

Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos

Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts

Sánchez Riaño, A. M.;^I Gutiérrez Morales, A. I.;^{II} Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. A.^I

Resumen. En la actualidad, la biomasa lignocelulósica y en especial los subproductos agroindustriales han dejado de ser productos de desecho-problema, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de alcohol carburante uno de los más importantes. Sin embargo, han sido y son muchos los limitantes que se han presentado en torno a la obtención de etanol a partir de este tipo de materiales, debido a su estructura lignocelulosa de compleja degradación. Por ello, han surgido diversidad de trabajos e investigaciones, que abarcan distintas problemáticas y proponen alternativas de solución y aportes enormes que poco a poco han abierto el camino hacia la explotación de la biomasa lignocelulósica para este fin. El presente documento, muestra una revisión del estado del arte de este tipo de materiales y su potencial de uso para biocombustibles (etanol), describiendo las características de las materias primas en cuestión, su estructura, las etapas (pre-tratamiento, hidrólisis, detoxificación y fermentación) y métodos que cita la literatura; al igual que los avances microbiológicos que han logrado para la incursión de los mismos en algunas de las etapas del proceso.

Palabras clave: Biomasa lignocelulósica, Bioetanol, Hidrólisis enzimática, Detoxificación, Fermentación.

Abstract. Currently, the lignocellulosic biomass and agro-products have left to be a problem-waste product to become potential raw material for various agricultural and industrial processes, for instance the production of alcohol fuel is one of the most important products. However, there have been many limits around the production of ethanol due to this kind of materials have a structure of lignocellulose with a complex degradation. Therefore, diversity of research works have emerged and research, covering various issues and propose alternative of solutions, so these have gradually opened the way to the exploitation of lignocellulosic biomass for this purpose. In this paper, we show a review of different kind of raw materials and their potential use for biofuels (ethanol), describing the characteristics of the materials, its structure, stages of the production (pre-treatment, hydrolysis, detoxification and fermentation) and,

I Grupo de Investigación CEDAGRITOL. Programa Ingeniería Agroindustrial, Facultad Ingeniería Agronómica, Universidad del Tolima. cedagritol@ut.edu.co, carivera@ut.edu.co.

II. Technische Universiteit Delft (Holanda). Applied Sciences-TNW, Biotechnology department.

as well as microbiological advances have been achieved to improve some stages of that process.

Key words: Lignocellulosic biomass, Bioethanol, Enzymatic Hydrolysis, Detoxification, Fermentation.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la generación de alternativas energéticas distintas a las ya convencionales obtenidas principalmente de la explotación del petróleo, ha conllevado al uso de materias primas naturales dando lugar a los llamados biocombustibles dentro de los cuáles destaca el bioetanol. Ello ha surgido a raíz de la necesidad de proteger el medio ambiente, preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial de uso de productos agrícolas, y en especial de los subproductos que estos generan al someterlos a distintos procesos agroindustriales, cuya disposición final es un gran problema ambiental. De estos subproductos ó residuos en su mayoría corresponden a biomasa lignocelulosa rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80%, los cuales pese a su dificultosa degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos a azúcares monosacáridos para su posterior conversión a etanol. Las apuestas en investigación están dirigidas al estudio e incursión de pretratamientos viables tanto en proceso como económicamente para este tipo de materias primas, y el uso de microorganismos, hongos y/o bacterias modificadas, combinadas, etc., para la potencialización de estas en la fermentación de azúcares y posterior obtención de bioetanol.

2. CARACTERIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

2.1 Composición de materiales lignocelulósicos

Compuestos principalmente de tres tipos diferentes de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina (Fengel y Wegener, 1984), envueltos en una compleja estructura. Este tipo de materiales son los más abundantes en la naturaleza.

2.1.1 Celulosa

Está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por b-1,4 glicosídicos (Fengel y Wegener, 1984), monosacárido de gran importancia en la fermentación. La celulosa posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las cepas de celulosa son “empaquetados” denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas de ce-

lulosa son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

2.1.2 Hemicelulosa

Carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), azúcar y ácidos, entrelazadas entre sí glucosídicamente. Muchas de ellas, en la degradación hidrolítica, dan, junto a glucosa, manosa, galactosa, etc (Palacio, 1956). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

2.1.3 Lignina

Heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Fengel y Wegener, 1984).

2.2 Composición y contenido de los materiales de interés en la industria de la fermentación, en cada uno de los subproductos considerados

Las propiedades físicoquímicas de los subproductos en mención dependen de las condiciones climáticas y del terreno donde se hayan generado. En la tabla 1, se muestran valores promedio reportados en la literatura.

Material lignoceluloso	%(w/w) BS Celulosa	%(w/w) BS Hemicelulosa	%(w/w) BS Lignina	Referencias
Cascarilla de arroz	39.05 25.89-35.5	18.1 – 21.35	22.80 18.20 – 24.6	(Valverde <i>et al.</i> , 2007)
Bagazo de Caña	48,81	24.42	25,82	(Area, 2002)
Desechos cítricos (Bagazo y cáscara)	20.63 16.2 ± 0.5	10.86 13.8 ± 0.3	2.62 1.0 ± 0.3	(Sánchez, M. <i>et al.</i> , 1996) Limón – Citrus limón L. (Mamma <i>et al.</i> , 2008) Naranja
Subproductos de Plátano (Cáscara de Banano)	13.2	14.8	14.00	(Monsalve <i>et al.</i> , 2006)

Tabla 1. Composición promedio en polímeros de interés de cada una de las materias primas. Fuente: los autores.

Para el caso de los cítricos, estos son ricos también en sustancias de interés para la fermentación como son azúcares simples (fructosa, glucosa y sacarosa) y otro polímero de importancia como la pectina (IMECAL, 2008).

2.3 Producción de materiales originales y residuos (mundial y nacional) / Costo-beneficio de producir alcohol a partir de los mismos

Para el caso de la cascarilla de arroz, a nivel mundial la FAO reporta una producción de 607.000.000 Tm (Méndez, 2005) de arroz paddy en el año 2004, de los cuáles Colombia aportó 2.720.9081Tm (MADR y Agrocadenas, Arroz, 2005). Tomando en cuenta que la cascarilla representa un valor promedio del 20% del peso del grano (Ahumada y Rodríguez, 2006), se tendría una generación de residuo de 134.000.000 Tm y 544.182 Tm, a nivel mundial y de Colombia, respectivamente. Para el caso del departamento del Tolima anualmente se producen 152.622 Tm de cascarilla de arroz (Corporación C, 2006).

En cuanto a los subproductos de la industria de jugos cítricos (bagazo y cáscara), la FAO reporta que para el 2004 se tuvo una producción mundial de cítricos de 102,239,670 Tm (Bruno, 2008), de las cuáles Colombia aportó 305.000 Tm (MADR & Agrocadenas, Cítricos, 2005) y el Tolima 144.550 Tm (Corporación C, 2006); de esta cantidad de acuerdo a (Mamma *et al.*, 2008), y suponiendo que el 50% de la producción total mundial, nacional y departamental se destine para esta industria se obtendría una generación de desechos de 25.559.918 Tm, 76.250 Tm, y 36.138 Tm respectivamente.

En lo que respecta a la agroindustria panelera, Colombia es el segundo productor mundial después de la India. En 1998 se cultivaron en Colombia 226.000 hectáreas, con una producción de 105.95 Tm de caña/Hectarea (Asocaña, 2007), es decir un total de 23.944.700 de Tm de caña los cuáles según Corpoica, *et al.* (1998), debieron arrojar 9.577.88 Tm de bagazo. Para el caso del departamento del Tolima en 2006 se produjeron 101516,39 Tm de caña (Corporación C, 2006), es decir 40.6 Tm de bagazo. En la tabla 2 se consigna la información mencionada y los rendimientos promedio de etanol generados a partir de cada uno de los subproductos de acuerdo a diferentes estudios.

Materia prima	Cantidad de subproducto año		Rendimiento en Etanol
	Mundial (Tm)	Colombia (Tm)	
Cascarilla de arroz	134.000.000 (MADR y Agrocadenas, Arroz, 2005)	544.182 (MADR y Agrocadenas, Arroz, 2005)	0.25 L/Kg M.P. (Rojas y Cabanillas, 2008). 0.20 g/g (Saha y Cotta, 2007)
Bagazo de Caña	2005 fue de 1,267 millones, Colombia 3%, (FAO, 1993)	Producción de caña es 84.1 ton/Ha (FAO, 1993)	0.34 L/Kg M.P. (Forero, 2009)
Desechos cítricos (Bagazo y cáscara)	25.559.918 (Mamma <i>et al.</i> , 2008)	76.250 (Mamma <i>et al.</i> , 2008)	0.16 L/ Kg M.S. (Coll, 2008)
Subproductos de Plátano	6246 miles de Ton. (FAO, 1993)	Producción de plátano 53.674 (MADR y IICA, 2000)	-

Tabla 2. Rendimientos en etanol para cada una de las materias primas. Fuente: los autores.

