundu, P. M., Kimura, T. & Sakka, K. 2007. High-level heterologous expression of *Bacillus halodurans* putative xylanase xyn11a (BH0899) in *Kluyveromyces lactis*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71, 688-93.
119. Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., Aboushadi, N. et al. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*. 450, 560-5.
120. Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T. & Makino, K. 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiol*. 153, 3044-54.
121. Wilder, B. M. & Albersheim, P. 1973. The structure of plant cell walls: IV. A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol*. 51, 889-893.
122. Wills, C. 1990. Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 25, 245 - 280.
123. Wingren, A., Galbe, M., Roslander, C., Rudolf, A. & Zacchi, G. 2005. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous-saccharification-and-fermentation-based bioethanol process. *Appl Biochem Biotechnol*. 122, 485-499.
124. Withers, S. G. 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym*. 44, 325-337.
125. Wong, K. K., Tan, L. U. & Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 52, 305-317.
126. Wurleitner, E., Pera, L., Wacenovskiy, C., Cziferszky, A., Zeilinger, S., Kubicek, C. P. & Mach, R. L. 2003. Transcriptional regulation of xyn2 in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*. 2, 150-8.
127. Xiao, Z., Gao, P., Qu, Y. & Wang, T. 2001. Cellulose-binding domain of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose. *Biotechnol Lett*. 23, 711-715.
128. Yao, Q., Sun, T., Chen, G. & Liu, W. 2007. Heterologous expression and site-directed mutagenesis of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Lett*. 29, 1243-1247.
129. Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L. & Kubicek, C. P. 2003. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. *Mol Genet Genomics*. 270, 46-55.
130. Zhang, X., Xu, C. & Wang, H. 2007. Pretreatment of bamboo residues with *Coriolum versicolor* for enzymatic hydrolysis. *J Biosci Bioeng*. 104, 149-51.

## Correspondencia:

Jorge L. Folch-Mallol.

Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM.  
Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa,  
62210, Cuernavaca, Mor. México.

Phone: (+52) 777 3297057

Fax: (+52) 777 3297030,

jordi@buzon.uaem.mx