



Biocombustibles: panorama general y mejoras en la producción mediante microorganismos genéticamente modificados.

Guzmán-Moreno, J.; López-Olmos, K., Medrano-Santillana, M., Romo-Rodríguez, P. y Ponce-Noyola, P.; poncep@quijote.ugto.mx. Tel: 4737320006 ext. 8149
Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Unidad Noria Alta, Departamento de Biología, Noria Alta s/n.

Abstract.

The present revision offers an overview on the production of biofuels, such as bioethanol, biodiesel and biogas, through native and genetically modified microorganisms.

Key Words: biofuel, bioethanol, biodiesel, biogas, modified microorganism.

Resumen.

La presente revisión brinda un panorama general sobre la producción de biocombustibles, tales como bioetanol, biodiesel y biogás, a través de microorganismos nativos y genéticamente modificados.

Palabras clave: biocombustibles, bioetanol, biodiesel, biogás, microorganismos modificados.

Introducción.

La naturaleza agotable de las reservas de combustibles fósiles y el cambio climático están suscitando preocupaciones sobre la seguridad energética, generando interés en la utilización de energías renovables como los biocombustibles. Como resultado, sistemas microbianos han sido extensivamente estudiados y exitosamente usados para la biosíntesis de algunos biocombustibles, el más notable, el etanol. La producción de otros biocombustibles, tales como el biodiesel, que es un sustituto del diesel derivado del petróleo y el biogas, han sido también de interés mundial (Koffas, 2009).



Acerca de los biocombustibles.

A partir de la biomasa se pueden obtener una serie de productos llamados biocombustibles, tales como bioetanol, biodiesel, biogás, además de otros bioproductos. La importancia de estos productos en el ámbito actual se debe a que ambientalmente el uso de estos combustibles podría poco a poco sustituir a los combustibles fósiles, además se sabe que los gases contaminantes propios de la generación de energía a base de combustibles fósiles comunes como gasolina, son menores mediante la combustión de biocombustibles. Por otra parte el hecho de poder utilizar biomasa proveniente de desechos industriales y por consiguiente hacer de esto un recurso renovable presenta considerables oportunidades económicas.

El bioetanol se produce a partir de la fermentación de los contenidos de la materia orgánica de las plantas, el cual contiene alrededor del 5% de agua. La materia prima que se utiliza para la obtención del bioetanol consta principalmente de los azúcares de la caña o remolacha, de los azúcares del almidón de los cereales, y de la biomasa lignocelulósica fermentando los azúcares de la celulosa y hemicelulosa. Siendo la última opción la que ofrece un mayor potencial para la producción de bioetanol debido a que se genera como residuos de desechos agrícolas, forestal e industrial (Kumar, 2008; Olofsson, 2008).

Hay muchas razones por las cuales se interesan en aplicar la biotecnología en el proceso de obtención de bioetanol. Primero, para la conversión biológica de biomasa celulósica por medio del mejoramiento de los pre-tratamientos, de las enzimas y de los organismos fermentativos. Segundo, el reciente encarecimiento del petróleo y la búsqueda de combustibles alternos. Tercero, la problemática del cambio climático mundial y la necesidad de tener fuentes alternas de combustibles que no contribuyan con este. Es por ello que surgen las opciones de producir combustibles líquidos orgánicos y químicos para ser usados a gran escala y a bajo costo. Por último, el gran desarrollo de las herramientas biotecnológicas que conlleva a la reducción de costos y aumentar la eficiencia tanto de producción de la biomasa como de su conversión a combustibles orgánicos y químicos (Hahn-Hägerdal, 2008; Mukhopadhyay, 2008; Rubin, 2008).



Por otra parte el biodiesel es el producto de la alteración química de grasas animales y aceites vegetales (compuestos por ácidos grasos y triglicéridos) con el fin de producir ésteres de metilo, los cuales se consideran propiamente biodiesel (Mittelbach, 1983). Debido al origen de las materias primas necesarias para la producción de biodiesel este combustible se considera de uso renovable (Krawczyk, 1996). Entre las materias primas que se utilizan en la producción de biodiesel se encuentran las grasas de origen animal y las de origen vegetal como los aceites de palma, de piñón, maíz, soja, entre otros aceites vegetales. En la actualidad fuentes como las microalgas brindan una atractiva alternativa para la obtención de los aceites necesarios para la producción de biodiesel, ya que los rendimientos en la extracción de aceite son mayores que usando cultivos como la palma (Chisti, 2007).

