

## BIOPROCESSOS INDUSTRIALS. BIOCOMBUSTIBLES

FRANCESC GÒDIA I CARLES SOLÀ

*Departament d'Enginyeria Química, ETSE, Universitat Autònoma de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Francesc Gòdia. Departament d'Enginyeria Química, ETSE, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

Adreça electrònica: *francesc.godia@uab.cat*.

### RESUM

La biotecnologia ha tingut ja un important impacte en la millora o substitució de processos químics industrials. En aquest capítol es revisen els aspectes més importants de l'anomenada *biotecnologia blanca*, i les seves principals aplicacions en diferents sectors: enzims industrials, indústria quimicofarmacèutica, producció de biopolímers i biocombustibles.

**Paraules clau:** biotecnologia blanca, enzims industrials, biocatàlisi, biopolímers, biocombustibles.

### INDUSTRIAL BIOPROCESSES. BIOFUELS

#### SUMMARY

Biotechnology has already made an important impact in the improvement or replacement of industrial chemical processes. In this chapter, the most important aspects of White Biotechnology are reviewed, as well as the main applications in different sectors: industrial enzymes, chemico-pharmaceutical industry, biopolymer production, and biofuels.

**Key words:** white biotechnology, industrial enzymes, biocatalysis, biopolymers, biofuels.

#### INTRODUCCIÓ

La utilització d'enzims, microorganismes o parts dels mateixos en l'obtenció de productes industrials és una de les aplicacions ja consolidades de la biotecnologia, i recentment se'n fa referència de manera global

amb el terme *biotecnologia blanca*. L'elevada especificitat dels catalitzadors biològics, la capacitat de dur a terme en condicions suaus les reaccions en les quals intervenen (per exemple, pel que fa a temperatura, pressió o pH) i la possibilitat d'emprar matèries primeres noves, han estat els elements deter-

minants en la concepció i consolidació de nous processos industrials biotecnològics (bioprocessos) o en la substitució de processos industrials químics convencionals, de manera total o parcial, per bioprocessos. A més, cal emmarcar aquesta tendència en una dinàmica global en la qual els processos industrials evolucionen, i hauran d'evolucionar encara més, no solament en termes d'eficiència econòmica, sinó també en termes de menor impacte ambiental i utilització de matèries primeres renovables. Només amb aquests criteris es podrà desenvolupar una indústria sostenible, a escala mundial, que contribueixi al progrés sense malmetre el futur. En el futur, l'impacte de la biotecnologia en la indústria química anirà augmentant (Sijbesma, 2003). El darrer informe publicat per Burrill *et al.* (*Biotechnology 2007. Life sciences: a global transformation*) fa la previsió que l'any 2010 la biotecnologia industrial representarà el 10 % de les vendes de la indústria química, uns 125.000 milions de dòlars, mentre que l'any 2005 el sector va representar un 7 % de les vendes (77.000 milions de dòlars). La despesa en energies netes es preveu que es multiplicarà per quatre en la pròxima dècada, i això suposarà un mercat global de 226.000 milions de dòlars.

Els avantatges fonamentals que es deriven dels bioprocessos a escala industrial són diversos (Hatti-Kaul *et al.*, 2007).

— La generació de catalitzadors més eficients, que poden catalitzar reaccions amb una elevada selectivitat, incloent-hi també reaccions estereoselectives i enantioespecífiques, que donen com a resultat productes molt purs i, per tant, amb pocs subproductes i processos de purificació menys intensius.

— La reducció en el consum d'energia, derivada de la utilització de condicions de treball suaus, com ara temperatures moderades.

— També el descobriment de microor-

ganismes extremòfils, que estan adaptats a viure en condicions extremes (temperatures molt elevades o molt baixes, alcalinitat o acidesa elevades, etc.) ha permès ampliar el ventall d'aplicacions industrials dels catalitzadors biològics.

— La generació de menys residus a causa de la utilització de microorganismes permet substituir en un sol pas diferents etapes d'un procés convencional.

— La utilització de matèries primeres renovables (per exemple, permeten desenvolupar una indústria basada en els biocombustibles en substitució del hidrocarburs, en via d'exhauriment) i la disminució de les emissions (CO<sub>2</sub>, residus...).

— La menor utilització de compostos tòxics, com ara dissolvents, ja que moltes reaccions es produeixen en medis aquosos.

— Finalment, l'obtenció de productes amb característiques noves que els milloren, com ara la seva biodegradabilitat.

Els avenços recents en els aspectes més bàsics de la biotecnologia han estat elements facilitadors vitals per desenvolupar moltes de les noves aplicacions industrials. D'una banda la identificació de nous microorganismes i enzims mitjançant tècniques modernes de cribratge, la selecció de soques productores, la modificació genètica i, en definitiva, la conversió dels microorganismes en factories cellulars mitjançant l'enginyeria metabòlica; d'altra banda, la millora en el disseny, construcció i operació de plantes biotecnològiques ha permès portar a la pràctica nous processos de manera eficient.

En aquest capítol es farà una breu ullada a la situació actual de les principals aplicacions dels bioprocessos industrials, en sectors tan diversos com la indústria quimicofarmacèutica, els detergents, el processament de la pasta de paper o els biopolímers. En aquest context, la generació de nous biocombustibles té un paper molt important, a causa de l'elevada dependència que en té la

societat actual. És important destacar aquí que el sector anomenat *biotecnologia blanca* pot incloure des d'un producte bàsic, d'elevada producció i baix preu, com ara el bioetanol (uns trenta milions de tones produïdes el 2005, amb un preu de 0,4 €/kg), fins a un producte de química fina, amb baixa producció i elevat preu, com ara la vitamina B12 (vint tones produïdes el 2005, amb un preu de 25.000 €/kg). De manera general, s'utilitzen enzims quan es busquen aplicacions en les quals intervé només una o, en tot cas, molt poques reaccions. En canvi, quan la transformació requerida implica diferents passos, ja no sol ser rendible aïllar i purificar els enzims corresponents a cada etapa, i és més avantatjós l'ús de microorganismes.

## BIOPROCESSOS

A més de tots els avenços moleculars, que han permès el desenvolupament de nous biocatalitzadors amb activitats noves i més eficients, cal fer esment explícit que la seva producció a l'escala final requerida en cada cas necessita el desenvolupament del bioprocés corresponent (Doran, 1995; Bailey i Ollis, 1986). Aquest desenvolupament comença una vegada s'ha definit i posat a punt el sistema biològic amb el qual s'obté el producte corresponent, per exemple un enzim o una cèl·lula recombinant, en el qual s'inclou la definició del medi i les condicions de cultiu, les característiques del seu creixement i qualsevol aspecte que n'optimitzi el creixement i la producció. Un dels aspectes concrets que es poden definir en aquesta etapa és si la utilització del biocatalitzador es farà en forma lliure (cas habitual en la majoria de fermentacions, per exemple, en què l'obtenció de producte sol estar associada al creixement cel·lular), o en forma immobilitzada, sobre una matriu (cas freqüent quan es treballa amb enzims,

en què la biotransformació no està associada a creixement) (Guisán, 2006). També caldrà definir la forma d'operació del sistema: discontinu, discontinu alimentat, continu, etc. (Doran, 1995).

