



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

UNIDAD REGIONAL UNIVERSITARIA DE ZONAS ARIDAS

**"PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS DE CEBADA (*Hordeum vulgare*) Y TRIGO (*Triticum
vulgare*)"**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO
AMBIENTE EN ZONAS ARIDAS**

PRESENTA:

Q.F.B. LUIS ANGEL GONZALEZ ESPINDOLA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Bermejillo, Durango. MAYO de 2013

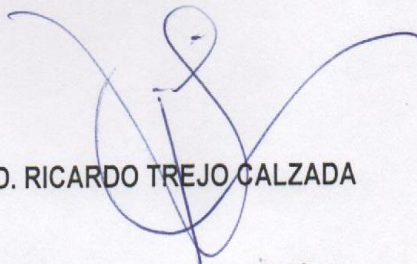
**"Producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de
Hordeum vulgare (cebada) y *Triticum vulgare* (trigo)"**

Tesis realizada por **Q.F.B Luis Ángel González Espíndola** bajo la
dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada
como requisito parcial para obtener el grado de:

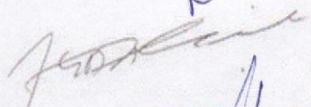
**MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES
Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ARIDAS**

COMITÉ ASESOR

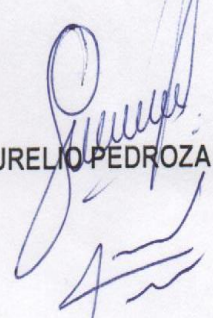
DIRECTOR:


PhD. RICARDO TREJO CALZADA

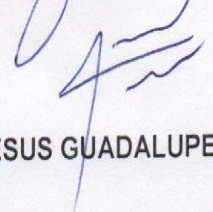
ASESOR:


PhD. PAg. CAC ABIMBOLA ABIOLA

ASESOR:


PhD. AURELIO PEDROZA SANDOVAL

ASESOR:


PhD. JESUS GUADALUPE ARREOLA AVILA

DEDICATORIAS

Durante estos dos años de lucha constante, de gratas vivencias, de momentos de éxitos y también de angustias y desesperanza para poder cumplir mis objetivos y así poder alcanzar uno de mis más grandes anhelos, culminar mi maestría, los deseos de superarme y de lograr mi meta eran tan grandes que logre vencer todos los obstáculos y es por ello que debo dedicar este triunfo a quienes en todo momento me llenaron de amor y apoyo, y por sobre todo me brindaron su amistad.

A mis padres María del Carmen y Luis, por su apoyo durante todo este tiempo como estudiante nuevamente y gracias a ellos son el profesionalista que soy ahora. Además agradezco su comprensión durante todas las noches de desvelo, en ocasiones mi mal humor por no dormir y sobre todo estoy muy agradecido por no escatimar centavo para mi educación.

A mi hermana Viviana, por compartir su felicidad y logros conmigo y hacerme sentir que se sienten orgullosos de mí. Y mis sobrinas Evelyn y Abigail por su cariño en todo momento.

A Rosario por ser la persona que llego a iluminar mi vida desde hace casi 6 años, por su apoyo, comprensión, ayuda, tolerancia y sobre todo por alentarme y no dejarme vencer ni en los peores momentos. Y con quien compartiré toda mi vida. Gracias Amor por estar presente, apoyarme y sobre todo entenderme en todo! TE AMO. Gracias por Existir.

A mis amigos, que siempre estuvieron a mi lado durante horas y días en el transcurso de este proyecto, escucharme cuando más los necesite, comprenderme y apoyarme con mi trabajo.

GRACIAS A TODOS POR HACER ESTE SUEÑO POSIBLE

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por el apoyo Económico brindado durante mis estudios de Maestría.

A la **Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas** de la Universidad Autónoma Chapingo (URUZA-UACH), institución donde realicé mis estudios de postgrado.

A **Olds College Centre of Innovation** (OCCI), por todo el apoyo que recibí durante la estancia en esta institución.

Agradezco principalmente a mi director de tesis. **Dr. Ricardo Trejo Calzada**, por su apoyo incondicional y amistad durante el proyecto y sobre todo agradezco la confianza puesta en mí.

Al **Dr. Abimbola Abiola**, de Olds College, AB, CAN por su apoyo para realizar la estancia de investigación que finalmente se convirtió en mi trabajo de tesis.

A mis compañeras, **Olivia García Galindo y Mali Nay Buendía Tamariz**, por su ayuda para realizar este proyecto y compartir horas y horas de trabajo.

PRODUCCION DE BIOETANOL A
PARTIR DE RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS DE *Hordeum
vulgare* (CEBADA) y *Triticum vulgare*
(TRIGO)

¹Luis Ángel González Espíndola
²Ricardo Trejo Calzada

BIOETHANOL PRODUCTION FROM
LIGNOCELLULOSIC RESIDUES OF
Hordeum vulgare (BARLEY) AND,
Triticum vulgare (WHEAT)

¹Luis Ángel González Espíndola
²Ricardo Trejo Calzada

ABSTRACT

RESUMEN

Los materiales lignocelulósicos, suponen una fuente inagotable de productos con interés industrial. En el norte de México no se ha estudiado el potencial productor de bioetanol a partir de especies vegetales con alta producción de biomasa y particularmente de material lignocelulósico; Debido a que nos ofrece la ventaja de ser económica, natural y generar un mínimo daño al medio ambiente. El objetivo de este trabajo se centró en producir bioetanol lignocelulosico a partir de rastrojo de Trigo (*Triticum vulgare*) y cebada (*Hordeum vulgare*). Se utilizaron tres tipos de pre tratamiento siendo uno de ellos físico (reducción del tamaño de partícula) y otro químico (H_2SO_4 4% v/v), posteriormente fue realizado un tratamiento enzimático con dos complejos enzimáticos comerciales, y llevados a incubación a 50°C durante 72 horas, realizando la prueba Benedict Cuantitativa para azúcares reductores por medida espectrofotométrica. El tratamiento 1% H_2SO_4 presento una concentración de 1,71 g/L de etanol en el caso de la cebada. Mientras que para el del trigo, la concentración de alcohol producido fue superior a los 2,0 g/L. de etanol en los tratamientos 3%, 4% y 5%.

Palabras clave: Azúcares reductores,
Triticum vulgare, *Hordeum vulgare*,
Bioetanol.

Lignocellulosic materials, are an endless source of products with industrial interest. In northern Mexico have not studied the potential producer of bioethanol from plants with high biomass production and particularly lignocellulosic material; because it offers the advantage of being cheap, natural and generate minimal damage to environment. The aim of this work focused on lignocellulosic bioethanol production from wheat straw (*Triticum vulgare*) and barley (*Hordeum vulgare*). Three different types of treatment were used, one being physical (particle size reduction) and other chemical (4% H_2SO_4 v / v), then an enzyme treatment was carried out with two commercial enzyme complexes, and brought to incubation at 50 ° C for 72 hours, conducting the test for reducing sugars Quantitative Benedict spectrophotometrically. The 1% H_2SO_4 concentration treatment presented a concentration of 1.71 g / L of ethanol in the case of barley. As for the wheat, the concentration of alcohol produced was higher than 2.0 g / L ethanol in treatments 3%, 4% and 5%.

Keywords: Reducing sugars, *Triticum vulgare*, *Hordeum vulgare*, Bioethanol.