El uso del biodiesel como fuente alterna de energía se ha vuelto popular recientemente ya que brinda la opción de ser un combustible con bajas emisiones contaminantes como monóxido de carbono en comparación con los derivados de fuentes fósiles.

El biogas es un combustible gaseoso, el cual es amigable con el medio, limpio, económico y versátil. Es una mezcla de gases, principalmente metano y bióxido de carbono, esta mezcla de gases es obtenida mediante una digestión de biomasa, tales como lodos del drenaje, desechos animales o de efluentes industriales en condiciones anaeróbicas y dura pocas semanas (Demyrbas, 2009).

La digestión anaeróbica se denomina como la conversión de material orgánico directamente a una forma gaseosa, denominada biogas, sin embargo esta mezcla puede contener otros gases como sulfuro de hidrogeno siendo el metano el principal componente del biogás. Es importante mencionar que la composición química del biogas es muy similar a la del gas natural.

Otro tipo de biogás comúnmente producido es el hidrógeno, éste es un gas de baja solubilidad y tiene aproximadamente el mismo calor de combustión que el metano y puede ser empleado para procesos de combustión y así obtener casi el mismo valor energético del metano. Sin embargo el hidrógeno tiene un beneficio extra, ya que puede ser usado como



combustible en una celda convencional, donde la electricidad puede ser producida sin combustión, produciendo así energía eléctrica libre de contaminación, con una eficiencia al menos 50% más alta que con una turbina de combustión de vapor. Actualmente la industria del biohidrógeno se está consolidando (cerca de 108m³/por año en los Estados Unidos), pero prácticamente todo el hidrógeno proviene de los combustibles fósiles (Rittman, 2008)

Generalidades de los procesos de obtención de biocombustibles.

En la actualidad se puede dividir en diferentes pasos el proceso de conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol: primero se colecta la biomasa de donde se piensa hacer la conversión a etanol. Segundo, se hace un tratamiento a la biomasa, generalmente termoquímicamente para biomasa de residuos agrícolas, para remover la lignina y solubilizar la hemicelulosa y hacer más accesible la celulosa a enzimas celulíticas. El tercero es la hidrólisis enzimática para convertir la celulosa en azúcar, las enzimas utilizadas en este paso generalmente se producen en un proceso aparte y posteriormente se adicionan. Cuarto, los azúcares, hexosas y pentosas, son fermentados a etanol por medio de microorganismos, posteriormente el etanol es retirado para su destilación (Goldschmidt, 2008, Hahn-Hägerdal, 2006).

La producción del biodiesel empieza con la alteración química de los ácidos grasos y triglicéridos, los cuales necesitan pasar a esteres alcalinos de ácidos grasos para poder ser usados como biodiesel. Actualmente esta reacción de trans-esterificación es realizada bajo condiciones alcalinas, aunque el uso de enzimas también es una opción (Fjerbaek, 2009).

El biogás por su parte puede producirse en plantas generadoras o en biodigestores, estas estructuras son empleadas para proveer condiciones anaeróbicas que estimulen las reacciones químicas y microbiológicas que resulten en la descomposición de los desechos o la biomasa dándose así la producción de biogás.

El costo de la producción de metano es relativamente elevado comparado con el costo del gas natural de los depósitos de combustibles fósiles, pero esta situación debería cambiar conforme el costo del gas natural se eleve y se mejoren las tecnologías de pre-tratamiento y de producción de metano (Rittman, 2008).



La forma más común de convertir biomasa a hidrógeno es mediante un proceso de fermentación bacteriana que es en esencia una versión truncada del proceso de metanogénesis. Una combinación de un pH moderadamente ácido y un tiempo de retención de sólidos corto suprime a los metanógenos y acentúa la producción de hidrógeno. El problema de la fermentación de hidrógeno es que solo una pequeña fracción del material orgánico de inicio termina en hidrógeno, incluso cuando el material de inicio es solo glucosa (Lee, 2008).

Intervención de microorganismos en la producción de biocombustibles.

En la producción del etanol a partir de biomasa lignocelulósica en cuatro pasos intervienen microorganismos: en la producción de enzimas celulolíticas, la hidrólisis del material celulósico, la fermentación de hexosas y la de pentosas.