Abans d'arribar a l'escala final de producció se solen fer proves en bioreactors de mida petita (primer reactors a escala de laboratori i després a escala pilot). En sistemes amb cèl·lules que creixen en suspensió el bioreactor industrial més habitual és el tanc agitat, mentre que si es treballa amb enzims en forma immobilitzada se solen emprar els bioreactors de llit reblerts. En aquesta etapa de canvi d'escala cal estudiar com aporta el bioreactor totes les condicions necessàries perquè el biocatalitzador continuï operant de manera òptima a una escala de volum superior. Aquí intervenen de manera directa una sèrie de processos físics, com ara la transferència de matèria, essencial en el cas de la transferència d'oxigen del corrent d'aire que alimenta el reactor al líquid del mateix, la transferència de calor, o les característiques de mescla en el líquid, importants per assegurar-ne l'homogeneïtat. En definitiva, cal que a escala de producció també es pugui assegurar que es mantenen la temperatura, el pH, la concentració d'oxigen, etc., òptims per al biocatalitzador a utilitzar. A més, cal comprovar que aspectes intrínsecs als bioreactors i a la seva operació no afectin negativament les cèl·lules. Cal comprovar que els efectes d'estrès associats a l'agitació mecànica, el bombolleig, les possibles manques d'homogeneïtat en tancs de gran volum, la presència d'escumes o la pressió hidrostàtica no imposin limitacions en el creixement cel·lular. Moltes vegades els resultats que s'obtenen en aquest procés obliguen a introduir canvis de disseny en els bioreactors per evitar alguna de les limitacions observades. El volum definitiu del procés de producció es podrà fixar després d'aquestes etapes, en funció de la producció final requerida i la

productivitat volumètrica assolida als bioreactors pilot.

El disseny del bioprocés a escala de producció inclou el bioreactor com a nucli, però també ha de considerar altres aspectes essencials per garantir la correcta operació. En concret, tots els serveis associats, com el subministrament d'aire, l'equip d'esterilització, els equips de preparació i esterilització del medi, l'aigua de refrigeració o calefacció i tot el sistema de monitorització i control del procés. En sistemes que operin en continu s'hauran de desenvolupar sistemes de retenció cel·lular. Si el procés treballa de manera asèptica cal fer una atenció especial, ja que la dificultat de mantenir l'esterilitat en un bioreactor augmenta sensiblement a volums elevats, en què, a més, el risc de pèrdues en cas de contaminacions és molt elevat. Finalment, caldrà també reflectir totes les necessitats des del punt de vista de la bioseguretat quan es treballa amb cèl·lules patògenes. La segona part, que és tan important o més que el nucli del bioreactor, consisteix en tot el procés de purificació del producte. Cal tenir en compte que els bioprocessos solen assolir concentracions finals de producte molt baixes quan es comparen amb els processos químics, normalment per sota del 10 %. Per tant, el procés de recuperació del producte, reutilització del medi sobrant i purificació final, té una importància molt elevada i sovint acaba dictant l'economia global del procés. De fet, en alguns casos la purificació pot representar el 80-90 % dels costos d'un bioprocés. Com en el cas anterior, els sistemes de purificació també s'han d'estudiar i adaptar, primer a escala de laboratori i després a escala pilot, fins arribar a poder-los dissenyar a escala de producció.

Finalment, cal fer esment de la importància que té considerar tots aquests aspectes associats a la producció final a gran escala des del primer moment en què es comencen a desenvolupar els biocatalitzadors. Per

exemple, si es treballa amb un sistema d'expressió en una cèl·lula que en créixer augmenta molt la viscositat del medi de cultiu, es pot arribar a la situació contradictòria que una cèl·lula amb una activitat molt interessant en el laboratori no es pugui portar a la indústria per problemes insalvables en la mescla i transferència d'oxigen de reactors de gran volum. També, una cèl·lula modificada per exportar proteïnes a través de la membrana de manera eficient pot, en canvi, tenir una elevada fragilitat en ser cultivada en sistemes agitats. Un últim exemple pot ser el d'afegir components al medi de cultiu per millorar la productivitat en els bioreactors, que dificulten molt, però, el procés de purificació. En conclusió, cal tenir en compte tots els diferents components que formen part d'un bioprocés, i que es recullen de manera esquemàtica a la figura 1, de manera integrada, per assolir resultats que permetin portar a terme els bioprocessos a escala industrial de manera òptima i rentable.

## LES APLICACIONS INDUSTRIALS DELS ENZIMS. BIOCATALISI

Segurament una de les principals aplicacions industrials de la biotecnologia es pot englobar dins d'aquest apartat. La producció d'enzims ha esdevingut, de fet, un subsector industrial en si mateix, ja que els enzims poden ser directament part d'un producte final, com un detergent, o un biocatalitzador que permeti fer una determinada transformació d'un substrat en un producte, com ara la isomerització de glucosa a fructosa. El ventall d'aplicacions industrials dels enzims ha anat augmentant de manera continuada en les darreres dècades (Buchholz *et al.*, 2005; Aehle, 2007), de la mà de la identificació de nous enzims amb noves activitats i del desenvolupament de processos optimitzats de fermentació en

els quals es poden produir grans quantitats d'enzims de manera eficient i rentable. A més, l'aplicació de la tecnologia del DNA recombinant ha permès obtenir soques microbianes amb una elevada capacitat de produir enzims com a proteïnes heteròlogues, i també enzims específicament dissenyats mitjançant evolució dirigida o modificació genètica, capaços de dur a terme reaccions altament específiques i en condicions ambientals més extremes (Liese *et al.*, 2006). Tot això fa que actualment més del 50 % del enzims emprats en processos industrials provinguin de microorganismes modificats genèticament (Gravilescu i Chisti, 2005). Cal tenir en compte també que en les aplicacions destinades als sectors de la salut i l'alimentació cal emprar soques considerades segures (GRAS) o de tipus 1.

Els enzims es poden classificar de moltes maneres, normalment en funció de la seva activitat catalítica. Pel que fa als principals grups amb aplicacions industrials, són:

a) **Proteases.** Enzims que hidrolitzen les proteïnes en fragments més curts (polipeptids) i en alguns casos a aminoàcids. S'apliquen a la formulació de detergents, processament d'aliments, i síntesi quimiofarmacèutica.

b) **Carbohidrases.** Enzims que hidrolitzen els polisacàrids a sucres senzills. S'apliquen en el camp de l'alimentació, la indústria de la pasta de paper, la indústria tèxtil i els detergents.

c) **Lipases.** Enzims que hidrolitzen els triglicèrids a àcids grassos i glicerol. S'apliquen en el camp de l'alimentació, els detergents, el tractament d'efluents i la indústria farmacèutica.

d) **Pectinases.** Enzims que permeten la degradació de la pectina, un polisacàrid complex que es troba a la fruita. S'apliquen en el camp de l'alimentació i de les begudes.

e) **Cellulases.** Enzims que degraden la cel·lulosa a sucres. S'apliquen en el camp de

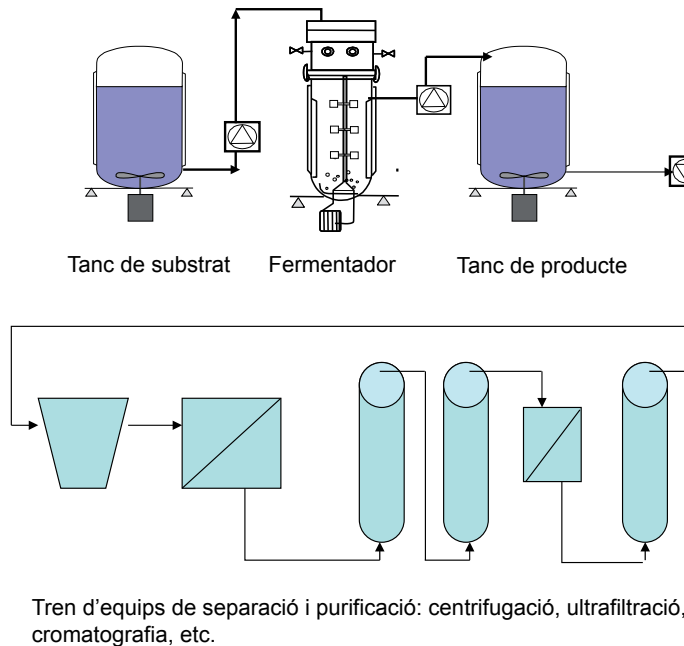


FIGURA 1. Esquema de les principals etapes que conformen un bioprocés.