Conforme a la tabla 2, si toda la cascarilla de arroz y subproductos cítricos colombianos resultantes se destinaran a la producción de etanol, anualmente se tendrían aproximadamente 136.045.500L y 12.200.000L de etanol, lo que conforme al precio nacional de \$6.200 (Guzmán, 2009) por el cual se cotiza el galón de etanol actualmente, generaría entradas por \$222.848.639.400 y \$19.984.147.950, respectivamente, sumas importantes considerando que estos subproductos no tienen costo comercial y son un problema ambiental.

3. TRANSFORMACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

3.1 Pretratamiento

Etapa indispensable para el procesamiento de biomasa lignocelulósica que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos. Se hace necesario principalmente porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma unas barreras contra un ataque enzimático. Un pretratamiento ideal es reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial (Krishna and Chowdary, 2001).

3.1.1 Descripción de diferentes alternativas de pretratamiento

3.1.1.1 Pretratamiento mecánico

- a. Trituración mecánica: Molienda para reducción de partícula del tamaño de malla inferior a 40, tiene un efecto mínimo en los rendimientos de la hidrólisis, así como la tasa de hidrólisis de la biomasa (Chang y Holtzaple, 2000).

- b. Ultrasonido: Es una técnica empleada para extraer lignina y hemicelulosa, en Yu *et al.* (2009), emplearon este método a 25°C y diferentes períodos de tiempo entre 10 a 60 min., encontrando que el mejor tiempo de residencia fue de 30 min.; sin embargo, su efecto sobre la biomasa es muy superficial comparado con métodos como el pretratamiento con H₂O₂.

3.1.1.2 *Pretratamiento térmico.* En este tipo de pretratamiento la materia prima es calentada en un rango de 150 a 180°C, donde la hemicelulosa y seguida a ella la lignina son solubilizadas (Bobleter, 1994). Temperaturas superiores a 180 °C solubiliza la hemicelulosa (Beall y Eickner, 1970). Durante los procesos térmicos una parte de la hemicelulosa es hidrolizada y forma ácidos, estos son asumidos como catalizadores para hidrolizar la hemicelulosa (Gregg y Saddler, 1996).

- a. Explosión por vapor: La materia prima se somete a temperaturas entre 160-260°C, mediante la inyección directa de vapor saturado, por un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Seguidamente se lleva el producto a una rápida descompresión hasta presión atmosférica. Como resultado se obtiene biomasa con alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras), y químicas (despolimerización y rotura de enlaces) y una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Las variables a controlar en este tipo de procedimiento son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, y la humedad (Duff y Murray, 1996).
- b. Agua líquida a alta temperatura (LHW): En este proceso se somete la biomasa al efecto de agua caliente a una temperatura entre 170 – 230°C por un tiempo de 46 min. El objetivo de este pretratamiento es solubilizar principalmente la hemicelulosa de la celulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para evitar la formación de inhibidores, el pH debe mantenerse entre el 4 y 7 durante el pretratamiento. Mantener el pH entre 4 y 7 minimiza la formación de monosacáridos y, por lo tanto, también la formación de productos de degradación que puede seguir catalizando la hidrólisis del material celulósico durante el pretratamiento (Kohlmann *et al.*, 1995).

3.1.1.3 *Pre-tratamientos físico-químicos.*

- a. Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX): El pretratamiento con amoníaco se realiza con cargas de amoníaco en torno a 1:1 (amoníaco kg/kg peso biomasa seca) a temperaturas que van desde la temperatura ambiente con una duración de 10 a 60 días, a temperaturas de hasta 120 °C, con una duración de varios minutos (Alizadeh *et al.*, 2005). También se da un aumento de seis veces

la hidrólisis enzimática y un rendimiento de 2,5 veces el rendimiento a etanol después de este pretratamiento.

- b. Explosión con CO₂: Se lleva a cabo con alta presión y altas temperaturas de hasta 200 °C, con una duración de varios minutos. Este pretratamiento produce líquidos que pueden ser ácidos, estos ácidos hidrolizan especialmente la hemicelulosa. El CO₂ también se aplica como CO₂ supercrítico (35 °C, 73 bares), este incrementa el rendimiento de glucosa en 50-70% de bagazo (Zheng *et al.*, 1998), el 14% de pino amarillo y el 70% de álamo (Kim y Hong, 2001). Esto es probablemente causado por el aumento del tamaño de poros.

3.1.1.4 Pretratamiento químico.

- a. Hidrólisis ácida: Es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Galbe y Zacchi, 2002). Siendo solamente usados a nivel industrial los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Los métodos industriales de hidrólisis ácida se agrupan en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados (10-30%), trabajan a bajas temperaturas (170-190°C) y mayor tiempo de residencia; y los que utilizan ácidos diluidos (1-5%), a temperaturas más altas (160-240°C), y tiempo de reacción de 6-12 segundos.

La principal reacción que ocurre durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de hemicelulosa, especialmente xilano como glucomanano. La hemicelulosa puede ser sometida a reacciones hidrolíticas produciendo monómeros, como furfural, HMF y otros productos (Fengel y Wegener, 1984). Durante el pretratamiento ácido la lignina es rápidamente condensada y precipitada en ambientes ácidos (Liu y Wyman, 2003).

- b. Oxidación húmeda: Un pretratamiento oxidativo consiste en la adición de un compuesto oxidante, como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético a la biomasa, que está sumergida en el agua. Durante el pretratamiento oxidativo puede tener lugar reacciones como sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, rompimientos de vínculos de alquil, aril, éter o de núcleos aromáticos (Hon y Shiraishi, 2001).
- c. Tratamientos con ozono: El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa. Se lleva a cabo a condiciones de presión y temperatura ambiente.

les. La degradación es esencialmente limitada a atacar la lignina y hemicelulosa aunque la celulosa es afectada (Sun y Cheng, 2002).

- d. Hidrólisis con álcalis: Se lleva a cabo con NaOH diluido donde se sumerge el material lignocelulósico, a 60°C por 24 horas, produciendo un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar reacciones como solvatación y saponificación. Esto provoca un estado de inflamación de la biomasa, lo que la hace más accesible para enzimas y bacterias. Disoluciones de álcalis fuertes dan lugar a hidrólisis alcalina, degradación y descomposición de polisacáridos y rompimiento de radicales finales. La pérdida de polisacáridos es causada principalmente por el rompimiento de radicales finales y reacciones hidrolíticas (Fengel y Wegener, 1984).
- e. Tratamiento con solventes orgánicos: En el proceso, un compuesto orgánico o acuoso se mezcla con un ácido inorgánico (HCl o H₂SO₄), este se utiliza para romper el interior de la lignina y puentes de hemicelulosa. Se emplean disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol y alcohol tetrahidrofurfúrico. Ácidos orgánicos como oxálico, acetilsalicílico y salicílico también puede ser utilizados como catalizadores en el proceso. A temperaturas altas (por encima de 185 °C), el uso de catalizadores es innecesario para la deslignificación (Sanchez y Cardona, 2005).

3.1.1.5 Pretratamientos biológicos. En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinadas enzimas ó micro-organismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático, por lo que generalmente se hace necesario hacer primero un tratamiento con hongos y posteriormente con las enzimas.