Para lograr que los monómeros de azúcar estén disponibles para la fermentación, es necesario que al material pre-tratado se le realice una hidrólisis enzimática. Aquí es donde entran los microorganismos que son productores de una gran variedad de enzimas; los hongos y bacterias tienen la capacidad de degradar material lignocelulósico y en la mayoría de los casos hay un conjunto de enzimas celulolíticas que actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa, como por ejemplo *Trichoderma reesei* que tiene dos endoglucanasas, dos celobiohidrolasas, cuatro endoglucanasas y una beta glucosidasa. Aparte de *Trichoderma* existen otros hongos aerobios productores de celulosas como *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. Los hongos anaerobios son menos comunes pero algunos son *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllumcyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces*. (Kumar, 2008; Maki, 2009; Goldschmidt, 2008; Hahn-Hägerdal, 2008).

También se han estudiado hongos termófilos productores de celulosas como *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, y *Thermonospora curvata*. El interés de los anteriores es producir celulosas termoestables con la finalidad de tener una menor inhibición por la temperatura o utilizar un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (Olofsson, 2008). Al igual que los hongos existen varias cepas de bacterias en



estudio para la producción de celulasas, entre las cuales se encuentran *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulolyticus*, y *Saccharophagus degradans*. De las bacterias anaerobias el género más utilizado es el de *Clostridium*, y entre las aeróbicas están *Cellulomonas* y *Streptomyces*. (Maki, 2009; Kumar, 2008).

La producción de celulasas en los microorganismos es regulada genéticamente y controlada bioquímicamente por inducción, represión catabólica e inhibición por producto final. También factores físicos como el pH, temperatura, adsorción y algunos factores químicos como nitrógeno, fósforo y compuestos fenólicos se consideran factores de inhibición de la bioconversión de la lignocelulosa (Kumar, 2008; Goldschmidt, 2008). Por esto la ingeniería metabólica y genética brindan las herramientas necesarias para entender los mecanismos moleculares de la bioconversión de la biomasa lignocelulósica (Mukhopadhyay, 2008). Al principio se utilizaron métodos de mutagénesis para obtener cepas mejoradas para la producción de celulasas, como la cepa NTG-19 de *Fusarium oxysporum* que se obtuvo por radiación ultravioleta y tratamiento químico con NTG, teniendo aumentada en un 80% la capacidad de actividad de celulasas respecto a la cepa parental. También mediante un tratamiento con NTG se obtuvo cuatro cepas mutantes de *Cellulomonas flavigena* denominadas M4, M9, M11 y M12, con actividades xilanolíticas. Así como una mutante creAd30 de *Aspergillus nidulans* que muestra niveles elevados en el metabolismo de glucosa y sin resistencia a la inhibición del producto final. En la actualidad se ha logrado clonar y expresar varios genes de celulasas de hongos en otros sistemas como el caso *Penicillium crysogenum*, *Trichoderma reesei*, entre otros; lo cual ayuda a la caracterización de los sistemas y a economizar los procesos en un futuro. (Kumar, 2008).

Después de la hidrólisis de los azúcares estos son fermentados a etanol. El hidrolizado contiene hexosas y pentosas, principalmente glucosa y xilosa respectivamente. La fermentación comúnmente se lleva a cabo con *S. cerevisiae* pero solo con hexosas ya que no es capaz de fermentar pentosas (Rubin, 2008). Las pentosas pueden ser fermentadas por otro microorganismo, como *Pichia stipitis* o *Candida shehatae*, en otro paso adicional o se puede utilizar una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente para la fermentación



de hexosas y pentosas. Uno de los problemas que se tienen con los microorganismos fermentadores es la poca tolerancia a etanol y una estrategia que se plantea es el remover el producto final o hacer más tolerante a los microorganismos mediante modificaciones genéticas. Otra problemática es la inhibición de la fermentación por productos del pre-tratamiento y de igual manera se trabaja en organismos más tolerantes en la inhibición de estos metabolitos (Kim, 2008; Branduardi, 2008).