la pasta de paper, la indústria tèxtil, els aliments, detergents i en el sector energètic.

f) Amilases. Enzims que degraden l'estructura ramificada del midó i alliberen cadenes lineals de polisacàrids. S'apliquen en el camp de l'alimentació i la indústria tèxtil.

g) Invertases. Enzims que catalitzen reaccions d'isomerització. S'apliquen en el camp de l'alimentació i en la indústria químicofarmacèutica.

h) Ligninases. Degradació dels compostos de lignina. S'apliquen en la indústria de la pasta de paper.

Per ordre d'importància, el sector de l'alimentació representa un 30-45 % de les aplicacions, el dels detergents està al voltant del 33 %, el de la indústria tèxtil i de la pasta de paper és el 10-18 %, i el de la indústria químicofarmacèutica un 5 % del mercat mundial (Dechema, 2004). El mercat global de la indústria dels enzims és molt notable i se situava en 1.800.000 € durant el període 2004-2005. Està clarament dominat per empreses europees, entre les quals destaquen les daneses, com Novozymes, Chr. Hansen o Danisco, que en conjunt dominen més del 50 % del mercat mundial dels enzims.

En el cas dels detergents, els enzims són directament part del producte mateix. La incorporació d'enzims als detergents es va iniciar en els anys seixanta, i actualment els enzims emprats inclouen un ampli ventall: proteases, amilases, cellulases i lipases. Els avantatges principals són la reducció de la temperatura i el temps de rentatge, cosa que afavoreix la qualitat del resultat, redueix el consum d'energia i també l'impacte ambiental a causa de la biodegradabilitat dels enzims. S'estima que una disminució de la temperatura de rentatge de 95 °C a 40 °C redueix el consum d'energia en un 70 %. Les aplicacions principals són en detergents per a rentadores de roba i de plats. Els enzims es processen en forma encapsulada per evitar reaccions al·lèrgiques per contacte direc-

te o per inhalació (fet que es va observar al principi en els treballadors de les plantes de preparació de detergents amb enzims): de fet, aquesta és també la raó per la qual encara no s'utilitzen en detergents d'aplicació en superfícies obertes.

La utilització dels enzims en el camp de l'alimentació és molt notable, com s'ha comentat. Les indústries làcties, de panificació i begudes aglutinen un percentatge molt important de les aplicacions. Les proteases s'utilitzen en la coagulació de la llet i les lipases milloren l'aroma dels formatges en potenciar-ne la maduració. Les lactases permeten trencar la molècula de lactosa en glucosa i galactosa i, per tant, permeten preparar productes sense lactosa. En la panificació s'utilitzen amilases per millorar la textura del pa, per establir i condicionar la massa de panificació (xilanasas, lipases i fosfolipases), i per enfortir-la (glucosa-oxidasa i lipooxygenasa). En la producció de la cervesa els enzims intervenen en diferents etapes, com ara en l'addició d'enzims als ja produïts en l'ordi per afavorir el procés de producció, la utilització d'amilases, glucanases i proteases per hidrolitzar els sucres de la malta, de betaglucanases i arabinoxilanasas per millorar la filtrabilitat, i d'amiloglucosidases i pullulanases per a la preparació de cervesa baixa en calories, entre altres. En la producció de sucres de fruita, les pectinases s'utilitzen per a la clarificació. La papaïna, una proteasa, s'utilitza per entendre la carn i afavorir-ne la cocció.

Segurament els enzims que han tingut un major impacte, però, en el camp de la preparació d'aliments, pel seu gran volum, són els que s'utilitzen en l'obtenció de sucres a partir del midó. De fet, els avantatges que representa aquest procés han fet que hagi substituït de manera completa, i en pocs anys, el procés anterior, basat en la hidròlisi àcida a temperatura alta. El midó presenta en la seva estructura (vegeu la figura 2) cadenes d'amilosa, un polisacàrid

lineal format per enllaços  $\alpha$ -1,4 entre molècules d' $\alpha$ -D-glucosa, i d'amilopectina, d'estructura ramificada que es produeix a causa dels enllaços  $\alpha$ -1,6 entre molècules d' $\alpha$ -D-glucosa situades en diferents cadenes d'amilosa. L'estructura ramificada del midó és més soluble que l'estructura lineal, que dona molta viscositat a les solucions de midó. El procés d'hidròlisi enzimàtica del midó, normalment a partir dels grànuls obtinguts del blat de moro, necessita, doncs, combinar diferents activitats enzimàtiques i en condicions diferents. Dels dos components, el més difícil d'hidrolitzar és l'amilopectina, ja que la majoria d'enzims ataquen els enllaços  $\alpha$ -1,4, però per arribar a una hidròlisi com més completa millor cal també hidrolitzar els enllaços  $\alpha$ -1,6, que representen un 4-6 % de la glucosa present en el midó. El procés consta bàsicament de tres etapes: gelatinització, liqüefacció i sacarifi-

cació. Es parteix d'una suspensió aquosa de grànuls de midó, a una concentració del 30-40 % en pes, a pH 6-6,5, amb 20-80 ppm de  $\text{Ca}^{2+}$ , que actua com a estabilitzant i activador dels enzims. El procés de gelatinització implica la dissolució del midó per formar una solució viscosa. En aquesta etapa ja s'afegeix un dels enzims, l' $\alpha$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucan-glucanohidrolasa), que és capaç d'hidrolitzar enllaços  $\alpha$ -1,4, però no els enllaços  $\alpha$ -1,6. El procés es realitza en continu, durant cinc minuts, en reactors tubulars, i un dels principal avenços ha estat el desenvolupament d' $\alpha$ -amilases (a partir de *Bacillus licheniformis*) altament termotables, que permeten realitzar el procés a 105 °C mitjançant injecció directa de vapor. En el segon pas, la liqüefacció, que es realitza en tancs a 90-100 °C durant dues hores, es completa l'acció de les amilases i s'arriba a un grau de sacarificació d'un 8-12 %, i una