¹Tesista
²Director

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	ii
ABSTRACT	ii
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	3
I.1 <i>Objetivo general</i>	3
I.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
III. HIPOTESIS	4
IV. REVISION DE LITERATURA	5
4.2 <i>Biocombustibles</i>	6
4.2.1 Primera generación	6
4.2.2 Segunda generación	7
4.2.3 Tercera generación	8
4.2.4 Cuarta generación	9
4.3 <i>Biocombustibles en México</i>	10
4.4 <i>Biomasa energética</i>	11
1.2 <i>TRIGO</i>	16
1.2.1 Descripción	16
1.2.2 Producción	17
1.3 <i>CEBADA</i>	18
1.3.1 Producción	18

1.4	ETANOL LIGNOCELULOSICO	19
1.5	MATERIA PRIMA LIGNOCELULOSICA	20
1.5.1	Composición química de los materiales lignocelulósicos	21
1.5.2	Celulosa	22
1.5.3	Hemicelulosa	23
1.5.4	Lignina	24
1.6	MÉTODOS FÍSICOS DE DEGRADACION DE MATERIAL LIGNOCELULOSICO	25
1.6.1	Fragmentación mecánica y pirolisis	25
1.7	MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA DEGRADACION DE MATERIAL LIGNOCELULOSICO	26
1.7.1	Explosión por vapor	26
1.7.2	Explosión de fibra de amoníaco (AFEX)	26
1.7.3	Hidrólisis ácida	27
1.7.4	Hidrólisis alcalina	27
1.7.5	Deslignificación oxidativa	28
1.7.6	Proceso organosolvente	28
1.8	MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA HIDROLIS	28
1.9	COMPLEJOS ENZIMATICOS UTILIZADOS	29
1.9.1	Mecanismo de hidrólisis enzimática	30
1.3	Microorganismos productores de celulasas	31
1.10	Preparados celulolíticos comerciales	32
1.11	DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES	33
1.12	FERMENTACION	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.12.1	Microorganismos fermentativos	35
1.12.2	Saccharomyces cerevisiae	35
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.2	Definición de población y muestras	37
2.3	Preparación de materia prima	37
2.4	Pre-tratamientos del material vegetal	38
2.5	Curva de calibración para glucosa	38
2.6	Cuantificación de azúcares reductores	40

2.6.1	Prueba de Benedict	40
2.7	<i>Hidrólisis enzimática</i>	42
2.8	<i>Preparación del Inóculo</i>	43
2.9	<i>fermentación</i>	43
2.10	<i>Curva de calibración para etanol</i>	44
2.11	<i>Evaluación de contenido de etanol por Microdifusión</i>	45
2.12	<i>ANÁLISIS ESTADISTICO</i>	45
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
IV.	CONCLUSIONES	55
V.	LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Posibles sustitutos de energías fósiles no renovables.	12
Cuadro 2. Patrón de disolución para curva de calibración de glucosa	39
Cuadro 3. Producción de azúcares promedio (media $\pm$ desviación estándar) posteriores al pre tratamiento ácido y enzimático así como la concentración de alcohol en trigo y cebada.	47
Cuadro 4. Concentración media de azúcares en el tratamiento enzimático, pre tratamiento ácido y concentración de alcohol en cada tratamiento de ácido sulfúrico para cebada. Las letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (HSD $\alpha = 0.05$).....	49
Cuadro 5 . Concentración media de azúcares en el tratamiento enzimático, pre tratamiento ácido y concentración de alcohol en cada tratamiento de ácido sulfúrico para trigo. Las letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (HSD $\alpha = 0.05$).....	50
Cuadro 6. Correlación de Pearson entre la concentración de azúcares reductores presentes posteriores al tratamiento ácido y posterior al tratamiento enzimático así como la concentración de alcohol en el caso del trigo.	52
Cuadro 7 Correlación de Pearson entre la concentración de azúcares reductores presentes posteriores al tratamiento ácido y posterior al tratamiento enzimático así como la concentración de alcohol para cebada.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Productos de la conversión de biomasa seca (Carrillo, 2004).....	16
Figura 2. Mapa de distribución en la producción de trigo en México (SIAP-SAGARPA).	17
Figura 3. Estrategias para la conversión de material lignocelulosico a bioetanol (Guijari <i>et al.</i> , 2009)	20
Figura 4. Representación de los enlaces glucósidicos entre moléculas de glucosa en la celulosa.	23
Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa.....	24
Figura 6. Estructura química de lignina	25
Figura 7. Ecuación de la curva de calibración para glucosa	40
Figura 8. Representación grafica de la curva de calibración para etanol	44
Figura 9. Comparativo de alcohol producido entre cebada y trigo (mL Kg ⁻¹).	51

I. INTRODUCCIÓN

El bioetanol es el sustituto principal de los combustibles fósiles líquidos. A nivel mundial existe una tendencia creciente en la producción de biocombustibles (González y Brugues, 2010). El interés por los biocombustibles se empezó a desarrollar hacia mediados de la década pasada, en el marco de una preocupación más amplia para el desarrollo de fuentes de energía nuevas y limpias; que sean más amigables con el ambiente, que permitan avanzar en la superación del contexto energético actual basado en los combustibles fósiles.

Los biocombustibles líquidos ofrecen una alternativa viable a gran escala para su producción (Legge, 2008). Particularmente, los biocombustibles que pertenecen a la segunda generación, donde se busca la no competencia con la alimentación y son de origen biológico obtenidos a partir de restos orgánicos, debido que la gran mayoría de la energía actualmente producida es procedente de la caña de azúcar, trigo, maíz o semillas oleaginosas (Quaak *et al.*, 1999). El bioetanol es un recurso renovable biodegradable que reduce los niveles de CO₂ y compuestos tóxicos tales como el benceno y tolueno (Montiel, 2010)

Los materiales lignocelulósicos, suponen una fuente inagotable de productos con interés industrial. En otro plano, a partir de la celulosa obtenida del material vegetal puede obtenerse glucosa, siendo ésta utilizada por microorganismos mediante la vía Entner- Duodoroff para la producción de etanol (Marquina, 1991). Sin embargo, hay fuentes de material distintos de los cultivos de

alimentos que tienen potencial para la conversión en etanol (Abideen *et al.*, 2011).

Existen una gran variedad de procesos industriales destinados a la transformación de los materiales lignocelulósicos en productos más sencillos, generalmente azúcares para su posterior transformación en otros productos de interés industrial, bien por vía química, enzimática o con el uso de microorganismos (Marquina, 1991). En la actualidad los procesos químico-biológicos para obtener los residuos celulósicos lo hacen con relativa rentabilidad para su aplicación industrial (Rojas y Cabanillas, 2008). La finalidad de los pre-tratamientos es llevar a cabo la separación de las moléculas de azúcares presentes y para su cuantificación se usa una de las técnicas para la detección de azúcares reductores, denominada DNS o ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959) o la técnica de azúcares reductores de Benedict.

Las posibles fuentes de material lignocelulósico en el norte de México como productoras viables de biocombustibles no han sido exploradas. Con lo cual se plantea el uso potencial de la obtención biomasa para la producción de bioetanol a partir de trigo (*Triticum vulgare*), y cebada (*Hordeum vulgare*) lo cual nos ofrece la ventaja de ser económica, natural y generar un mínimo daño al medio ambiente. En la Comarca Lagunera se ignora el uso de este tipo de materiales forrajeros como fuente potencial para el proceso de producción de biocombustibles. El presente estudio tuvo como objetivo producir bioetanol lignocelulosico a partir de paja de trigo y cebada.

II. OBJETIVO

I.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento científico y tecnológico en la producción de biocombustibles a partir de residuos agrícolas como materia prima.

I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la eficiencia de la aplicación de ácido sulfúrico como pretratamiento ácido en el proceso de producción de bioetanol a partir de residuos de trigo y cebada.
2. Cuantificar los azúcares reductores producidos en residuos de trigo y cebada tratados con ácido y posterior hidrólisis enzimática.
3. Cuantificar el bioetanol producido mediante tratamientos ácidos y posterior hidrólisis enzimática y fermentación de residuos de trigo y cebada.

III. HIPOTESIS

Ho: Altas concentraciones de ácido sulfúrico en el pretratamiento de residuos de trigo y cebada no tienen ningún efecto sobre la producción final de bioetanol.

IV. REVISION DE LITERATURA

En la segunda mitad del siglo XIX comenzó la era del petróleo, con la exploración y producción de los yacimientos de Pennsylvania, Estados Unidos, iniciativas que después fueron imitadas en otros países, los cuales utilizaron el petróleo para la iluminación y calefacción; y, si bien durante la época del petróleo barato esta materia prima fue insustituible, a partir de la crisis energética de la década de los setenta se trató de economizar combustible, mediante la implantación de regulaciones que implicaron, a su vez, una mayor eficiencia energética de los motores de combustión interna y un control de las emisiones contaminantes (Aguilar, 2007).

La tendencia actual del agotamiento de los combustibles fósiles ha causado un incremento en la necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de energía. Hoy en día la sustitución de combustibles líquidos provenientes de fuentes fósiles en motores de combustión por aquellos provenientes de recursos renovables, es un hecho en pleno desarrollo a nivel mundial, gracias al aumento de la demanda de energía, la escasez de petróleo y el impacto de éste en el calentamiento global.

Los biocombustibles son recursos energéticos procesados por el ser humano a partir de materias producidas recientemente por seres vivos, a las cuales se les denomina “biomasa”. Pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, y su finalidad última es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante

una reacción de combustión. Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos (Álvarez, 2009).