Existen organismos celulolíticos nativos, entre los más usados y estudiados recientemente son los termofílicos anaerobios debido a su habilidad de convertir de manera natural a la biomasa lignocelulósica en etanol, como *Clostridium thermocellum*, que tienen la ventaja de no necesitar aeración para la fermentación, lo cual significa una disminución en el costo del proceso; también la temperatura óptima de crecimiento de estos está alrededor de los 60°C, lo cual facilitaría la remoción y recuperación del etanol por evaporación y destilación (Goldschmidt, 2008; Kumar, 2008). Sin embargo así como ventajas existen desventajas, una de las cuales es la poca producción de etanol en comparación con los grandes productores como *S. cerevisiae*, esto debido a las dos vías que existen para producir el etanol y que además de este se produce lactato y acetato. Esta desventaja se puede solucionar por ingeniería genética bloqueando una de las rutas metabólicas para dirigir la producción total a etanol. Algunos autores han propuesto genes blancos como los de las enzimas lactato deshidrogenasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa y la hidrogenasa para hacer mutantes y bloquear esta vía. Otro problema es la baja tolerancia a etanol, lo cual se da por la inhibición de las enzimas glucolíticas, daño a la membrana celular, reducción de la posa de nucleótidos de piridina y por la inhibición de la enzima alcohol deshidrogenasa (Goldschmidt, 2008; Mukhopadhyay, 2008, Kim, 2008; Branduardi, 2008).

Los microorganismos que no son celulolíticos y que actualmente se estudia más en la mejora son *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* y *E. coli*. (Atsumi, 2008; Branduardi, 2008; Hahn-Hägerdal y col. 2006). Y aquí la idea es que estos microorganismos tengan un sistema celulolítico funcional para crecer en material lignocelulósico y en el caso de *E. coli* también que tenga la capacidad de generar etanol. *S. cerevisiae* naturalmente no puede fermentar



pentosas, sin embargo con la ayuda de la ingeniería genética se ha podido resolver de manera parcial esto, ya que se han obtenido cepas capaces de fermentar xilosa y arabinosa mediante la introducción del gen de una xilosa isomerasa de *Piromyces sp.*, a la levadura *S. cerevisiae*. También una cepa fermentadora de xilosa y celobiosa que se obtuvo por la introducción de una beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* en *S. cerevisiae*. (Atsumi, 2008; Branduardi, 2008; Hahn-Hägerdal y col. 2006).

De la producción de biodiesel se tiene en este aspecto que como en cualquier proceso industrial, siempre se trata de obtener mayores rendimientos en la producción. El uso de la ingeniería genética para la mejora de los organismos involucrados en el proceso de obtención de biodiesel tiene un gran impacto económico. Por ejemplo, mediante mejoras genéticas en microalgas se ha podido lograr aumentar la eficiencia fotosintética, incrementar la tasa de obtención de biomasa y elevar el contenido y la calidad del aceite en biomasa (Chisti, 2008). En general las dos últimas mencionadas son las mejoras a nivel genético en las que más comúnmente se trabaja. Cabe resaltar que las microalgas son una de las alternativas más viables para su uso en la producción de biodiesel, debido a que el uso de esta materia prima no pone en riesgo a aquellas cuyo destino sea para consumo humano (Wagner, 2007).

Nuestro país es un consumidor de diesel, por lo que el establecimiento de plantas productoras de biodiesel es un punto interesante para la economía nacional. A su vez el uso de microorganismos genéticamente mejorados para la producción de biodiesel juega un papel importante en el establecimiento de dichas industrias, ya que gracias a estas mejoras los productores e inversionistas se ven alentados para iniciar esta clase de proyectos.

Referente a la producción de biogás en este apartado podemos mencionar que el mismo tipo de bacterias anaeróbicas que produjeron el gas natural también producen el biogas actualmente. Las bacterias anaeróbicas son algunas de las formas de vida más antiguas en la Tierra; evolucionaron antes de que la fotosíntesis de las plantas liberara grandes cantidades de oxígeno a la atmósfera. Algunas de las bacterias empleadas en este



proceso de producción son: *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostrydium botirycum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* (Takeshi, 2005). También se reportó el aislamiento de una cepa de *Enterobacter aerogenes* que produce grandes cantidades de hidrógeno a partir de muchos tipo de carbohidratos, incluso de polioles, lo cual resulta interesante ya que el hidrógeno es una fuente de energía limpia (Takeshi, 2005). Se ha propuesto que es factible la producción de hidrógeno a partir de desechos de combustibles en condiciones húmedas mediante una transformación química causada por bacterias (Sakka, 2003).

El uso del biogás, un producto sustentable, en vez de otros combustibles, puede reducir considerablemente las emisiones de gases de invernadero, incluyendo el dióxido de carbono, lo cual contribuye a que se alcancen las metas de reducción de estos gases a nivel nacional e internacional, con lo que se ayuda a que se combata el calentamiento global (Anzil, 2007).

Otros bioproductos.