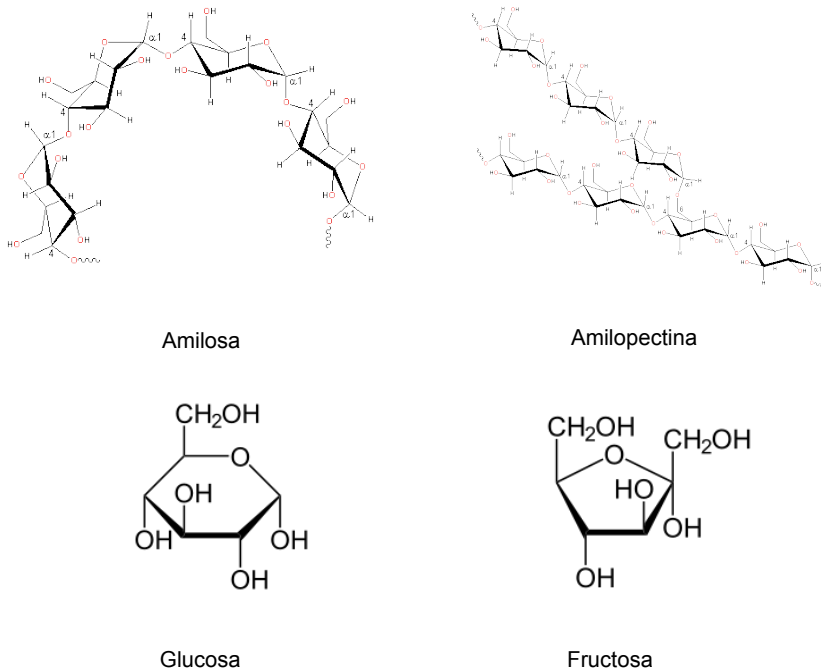


FIGURA 2. Estructures dels principals compostos involucrats en el procés d'hidròlisi del midó per a l'obtenció de sucres.

viscositat sensiblement reduïda. A continuació es pot procedir a la tercera etapa del procés, la sacarificació, que normalment es realitza en tancs en discontinu (tot i que es pot mantenir l'alimentació en altres etapes contínues del procés mitjançant la utilització d'un nombre de tancs igual o superior a sis) durant 72 h, a pH 4,5 i 60 °C, i en la qual es combinen dos tipus d'enzims. D'una banda, les anomenades *glucoamilases* (1,4- $\alpha$ -D-glucan-glucohidrolasa), que alliberen  $\beta$ -D-glucosa tant dels enllaços  $\alpha$ -1,4 com dels  $\alpha$ -1,6, i també dels menys freqüents  $\alpha$ -1,3. Aquests enzims se solen obtenir a partir del cultiu d'*A. niger*. I de l'altra, s'afegeixen enzims desramificadors, és a dir, pullulanases o isoamilases, que són capaços d'hidrolitzar els punts de ramificació de l'amilopectina d'una manera molt més ràpida que les glucoamilases. El desenvolupament de pullulanases que puguin ser estables i actives en les mateixes condicions que les glucoamilases (a partir de *B. acidopullulyticus*) ha estat un dels desenvolupaments més importants per optimitzar aquest procés i, d'aquesta manera, assolir rendiments de sacarificació al voltant del 99 %.

Entre les diferents aplicacions de la glucosa obtinguda per hidròlisi del midó cal destacar l'obtenció de xarops rics en fructosa, que també es basa en un procés enzimàtic. En aquest cas, la utilització de l'enzim glucosa-isomerasa, que catalitza la transformació de la glucosa en fructosa, en forma immobilitzada sobre suports, permet operar processos en continu, a 60-70 °C i pH 6,8-7,2. El poder edulcorant major de la fructosa i el contingut menor en calories respecte a la sacarosa fa que aquest xarop tingui una utilització important en l'edulcoració de begudes, gelats, etc.

El tercer gran grup d'aplicacions industrials dels enzims és el de la indústria del paper i la indústria tèxtil. La matèria primera per a la producció de paper és la cel·lulosa

obtinguda de la fusta. Hi ha diferents punts en els quals es poden utilitzar enzims, però la seva introducció encara no està generalitzada del tot. Els enzims més àmpliament emprats són les xilanases, que s'utilitzen per millorar l'extracció de lignines en el procés de blanquejament de la polpa de paper. Un dels principals avantatges de la seva utilització és la important reducció en l'ús de clor (fins a un 90 %) en aquest procés, amb la disminució conseqüent de compostos orgànics clorats en les aigües residuals de les plantes. Un dels punts d'aplicació addicionals és la introducció, relativament recent, de cellulases i hemicellulases, en el procés d'eliminació de la tinta, quan es processa polpa de paper provinent de reciclatge (a Europa un 55 % del paper produït el 2004 provenia de paper reciclat). Pel que fa a la indústria tèxtil, l'impacte més important de l'ús d'enzims ha estat en les fases finals del procés de producció dels teixits, l'anomenat *acabat*, i en particular per al cas de les fibres de cotó. Un dels processos més generalitzats és la utilització d'amilases per eliminar restes de midó després del procés de teixir. També s'han començat a introduir els enzims, encara que no de manera generalitzada, en les operacions d'eliminació de restes de components de les parets cel·lulars, com ara ceres i olis, mitjançant pectinases. També en bastants processos s'utilitzen catalases per eliminar el peròxid d'hidrogen sobrant en el procés de blanqueig, i s'evita així haver de fer diferents cicles d'esbandit dels teixits en aigua calenta, fet que implica una reducció del 80 % en l'ús de substàncies químiques, un 20 % de reducció en l'aigua emprada i un 10 % dels costos energètics. Les cellulases s'utilitzen per millorar la qualitat final dels teixits i, de fet, representen uns dos terços de les vendes d'enzims en aquest sector.



## LA BIOCATALISI EN LA INDÚSTRIA QUIMICOFARMACÈUTICA

La biotecnologia ha entrat a formar part dels processos de la indústria química, bé mitjançant la utilització d'enzims o microorganismes. Normalment s'està produint la substitució d'un o més passos en processos químics ja establerts per un sol pas biocatalític, fet que comporta una reducció de matèries primeres, subproductes, residus o ús d'energia. Els principals sectors en què s'ha produït un major impacte, a banda dels dels biopolímers i els biocombustibles, que es tracten en apartats específics, són:

a) La producció d'aminoàcids, com ara àcid L-glutàmic, L-lisina, L-trionina o L-metionina.

b) La producció d'àcids orgànics, com ara cítric, làctic, succínic i gluconic.

c) La producció de vitamines, com ara la vitamina C, la B12 o la riboflavina.

d) La producció d'antibiòtics i els seus derivats, com ara l'àcid 6-aminopenicil·lànic, la D-p-hidroxifenilglicina o l'àcid 7-aminocefalosporínic.

La producció d'antibiòtics  $\beta$ -lactàmics és un molt bon exemple de la contribució i l'evolució de la biotecnologia en l'obtenció de productes de gran volum. Els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics es poden diferenciar en dues grans famílies, les penicil·lines i les cefalosporines (Elander, 2003) i, tot i que es van començar a desenvolupar fa diverses dècades, els anys 1999-2000, encara representaven el 65 % del mercat mundial d'antibiòtics. En ambdós casos hi ha tota una família de molècules, derivades fonamentalment de la modificació de la penicil·lina i la cefalosporina, amb l'eliminació de la seva cadena lateral i amb l'alliberament de la part nuclear de la molècula, a la qual després s'afegeixen diferents radicals per obtenir els diferents antibiòtics (Queener i Neuss, 1982). En aquest procés es combinen etapes químiques i biotecnològiques, però de manera

cada vegada més marcada les primeres estan deixant lloc a les segones. S'anomenen en general antibiòtics semisintètics, ja que una part de la síntesi és biològica, mentre que l'addició dels radicals es fa habitualment per via de síntesi química. A la figura 3 es poden observar les estructures dels principals components implicats en aquests processos.