El etanol puede ser utilizado en varias formas como un combustible de transporte. Una de las mejores aplicaciones conocidas es en mezcla con gasolina. Esta mezcla es normalmente llamada “Gasohol”, y es generalmente seguido del porcentaje (volumétrico) de la mezcla (Yoosin, 2007).

En los últimos años, en México se ha destacado la urgencia de realizar reformas estructurales que permitan un mayor desarrollo para enfrentar las necesidades que la globalización y la economía traen consigo. El sector energético es uno de los campos en los que se resalta la importancia de efectuar cambios y mejoras.

4.2 BIOCOMBUSTIBLES

Se pueden distinguir diferentes generaciones de biocombustibles para sus diferentes usos (Álvarez, 2009):

4.2.1 PRIMERA GENERACIÓN

Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Ejemplos de estas materias son el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de girasol, aceite de soya, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de semilla de

algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuete, entre otros. También se emplean como insumos a las grasas animales, grasas y aceites de desecho provenientes de la cocción y elaboración de alimentos, y desperdicios sólidos orgánicos.

Los biocombustibles son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterification (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene etanol, metanol y n-butanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogás (mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente, obtenida a partir de los desperdicios orgánicos). Las ventajas de estos biocombustibles son su facilidad de procesamiento, sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero (excepto en el caso del maíz, donde el balance de estas emisiones es casi nulo) y un balance positivo en dichas emisiones, pero tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos.

4.2.2 SEGUNDA GENERACIÓN

Los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera.

Los procesos de producción tienen un nivel de complejidad más alto que los de primera generación, y como ejemplos destacan la sacarificación-fermentación y el proceso Fischer-Tropsch. Este último proceso también recibe los nombres de proceso GTL y proceso BTL, cuyas siglas en inglés provienen de “Gas-To-Liquids” y “Biomass-To-Liquids” respectivamente, los cuales consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica de la biomasa, para después sintetizar algún combustible líquido como el etanol.

Mediante los procesos de segunda generación se fabrica etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de anhídrido carbonoso, mejor conocido como monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, 2,5-dimetilfurano (DMF), entre otros. La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético, pero su desventaja es la poca ganancia en disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos, respecto a los biocombustibles de primera generación.

4.2.3 TERCERA GENERACIÓN

Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verdeazules.

Los procesos de obtención de biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo, sin embargo, se ha logrado producir biodiesel y etanol a nivel planta piloto. Las ventajas de estos biocombustibles son el secuestro de anhídrido carbónico (CO_2) para la producción de los insumos y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero, pero su desventaja es la utilización de tierras de cultivo de alimentos para sembrar los insumos, con excepción de las algas verdes.

4.2.4 CUARTA GENERACIÓN

Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO_2) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.

Actualmente esta generación de biocombustibles se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de anhídrido carbónico, sin embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes.

Como es sabido, la humanidad ha hecho uso de la biomasa por varios miles de años. El uso directo de la misma sin procesamiento alguno podría constituir una Generación Cero de los biocombustibles, entre los cuales se pueden mencionar

a la leña, la paja de trigo, el rastrojo de otras plantas de cultivo, el estiércol del ganado, y el carbón vegetal. No es sino hasta fines del siglo XIX que se comenzó a procesar la biomasa para producir combustibles derivados de la misma. A finales del siglo XX aparecieron los primeros mercados de estos recursos energéticos y se vislumbra un mayor crecimiento, desarrollo y expansión de los mismos tendiente a su globalización. Es por ello que el presente trabajo busca analizar de forma breve el estado actual de estos mercados, sus antecedentes y panorama futuro, así como determinar los nexos entre mercados vía comercio internacional.

4.3 BIOCOMBUSTIBLES EN MÉXICO

El uso de biocombustibles en México es casi inexistente aún, no obstante el país produce etanol para su uso en bebidas alcohólicas, productos farmacéuticos y alimenticios, y como solvente y reactivo industriales. El etanol producido actualmente proviene del jugo de la caña de azúcar y se obtiene en algunos ingenios azucareros, a través de la fermentación del jugo y la destilación.

Sin embargo, existe una planta de generación de electricidad a partir del uso de biogás producido en un relleno sanitario ubicado en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, la cual tiene una capacidad instalada de generación de 12.72 MW y puede producir 40 000 MWh anuales (3 442 TPE/año). Con la quema de biogás para producir electricidad, esta planta, primera en América Latina, ha generado cerca de 202 500 MWh de energía eléctrica (equivalente a 17 423

TPE) desde el inicio de su operación (2003) hasta 2007, cuya producción ha sido destinada para abastecer 40% del alumbrado público de la zona metropolitana de Monterrey.

4.4 BIOMASA ENERGÉTICA

Biomasa, según el Diccionario de la Real Academia Española es la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

El uso del término energía comercial solamente describe los productos de los combustibles fósiles, la electricidad. Mientras el término energía renovable es aquella que se obtiene a partir del sol, el viento y el agua, es muy engañosa y ignorado el rol que tiene la biomasa en la economía monetaria de los países en desarrollo. Existen diferentes maneras de producir energías limpias y renovables a partir de biomasa. El carbón y los combustibles líquidos como el metanol, etanol y ahora el biodiesel han sido desde siempre productos comerciales, es por ello que los residuos de cultivos y el estiércol están siendo tratados (Cuadro 1). El biogás (60% metano), que es un producto de la biomasa, es actualmente producido comercialmente.

Cuadro 1. Posibles sustitutos de energías fósiles no renovables.

Energías fósiles no renovables	Biomasa
Carbón, gas derivado del carbón	Leña
Energías fósiles del aceite, queroseno (parafina), diesel y petróleo (gasolina).	Residuos agrícolas y forestales
LPG (Gas licuado)	Estiércol
Gas Natural	

(Walter et al., 2008)

En Brasil el set de las fuentes de biomasa para la producción de etanol están directamente influenciadas por la producción de la industria de la caña de azúcar, considerando la producción de alcohol y bagazo, seguida fuertemente por la forestal, que indica la producción de este a través de madera (usada principalmente para carbón y madera) y una área aun en desarrollo es el uso de desechos agrícolas. La importancia de la energía a partir de biomasa en este país ha dependido de estos factores:

- El tamaño de país y la disponibilidad de su tierra.
- El clima adecuado.
- La viabilidad de mano de obra económica.
- El dominio de las tecnologías de producción y conversión de biomasa en el área de la agricultura y de la industria. (Walter et al., 2008)

El lograr con estos requerimientos permite considerar a la región como un país con potencialidad en la producción de biomasa en el escenario de las bioenergías. La productividad de una región se ve intrínsecamente afectada

por las características del suelo de cultivo, en donde la calidad de este, el medio ambiente y las buenas prácticas agrícolas determinan el rendimiento obtenido de la biomasa. (Walter *et al.*, 2008)

De acuerdo con Agencia Internacional de Energía (IEA) y las estadísticas oficiales en el 2007, la biomasa provee del 10% de la energía a nivel mundial en el 2005. La Biomasa es usada para producir calor (leña) y para la generación de energía en una escala menor en muchas ciudades a través del mundo (Openshaw, 2010).

Esta sentencia fue muy criticada a nivel internacional, ya que los sistemas de transporte como vehículos, barcos y aviones pueden disminuir en gran manera las emisiones de CO₂. Podría incluirse en este panorama una combinación de tipos de vehículos: vehículos de pilas de combustible propulsados con hidrógeno, vehículos eléctricos, vehículos que circulen con biocombustibles y aviones propulsados con hidrógeno. El hidrógeno, los biocombustibles y la electricidad empleada en el transporte podrían producirse con un nivel de emisiones de CO₂, del pozo a la utilización del vehículo, de prácticamente cero. También se podrían utilizar los biocombustibles para sustituir a la gasolina. Como tal, se ofrecen ventajas importantes en lo que a la seguridad energética se refiere y un posible nuevo potencial para el desarrollo agrícola (Dinneen y Vierhout, 2007).

La biomasa vegetal ha sido utilizada en gran escala con fines energéticos; sin embargo, hay factores que dificultan y limitan el aprovechamiento de una parte

considerable de la misma. Los costos energéticos de recolección y transporte restringen el aprovechamiento de la biomasa producida en lugares relativamente alejados de los centros de utilización.

Por otra parte, la existencia de vastos eriales, la extensión limitada de las zonas cultivables, impone la introducción de nuevas concepciones para mejorar la productividad de las áreas cultivables y explotación de las baldías, incluyendo especies hasta ahora poco valorizadas, con el fin de optimizar la producción de biomasa energética (García, 1983).