La industria de los biocombustibles tiene una característica dual en la economía, por un lado se produce un generador de energía y por otro lado se obtienen derivados o co-productos en procesos de conversión secundaria o refinamiento de éstos hasta convertirlos en combustibles. En la producción de bioetanol, a partir del maíz, uno de los co-productos principales es el DDGS (por sus siglas en inglés “distillers dried grains with solubles”), el cual es derivado del proceso de molienda seca del maíz, que se utiliza como alimento para ganado debido a su alto contenido de fibra y proteínas. En el proceso de molienda húmeda del maíz, se derivan los siguientes co-productos: gluten de maíz (CGM, “corn gluten meal”), alimento de gluten de maíz (CGF, “corn gluten feed”), aceite de maíz crudo y germen alimenticio. También de este último proceso, se aísla y recupera el almidón de un grado altamente puro; el almidón a su vez es utilizado para obtener productos, tales como: glucosa, jarabe de maíz alto en fructosa, etanol y otros químicos. El CO₂ que se genera en los procesos de fermentación también puede ser comercializado a las industrias refresqueras. Los co-productos son una parte inherente del procesamiento del maíz e



históricamente no han recibido la misma atención en el desarrollo como los productos primarios. Como un resultado, estos co-productos tienen un valor bajo y altos costos en el proceso y típicamente son vendidos como ingredientes para alimento animal, especialmente para dieta de rumiantes (Rausch, 2006).

Otro de los principales co-productos o producto secundario de la industria de los biocombustibles, es el glicerol que puede ser obtenido de la fermentación de la glucosa o como un derivado de la conversión industrial de la lignocelulosa en etanol. En la producción de biodiesel puede llevarse a cabo la generación de glicerol crudo, derivado de la trans-esterificación de triglicéridos. Un adicional refinamiento del glicerol crudo se requiere para poder ser comercializada a los sectores farmacéuticos y de cosméticos, y esto le brinda un mayor costo energético (Ramírez de la Piscina, 2008). Otros derivados del proceso de obtención de biodiesel son 1,3-propanediol, lactato y formato (Ito, 2005).

En el período de 1960's a 1980's, en la producción de biobutanol ruso, se obtenían como derivados al H_2 y al CO_2 aunque en ese tiempo no les tenían asignado un uso. En la metanogénesis se obtienen los derivados NH_3 y H_2S . En el caso de la producción de bioetanol mediante la fermentación continua utilizando la bacteria *Zymomonas mobilis*, produce cantidades considerables de sorbitol, acetoina, glicerol y ácido acético así como también el polímero extracelular llamado levan (Antoni, 2007).

Últimamente, en Grecia se está utilizando el cardo (*Cynara cardunculus L.*), que es un cultivo perene de origen mediterráneo y bien adaptado a las condiciones ambientales del lugar; dicho cultivo tiene múltiples aplicaciones, ya que puede ser utilizado en la manufactura de papel, como forraje en el invierno, pero la más importante, como biocombustible sólido y/o líquido en el sector de bio-energía. Por otro lado, el cardo se utiliza también para la extracción de compuestos activos de fármacos tales como, la inulina (obtenida de las raíces) y la cinarina y la silymarina (obtenidas de las hojas) (Grammelis 2008).

Existen otras alternativas, tales como la utilización de biosólidos los cuales contienen nutrientes y energía que pueden ser usados benéficamente. Esfuerzos



significativos se hacen recientemente para el desarrollo de nuevas tecnologías para el manejo de biosólidos y hacer uso de sus productos (Wang, 2008).

Otros métodos para la obtención de energía son la utilización de la fuerza del agua (presas de contención, el poder de las corrientes y de las olas, etc.) y del viento (Kerr, 2007; Leithead, 2007). Recientemente, existe el interés de capturar la energía solar para producir hidrógeno y electricidad utilizando los mecanismos del aparato fotosintético natural (Barber, 2007). Las primeras aproximaciones indican la necesidad de modificar la expresión de genes relacionados con la tasa de fotosíntesis oxigénica. Esta nueva corriente arrojó un nuevo concepto que es PhonatoI[®], que combina las propiedades de bacterias fotosintéticas y fermentativas en una bacteria “fotofermentativa” que usa la energía solar para reducir el CO₂ a una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo alcoholes, tales como- etanol, butanol, propanodiol y muchos otros; teniendo como único producto de desecho al oxígeno (<http://www.photanol.nl>).

Bibliografía.