El procés es comença en tots els casos mitjançant una fermentació, normalment en tancs de gran volum, que poden arribar als 250 m<sup>3</sup>, cosa que sense dubte és també un esforç notable d'enginyeria. Les soques habitualment emprades són *Penicillium chrysogenum* i *Cephalosporium acremonium*, i s'ha fet una gran evolució en l'obtenció de soques millorades, durant anys de recerca contínua de noves soques i de la millora per enginyeria genètica, que permeten

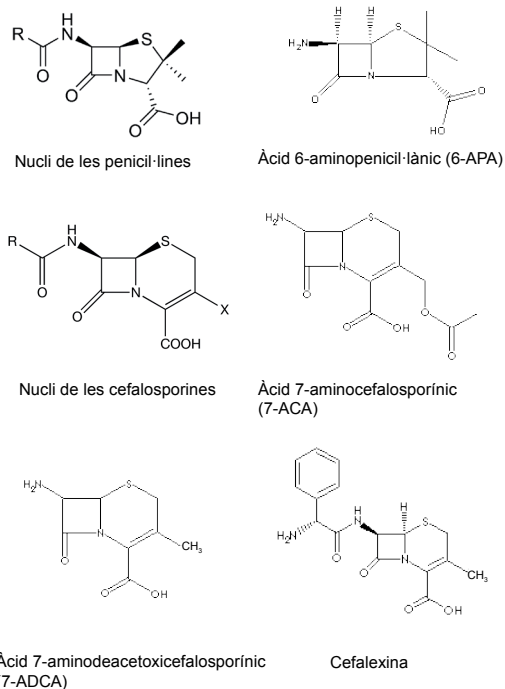


FIGURA 3. Estructures dels principals compostos involucrats en el procés d'obtenció d'antibiòtics semisintètics.

una producció major de l'antibiòtic buscat o establir noves rutes de biosíntesi en afegir activitats noves a un determinat microorganisme. A partir de la molècula bàsica d'antibiòtic es generen les molècules d'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA), en el cas de la penicil·lina, o d'àcid 7-aminocefalosporànic (7-ACA) en el cas de la cefalosporina. L'obtenció de 6-APA mitjançant la via química implica la utilització de dimetilclorsilà, N-N'-dimetilani·lina, fosfopentaclorur i amoni, i es realitza a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En canvi, la via enzimàtica mitjançant la penicil·lina-acilasa utilitza només amoni, i es realitza a una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pel que fa als dissolvents emprats, per a una mateixa quantitat de producte, cinc-centes tones de 6-APA, cal emprar  $10.000\text{ m}^3$  d'aigua per la via enzimàtica, mentre que per la via química calen  $4.200\text{ m}^3$  de diclorometà i  $4.200\text{ m}^3$  de n-butanol. Aquestes han estat raons de pes a l'hora d'adoptar la via enzimàtica en els processos d'obtenció d'antibiòtics derivats de la penicil·lina. D'altra banda, unes dues terceres parts dels antibiòtics comercials es deriven de la molècula de 7-ACA, de la qual es produeixen entre quatre mil i cinc mil tones a l'any. L'alliberament de la molècula de 7-ACA a partir de la cefalosporina es pot fer per via química, però també per via enzimàtica, en un procés en dues etapes, en què intervenen els enzims D-aminoàcid-oxidasa i glutaril-acilasa, o en un procés en una sola etapa, basat en l'enzim cefalosporina-C-acilasa. La producció d'enzims recombinants ha permès que més d'un 20 % dels processos químics ja hagin estat substituïts per processos biològics. Un dels exemples recents més singulars ha estat el desenvolupament, per part de l'empresa DSM, d'una via de producció completament biotecnològica per a l'obtenció de l'antibiòtic *cefalexina*, un antibiòtic de la família de les cefalosporines (Bruggink i Nossin, 2006). Aquest antibiòtic es produïa a partir d'una fermentació amb *Penicillium chrysogenum* seguida

d'un conjunt de passos de síntesi química, fins a tretze. La nova ruta biotecnològica té només tres etapes. La primera és una fermentació amb una soca recombinant de *P. chrysogenum*, en la qual s'ha clonat l'activitat del enzim expandasa (anomenat així perquè expandeix l'anell de cinc àtoms del nucli de les penicil·lines al de sis àtoms de les cefalosporines), que permet obtenir directament adipoil-7-ADCA en comptes de penicil·lina G. A continuació es fan dues transformacions enzimàtiques, catalitzades per la glutaril-acilasa i la penicil-acilasa, per arribar al producte final. Cal mencionar la important reducció en l'ús de dissolvents i reactius orgànics que ha representat la introducció d'aquest nou procés, fins a un 90 %, la reducció de la necessitat d'energia en un 40 % i dels residus generats en un 15 %. La combinació d'aquests factors ha permès reduir els costos en un 50 %. Aquest procés ha estat desenvolupat per DSM i industrialitzat el 2001. La nova soca permet arribar de manera més fàcil a l'intermediari 7-ADCA, a partir del qual s'han pogut obtenir tota una sèrie de nous antibiòtics.

Un segon exemple, entre molts, el podem trobar en la producció de l'aminoàcid L-lisina. En general els aminoàcids s'han d'afegir en diferents quantitats als aliments, ja que les fonts naturals d'aminoàcids no permeten abastir la demanda. Tenint en compte que la forma biològicament activa dels aminoàcids és l'enantiòmer L i que la síntesi química convencional produeix mesclades racèmiques que cal separar, la majoria d'aminoàcids s'obtenen per mètodes biotecnològics, bé mitjançant enzims o fermentació, i també de l'extracció a partir de fonts naturals (Aida *et al.*, 1986). La lisina és un aminoàcid essencial, que s'ha d'incloure en l'alimentació per assolir els requeriments nutricionals, tant en humans com en animals. La seva producció fou d'un milió de tones el 2006, i representa un percentatge elevat de la producció global d'aminoàcids.

La lisina es produeix actualment només per la via de la fermentació. S'utilitzen soques de *Chorynebacterium glutamicum* i *Brevibacterium flavum*, amb diferents tipus de modificacions genètiques per augmentar els rendiments en lisina i evitar la formació de subproductes (Anastassiadis, 2007).

## LA PRODUCCIÓ DE BIOPOLÍMERS

Els plàstics i els polímers són els materials més emprats al món, amb una producció de 224 milions de tones l'any 2004. No obstant això, l'obtenció de plàstics està basada en els derivats del petroli i, per tant, en matèries primeres no renovables. A més, tant les matèries primeres com els productes no són biodegradables (amb algunes excepcions, ja que es poden produir plàstics biodegradables a partir de derivats del petroli), cosa que significa un desavantatge addicional des del punt de vista de l'impacte ambiental. La producció de polímers a partir de matèries primeres renovables, és a dir, glúcids, per biotecnologia, representa una alternativa vertadera a aquesta problemàtica (Gross i Kaira, 2002), que ja s'està començant a desenvolupar industrialment (Kaplan, 1998). Tot i que des de fa anys s'han desenvolupat polímers derivats del midó i de la cel·lulosa, el que actualment s'entén com a nous polímers basats en la biotecnologia, i que es plantegen com a substituïts dels plàstics actuals, es poden agrupar en dos grans tipus:

a) Els derivats de l'àcid làctic. En aquest cas es parteix com a matèria primera de sucre o de midó, i aquest darrer cal hidrolitzar-lo a glucosa seguint el procés descrit en l'apartat corresponent. A continuació es realitza una fermentació a àcid làctic, mitjançant diferents soques del bacteri *Lactobacillus*. Una manera habitual de millorar el rendiment de les fermentacions és l'eliminació de l'efecte inhibidor del producte