La biomasa con alto grado de humedad puede transformarse por degradación biológica, mediante procesos anaeróbicos, en metano o etanol, consiguiéndose aumentar el valor energético de la biomasa de 16 kJ/g a 30 kJ/g en el caso de etanol y a 56 kJ/g en el de metano (Carrillo, 2004).

Las técnicas más desarrolladas son, por un lado, la digestión anaeróbica de biomasa con alto contenido en celulosa (basura, plantas acuáticas y residuos agrícolas, ganaderos e industriales) para la generación de metano, y por otro, la fermentación de materiales azucarados o amiláceos para la producción de etanol (Figura 1). En contraste con la digestión anaeróbica que emplea materias primas de escaso valor, la fermentación alcohólica utiliza como substratos productos de alto valor económico (Carrillo, 2004).

En la fermentación alcohólica intervienen levaduras que convierten directamente las hexosas (glucosa, etc.) en etanol. El rendimiento teórico en peso, con glucosa como substrato, es superior al 50%, recuperándose

aproximadamente el 93% de la energía contenida en el sustrato. En la práctica, el rendimiento puede estar entre el 85 y 90% del valor teórico (García, 1983).

Para producir etanol a partir de biomasa, primero hay que liberar los componentes de azúcar atrapados en el sustrato. La biomasa se compone de tres fracciones principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y hemicelulosa contienen azúcares en forma polimérica que pueden ser convertidos por las enzimas en monómeros para la fermentación posterior. Sin embargo, la lignina, el duro componente de la planta parecido a la madera, protege las fibras contra los ataques de microorganismos y enzimas, impidiendo que la celulosa y la hemicelulosa reaccionen con el agua y se hinchen.

Por lo tanto, el uso de biomasa como materia prima requiere la descomposición de la lignina para que las fracciones de celulosa y hemicelulosa queden asequibles para la hidrólisis enzimática. Normalmente, se aplica un pre-tratamiento inicial físico o químico para debilitar la estructura de la fibra, seguido del tratamiento enzimático para liberar los azúcares C6 de la celulosa y, en algunos casos, los azúcares C5 de las fracciones de hemicelulosa. Luego los azúcares pueden fermentarse y procesarse en etanol (Perlack, 2007).

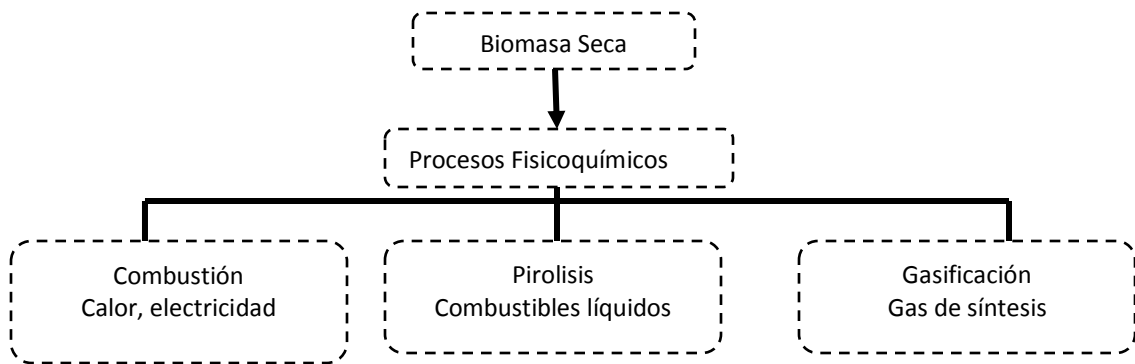


Figura 1 Productos de la conversión de biomasa seca (Carrillo, 2004).

1.2 TRIGO

1.2.1 DESCRIPCIÓN

El trigo (*Triticum vulgare*) es una planta gramínea anual con espigas de cuyos granos molidos se saca la harina. Los granos de trigo común pueden ser blandos o duros. La altura de la planta varía entre 30 y 150 cm. Tiene mayor producción en terrenos cargados de materia orgánica y arcilla. Prospera en climas subtropicales, moderadamente templados y fríos. El coeficiente de transpiración del trigo es de 450 a 550, es decir, que se necesitan de 450 a 550 litros de agua para elaborar 1 kg de materia seca. El trigo es el cereal que más se utiliza en la alimentación humana, por su alto valor energético, además de que contiene más proteínas que el maíz y el arroz.

1.2.2 PRODUCCIÓN

En México el trigo ocupa el segundo lugar en la producción de cereales, con alrededor del 14% de la producción nacional. En 2009 el valor generado por la producción de este grano representó el 2.46% del PIB primario y el 0.10% del PIB Total.

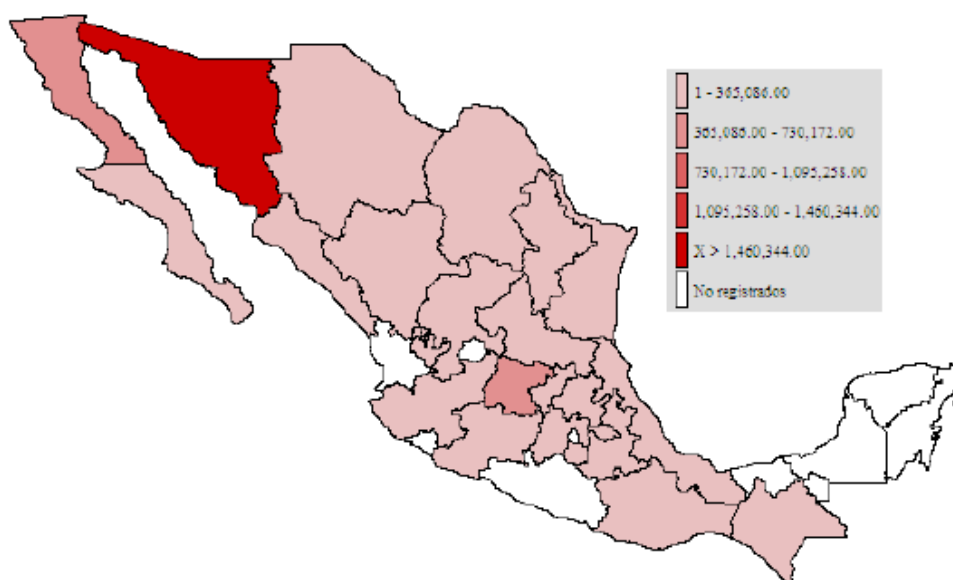


Figura 2. Mapa de distribución en la producción de trigo en México (SIAP-SAGARPA).

La superficie sembrada de trigo en México depende de los factores climáticos, ya que un 80.5% es sembrada en el ciclo Otoño-Invierno (O-I). Entre el año 1986 y 2004 se registró una disminución en la superficie sembrada de casi 60%. Sin embargo, desde el año 2005, se observa un incremento en los niveles de producción impulsados por el alza en el precio del grano.

En el año 2009 la superficie alcanzó 866 mil hectáreas y la producción 4.1 millones de toneladas con un valor cercano a los 12 millones de pesos. El principal estado productor de trigo es Sonora, que en el año 2009 tuvo una producción de 1.8 millones de ton, que representó el 44% de la producción nacional. Los estados de Guanajuato, Baja California, Chihuahua y Michoacán son también importantes productores de trigo en México y junto con Sonora generan el 85.5% de este cereal en el país (Financiera Rural, 2008).

1.3 CEBADA

La cebada (*Hordeum vulgare*) pertenece a la familia de las gramíneas. Las hojas están integradas por las espiguillas, y las glumillas están adheridas al grano. La cebada crece mejor en los climas frescos y moderadamente secos, alcanza de 70 a 110 cm de altura. En México el cultivo de la cebada se orienta básicamente a la elaboración de malta para la producción de cerveza. La cosecha se realiza en forma combinada, cuando la humedad del grano es de 13.5%, cuando el grano está maduro y seco, no es recomendable cosechar con más de 16.5% de humedad del grano.

1.3.1 PRODUCCIÓN

A nivel nacional, la producción de cebada en 2008 fue de 796.86 miles de toneladas. En México, la producción de cebada se encuentra concentrada en 4 estados: Guanajuato (33.9%), Hidalgo (27.3%), Estado de México (12.6%) y

Guerrero (1.0%). Guanajuato produjo 313.73 miles de toneladas en promedio entre el año 2002 y 2008. Hidalgo, entre el año 2002 y 2008 registró una producción promedio de 213.39 miles de toneladas por año. Los estados de Tlaxcala y Estado de México representan, el 19.2% de la producción nacional, con un volumen de 90,094 y 62,706 toneladas respectivamente (Financiera Rural, 2008).