1. Antoni, D., Zverlov, V.V. y Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77:23-35.
2. Atsumi S. y Liao J. C. (2008). Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:414–419
3. Barber, J. (2007). Biological solar energy. *Phil Trans R Soc A.* 365:1007-1023.
4. Branduardi P., Smeraldi C., Porro D. (2008). Metabolically Engineered Yeasts: ‘Potential’ Industrial Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 15:31–40
5. Chisti, (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology.* Vol.26 No.3, 126-131.
6. Demyrbas Ayhan. (2009). Green Energy and Technology, Biohidrogen for future fuel demands. Springer editorial, New York. 74 – 77.
7. Dietsberg M. A. y Anderson M. (2007). Vision of the U.S. Biofuel Future: A Case for Hydrogen-Enriched Biomass Gasification. *Journal of American Chemical Society.* Vol. 46, 8863-8874.



8. Federico Anzil, (2007). Obtenido de la URL:
<http://www.zonaeconomica.com/biocombustibles>
9. Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. (2009). A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102, No. 5.
10. Goldschmidt, F. (2008). From Cellulose to Ethanol: Engineering Microorganisms to Produce Biofuel. Term Paper, HS.
11. Grammelis, P., Malliopoulou, A., Basinas, P. y Danalatos, N.G. (2008). Cultivation and Characterization of *Cyanara cardunculus* for solid biofuels production in the Mediterranean region. *Int J Mol Sci*. 9:1241-1258.
12. Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Liden G., y Zacchi G. (2006). Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* **24**(12): 549-556
13. Hahn-Hägerdal B., Himme M. E., Somerville C. y Wyman C. (2009). Welcome to Biotechnology for Biofuels. 1:1
14. <http://www.photanol.nl>
15. Dietenberger M. A. y Anderson M. (2007). Vision of the U.S. Biofuel Future: A Case for Hydrogen-Enriched Biomass Gasification. *Ind. Eng. Chem. Res*, 46, 8863-8874.
16. Nishio, N Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(3):260-265.
17. Kerr, D. (2007). Marine energy. *Phil Trans R Soc A*. 365:971-992.
18. Kim T. Y., Sohn S. B., Kim H. U., y Y. Lee S. (2008). Strategies for systems-level metabolic engineering. *Biotechnol. J.*, 3, 612-623
19. Koffas, M.A.G. (2009). Expanding the repertoire of biofuel alternatives through metabolic pathway evolution. *PNAS*. 106(4): 965-966.
20. Krawczyk, T., (1996). Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM* 7, 801-829.
21. Kumar R., Singh, S. y Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377-391
22. Lee H-S, Salerno M, Rittmann B.E. (2008b). Thermodynamic evaluation of hydrogen production in glucose fermentation. *Environmental Science and Technology* (in press).



23. Leithead, W.E. (2007). Wind energy. *Phil Trans R Soc A*. 365:957-970.
24. Maki M., Leung K. T., Qin W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* 5(5):500-516
25. Mittelbach M, Worgetter M, Pernkopf J, Junek H. (1983). Diesel fuel derived from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl-ester. *Energ Agr* 2(4):369–384
26. Mukhopadhyay A., M Redding A., Rutherford B. J, y Keasling J. D. (2008). Importance of systems biology in engineering microbes for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:228–234
27. Olofsson K., Bertilsson M. y Lidén G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1:7
28. Ramírez de la Piscina, P. y Homs, N. (2008). Use of biofuels to produce hydrogen (reformation processes). *Chemical Society Reviews*. 37: 2459-2467.
29. Rausch, K. D. y Belyea, R. L. (2006). The Future of Coproducts from Corn Processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 128: 47-86.
30. Rittmann B.E. (2008a). Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 100, No. 2.
31. Rubin E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. Vol. 454:14
32. Sakka M., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (2004). Hydrogen Gas Generation from Refuse – Derived Fuel (RDF) under wet conditions. *Journal of bioscience, biotechnology and biochemistry*. Vol. 68 (2), 466 – 467.
33. Takeshi I., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol – containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of biosciences and bioengineering*. Vol. 100, No. 3, 260- 265.
34. Tchobanoglous G, Burton FL. (1991). *Wastewater engineering: Treatment and reuse*. 3rd edn. New York: McGraw-Hill Book Co.
35. Wagner L. (2007). *Biodiesel from algae oil*. Mora associates publications.
36. Wang, H., Brown, S.L., Magesan, G.N., Slade, A.H., Quintern, M., Clinton, P.W. y Payn, T.W. (2008). Technological options for the management of biosolids. *Environ Sci Pollut Res*. 15:308-317.