- a. Tratamiento con hongos: Utiliza microorganismos como hongos de podredumbre marrón, blanco y suave se para degradar lignina y hemicelulosa en los materiales de desecho. La podredumbre marrón ataca la celulosa, mientras que la podredumbre blanca y suave ataca tanto la celulosa como la lignina. Hongos de pudrición blanca (basidiomicetos) son los más eficaces para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos (Fan *et al.*, 1987).
- b. Tratamiento con bio-solventes orgánicos: Emplea solventes orgánicos y hongos, el primero para permitir la acción de hidrólisis en la hemicelulosa y el segundo para la descomposición de la red de lignina. Se han realizado estudios con etanol

como solvente y podredumbre blanca para la degradación de lignina en madera, los hongos usados fueron *Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *Pleurotus ostreatus*, y *Coriolus versicolor*. El pretratamiento biológico puede ahorrar el 15% de la electricidad necesaria en la etanolisis, el etanol puede ser reutilizado y es amigable con el medio ambiente (Itoh *et al.*, 2003)

PRETRATAMIENTO MECÁNICOS		
Método	Ventajas	Desventajas
Trituración mecánica	La reducción de tamaño de partículas lleva a un aumento de superficie específica y una reducción del grado de polimerización (DP). El incremento del área superficial específica, reduce DP, este es un factor que incrementa los rendimientos de la hidrólisis entre el 5–25% (dependiendo de la clase de biomasa, clase y duración de la molienda), también se disminuye el tiempo de digestión entre el 23–59% (así se incrementa la velocidad de la hidrólisis) (Delgenés <i>et al.</i> , 2003).	A pesar de no producirse inhibidores (como furfural y HMF (hidroximetilfurfural)), la molienda es ideal tanto para el metano y la producción de etanol. Sin embargo, esta operación requiere de alta consumo energético (Cowling y Kirk, 1976) y se encontró este pretratamiento económicamente no viable (Fan <i>et al.</i> , 1987). Teniendo en cuenta las necesidades de alta energía de molienda y el continuo aumento de los precios de la energía, es probable que la molienda no sea el pretratamiento más viable.
Ultrasonido		El efecto sobre la biomasa es muy superficial.
PRETRATAMIENTOS TÉRMICOS		
Explosión de vapor	Hidrólisis de 80 al 100% de la hemicelulosa. Alta concentración de sólidos. Reducción del tamaño con menor gasto energético. Despolimerización baja de la celulosa y recuperación fácil de esta por lavado. La lignina inalterada se puede extraer. Grous <i>et al.</i> , (1986) reporta un incremento en la digestibilidad enzimática de la biomasa después de este pretratamiento.	Destrucción de una parte de los xilanos de las hemicelulosas. Incompleta rotura de la matriz lignina-carbohidratos. Generación de inhibidores que afectan el proceso de fermentación. Debe combinarse con H ₂ SO ₄ , SO ₄ ó CO ₂ para mejorar la eficiencia. Existe el riesgo de producción de compuestos fenólicos soluble (Benjamin <i>et al.</i> , 1984). Puede darse la condensación y precipitación de compuestos soluble de lignina haciendo la biomasa menos digestible, reduciendo la producción de etanol (Hendriks y Zeeman, 2009).
Agua caliente líquida presurizada	Se recuperan la mayoría de las pentosas. Hidrólisis de la hemicelulosa de 80-100%. Baja ó nula formación de inhibidores. Respecto al pretratamiento con vapor, este tiene la ventaja de solubilizar productos de hemicelulosa y lignina en concentraciones más bajas.	Debido a las bajas concentraciones se reduce el riesgo de degradación de productos como furfural y la condensación y la precipitación de compuestos de lignina (Hendriks y Zeeman, 2009).

PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS		
Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	No se producen inhibidores. No requiere pequeños tamaños de partícula para aumentar su eficiencia.	No se solubiliza la hemicelulosa. La composición del material sometido a este proceso prácticamente no cambia. Sólo es aplicable y efectivo hasta un 90% en materiales con contenidos de lignina menores a 15%. Requiere recuperación del amoníaco.
Explosión con CO ₂	Es más barato que la explosión con amoníaco. No origina los compuestos inhibitorios que se originan durante la explosión por vapor (Zheng <i>et al.</i> , 1998)	Rendimientos relativamente bajos comparados con la explosión por vapor y el proceso AFEX.
PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS		
Hidrólisis ácida	Ácidos concentrados: se obtienen rendimientos de hidrólisis superiores al 90%. Ácidos diluidos: bajo consumo de ácidos; hidrólisis del 80 al 100% de la hemicelulosa; la T° alta favorece la hidrólisis de la celulosa.	Ácidos concentrados: la gran cantidad de ácido requerido; los costos de la recuperación del ácido; los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que conllevan a altas inversiones en los equipamientos; es necesaria una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación (Keller, 1996). Existe el riesgo de formación de inhibidores. Ácidos diluidos: Requiere altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa; a pesar de las T° altas y tiempos de residencia cortos que generan máximos rendimientos en glucosa, tan sólo han logrado el 60% en torno al rendimiento teórico
Tratamientos con ozono	La eliminación efectiva de la lignina. No origina productos inhibidores.	Los altos costos por la cantidad de ozono requerido. No ha sido probado en cascarilla de arroz, sin embargo, si en paja de trigo.
Hidrólisis con álcalis	Aumento del área superficial interna. Descenso del nivel de cristalización. Separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. Rotura de la estructura de la lignina.	La efectividad de este pre-tratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar, que debe ser máximo de 18%. El pretratamiento alcalino causa la solubilización de hemicelulosa y lignina. Existe a menudo una pérdida de productos en la degradación de hemicelulosa y la solubilización de lignina, a menudo tiene un efecto inhibitorio.

Oxidación húmeda	Este tratamiento tiene la ventaja de no generar prácticamente productos de degradación como el furfural, y HMF (Klinke <i>et al.</i> , 2002).	Durante un pretratamiento oxidativo una gran cantidad de azúcares se pierden, porque no es un proceso selectivo. También se forman los compuestos solubles de lignina, lo que puede dar la inhibición en la conversión posterior de hemicelulosa en etanol (Hendriks y Zeeman, 2009).
Tratamiento con solventes orgánicos	Solubilización de la lignina e hidrólisis de la hemicelulosa casi total.	Para reducir costos y evitar problemas en la posterior etapa de fermentación, se deben reciclar los solventes.
PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS		
Tratamiento con hongos	Bajo requerimiento energético, producción del proceso a condiciones ambientales.	La tasa de hidrólisis es demasiado lenta.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de pretratamiento para materiales lignocelulósicos. Fuente: los autores.

3.2 Hidrólisis enzimática

3.2.1 Definición

Proceso catalizado por enzimas denominadas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa (los autores). El uso del pre-tratamiento como se explicaba anteriormente, facilita el desarrollo de esta etapa. Cabe destacar que en la mayoría de procesos existe un primordial interés por los azúcares provenientes de la celulosa, sin embargo, la tendencia actual es el aprovechamiento integral de la biomasa, y en especial de otros azúcares como las pentosas, provenientes de la hemicelulosa, conllevando al uso de enzimas que actúen sobre dichas sustancias como es el caso de las xilanasas y las xilasas (los autores).

3.2.2 Contenido enzimático

Las enzimas del complejo celulasa y el mecanismo de la hidrólisis enzimática, según cita Gómez (2008), han sido agrupadas en tres componentes mayores:

Endo β -glucanasas ó 1,4- β -glucan glucanohidrolasas (EC 3,2,1,4), que rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa.

- Exo β -glucanasas ó 1,4- β -glucan celobiohidrolasas (EC 3,2,1,91), que atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa.

- B-glucosidasas ó celobiosas (EC 3,2,1,21), la que hidroliza celobiosas y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa.
- Para el caso de la hemicelulosa esta corresponde a un heteropolisacárido, ya que sus ramificaciones están compuestas por más de un tipo de monómero ó polisacáridos como es el caso de la xilosa (principal constituyente), arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucorónico, a su vez unidos por un solo tipo de monosacáridos unidos por enlaces β (1-4), que forman cadena lineal ramificada. Entre los cuáles destacan la glucosa, la galactosa ó la fructosa (dependiendo del tipo de material a emplear) (Wikipedia, 2009). Por ello, con el fin de aprovechar la fracción hemicelulosa se suelen emplear enzimas tales como xilasas, xilanasas, α -l-arabinofuranosidasa, β -xylosidasa, entre otras.

3.2.3 Uso de enzimas comerciales

Corresponden a preparados celulíticos ó hemicelulíticos obtenidos a partir de microorganismos como hongos y bacterias, aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. No obstante, son de utilidad sólo aquéllos que presentan producción extracelular de celulasas y/o hemicelulasas. La tabla 4, muestra con base en información encontrada en Ovando y Waliszewski (2005), una serie de microorganismos a partir de los cuáles se obtienen la mayor parte de los preparados enzimáticos comerciales.