1.4 ETANOL LIGNOCELULOSICO

El alcohol tal como etanol o butanol producido directamente a partir de biomasa renovable es considerado una de las fuentes alternativas de energía para el desarrollo sostenible de los recursos humanos la sociedad. La conversión de la biomasa económicamente competitiva con el etanol de bajo costo, sin embargo, sigue siendo un desafío significativo, debido principalmente a la falta de un robusto biocatalizador (Guijari *et al.*, 2009) Las estrategias para desarrollar tal biocatalizador industrial, ilustrada en la Figura 3, son: 1) conversión directa de biomasa lignocelulósica en biocombustibles alcohol a través de un único biocatalizador sin pasos intermedios (es decir, bioprocesamiento consolidado), y 2) tratamiento de biomasa lignocelulósica en bruto por medios físicos y químicos, y seguido por una etapa de fermentación biocatalizador mediada. A nivel mundial los esfuerzos, extensivos e intensivos en los últimos años se han hecho en cada paso a lo largo de estas rutas estratégicas para el logro de la objetivo de producir con el medio ambiente, la energía renovable (Guijari *et al.*, 2009).

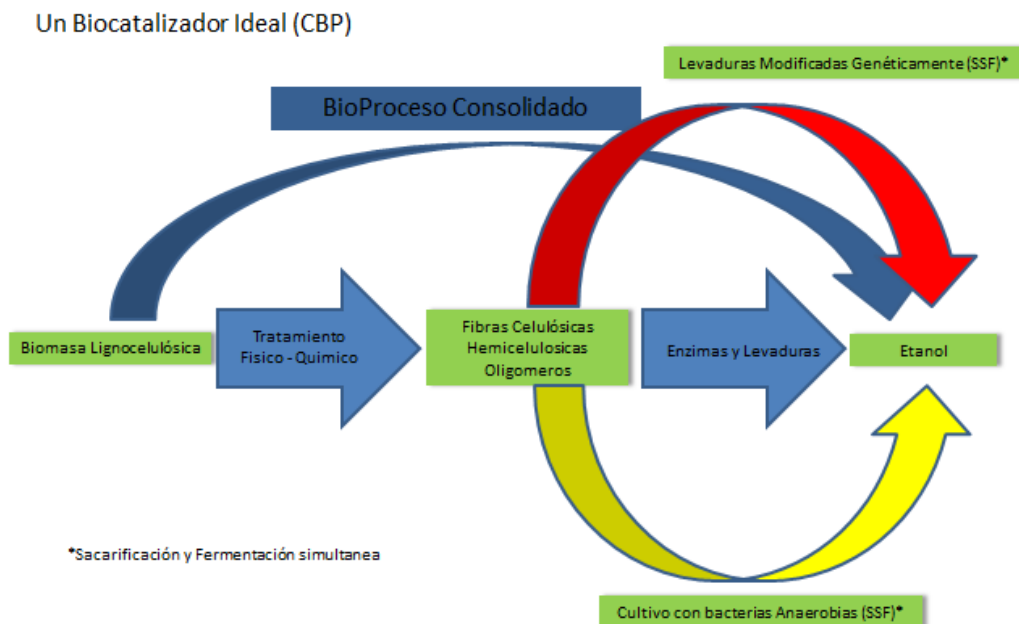


Figura 3. Estrategias para la conversión de material lignoceluloso a bioetanol (Guijari *et al.*, 2009)

1.5 MATERIA PRIMA LIGNOCELULOSICA

En la última década ha crecido mucho el interés en estos materiales lignocelulósico como fuente de energía. Actualmente se producen biocombustibles a partir de cultivos que son materias primas para productos comestibles y mientras se está investigando cultivos que no compiten en el mercado de materias primas comestibles. Sobre todo las plantas herbáceas han recibido mucho interés en el sector de biomasa y cultivos energéticos por su renovabilidad y su disposición de stocks de biomasa que alcanzó 1549 millones de toneladas/año a nivel mundial (Kim y Dale, 2004).

Las plantas herbáceas se caracterizan por su bajo contenido leñoso. En general suelen tener tallos verdes, finos y blandos, aunque existen especies herbáceas con tallo ancho como el plátano y papaya. Las plantas herbáceas están clasificadas dentro de la división *Spermatophyta* y subdivisión *Angiospermae*, dentro de las clases *Dicotyledoneae* y *Monocotyledoneae* (Liliopsida). La mayoría pertenece a la familia de *Poaceae* (Gramineae (las gramíneas)), la familia de mayor importancia económica. Crecen rápidamente y producen flores y semillas en relativamente poco tiempo. La mayoría de ellos es anual; mueren después de perder sus semillas. Las bienales y perennes viven respectivamente dos y más hasta 25 años. También pierden sus tallos y hojas, pero al año sobrevive la parte de la planta bajo tierra (Gómez, 2008)

En general las plantas perennes pueden ser una mejor opción que plantas anuales, porque no generan los costes anuales de siembra, cosecha, combustibles, etc. Además suelen desarrollar raíces más profundas que fijan más carbono de la atmósfera. Sin embargo no se garantiza la continuidad de la disponibilidad de stocks.

1.5.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

En general las paredes celulares de plantas consisten en polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos minoritarios (minerales, lípidos, proteínas, etc.). Los polisacáridos se clasifican en celulosa, hemicelulosas y pectinas. Gran parte de los compuestos fenólicos están presentes en la estructura de lignina. La pared celular primaria envuelve la célula que durante la fase de

expansión celular crece hasta un tamaño 100 veces más larga que su tamaño justo después de dividirse. Después ciertas células empiezan a desarrollar una pared secundaria. Los compuestos fenólicos pueden alcanzar hasta 30 % en peso seco de las paredes celulares secundarias (Scheller y Ulvskov, 2010). Relativamente poco se conoce sobre la organización y coordinación de celulosa, hemicelulosa y lignina durante y después la biosíntesis que determinan la morfología y funcionalidad de la pared celular.

Evidentemente celulosa, hemicelulosas y lignina son los principales constituyentes de la pared celular de fibras de plantas. La morfología de fibras depende principalmente de la composición y la organización estructural de estos constituyentes. Sin embargo contiene compuestos minoritarios no poliméricos que pueden ser de vital importancia para los procesos fisiológicos de la célula. La cantidad y el tipo de estos compuestos pueden influir mucho en procesos industriales. A continuación se describen cada uno de los compuestos de una fibra o un material lignocelulósico.

1.5.2 CELULOSA

La celulosa es un homopolímero lineal de elevado peso molecular y grado de polimerización; entre 200 y hasta 10,000 unidades en estado nativo de β -D-glucopiranosas unidades por enlace glicosídico o de tipo éter entre carbono 1 y 4 (β ,1-4) (Figura 4). Es el componente principal de las paredes celulares de los vegetales y el polímero mayoritario del planeta, tiene una estructura fibrosa, es blanca, muy estable y resistente al ataque químico, también a la tracción

mecánica. Debido al carácter asimétrico de este enlace, también puede considerarse a la celulosa como un poliacetal del dimero celobiosa (4-O-β-D-glucopiranosil-β -D-glucosa), que no existe de forma natural, solo puede obtenerse por la hidrólisis parcial de la celulosa (Barroso, 2011; Gómez, 2008)

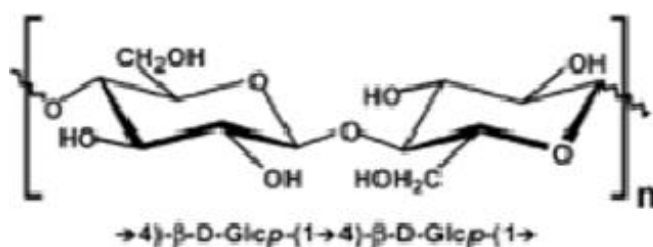


FIGURA 4. Representación de los enlaces glucósidicos entre moléculas de glucosa en la celulosa (Barroso, 2011).