final mateix, l'àcid làctic, mitjançant neutralització amb hidròxid o carbonat càlcic i formació de lactat càlcic en solució. En finalitzar la fermentació es filtra la solució de lactat càlcic per eliminar-ne les impureses, com ara les mateixes cèl·lules responsables de la fermentació, s'evapora, es recristalitza i finalment s'acidifica amb àcid sulfúric per obtenir l'àcid làctic. El procés produeix quantitats importants de sulfat de calci, i l'àcid obtingut requereix una purificació posterior per eliminar restes de proteïnes i glúcids. L'àcid làctic es pot assecar i extrudir per obtenir un material amb propietats termoplàstiques, o es pot polimeritzar químicament per a obtenir àcid polilàctic (PLA), que té propietats molt interessants com a polímer termoplàstic i biodegradable (Gupta *et al.*, 2007), i que després es pot processar per obtenir diferents productes del camp dels embalatges, fibres tèxtils i, de manera molt notable, materials biocompatibles i biodegradables per a aplicacions mèdiques. També es poden produir tota una sèrie de copolímers basats en el PLA. La polimerització es fa a partir del ciclodímer de l'àcid làctic (lactida), mitjançant una reacció d'esterificació que es produeix amb l'obertura dels anells (a la figura 4 es poden observar les estructures d'aquests compostos). Una de les primeres instal·lacions industrials en què s'ha desenvolupat aquest procés és el resultat d'una aliança entre un dels principals productors de blat de moro als EUA, Cargill, i una empresa petroquímica, Dow Chemicals, fet que no deixa de ser significatiu, tot i que actualment Dow Chemicals s'ha retirat de l'explotació. Aquesta planta produeix el polímer NatureWorks, un dels primers plàstics biodegradables derivats de glúcids, i se'n produeixen 140.000 tones/any. Recentment l'empresa japonesa Tejin Ltd. Japan s'ha associat a Cargill en la producció de NatureWorks. També recentment, a finals de 2007, s'ha creat una nova associació entre dues empreses, Galactic i Total

Petrochemicals, per construir una nova planta de PLA a Bèlgica, amb capacitat de producció de 1.500 tones/any. A Holanda, l'empresa Rodenburg BioPolymers també produeix un polímer derivat de l'àcid làctic, Solanyl, amb una capacitat de producció de 40 000 tones/any.

b) Els polihidroxialcanoats (PHA). Els PHA són bioèsters, formats per hidròxids grassos que, de fet, són una classe especial de polímers de reserva. Són sintetitzats per un ampli ventall de bacteris, en els quals es dipositen com a inclusions citoplasmàtiques insolubles. El factor clau en aquest procés és l'expansió (de manera natural o recombinant) de l'enzim polièster-sintetasa (Rehm, 2007). Es coneixen cinquanta-nou gens de polièster-sintetasa en quaranta-cinc microorganismes diferents. L'enzim permet el pas de conversió dels tioèsters (R)-hidroxiaxil-CoA a polièster, amb alliberament de CoA (Reddy *et al.*, 2003). En aquest cas també ja hi ha alguns processos industrials, com per exemple el cas de Metabolix, una empresa que produeix PHA amb un elevat grau de puresa per a aplicacions mèdiques, i que ja disposa d'una planta pilot per a la fabricació de 1.000 tones/any de l'anomenat Biopol.

A més, cal destacar també en aquest apartat la utilització de materials basats en la fermentació o els enzims per modificar polímers ja existents, tot i que en aquests casos no són biodegradables. El procés més antic que utilitza la biocatàlisi en un procés de producció d'un polímer és la conversió

enzimàtica de l'acrilonitril ( $\text{CH}_2\text{CHCN}$ ) a acrilamida ( $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ ), per poder ser emprada després en l'obtenció de poli-acrilamida. Aquest és un exemple de les aplicacions del grup de les nitril-hidrata-ses (Nhases), normalment obtingudes de soques recombinants de *Rhodococcus*, que permeten convertir els grups nitrils a amides en condicions suaus (Yamada *et al.*, 2001). El procés industrial pioner en aquesta transformació el va desenvolupar al Japó l'empresa Nitto Chemical Industry (actualment Mitsubishi Rayon Co.), i representa una reducció del 80 % dels costos d'energia i l'obtenció d'una acrilamida de puresa major que la que s'obtenia per la via química, en eliminar-ne quasi completament el principal subproducte, l'àcid acrílic. El procés es realitza amb enzims immobilitzats que, de fet, s'obtenen mitjançant enllaç creuat directe de les cèl·lules de *Rhodococcus* amb una matriu de poli-acrilamida-dimetilaminoetilmetacrilat. En aquest procés s'arriben a obtenir concentracions finals de fins a 200 g/l d'acrilamida, i se'n produeixen unes quatre mil tones l'any. La producció mundial (sobretot localitzada al Japó) de polímers d'acrilamida basats en biotecnologia és d'unes 100.000 tones/any.

Un altre exemple destacat en aquest camp és la utilització de 1,3-propandiòl obtingut per fermentació a partir de sucres en la producció de polimetilenterftalat (PTT) que, de fet, ha donat lloc a un nou tipus de fibra de polièster que s'anomena Sorona. Aquest procés ha estat portat a la producció indus-

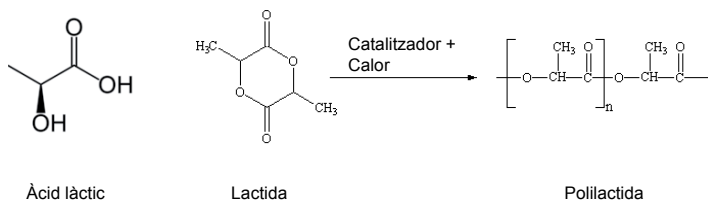


FIGURA 4. Estructures dels principals compostos involucrats en el procés de polimerització de PLA.

trial mitjançant un acord entre Tate & Lyle i DuPont, que té capacitat de producció de 23.000-45.000 tones. El desenvolupament d'una soca d'*Escherichia coli* modificada genèticament ha estat la clau per a la industrialització del bioprocés. La soca productora té divuit gens modificats, i ha representat un important esforç d'enginyeria metabòlica (Nakamura i Whited, 2003), ja que s'han incorporat a *E. coli* gens fonamentals trobats en altres organismes per a les dues rutes metabòliques principals implicades, la transformació de glucosa a glicerol (en què intervien la dihidroxiacetona-3-fosfat-deshidrogenasa i la glicerol-3-fosfat fosfatasa), i la transformació del glicerol a 1,3-propandiòl (on intervien la glicerol-deshidratasa i trimetilenglicol-deshidrogenasa); a més ha calgut incorporar també una sèrie de gens reguladors. El resultat final és una soca capaç de produir 135 g/l de 1,3-propandiòl, amb un 51 % de rendiment en pes a partir de glucosa. El Bio-PDO, com s'anomena comercialment, té tota una sèrie d'usos en l'elaboració de polímers i productes plàstics nous.

La producció de polímers basats en biotecnologia suposa encara avui dia un percentatge petit de la producció total. De fet, en la majoria dels casos els preus de venda encara són superiors als dels polímers obtinguts per via petroquímica. No obstant això, aquesta situació molt probablement canviarà en el futur, a mesura que la disponibilitat de recursos derivats del petroli disminueixi.