Tipo de M.O.	Características	Nombre del M.O.
Bacteria	Aeróbicas mesofílicas y termofílicas	Cellulomonas sp., Cellvibrio sp., Microbispora bispora y Thermomonospora sp.
	Anaeróbicas mesofílicas y termofílicas	Acetivibrio cellulolyticus, Bacteroides succinogenes, Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens y Clostridium thermocellum
Hongo	Aeróbicos	Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Penicillium pinophilum, Sporotrichum pulverulentum, Fusarium solani, Talaromyces emersonii y Trichoderma koningii
	Aeróbicos Termofílicos	Sporotrichum thermophile, Thermoascus aurantiacus y Humicola insolens
	Anaeróbicos mesofílicos	Neocallimastix frontalis, Piromonas communis, Sphaeromonas communis

Tabla 4. Microorganismos a partir de los cuáles se obtienen enzimas celulósicas y/o hemicelulósicas. Fuente: los autores.

De los anteriores según la fuente citada, los más comunes son los preparados celulíticos obtenidos a partir de Trichoderma sp, Aspergillus Niger y Bacillus Subtilis.

En cuanto a trabajos desarrollados que han empleado enzimas comerciales para la hidrólisis de cascarilla de arroz se hallan Saha y Cotta, (2007 y 2008), en donde además de evaluar el pre-tratamiento alcalino (con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NaOH), sobre cascarilla de arroz, también determinaron los rendimientos en diferentes mezclas ó cocteles enzimáticos. Por su parte, Krishna *et al.* (2001), emplean Celulasa de *Trichoderma reesei* QM-9414 (Celluclast) y β -glucosidasa (Novozym 188) de *Aspergillus niger*, para la hidrólisis de diferentes residuos agroindustriales.

3.2.4 Uso de enzimas obtenidas a partir de cultivos fúngicos y bacterianos aisladas en el laboratorio

Debido a los altos costos que el uso de enzimas comerciales genera en los procesos industriales, sumado al interés de conseguir mejores y mayores rendimientos tanto en la tasa de hidrólisis como de conversión de azúcares a etanol, se ha incrementado el uso de cultivos aislados de su ambiente natural y cultivados en el laboratorio, empleando diferentes metodologías para la producción y acción de enzimas de interés.

En cuanto a métodos para mejorar la acción enzimática se emplea la inmovilización que da mayor estabilidad a la enzima (Arroyo, 1998). Existen distintos tipos de inmovilización los cuales están clasificados en dos grandes categorías retención física y unión química. Arroyo (1998) y Sánchez (2009), en sus documentos describen cada una de estas categorías y sus diferentes técnicas, al igual que mencionan ventajas y deventajas de cada una de ellas.

De estas técnicas, el trabajo de Sharma *et al.* (2001), aplica crosslinking para celulasa de *A. Niger* con glutaraldehído. Y Baptista *et al.* (2006), aunque no para hidrólisis enzimática sino sobre levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) para fermentación, emplea unión a soportes de espuma de poliuretano, coque y leca. Otras investigaciones han empleado cultivos fúngicos, que luego de haber sido aislados de sus medios naturales y sembrados en Laboratorio, propagados en el sustrato a tratar, son inoculados en los reactores de hidrólisis, donde realizan el respectivo proceso de degradación de la celulosa y/ó hemicelulosa a sus monómeros, mediante la acción de sus enzimas. Ejemplo de ello, lo son trabajos como Oliveira *et al.* (2006), que emplea cascarilla de arroz como sustrato y Jørgensen *et al.* (2003), donde lograron purificar y caracterizar cinco celulasas y una xilanasa, y Mamma *et al.* (2008), donde emplean distintos cultivos fúngicos, para la hidrólisis de cáscaras de naranjas secas a través de la producción multienzimática (xilanolítica, celulítica y pectinolítica).

En cuanto a la obtención de enzimas celulíticas a partir de cultivos bacterianos, se

tiene a Lo *et al.* (2009), en el cual aislaron ocho cepas del género *cellulomonas sp.*, y una *Cellulosimicrobium cellulans*, empleando tres sustratos dentro de los cuales se halla la cascarilla de arroz y Lee *et al.* (2008), en el cual purificaron y caracterizaron la celulasa producida por *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3, empleando igual que el anterior cascarilla de arroz como sustrato.

3.3 Detoxificación

Denominado así porque su aplicación busca eliminar todas aquellas sustancias que pudieron formarse durante el sometimiento de la materia prima al pre-tratamiento y la hidrólisis enzimática, y que resultan tóxicas e inhibitorias en la fermentación. Dichas sustancias suelen formarse debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas en las que se desarrollan las anteriores etapas. De igual manera, busca evitar la formación de otras sustancias durante el proceso de fermentación que afecte la producción de etanol (los autores).

3.3.1 Tipos de sustancias inhibitorias y su clasificación

Existen distintas clasificaciones que agrupan este tipo de sustancias inhibitorias, Olson y Hahn-hägerdal (1996) y Cantarella *et al.* (2004) las dividen en cuatro grupos: Productos de degradación de azúcares, productos de la degradación de la lignina, componentes derivados de la estructura lignocelulosa y por último iones de metales pesados. Por otro lado Oliva (2003), los clasifica en tres grupos: derivados del furano (generados a partir de la hidrólisis de hemicelulosa), ácidos alifáticos de bajo peso molecular (degradación de furanos) y derivados fenólicos (provenientes de la degradación de la lignina). Cualquiera de estas clasificaciones es válida, ya que reúnen todos los compuestos tóxicos conocidos en este tipo de proceso.

De todos estos los más reconocidos son el furfural formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el hidroximetil furfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) (Oliva, 2003).

3.3.2 Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos fermentadores y el proceso

En la tabla 5, se presentan los efectos negativos de los compuestos tóxicos conforme a su clasificación.

Clasificación	Efectos	Observaciones
Furfural e hidroximetilfurfural (HMF)	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de la tasa específica de crecimiento. • Disminución de la productividad volumétrica y específica de etanol. • Disminución de la producción de biomasa. • Producen daños en la membrana plasmática celular. • Inhiben la acción de enzimas. 	<p>Los efectos producidos por el HMF son menores que el furfural, pero son los mismos. El furfural inhibe la alcohol deshidrogenasa, induciendo la formación de acetaldehído. En anaerobiosis el furfural se degrada a alcohol furfúrico y furoico. (Oliva, 2003).</p>
Ácidos alifáticos	<ul style="list-style-type: none"> • Descenso del rendimiento en etanol. • Disminución de la producción de biomasa. • Reducción de la tasa específica de crecimiento. • Muerte celular. 	<p>El mecanismo de inhibición de estos es aún confuso. Existen teorías tales como: Del acoplamiento acumulación intracelular de aniones (Oliva, 2003).</p>
Compuestos fenólicos.	<ul style="list-style-type: none"> • Daño en la membrana plasmática celular. • Descenso del rendimiento en etanol. • Disminución de la producción de biomasa. • Reducción de la tasa específica de crecimiento. • Muerte celular. 	<p>Son los más tóxicos para los microorganismos. Su efecto inhibitorio es aún desconocido; al parecer afecta la célula alterando su especificidad. Se cree que actúan de manera similar que los alifáticos (Oliva, 2003).</p>
Combinación de varios compuestos tóxicos	<ul style="list-style-type: none"> • Furfural y ácido acético: • Descenso de la tasa de crecimiento • Disminución del rendimiento de biomasa. • Descenso del rendimiento en etanol. • Furfural, ácido acético y derivados de lignina: • Descenso del rendimiento en etanol. • Descenso de la tasa de crecimiento • Disminución del rendimiento de biomasa. 	<p>Estos efectos se conocen como “efecto sinérgico”, ya que el efecto combinado de estos compuestos en conjunto es más alto que el ocasionado por cada uno de manera individual (Mussatto y Roberto, 2004).</p>

Tabla 5. Tipos de inhibidores y sus efectos sobre el proceso. Fuente: los autores.

3.3.3 Métodos de detoxificación

Son variadas las opciones de detoxificación que se han aplicado con éxito o no en distintos tipos de biomasa. Las mismas están clasificadas según el tipo de sustancias y acciones que las constituyen, por lo cual varios autores las agrupan en físicas, químicas y biológicas (Oliva, 2003; Mussatto y Roberto, 2004).