1.5.3 HEMICELULOSA

La hemicelulosa es un heteropolisacárido constituido por diversos monosacáridos (hexosas y pentosas), entre los que predomina la xilosa (Figura 5). La hemicelulosa es la segunda biomasa renovable más abundante y compone aproximadamente el 25-35% de la biomasa lignocelulósica (Saha, 2003). La hemicelulosa es mucho más fácil de hidrolizar que la celulosa debido a su estructura ramificada compuesta por diversos monosacáridos los cuales son más susceptibles a separarse (Peters, 2007). Así como la celulosa, la

hemicelulosa es también una fuente importante de recurso para la obtención de azúcares fermentables para la producción de energía (Kumar *et al.*, 2008).

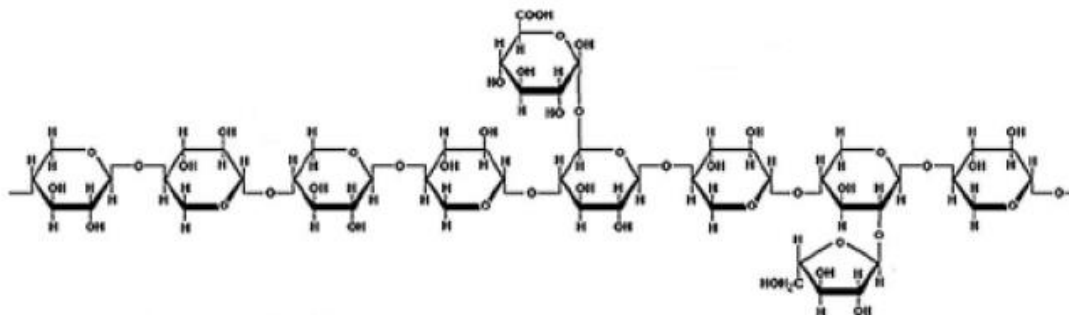


Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa (Barroso, 2011).

1.5.4 LIGNINA

La lignina es un polímero entrecruzado constituido por unidades básicas de naturaleza variada, entre las que predominan los grupos aromáticos fenólicos (Figura 6) (Saha, 2003). Además, es el compuesto orgánico natural más abundante en los materiales fibrosos. La importancia de la lignina en las plantas se debe principalmente a dos factores: a su contribución a la fuerza mecánica la cual es importante para el crecimiento de la planta, así como a la protección que brinda contra la degradación (Barroso, 2011; Prinsen, 2010).

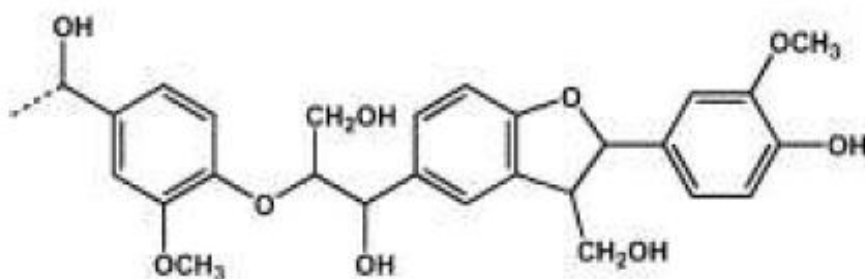


Figura 6. Estructura química de lignina (Barroso, 2011).

1.6 MÉTODOS FÍSICOS DE DEGRADACION DE MATERIAL LIGNOCELULOSICO

1.6.1 FRAGMENTACIÓN MECÁNICA Y PIROLISIS

Dentro de los métodos físicos para la degradación del material lignocelulósico se encuentran el fragmentado, triturado y molido (hasta 0.2–2 mm) para aumentar la superficie de contacto en el medio con lo cual se facilita el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y por tanto incrementa su tasa de conversión. Otro de método es la pirolisis donde se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300°C. Aunque es un método eficiente, tiene un costo elevado en comparación con otros métodos (Taherzadeh y Karimi, 2007).

1.7 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA DEGRADACION DE MATERIAL LIGNOCELULOSICO

1.7.1 EXPLOSIÓN POR VAPOR

Es uno de los pre tratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves. La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160–260°C (0.69–4.83 MPa) durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles. La adición de H_2SO_4 mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. Los factores que afectan el proceso son el tiempo del tratamiento, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad (Kumar *et al.*, 2009).

1.7.2 EXPLOSIÓN DE FIBRA DE AMONÍACO (AFEX)

Este pre tratamiento mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos los cuales son tratados con amoniaco a alta temperatura y presión. Es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90% de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulósico sea triturado. Para reducir los costos y proteger el ambiente, el amoniaco se recicla después del pre tratamiento (Ballesteros *et al.*, 2006). El efecto de los métodos físicoquímicos varía de acuerdo al material lignocelulósico.

1.7.3 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Los ácidos como el H_2SO_4 y HCl concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión. Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos que hidrolizan la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, en los residuos queda la celulosa y la lignina, esta última se extrae con solventes orgánicos. (Eggeman y Elander, 2005). El pre tratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa, pero su costo es alto en comparación con otros pre tratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación (Taherzadeh y Karimi 2007).

1.7.4 HIDRÓLISIS ALCALINA

Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. En las maderas duras hay un incremento en la digestibilidad y un descenso del contenido de lignina, en maderas suaves con lignina hasta en un 26% no se han obtenido resultados eficientes; en general la utilización de bases permite la disolución de la lignina, pero sus costos son altos, haciendo estos métodos no competitivos a gran escala (Sun y Cheng, 2002).

1.7.5 DESLIGNIFICACIÓN OXIDATIVA

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50% de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación (Barroso, 2011).

1.7.6 PROCESO ORGANOSOLVENTE

Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona así como también ácidos inorgánicos como catalizadores (H_2SO_4 ó HCL) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación (Zhao *et al.*, 2009).

1.8 MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA HIDROLIS

Los tratamientos biológicos son amigables con el ambiente e incrementan la accesibilidad al material celulósico favoreciendo una subsecuente hidrólisis y fermentación, sin embargo, es un proceso lento que limita su aplicación a nivel industrial. Las principales ventajas son el alto rendimiento del producto, las condiciones moderadas de la reacción, la poca generación de compuestos tóxicos y una mínima demanda de energía.

Algunas bacterias y hongos de podredumbre blanca y parda oxidan completamente la madera, por lo que tienen aplicaciones biotecnológicas en la

conversión de la lignocelulosa a productos de valor industrial (Balan *et al.*, 2008). Se han llevado a cabo búsquedas de organismos con capacidades celulolíticas, como en el trabajo de Li *et al.* (2008) que evaluaron la capacidad de *Fusarium concolor* para deslignificar la paja de trigo en 5 días, y proponen que podría utilizarse en pre tratamientos de materiales lignocelulósicos usados en la industria del biopulpeo y la bioconversión a etanol. Zhang *et al.*, (2007) utilizaron *Coriolus versicolor* en el pre tratamiento del bambú, observando una disminución en la cantidad de lignina y hemicelulosa y un aumento hasta del 37% en la tasa de sacarificación después del tratamiento.

El descubrimiento de enzimas con propiedades importantes resulta muy valioso, Quiroz- Castañeda *et al.* (2009) reportaron la caracterización de la actividad celulolítica de los hongos *P. sanguineus* y *B. adusta* en paja de trigo, cuyas enzimas son capaces de tolerar condiciones elevadas de temperatura y funcionan en un amplio rango de pH, lo que los hace potenciales candidatos para ser utilizados en procesos industriales que requieren la hidrólisis de la celulosa.

1.9 COMPLEJOS ENZIMATICOS UTILIZADOS

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Lee, 1997). El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (Cx) (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa

E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4-glucanasa (C1) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (Cb) (β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21) (Palmqvist . y Hahn-Hägerdal 2000).

1.9.1 MECANISMO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de C1 (Lee 1997; Ovando y Waliszewski, 2005; Buitrago y Tenjo, 2007).

En la segunda etapa actúa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa (Lee, 1997). Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis (Lee, 1997; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Ovando y Waliszewski, 2005). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa Cb, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Lee, 1997).

I.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen enzima celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa (Dongowski *et al.*, 2002).

A partir de los hongos aeróbicos, tales como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, se han obtenido los complejos celulolíticos utilizados en la mayoría de los estudios (Marquina, 1991; Aden *et al.*, 2002), debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa. Entre estos microorganismos, el hongo filamentoso *T. reesei* se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulolítico que produce y secreta, el cual presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endo- β -1,4-glucanasa,

exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa) (Aden *et al.*, 2002). También, las celulasas de *T. reesei* tienen la ventaja de que estas son resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 4.8 a 50 °C durante 48 h (Ryu y Mandels, 1980).