## ELS BIOCOMBUSTIBLES

L'augment dels preus del petroli, la disminució de les seves reserves i la preocupació sobre el canvi climàtic i els nivells creixents de CO<sub>2</sub> a l'atmosfera han tornat a posar de relleu la utilització de matèries renovables com a font d'energia. La utilització de fonts

renovables d'energia (des de plantes riques en sucre i midó fins a materials lignocel·lulòsics, que poden incloure tant residus de l'agricultura i l'explotació forestal, com plantacions específiques per a aquesta finalitat) comporta de manera global una disminució de les emissions de gasos amb efecte d'hivernacle, ja que en la seva producció s'ha produït fixació de CO<sub>2</sub>, i suposa una font energètica molt més distribuïda des del punt de vista geogràfic, que pot generar treball en les àrees rurals. Dels diferents tipus de biocombustibles que s'estan desenvolupant, avui dia els únics que s'estan explotant a escala industrial són el biodièsel i el bioetanol. Si s'hi afegeix l'etilèterbutilèter (ETBE), obtingut parcialment a partir de bioetanol, tindrem el 90 % del mercat actual dels biocombustibles (Antoni *et al.*, 2007). L'obtenció de biocombustibles per biotecnologia ja és actualment rendible des del punt de vista econòmic, a causa de l'encariment del preu del cru de petroli.

En aquest context, la producció d'etanol per fermentació, a partir de material provinent de biomassa de plantes, és el desenvolupament més rellevant i, de fet, el producte biotecnològic que es produeix en més quantitat al món (uns trenta milions de tones l'any 2005), ja que des de fa anys s'està utilitzant en molts països com a combustible, en especial al Brasil i als EUA. En el cas del Brasil representa un 14 % del total del combustible emprat. Es fan servir des de mesclades amb gasolina fins a motors que operen amb etanol, passant pels nous motors flexibles o híbrids, que permeten combinacions de carburants. Les matèries primeres varien en funció dels països. Al Brasil s'utilitza la canya de sucre, als EUA, el blat de moro, i a Europa la remolatxa, el blat i el vi. Els processos anomenats de primera generació, els primers que es van instal·lar i que actualment funcionen a escala industrial, es basen en la fermentació de la glucosa a etanol mitjançant llevats com els del gènere

*Saccharomyces*. Hi ha moltes plantes ja instal·lades i en funcionament, i cal assenyalar en aquest apartat que la primera companyia europea productora de bioetanol és l'espanyola Abengoa, que té un percentatge molt elevat de la seva producció als EUA. Un procés a partir de blat de moro té les etapes següents (vegeu la figura 5):

- Mòlta del blat de moro.
- Liqüefacció mitjançant els enzims  $\alpha$ -amilases.
- Sacarificació mitjançant glucoamilases.
- Fermentació de la solució de sucres amb llevats. Normalment la majoria de plantes tenen instal·lats processos en continu, mitjançant tancs en sèrie, que permeten optimitzar la producció, en concret minimitzant els efectes de la inhibició per producte que es dona en la fase final del procés fermentatiu.

- Rectificació. L'etanol, que al final de la fermentació es troba en una concentració al voltant del 10 % en pes, se separa de l'aigua mitjançant rectificació. S'obté en una concentració d'un 95 %, a causa de la formació d'un azeòtrop. Com a subproducte de la rectificació s'obté una mescla dels sòlids no fermentables i els llevats produïts al llarg de la fermentació.

- Deshidratació. Mitjançant filtres moleculars se separa l'aigua restant, fins assolir etanol completament deshidratat i pur.

- Desnaturalització. L'etanol es barreja amb un 2-3 % de gasolina per evitar que sigui utilitzat amb finalitats diferents que les de combustible.

- Subproductes. Cal mencionar que la planta de bioetanol produeix principalment dos subproductes. D'una banda, els components pesants de la rectificació, que contenen sòlids no fermentables, els lle-

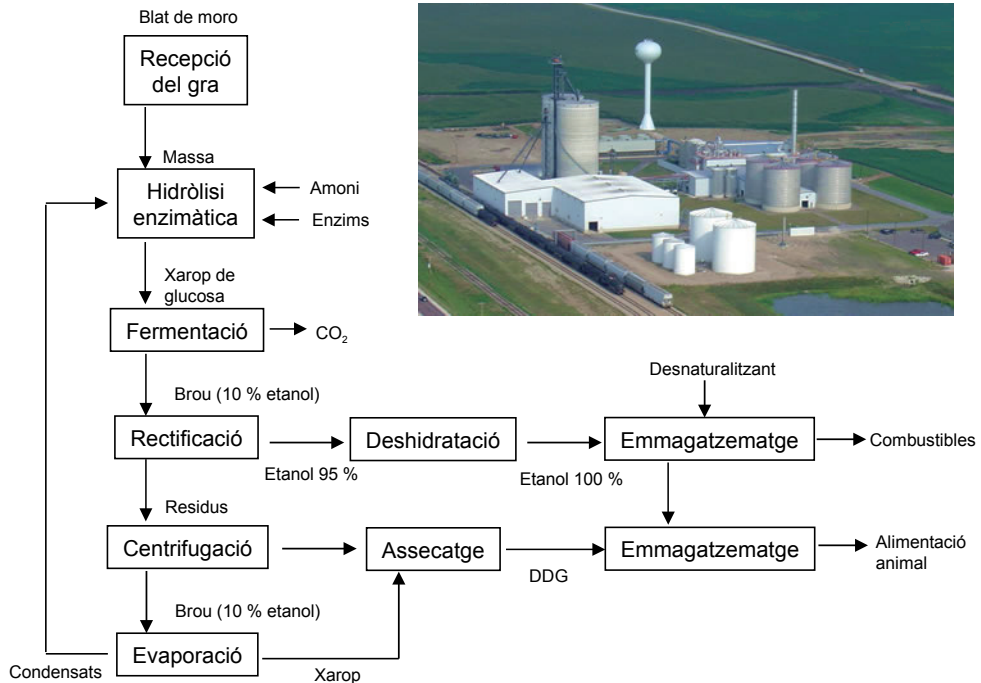


FIGURA 5. Esquema d'un procés industrial d'obtenció de bioetanol a partir de blat de moro.

vats mateixos, restes de proteïnes i glúcids. Aquesta fracció es deshidrata i esdevé un subproducte valorat com a suplement per a l'alimentació animal (*dried distilled grains, DDG*). D'altra banda, el CO<sub>2</sub> produït durant la fermentació se sol recuperar, filtrar i comprimir, per ser utilitzat en empreses de producció de begudes carbòniques.

Aquests processos de producció de bioetanol de primera generació han permès un primer desenvolupament del mercat, lligat a la major facilitat d'utilització de les matèries primeres. No obstant això, aquestes matèries, que també són necessàries per a l'alimentació humana i animal, no seran suficients per assolir una producció de bioetanol realment significativa (per exemple, a la UE es vol assolir un 20 % de substitució dels combustibles fòssils per biocombustibles per al 2020). Per això, la utilització de materials lignocel·lulòsics es considera la vertadera alternativa per al desenvolupament dels processos de segona generació (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Aquests materials són d'utilització més complexa, i el seu desenvolupament eficient haurà de considerar diferents aspectes. En primer lloc, la despolimerització de la cel·lulosa i l'hemicel·lulosa present en aquests materials a sucres solubles. Aquí hi ha dos factors importants: el pretractament (Galbe i Zacchi, 2007), que varia en funció del tipus de matèria primera (oxidació humida, tractament amb vapor, amb àcids, etc.), i la hidròlisi enzimàtica, amb els enzims cel·lulases i  $\beta$ -glucosidases. Un dels colls d'ampolla se situa actualment en l'absència d'enzims prou eficients a costos assequibles. Cal tenir en compte també que en aquesta etapa es poden produir components minoritaris (derivats de furà, àcids orgànics, compostos fenòlics i inorgànics, etc.) que poden ser inhibidors de l'etapa de fermentació. En segon lloc, el procés de fermentació és més complex, ja que el brou a fermentar conté una barreja d'hexoses i pentoses, a banda dels compostos amb potenci-