3.3.3.1 Métodos biológicos. Involucran el uso de enzimas y microorganismos específicos que actúan sobre los compuestos tóxicos cambiando su composición (Mussatto y

Roberto, 2004). Para el caso de la detoxificación con enzimas se encuentran principalmente el uso de peroxidasa y lacasas. Las primeras, transforman primordialmente fenoles y aminas aromáticas; estas son de gran efectividad e incluyen enzimas tales como horseradish peroxidasa (HRP), lignin peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), entre otras; y son producidas por distintos microorganismos en especial de tipo fúngico (Hamid y Rehman, 2009). En cuanto a las Lacasas, son conocidas bajo el término Sistemas Mediadores de Lacasas (LMS), ya que reúne un complejo enzimático conformado por distintas enzimas. Son muchas las fuentes ó microorganismos productores de lacasas un completo listado de ellos lo presenta Rodríguez y Toca (2006).

En cuanto a los microorganismos empleados para detoxificación se encuentran tanto de tipo bacteriano como fúngico. Para el caso de los fúngicos existen investigaciones como Nichols *et al.* (2008), donde emplean una cepa aislada de *Coniochaeta ligninaria* NRRL30616, para tratar los inhibidores presentes en un hidrolizado de maíz después de pre-tratamiento ácido-diluido. En el caso del uso de bacterias, está Okuda *et al.* (2008), en el cual utilizan una cepa de *Ureibacillus thermosphaericus*, para detoxificar hidrolizado de madera pre-tratado con ácido diluido.

3.3.3.2 *Métodos físicos y químicos.* En la tabla 6, se describen cada uno de estos métodos de detoxificación, algunos aún no probados en hidrolizados para producción de etanol, pero que pueden considerarse como alternativas de uso y ensayo en esta etapa.

Método	Descripción	Componentes que degrada	Microorganismo que favorece	Ejemplo	Fuente
Tratamientos con hidróxidos	Emplea hidróxidos de cualquier tipo. Forma precipitados con sales de calcio, los cuales son retirados antes de la fermentación. El pH de trabajo es igual a 10	Furfural, HMF, ácido acético. En baja proporción los azúcares fermentables.	<i>E. coli</i> , <i>Z. mobilis</i> , <i>P. stipitis</i> , <i>S. cerevisiae</i> .	(Purwadi <i>et al.</i> , 2004)	(Oliva, 2003) (Sánchez y Cardona, 2008)
Overliming	Ca(OH) ₂ , pH = 9–10,5, luego el pH es ajustado a 5,5–6,5 con H ₂ SO ₄ ó HCl.	Ácido acético, furfural y compuestos fenólicos.	<i>S. cerevisiae</i> recombinante y <i>E. coli</i> recombinante.	(Saha <i>et al.</i> , 2005); (Hodge <i>et al.</i> , 2009); (Cantarella <i>et al.</i> , 2004)	

Método	Descripción	Componentes que degrada	Microorganismo que favorece	Ejemplo	Fuente
Evaporación	Debe realizarse a pH bajo. Es poco efectivo	Furfural, ácido acético y ácido fórmico. No elimina HMF, ácido levunílico y compuestos fenólicos.	S. cerevisiae; P. stipitis		(Oliva, 2003) (Sánchez y Cardona, 2008)
Carbón activo	Su efectividad depende el tipo de material a tratar.	Algunos compuestos orgánicos e iones de metales.	S. cerevisiae.	(Hodge <i>et al.</i> , 2009)	(Oliva, 2003) (Sánchez y Cardona, 2008)
Carbón vegetal	Obtenido a partir de madera de abeto a 600°C.	Furfural, HMF y derivados fenólicos.	S. cerevisiae.	(Miyafuji <i>et al.</i> , 2003)	(Oliva, 2003)
Resinas de intercambio iónico	Se emplean tanto catiónicas como aniónicas (mejores a pH 10). Tienen alto costo.	Principalmente fenoles, seguido de furanos y ácidos alifáticos. Afectan los azúcares.	Z. mobilis, recombinante y S. cerevisiae.	(Palmqvist y Hahn-hägerdal, 2000a)	(Oliva, 2003) (Sánchez y Cardona, 2008)
Lignina Residual (Björklund y col., 2002)	La lignina actúa como absorbente en una extracción en fase sólida por sus propiedades hidrofóbicas.				(Oliva, 2003)
Utilización de zeolitas	Son minerales naturales ó sintéticos, de estructura tridimensional. Poseen alto intercambio iónico, notable superficie específica y lugares activos que permiten actividad catalítica.	Metales tóxicos: cromo, cobalto, níquel.		(Sivaraman <i>et al.</i> , 1994)	(Oliva, 2003)
Oxidación avanzada	Se basa en la generación de radicales hidroxilo. Reacción de Fenton. Emplean: O ₃ /O ₃ /H ₂ O ₂ y H ₂ O ₂ /UV (en ausencia y presencia de catalizadores TiO ₂ o ZnO).	Todo tipo de compuestos orgánicos (en especial el método con radicales libres OH)		Este método no ha sido aplicado en hidrolizados, pero ha sido de gran utilidad en aguas residuales.	(Herrera y Cifuentes, s.f.); (Oliva, 2003)

Método	Descripción	Componentes que degrada	Microorganismo que favorece	Ejemplo	Fuente
Extracción	Solventes Orgánicos (diétil éter, etil acetato, 3:1 Fase orgánica: Tasa fase acuosa volumétrica)	Ácido acético, furfural, vanilina, ácido hidroxibenzoico, y compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Remoción de furanos	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>P. stipitis</i>	(Cantarella <i>et al.</i> , 2004)	(Sánchez y Cardona, 2008)
Nanofiltración	Emplea membranas (NF ó NK), operadas bajo presión y retienen solutos de bajo peso molecular (1000 daltons).	Ácido acético	<i>P. stipitis</i>	(Wenga <i>et al.</i> , 2009)	(Wenga <i>et al.</i> , 2009)
Electrodialisis	Es un proceso químico que emplea membranas cargadas eléctricamente y con diferencia potencial eléctrica, para separar soluciones y componentes no cargados. Se emplean 20V de electricidad, y un flujo y concentración de compartimentos de 50L/h.	Ácido acético; recuperación de ácido empleado en pre-tratamiento.	<i>Pachysolen tannophilus</i>	(Cheng <i>et al.</i> , 2008)	(Cheng <i>et al.</i> , 2008)

Tabla 6. Métodos físicos y químicos de detoxificación. Fuente: los autores.

De las técnicas y métodos físicos y químicos mencionados, los de mayor difusión son el overliming, los tratamientos de neutralización con hidróxidos y extracción con solventes, no sólo por sus resultados exitosos en reducción de inhibidores y altos rendimientos en fermentación, sino igualmente por su costo que resulta bajo frente a metodologías como la nanofiltración y resinas de intercambio iónico. Por otro lado, al comparar los métodos físicos y químicos con los biológicos, estos últimos han venido tomando alto auge, en especial en cuanto al uso de cepas bacterianas y fúngicas, ya que la biorremediación ofrece ventajas económicas, de proceso y ambientales importantes evidenciadas en las investigaciones citadas.

3.3.4 Estado del arte (detoxificación) de las materias primas contempladas

En cuanto a los materiales lignocelulosicos contemplados en este documento, en materia de detoxificación, la tabla 7 presenta información concerniente.

Materia Prima	Técnica	Observación	Fuente
Cascarilla de arroz	Overliming y Neutralización con NaOH	Pretratado con ácido diluido. Comparando rendimientos en etanol con cada técnica y <i>P. stipitis</i> .	Huang, <i>et al.</i> , (2009),
	Overliming	Pretratado con ácido diluido. Reducción de [] de HMF y Furfural.	Karimi, <i>et al.</i> , (2006)
	Control de pH y T° en la sacarificación y fermentación. En Combinación con pre-tratamiento.	Puede evitar la formación de inhibidores.	Saha y Cotta (2007 y 2008),
	pretratamiento combinado explosión de vapor con ácido diluido en una y dos etapas	Las [] de HMF, a. acético y Furfural. Furfural, dependen de: la presión de hidrólisis, la concentración de ácido y el tiempo de retención.	Karimi, <i>et al.</i> , (2006).
	Biológico con hongos	<i>P. ostreatus</i> (presenta actividad de Lignin peroxidasa, manganesa peroxidasa y lacasas).	Yu, <i>et al.</i> , (2009).
Subproductos cítricos (D-limoneno principal inhibidor)		Evalua el efecto inhibitorio del D-limoneno de cáscaras de naranja en la producción de etanol con <i>Z. mobilis</i> sobre hidrolizado de residuos cítricos.	Wilkins (2009)
Bagazo de Caña	Biológico con enzimas y Overliming.	Enzima fenoloxidasa lacasa y Overliming sobre hidrolizado pretratado y no pretratado.	Martín, <i>et al.</i> (2002).
	Biológico con microorganismo modificado.	Cepa recombinante de <i>S. cerevisiae</i> y una sin modificar, adicionando inhibidores.	Martín, <i>et al.</i> (2007).
	Electrodiálisis	Remoción de inhibidores y recuperación de parte del ácido empleado en el pre-tratamiento.	Cheng, <i>et al.</i> (2008).
	Resina de intercambio aniónico, carbón activo, neutralización, overliming y lacasa.	Comparación de cada uno en rendimientos de etanol por fermentación con <i>Candida shehatae</i> .	Chandel, <i>et al.</i> (2007).
Subproductos Residuos del plátano	Biológico con hongos	<i>Phylosticta</i> spp. y <i>Aspergillus</i> spp., induciendo y evaluando la producción de enzimas lignolíticas y celulíticas hojas y pseudotallo.	Shah, <i>et al.</i> (2005)
		<i>P. ostreatus</i> y <i>P. sajor-caju</i> , sobre hojas y pseudotallo, fermentación en estado sólido, evaluando la actividad enzimática.	Reddy, <i>et al.</i> (2003)