1.10 PREPARADOS CELULOLÍTICOS COMERCIALES

En la actualidad existen disponible numerosos preparados enzimáticos comerciales grado alimenticio que contienen principalmente actividad celulolítica (endo- β -1,4-glucanasa E.C.3.2.1.4, exo- β -1,4-glucanasa E.C.3.2.1.91, β -1,4-glucosidasa E.C.3.2.1.21). Estos preparados enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Bhat, 2000). Algunos de estos preparados enzimáticos son: Crystalzyme PML-MX de Valley Research Inc., Biocellulase A de Quest Intl., Celluclast 1.5 L de Novo Nordisk, Econase Ce-S de Enzyme Development Co., Cellulase AP30K de Amano Enzyme, Stonenzyme Plus, Zymafilt L-300 y Macerex de Enmex S.A. de C.V., Novozym 342 de Novo Industries, Cellubrix L de Novo Nordisk y Cellulase de Bio-Cat Inc. Todos son solubles en agua y su presentación es en estado líquido, excepto el preparado Cellulase que es en polvo. Estos solamente son algunos de los preparados enzimáticos comercialmente disponibles en el mercado, ya que existen muchos de ellos, dado a la amplia gama de aplicaciones que tienen las celulasas en las

diferentes industrias tales como de alimentos para consumo humano, alimentos para animales, en textiles y combustibles (Ovando y Waliszewski, 2005).

1.11 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Los compuestos denominados carbohidratos o glúcidos son de suma importancia, debido a que estos son la principal fuente de energía para el cuerpo, para ello la mayoría de los análisis que se realizan a los alimentos son para identificar y cuantificar los glúcidos y así conocer cuál es la ingesta calórica. Los carbohidratos también llamados azúcares, osas o sacáridos, son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas o compuestos poliméricos que por hidrólisis producen polihidroxialdehidos y polihidroxicetonas. Según el número de unidades de azúcares sencillos que posean se clasifican en:

Monosacáridos o azúcares sencillos, que a su vez pueden ser aldosas cuando contienen el grupo aldehído o cetosas cuando contienen el grupo cetona. los monosacáridos naturales pertenecen a la serie D de los azúcares y pueden tener entre tres y hasta siete átomos de carbono.

- Disacáridos que están formados por dos monosacáridos unidos entre sí por enlaces glucosídicos.
- Oligosacáridos que tienen entre tres y diez monosacáridos unidos también por enlaces glucosídicos.
- Polisacáridos que son polímeros naturales con varios miles de unidades de azúcar sencillo ligadas entre sí.

De acuerdo con lo anterior, además de reconocer si un compuesto pertenece a la familia de los carbohidratos, es necesario diferenciar si se trata de un monosacárido tipo aldosa o cetosa, si es fácilmente oxidable o no, es decir si es un azúcar reductor o no lo es, si es de cinco átomos de carbono (pentosa) o de seis átomos de carbono (hexosa), si es disacárido o polisacárido (Hart *et al.*, 1997).

1.12 FERMENTACIÓN

El etanol es un producto del metabolismo de algunos microorganismos que puede ser obtenido por la hidrólisis de sustratos ricos en carbohidratos como pueden ser la caña de azúcar, maíz, arroz, etc. (Karimi *et al.*, 2006).

En teoría, se pueden obtener a partir de 1 gramo de glucosa 0,511 g de etanol (Buitrago y Tenjo, 2007). Cuando se fermentan sustratos puros el rendimiento es del 95% y se reduce al 91% cuando se utilizan materia primas grado industrial, las levaduras generalmente demuestran un grado de rendimiento de etanol cercano al 0,42 g/g bajo condiciones adecuadas a partir de xilosa (Karimi *et al.*, 2006).

Existen diferentes tipos de fermentación; batch o discontinua, continua o lote alimentado. La fermentación batch, consiste en un sistema cerrado (sustrato, cultivo de levadura) donde los productos se recogen hasta el final del proceso, siendo esta la más utilizada en los procesos industriales por ofrecer un menor costo de producción y requiere de un menor control en comparación con otros

procesos. Mientras que durante la fermentación continua, el crecimiento de microorganismos debe de ser mantenido constante mediante el bombeo de medio fresco y la eliminación del medio utilizado, lo cual permite al sustrato mantenerse constante durante el proceso de fermentación. En cambio, la fermentación de lote alimentado consiste en un proceso de alimentación intermitente ya que permite la entrada de materia (sustrato e inóculo) al sistema, pero no la salida (Buitrago y Tenjo, 2006).

1.12.1 MICROORGANISMOS FERMENTATIVOS

Uno de los principales organismos utilizados para la fermentación es la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, que aunque es eficiente para la producción de etanol, tiene la limitante de ser selectivo para el sustrato a utilizar, como algunos otros microorganismos, por ejemplo *Mucor indicus*, *Candida shehatae*, *Zymomonas mobilis* o *Trichoderma* sp. Actualmente, microorganismos como *Escherichia coli* o *Klebsiella oxytoca* han sido modificados genéticamente para la producción eficiente de etanol a partir de hexosas y pentosas presentes en polímeros de hemicelulosa (Zaldivar et al., 2005).

1.12.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

- Reino: Fungi – *Mycetae*
- División: Amastigomycota – *Eumycota*
- Subdivisión: *Ascomycotina*
- Clase: *Ascomycetes* – *Hemiascomycete*
- Subclase: *Hemiascomycetidae*
- Orden: *Endomicetales* – *Saccharomycetales*
- Familia: *Saccharomycetaceae* – *Endomycetaceae*
- Subfamilia: *Saccharomycetoidea*

- Genero: *Saccharomyces*
- Especie: *cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una de las especies más utilizada en la industria debido a su fácil manipulación, tolerancia a las altas concentraciones de etanol bajo costo, capaz de usar altas concentraciones de azúcar. Dentro de las características del cultivo, cabe señalar que su pH óptimo para el desarrollo se encuentra entre 4 y 5 para reducir el riesgo de contaminación bacteriana, además el rango de temperatura para este proceso se puede presentar entre los 28°C - 39°C, sin embargo, cerca de los 39°C la viabilidad celular se ve afectada (Leveau y Bouix, 2000; Tejeda *et al.*, 2011).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2 DEFINICIÓN DE POBLACIÓN Y MUESTRAS

El proceso experimental se realizó durante los meses de Junio y Julio del 2012 en los laboratorios de Olds College Centre of Innovation ubicado en Olds, Alberta, Canadá. La materia prima de rastrojo de Cebada y Trigo fueron proporcionados por una granja local cercana al poblado. Dicho material fue recolectado durante el mes de Mayo de 2012.

2.3 PREPARACIÓN DE MATERIA PRIMA

La materia prima fue secada en una estufa de aire circulante (Shell Lab, Sheldon Manufacturing, Inc) a 50°C durante 72 horas para eliminar cualquier resto de humedad. Posteriormente, fueron triturados en un molino (Thermomix, vorwerk) hasta alcanzar un tamaño de particular de 2 mm, finalmente el material vegetal molido y seco, fue conservado en bolsas de plástico hermética (Ziploc) a 4 °C hasta su uso (Saha *et al.*, 2005).

Keshwani y Cheng (2009) sugieren una molienda de 10-30 mm para las especies maderables y de 0.2 a 2 mm para pastos y forrajes, ya que si se realiza una molienda excesiva se presenta una reducción significativa en la cantidad de azúcares reductores y por lo tanto del etanol posterior al proceso de fermentación.

2.4 PRE-TRATAMIENTOS DEL MATERIAL VEGETAL

De acuerdo con la metodología implementada por Dien *et al.* (2011) and Detroy *et al.* (1981) con algunas modificaciones, el experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL donde las muestras fueron pre tratadas con un volumen de 12.0 mL de solución de H_2SO_4 en cinco diferentes concentraciones (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 % v/v) en combinación con 1.5 g de material vegetal por triplicado, posteriormente, se introdujeron en una autoclave (Sanyo MLS-3780) a 121 °C durante 1 h. Concluido este periodo de tiempo, se dejaron atemperar las muestras y fueron filtradas en un embudo Buchner con papel filtro (Whatman No. 1) usando 120 mL de agua desionizada a temperatura ambiente para el lavado, recuperando y pesando los sólidos presentes en la muestra (Wang *et al.*, 2010).

2.5 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA GLUCOSA

Se preparó una solución stock de glucosa 1% (p/v) para realizar diluciones y ser tratadas de acuerdo a la prueba de Benedict (Cuadro 2).