al d'inhibició ja esmentats. Això ha obligat a fer un esforç molt important en el desenvolupament de noves soques que permetin fermentar simultàniament els dos tipus de sucres. Així, per exemple, s'han desenvolupat soques del llevat *Saccharomyces cerevisiae* que, a més de la seva capacitat natural per fermentar hexoses, incorporen gens per als enzims responsables de la metabolització de xilosa en *Picchia stipitis* o d'altres que incorporen el gen de la xilosa-isomerasa del bacteri *Thermus thermophilus* (Hahn-Hägerdal, 2007). En tercer lloc, és fonamental avançar en nous conceptes d'integració de procés per minimitzar la demanda d'energia. Una alternativa clara en aquest sentit és la realització del procés simultani d'hidròlisi i fermentació (SSF). Un dels avantatges d'aquest procés és l'eliminació immediata de l'efecte inhibitori que tenen els sucres obtinguts en la hidròlisi enzimàtica mateixa, ja que són consumits continuament en el procés de fermentació. En resum, serà la millora combinada en tots aquests aspectes el que podrà portar finalment la producció de bioetanol a partir de materials lignocel·lulòsics a l'explotació industrial de manera econòmica (Wyman, 2007; Stephanopoulos *et al.*, 2007). L'interès creixent en aquests processos es reflecteix amb exemples com la decisió del Departament d'Energia dels EUA d'invertir 385 milions de dòlars en quatre anys en sis projectes de biorefineries per produir etanol a partir de diferents materials lignocel·lulòsics, la més gran de les quals serà construïda per Abengoa Bioenergy a Missouri i produirà unes 35.000 tones/any d'etanol a partir de palla de blat, pellofes de blat de moro i altres materials.

Pel que fa al biodièsel, cal mencionar que, de fet, no és un procés que es pugui considerar biotecnològic com a tal (Antoni *et al.*, 2007), tot i que la seva font sigui l'aprofitament de residus d'olis vegetals i presenti avantatges clars de tipus ambiental. El biodièsel és un monoalquil èster obtingut

dels àcids grassos dels olis vegetals, que actualment s'obté per transesterificació amb metanol, obtingut per via petroquímica. En el futur, la biotecnologia podria contribuir a aquest procés, en concret mitjançant la substitució del metanol per altres alcohols obtinguts per fermentació i en la utilització d'enzims o microorganismes recombinants per dur a terme la transesterificació, producte que s'ha anomenat *microdièsel* (Kalscheuer *et al.*, 2006). També s'ha proposat la utilització de microalgues per a la producció de la matèria primera (oli) de manera intensiva (Yusuf, 2007).

## CONCLUSIONS

La biotecnologia ha fet ja aportacions importants als processos industrials, i els ha fet més segurs, rendibles en termes econòmics i energètics, respectuosos amb el medi ambient, i eficients. Aquestes primeres aplicacions, algunes de les quals s'han tractat en aquest capítol, s'hauran d'anar ampliant i millorant, de manera que l'impacte augmenti en el futur proper. Per assolir-ho caldrà basar-se en una explotació intensiva del potencial de les tecnologies facilitadores, que permetin desenvolupar biocatalitzadors nous i més eficients, i en una aproximació més integrada i optimitzada dels processos biotecnològics. El desenvolupament d'una indústria sostenible, amb matèries primeres renovables i impacte menor en el medi ambient, passa en gran part per la biotecnologia com a vector de futur.

## BIBLIOGRAFIA

AEHLE, W. (2007). *Enzymes in industry: production and applications*. Berlín: Wiley-VCH.  
AIDA, K.; ICHIBA, I.; NAKAYAMA, K.; TAKINAMI, K.; YAMADA, H. (1986). *Biotechnology of amino acid production*. Amsterdam: Elsevier.

ANASTASSIADIS, S. (2007). «L-lysine fermentation». *Rec. Pat. on Biotechnol.*, 1:11-24.  
ANTONI, D.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. (2007). «Biofuels from microbes». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77: 23-35.  
BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2a ed., Nova York: McGraw-Hill.  
BRUGGINK, A.; NOSSIN, P. (2006). «Assessment of bio-based pharmaceuticals: the cephalixin case». A: DEWULF, J. [ed.]. *Renewables-Based Technology*. Nova York: John Wiley & Sons: 315-329.  
BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. (2005). *Biocatalyst and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH.  
DORAN, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Londres: Academic Press.  
ELANDER, R. P. (2003). «Industrial production of beta-lactam antibiotics». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: 385-392.  
GALBE, M.; ZACCHI, G. (2007). «Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production». *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 108: 41-65.  
GRAVILESCU, M.; CHISTI, Y. (2005). «Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry». *Biotechnology Advances*, 23: 471-499.  
GROSS, R. A.; KAIRA, B. (2002). «Biodegradable polymers for the environment». *Science*, 297: 803-807.  
GUISÁN, J. M. (2006). *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa: Humana Press.  
GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. (2007). «Poly(lactic acid) fiber: an overview». *Polym. Sc.*, 32: 435-482.  
HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRANSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. (2006). «Bio-ethanol: the fuels of tomorrow from the residues of today». *Trends in Biotechnol.*, 24: 549-556.  
HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRANSLUND, M. F. (2007). «Towards industrial pentose-fermenting yeast strains». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 937-953.  
HATTI-KAUL, R.; TÖRNVAL, U.; GUSTAFSSON, L.; BÖRJESSON, P. (2007). «Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals—a cradle-to-grave perspective». *Trends in Biotechnol.*, 25: 119-124.  
KALSCHUEUR, R.; STÖLTING, T.; STEINBÜCHEL, A. (2006). «Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production». *Microbiol.*, 152: 2529-2536.  
KAPLAN, D. L. (1998). *Biopolymers from renewable resources*. Berlín: Springer.  
LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (2006). *Industrial biotransformations*. 2a ed. Weinheim: Wiley-VCH.  
NAKAMURA, C.; WHITED, G. (2003). «Metabolic engineering for the microbial production on 1,3-propanediol». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14: 454-459.  
QUEENER, S. W.; NEUSS, N. (1982). «The biosynthesis of



- the betalactam antibiotics», A: MORIN, R. B.; GORMAN, M. [ed.]. *Chemistry and biology of beta-lactam antibiotics*, vol. 3. Nova York: Academic Press: 1-100.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI, K. C. (2003). «Polyhydroxyalkanoates: an overview». *Bioresour. Technol.*, 87: 137-146.
- REHM, B. H. A. (2003). «Polyester synthases: natural catalysts for plastics». *Biochem. J.*, 376: 15-33.
- SJIBESMA, F. (2003). «White biotechnology: gateway to more sustainable future» [en línia]. *Europabio*. <[www.europabio.org](http://www.europabio.org)>
- STEPHANOPOULOS, G. (2007). «Challenges in engineering microbes for biofuels production». *Science*, 315: 801-804.
- WYMAN, C. E. (2007). «What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol». *Trends Biotechnol.*, 25: 153-157.
- YAMADA, H.; SHIMIZU, S.; KOBAYASHI, M. (2001). «Hydratases involved in nitrile conversion: screening, characterization and application». *Chem. Rec.*, 1: 152-161.
- YUSUF, C. (2007). «Biodiesel from microalgae». *Biotechnol. Adv.*, 3: 294-306.