Tabla 7. Estado del arte (detoxificación) materias primas contempladas. Fuente: los autores.

3.3.5 Aspectos importantes a tener en cuenta en la detoxificación

Aunque son diversas las opciones de detoxificación a emplear sin embargo, la elección del mismo depende de factores como: a) Tipo de hidrolizado a ser detoxificado y materia prima de la que procede; b) Pre-tratamiento empleado para la hidrólisis; c) Organismo fermentador y d) Costo de operación de la técnica de detoxificación elegida (Mussatto y Roberto 2004).

3.4 Fermentación

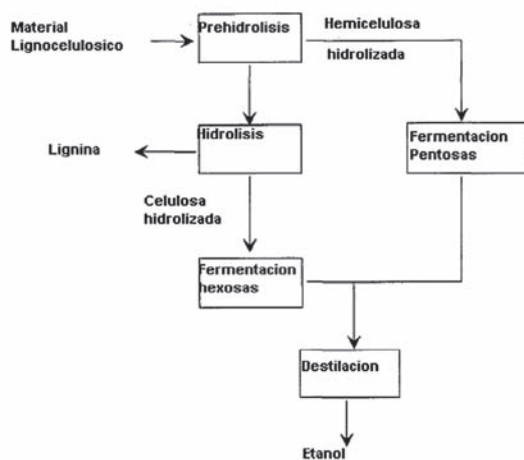


Figura 3. Diagrama general para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

3.4.1 Fermentación de hexosas

Las hexosas son monosacáridos (glúcidos simples) formados por una cadena de seis átomos de carbono. Su fórmula general es $C_6H_{12}O_6$. Su principal función es producir energía. Un gramo de cualquier hexosa produce unas 4 kilocalorías de energía. Las más importantes desde el punto de vista biológico son: glucosa, galactosa y fructosa.

3.4.2 Fermentación de pentosas

La interconversión de la pentosa y la hexosa sin oxidación-reducción tiene lugar por la vía de la pentosa-fosfato. Esta vía permite la síntesis de la hexosa por bacterias que crecen sobre la pentosa, y también permite la síntesis de otros dos azúcares, la pseudoheptulosa-7-fosfato y la eritrosa-4-fosfato. Esta última es una precursora en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. La fracción de pentosas en la hemicelulosa consiste principalmente de xilosas, pero depende del origen de la materia prima ya que la fracción de arabisona puede ser importante. Han sido estudiados diferentes microorganismos para fermentación, entre ellos bacterias, levaduras y hongos (naturales y recombinados).

3.4.3 Clases de microorganismos levadura, bacterias y hongos

Las investigaciones desarrolladas sobre este tema se han dirigido a la solución de distintas problemáticas. Por un lado se encuentra la capacidad natural de acción del microorganismo empleado (velocidad de procesamiento, temperatura óptima de trabajo, tipos de sustrato a emplear, entre otros factores), y el análisis de los inconvenientes que genera en la biomasa y en las etapas posteriores del proceso el tipo de pre-tratamiento dado a la biomasa y específicamente a su estructura. Por lo cual han recurrido a diferentes técnicas de mejoramiento de cepas (etanolgénicas, termotolerantes, etc.), y al uso de distintas clases de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos.

3.4.3.1 Bacterias empleadas en la fermentación. Se han empleado bacterias de los géneros *Clostridium* (*sporogenes*, *indolicus*, *sphnoides*, *saccharobutyricum*, *Thermohydrosulfuricum* y *Thermocellum*), que degradan grandes cantidades de celulosa y otros polisacáridos. Otras bacterias empleadas son: *Zimomonas mobilis*, *Erwinia amilovora*, *Spirocheta aurantia*, *Streptococcus lactis*, *Spirocheta litorales* y *Spirocheta stenostrepta*, con resultados satisfactorios en cuanto a productividad. Igualmente, se han empleado bacterias modificadas genéticamente para la degradación tanto de hexosas como de pentosas, y con características de resistencia. Al respecto Patrouilleau *et al.* (2007, pág. 24) señalan las ventajas de emplear “la cepa bacteriana de la especie *Escherischia coli*, desarrollada y patentizada por la Universidad de Florida (EUA), que fermenta ambos tipos de azúcares; introducción de operones que codifican enzimas para la asimilación de xilosa y de la ruta de las pentosas fosfato en *Zymomona mobilis* (Zhang *et al.*, 1995)”.

3.4.3.2 Levaduras empleadas en la fermentación. Aunque más lentas en la ejecución del proceso de fermentación, las levaduras son los microorganismos de mayor uso

en la producción de etanol, debido a su productividad, baja producción de inhibidores y facilidad de separación después de la fermentación. En dichos procesos se emplean levaduras de los géneros *Candida* (seudotropicalis), *Saccharomyces* (ceresviceae, ellipsoideus, anamensisi, carlsbergensis) y *Kluyveromyces marxianus* y *fragilis* (Krishna *et al.*, 2001), que además de altas eficiencias, son capaces de trabajar a temperaturas superiores a los 40°C. Otras son *Candida bytyrii*, *Pichia stipitis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens*.

Al igual que con las bacterias se han desarrollado investigaciones en las cuales se han modificado de alguna forma las especies originales de levadura. Una de dichas investigaciones dio lugar al desarrollo, en la Universidad Nacional de Colombia (2007), de una cepa de la especie *Kluyveromyces marxianus*, obtenida por mutagenesis química y posterior selección, capaz de fermentar la glucosa con buenos rendimientos, y otra ha sido citada por Patrouilleau *et al.* (2007, Pág. 24), quien señala “la introducción de plásmidos con genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis* en *Saccharomyces* spp. Para la co-fermentación eficiente de glucosa y xilosa”.

3.4.3.3 Cultivos fúngicos empleados en la fermentación. Aunque no se encuentran tan ampliamente difundidos a nivel industrial como las levaduras o las bacterias, éstos ofrecen ventajas como reducción de costos, fácil adquisición, entre otras; que coexisten con desventajas como los largos tiempos de residencia que requieren. Dentro de ellos se encuentran hongos como *Mucor racemosus*, del género *Rhizopus* y *Aspergillus*. Karimi *et al.* (2006), compara la producción de etanol a partir del hidrolizado de hemicelulosa de cascarilla de arroz empleando levadura *Pichia stipitis* y el hongo *Mucor indicus*, encontrando mayor conversión de xilosa a etanol por parte del cultivo fúngico en condiciones aerobias.

3.4.3.4 Uso de co-cultivos. El uso de co-cultivos o cultivos mixtos de microorganismos ya sean del mismo o diferente tipo también ha sido empleado, con el fin de acelerar el proceso de fermentación o de complementar la acción de los microorganismos para obtener mayores rendimientos en la tasa de conversión de azúcares a etanol. Muestra de ello, es el uso de dos levaduras, una que fermenta las hexosas, como *S. cereviceae*, y otra que fermenta las pentosas, como *P. stipitis*, aunque se han tenido mejores resultados en co-cultivos de *P. stipitis* con *K. marxianus* (Iraq *et al.*, 2007); o cultivo mixto de bacteria y levadura, como *Clostridium* y/o *Zymomonas mobilis* y/o *E. coli* y *S. cereviceae*. También se han reportado estudios de cultivos mixtos de hongos y levaduras como *Trichoderma viride* y *Pachysolen tannphylus*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, desarrollados con el mismo propósito (Hernández, 2007).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De las técnicas mencionadas en la actualidad las de mayor uso e interés en las materias primas contempladas en relación con el pre-tratamiento de la cascarilla de arroz son la hidrólisis ácida con H_2SO_4 diluido (cascarilla de arroz y cáscara de plátano), explosión de vapor (bagazo de caña y subproductos cítricos), técnicas dirigidas a atacar la hemicelulosa, acompañadas con hidrólisis enzimática con celulasas o combinadas con otras enzimas comerciales (dirigidas a la celulosa). En torno a estas técnicas, que suelen ir combinadas con una trituración mecánica previa a los pre-tratamientos, se han generado nuevas investigaciones con miras a mejorar su eficacia y eficiencia en la producción de bioetanol.

A partir del recorrido realizado por todas y cada una de las técnicas o pre-tratamientos y las etapas de proceso planteados por diferentes estudiosos en la materia para la adecuación de la biomasa lignocelulósica y su posterior conversión a bioetanol, se puede evidenciar que aunque si bien es cierto éstas ofrecen alternativas de solución para el aprovechamiento del potencial económico y ambiental de dicha biomasa, entre otros beneficios, también presentan grandes desventajas que deberán ser consideradas a la hora de optar por alguna de ellas.

El papel de la industria y la comunidad científica al respecto radica en lograr mejorar estas técnicas o incursionar con pre-tratamientos novedosos que presenten ventajas importantes. Entre estas ventajas se encuentra la capacidad de degradar la sólida estructura lignina-celulosa-hemicelulosa a azúcares mono y disacáridos sin producir inhibidores, además de aspectos de interés económico y ambiental como bajo consumo energético, bajos costos de inversión, empleo de reactivos baratos, eficientes, reciclables y aplicables e igualmente efectivos en diferentes clases de sustrato.

Por último, es un hecho que el empleo de la biomasa lignocelulósica (como la cascarilla de arroz, bagazo de caña, subproductos cítricos y del plátano), como materia prima en la obtención de bioetanol, representa una oportunidad relevante para la producción de este biocombustible a bajos costos, además de contribuir a la solución de la problemática ambiental generada por los desechos agroindustriales. Sin embargo, las posibilidades de que sea adoptada por la industria dependen del ingenio e implementación del mejor y más viable pre-tratamiento de adecuación de la biomasa (punto clave), combinado con un eficiente proceso de fermentación del hidrolizado y refinación del producto final. Por ello, la inversión en este tipo de investigaciones es de vital importancia no sólo para el avance científico, sino también para el desarrollo económico, ambiental, social y humano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada, L.M. y Rodríguez, P.J.E. (2006). Uso Del SiO₂ Obtenido De La Cascarilla De Arroz En La Síntesis De Silicatos De Calcio. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30 (117): 581-594.
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., y Dale, B.E., (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 121-124,1133-41.
- Area, M.C., Aguilar, S., Felissia, F. *et al.* (2002, octubre). Pulpado Hidroalcohólico de Alto Rendimiento de Bagazo de Caña de Azúcar. Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel. Campinas, Brasil.
- Arroyo, Miguel. (1998). Inmovilización de enzimas, Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39. Madrid – España. [Documento PDF]. URL. Disponible en: <http://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>
- Asocaña. (2007). Informe Anual 2006–2007. Cuadro 7. Indicadores agrícolas de cosecha de caña de azúcar 1980 – 2006. [Documento WWW]. URL. Recuperado 9, agosto, 2009, http://www.asocana.org/VerImagen.aspx?url=http://www.asocana.org/informes/i2006_2007/cuadro7.jpg
- Baptista, C.M.S.G., Coias, J.M.A., Oliveira, A.C.M. *et al.* (2006). Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology.* 40,127–131.
- Beall, F.C. y Eickner, H.W. (1970). Thermal degradation of wood components: a review of the Literature. Madison – USA. U.S.D.A. Forest service, research paper FPL 130.
- Benjamin, M. M., Woods, S. L. y Ferguson, J. F. (1984). Anaerobic toxicity and biodegradability of pulp mill waste constituents. *Water Res.* Vol. 18 (5), 601-607.
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* 19, 797-841.
- Bruno, Yanil. (2008). Cítricos: situación y perspectivas. [Documento WWW]. URL. Recuperado 7 mayo, 2009, http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario07/docs/14_Citricos_situacion_perspect.pdf
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A. *et al.* (2004). Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry.* 39: 1533–1542.
- Chandel, A. K., Kapoor, R. K., Singh, A., y Kuhad, R. C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology.* 98, 1947–1950.


- Chang, V.S., y Holtzaple, M.T. (2000). Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84 – 86, 5–37.
- Cheng, K-K., Cai, B-Y., Zhang, J-A. *et al.* (2008). Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*. 38, 105–109.
- Coll, L.C. (2008). La utilización de los residuos frutícolas para obtener bioetanol de Segunda Generación. *Jornadas Técnicas de Frutas y Hortalizas*. Palma de Mallorca - España, Recuperado el 6 de Mayo de 2009, <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/02378.pdf>
- Corporación Colombia Internacional. (2006). Evaluaciones Agropecuarias Municipales. Cultivos transitorios por municipio. Tolima 2006. Gobernación del Tolima.
- Cowling, E.B., Kirk, T.K. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion process. *Biotechnology and bioengineering symposium*. 6, 95-123.
- Delgenes, J. P., Penaud, V., y Moletta, R. (2003). Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. *ChemInform*. 34, edición 13, página no, Abril 1, 2003.
- Duff, S.J.B., y Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 55 (1): 1-33.
- Fan L. T., Gharpuray, M. M., y Lee, Y. H. (1987). *Cellulose Hydrolysis*. Berlin, Alemania. Springer-Verlag, 3, 1-68.
- FAO. (1993). Estadística base de datos FAOSTAT-Producción Agrícola de plátano y caña de azúcar. Recuperado 29, Abril, 2009 de, http://www.fao.org/index_es.htm
- Fengel, D. y Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter. Berlin.
- Forero, O. (2009). El bagazo de caña de azúcar, petróleo verde del siglo. [Documento WWW]. URL. Recuperado 28, agosto, 2009. http://www.dinero.com/seccion-patrocinios/green/bagazo-cana-azucar-petroleo-verde-del-siglo_62876.aspx
- Fox, M.H., Noike, T., y Ohki, T. (2003). Alkaline subcritical-water treatment and alkaline heat treatment for the increase in biodegradability of newsprint waste. *Water Science and Technology*. 48 (4): 77-84.
- Galbe, M., y Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 59, 618- 628.
- Gómez, F. (2008). Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano. (Tesis Doctoral). San Luis de Potosí – México. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

- Gregg D. y Saddler J.N. (1996). A technoeconomic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotech.* 57-58, 711–727.
- Grous, W.R., Converse, A.O., y Grethlein, H.E. (1986). Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme and Microbial Technology.* 8 (5): 274-280.
- Guzmán, J.L. (2009). En Colombia no modificarán el precio del etanol. [Documento WWW]. URL. Recuperado 11, mayo, 2009. <http://www.biodiesel.com.ar/?p=1300>
- Hamid, M., y Rehman, K.-U. (2009). Potential applications of peroxidases: a Review. *Food Chemistry.* 115, 1177–1186.
- Hendriks, A.T.W.M., y Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology.* 100, 10–18.
- Hernández, M.T. (2007). Tendencias Actuales En La Producción De Bioetanol. Facultad de Ingeniería-Universidad Rafael Landívar. Boletín Electrónico No. 08.
- Herrera, C., y Cifuentes, G. (s.f.). Degradación De Orgánicos Poliméricos En Aguas Industriales Mediante Oxidación Avanzada. [Documento PDF]. URL. <http://www.hydroprocess.cl/2006/becas/B07%20HERRERA%20CARMEN%20%28USACH%29.pdf>
- Hodge, D.B., Andersson, C., Berglund, K.A., y Rova, U. (2009). Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme and Microbial Technology.* 44, 309–316.
- Hon, D.N.S. y Shiraishi, N. (2001). *Wood and Cellulosic Chemistry*, second ed. Dekker, New York.
- Huang, C-F, Lin, T-H, Guo, G-L, y Hwang, W-S. (2009). Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology.* 100, 3914–3920.
- IMECAL. (2008). Proyecto Atenea: Bioetanol celulósico a partir de Residuos Cítricos. [Documento PDF]. Disponible en: <http://www.imecal.com/pdfs/ATENEA.pdf>
- Itoh, H., (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology.* 103, 273-280.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J. *et al.* (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology.* 32, 851–861.
- Karimi, K., Emtiazi, G., y Taherzadeh, M. J. (2006). Production of ethanol and mycelial biomass from rice Straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochemistry.* 41, 653–658.

- Karimi, K., Kheradmandinia, S., y Taherzadeh, M.J. (2006). Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*. 30, 247–253.
- Keller, F.A. (1996). Integrated bioprocess development for bioethanol production. *Handbook on bioethanol: production and utilization*. 351-357.
- Kim, K.H., y Hong, J. (2001). Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*. 77, 139–144.
- Klinke, H.B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*. 82 (1): 15–26.
- Kohlmann, K.L., Westgate, P.J., Sarikaya, A. *et al.* (1995). Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates. BTEC paper 127. En: 207th American Chemical Society National Meeting, ACS Symposium series No. 618. *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, 237–255.
- Krishna, S.H., T. Reddy, J., y Chowdary, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*. 77, 193±196.
- Laureano, P.L., Teymouri, F., Alizadeh, H., y Dale, B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 124 (1-3): 1081–1099.
- Lee, Y-J., Kim, B-K., Lee, B-H., *et al.* (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*. 99, 378–386.
- Liu, C., y Wyman, C.E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.
- Lo, Y-C., Saratale, G.D., Chen, W-M. *et al.* (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*. 44, 417–425.
- MADR-Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA - ACT Colombia. (2000). Acuerdo De Competitividad De La Cadena Productiva Del Plátano En Colombia: Colección Documentos IICA, Serie Competitividad No.18. ISBN 958-9328-29-6. pp. 35-41. [Documento PDF]. URL. Disponible en: http://sisav.valledelcauca.gov.co/CADENAS_PDF/platano/IICABogota.pdf
- MADR (2005). La cadena del arroz en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica. 1991-2005. [Documento PDF]. URL. Disponible en: http://www.agrocadenas.gov.co/arroz/documentos/caracterizacion_arroz.pdf
- MADR (2005). La cadena de cítricos en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica

- mica. 1991-2005. [Documento PDF]. URL. Disponible en: http://www.agrocadenas.gov.co/citricos/documentos/caracterizacion_citrico
- Mamma, D., Kourtoglou, E., y Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*. 99, 2373–2383.
- Martín, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F. *et al.* (2002). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 274–282.
- Martín, C., Marcet, M., Almazán, O., y Jönsson, L.J. (2007). Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*. 98, 1767–1773.
- Méndez, P. (2005). ARROZ: estabilidad de los precios mundiales. Infoarroz. Informativo mensual, Diciembre. [Documento PDF]. URL. Disponible en: <http://r0.unctad.org/infocomm/espagnol/arroz/docs/ia1205es.pdf>
- Miyafuji, H., Danner, H., Neureiter, M. *et al.* (2003). Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 396-400.
- Monsalve, J.F., Medina de P, V.I. y Ruíz C., A. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. Medellín. ISSN 0012-7353. *Dyna*. 73 (150): 21-27.
- Mussatto, S. y Roberto, I. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 93, 1–10
- Nichols, N.N., Sharma, L.N., Mowery, R.A., *et al.* (2008). Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 42, 624–630.
- Okuda, N., Soneura, M., Ninomiya, K. *et al.* (2008). Biological Detoxification of Waste House Wood Hydrolysate Using *Ureibacillus thermosphaericus* for Bioethanol Production. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*. 106 (2): 128–133.
- Oliva, J.M. (2003). Efecto De Los Productos De Degradación Originados En La Explosión Por Vapor De Biomasa De Chopo Sobre *Kluyveromyces Marxianus*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense De Madrid (España). [Documento PDF]. URL. Disponible en: <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>
- Oliveira, L.A., Porto, L.F.A., y Tambourgi, E.B. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*. 97(6): 862-867.
- Olsson, L., y Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 18, 312-331.

- Ovando, C. S.L., y Waliszewski, K.N. (2005). Preparativos de Celulasas Comerciales y Aplicaciones en Procesos Extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(42): 111-120.
- Palacio, H. (1956). Fabricación del alcohol. Barcelona – España. Salvat Editores, S.A.. pp. 279-305.
- Palmqvist E., y Hahn-Hägerdal. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74,17-24.
- Patrouilleau, R.D., Lacoste, C., Yapura, P., y Casanovas, M. (2007). Perspectivas De Los Biocombustibles En Argentina, Con Énfasis En El Etanol De Base Celulósica. Argentina. [Documento PDF]. URL. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/actual/info/perspectiva_%20biocombus.pdf
- Purwadi, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J. (2004). Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by Ca(OH)₂. *Journal of Biotechnology*. 114, 187–198
- Reddy, G.V., Babu, P.R., Komaraiah, P. *et al.* (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*. 38, 1457-1462
- Rodríguez, C.S., y Toca, H.J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of lacases: A review. *Biotechnology Advances*. 24, 500–513
- Rojas, R., y Cabanillas, A.J. (2008). Producción de alcohol de residuos lignocelulósicos – cáscaras de arroz (*Oriza sativa*). *Revista Virtual REDESMA* –Julio 2008. Perú. [Documento PDF]. Disponible en: [http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20\(Rojas%20&%20Cabanillas\).pdf](http://www.darwinnet.org/docs/Produccion%20de%20alcohol%20(Rojas%20&%20Cabanillas).pdf)
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., y Wu, V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to etanol. *Process Biochemistry*. 40, 3693–3700
- Saha, B.C., y Cotta, M.A. (2007). Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to etanol. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 528–532
- Saha, B.C., y Cotta, M.A. (2008). Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass And Bioenergy*. 32, 971 – 977
- Sánchez, M., Hernández, F., Pulgar, M.A., y Cid, J.M. (1996). (Visitado 2009, Mayo 7). Digestibilidad del fruto del limón (*Citrus limón L.*) en caprino. *Arch. Zootec*. Vol. (45), 79 – 82. [Documento PDF]. Disponible en: http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/18_14_19_-169_09.pdf
- Sánchez, J.M. (2009). Inmovilización de enzimas. UCM. Madrid-España.. [Documento PDF]. URL. Disponible en: http://www.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/00_INMOVILIZACION_Introduccion.pdf

- Sánchez, Ó.J., y Cardona, C.A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*. 30 (11): 671-678.
- Sánchez, O.J., y Cardona, C. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270–5295.
- Shah, M.P., Reddyb, G.V., Banerjee, R. *et al.* (2005). Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). *Process Biochemistry*. 40, 445–451.
- Sharma, A., Khare, S.K., y Gupta, M.N. (2001). Hydrollisis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulose. *Bioresource Technology*. 78 (3): 281-284.
- SivaRaman, H., Chandwadkar, A., Baliga, S.A., y Prabhune A.A. (1994). Effect of synthetic zeolite on ethanolic fermentation of sugarcane molasses. *Enzyme and Microbial Technology*. 16 (8): 719-722.
- Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83 (1), 1-11
- Universidad Nacional De Colombia. (2007). La biomasa Lignocelulósica como materia prima para la producción de etanol. [Documento WWW]. URL, Recuperado 22, marzo, 2009, http://www.engormix.com/la_biomasa_lignocelulosica_como_s_articulos_1463_AGR.htm.
- Valverde, G.A., Sarria, L.B., y Monteagudo, Y.J.P. (2007). Análisis Comparativo De Las Características Físicoquímicas De La Cascarilla De Arroz. *Scientia et Technica*. Año XIII, Diciembre. 37, 255–260.
- Wenga, Y-H, Wei, H-J, Tsai, T-Y, *et al.* (2009). Separation of acetic acid from xylose by nanofiltration. *Separation and Purification Technology*. 67, 95–102.
- Wikipedia O. (2009). Concepto de Hemicelulosa. *Enciclopedia Libre*. [Documento WWW]. URL, Recuperado 15, Noviembre, 2009, <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemicelulosa>
- Wilkins, M.R. (2009). Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *biomass and bioenergy*. 33, 538–541
- Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z. y Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Biore-source Technology*. 100, 903–908
- Zheng, Y-Z., Lin, H-M y Tsao, G.T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology Progress*. 14 (6): 890-896. 

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Sánchez Riaño, A.M.; Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. A. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Revista <i>Tumbaga</i> (2010), 5, 61-91	Día/mes/año 16/09/2009	Día/mes/año 30/10/09