Cuadro 2. Patrón de disolución para curva de calibración de glucosa

Tubo No.	mL de solución de glucosa	mL de agua	mL reactivo de Benedict
1	0	5.0	1.0
2	0.5	4.5	1.0
3	1.0	4.0	1.0
4	1.5	3.5	1.0
5	2.0	3.0	1.0
6	2.5	2.5	1.0
7	3.0	2.0	1.0
8	3.5	1.5	1.0
9	4.0	1.0	1.0
10	4.5	0.5	1.0
11	5.0	0	1.0

Se elaboró la curva patrón donde se graficó en el eje de las abscisas el promedio de la absorbancia determinada a 735 nm y en el eje de las ordenadas el promedio de la concentración de glucosa determinada en g/L. Se determinó la ecuación de la recta que relaciona a los dos parámetros:

$$Y = b + mx$$

En donde “y” representa la absorbancia que se determinó a 735 nm, “x” representa la concentración de glucosa que se determinó en g/L, “m” representa la pendiente de la línea recta y “b” es la intersección al origen.

De esta manera se pudo determinar la ecuación que se muestra en la Figura 7.:

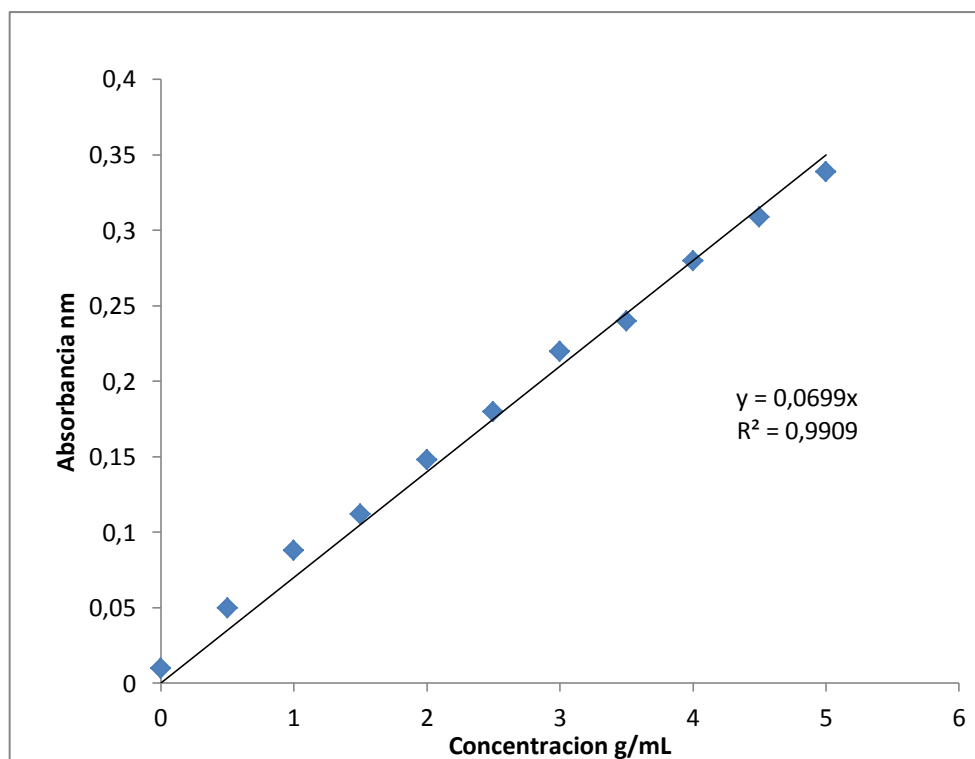


Figura 7. Ecuación de la curva de calibración para glucosa

2.6 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

2.6.1 PRUEBA DE BENEDICT

Esta prueba identifica azúcares reductores (aquellos que tienen su OH libre del C anomérico), como lactosa, glucosa, maltosa y celobiosa. En soluciones alcalinas, pueden reducir el Cu^{2+} que tiene color azul a Cu^+ , que precipita de la solución alcalina como Cu_2O de color rojo-naranja.

El reactivo de Benedict consta de:

- Sulfato cúprico
- Citrato de sodio
- Carbonato Anhidro de Sodio
- Además se emplea NaOH para alcalinizar el medio.

El fundamento de esta reacción radica en que en un medio alcalino, el ion cúprico (otorgado por el sulfato cúprico) es capaz de reducirse por efecto del grupo Aldehído del azúcar (CHO) a su forma de Cu^+ . Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso (Cu_2O).

El medio alcalino facilita que el azúcar esté de forma lineal, puesto que el azúcar en solución forma un anillo de piranósico o furanósico. Una vez que el azúcar está lineal, su grupo aldehído puede reaccionar con el ion cúprico en solución (McMurry, 2001)

En estos ensayos es posible observar que la fructosa (una cetohexosa) es capaz de dar positivo. Esto ocurre por las condiciones en que se realiza la prueba: en un medio alcalino caliente esta cetohexosa se tautomeriza (pasando por un intermediario enólico) a glucosa (que es capaz de reducir al ion cúprico).

Los disacáridos como la sacarosa (enlace α (1 $\rightarrow$ 2) O) y la trehalosa (enlace α (1 $\rightarrow$ 1)O), no dan positivo puesto que sus OH del C anoméricos están siendo utilizados en el enlace glucosídico.

En resumen, se habla de azúcares reductores cuando tienen su OH del C anomérico libre, y éstos son los que dan positivo en la prueba de Benedict (Carey, 2000).

Para la prueba de azúcares reductores del hidrolizado previo y posterior al pre tratamiento enzimático se utilizó un 1 mL de cada preparación, colocándolo en un tubo de ensayo con 4 mL de agua y 1 mL de reactivo de Benedict cuantitativo (Benedict's Solution Quantitative, Carolina, Burlington NC), estos se incubaron en agua caliente (90°C) durante 20 minutos, pasado el tiempo se dejaron enfriar y se centrifugaron a 3000 rpm x 2 min. Se utilizó el sobrenadante para la cuantificación espectrofotométrica (HACH DR/400 U) a una longitud de onda de 750 nm.

2.7 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El experimento de la hidrólisis enzimática se realizó en matraces redondos de 250 mL usando la fracción líquida filtrada del tratamiento ácido, estabilizando el pH de la solución a un rango entre 4.5 – 5.0 con NaOH (10 M). Se añadió la disolución enzimática que consistió en 2 mL/100 g de las enzimas Cellobiase de *Aspergillus niger*, C6105, Sigma Aldrich, USA) y Cellulase (de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730, Sigma-Aldrich, USA) en un volumen apropiado de buffer de $\text{Na}_2\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$, que fueron colocados en una incubadora (LAB-LINE 3529, Incubator shaker) con agitación constante de 100 rpm a 50°C durante 72 h (Saha *et al.*, 2005).

2.8 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

De acuerdo al método sugerido por Digman *et al.*, (2010) con modificaciones, el inóculo fue preparado a partir del crecimiento del liofilizado de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858) durante 24 h a 30°C en tubo con caldo nutritivo a base de extracto de levadura (10g L⁻¹), peptona (20g L⁻¹) y dextrosa (20g L⁻¹). Posteriormente, se inocularon 5 placas Petri con la misma preparación para medio sólido (adicionando 15 g L⁻¹ de agar bacteriológico). Se incubaron bajo las mismas condiciones. Se tomaron colonias jóvenes de *S. cerevisiae* y se disolvieron 10 mL de agua destilada estéril hasta alcanzar una turbidez que represente 1.0 de la Escala de MacFarland a una longitud de onda de 600 nm.

2.9 FERMENTACIÓN

El medio de cultivo fue preparado de acuerdo al método sugerido por Aurea-Victoria (2010), donde se obtuvieron 100 mL del hidrolizado y le fue añadido 1g de extracto de levadura y 2g de peptona, ajustando el pH a 7.0 con NaOH (5 M) y esterilizados durante 15 min a 121°C. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se adicionó el inóculo (10% v/v) y fue incubado durante 36 h en agitación (200 rpm) a 35°C como es sugerido por Silva (2010).

2.10 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ETANOL

Se prepararon 5 soluciones de concentración conocidas de alcohol etílico: 0.25, 0.50, 1.25, 2.50 y 5.0 g/L. Se utilizó la metodología de Microdifusión en cámara de Conway para obtener la siguiente ecuación: $y = 0,0195x + 0,0201$

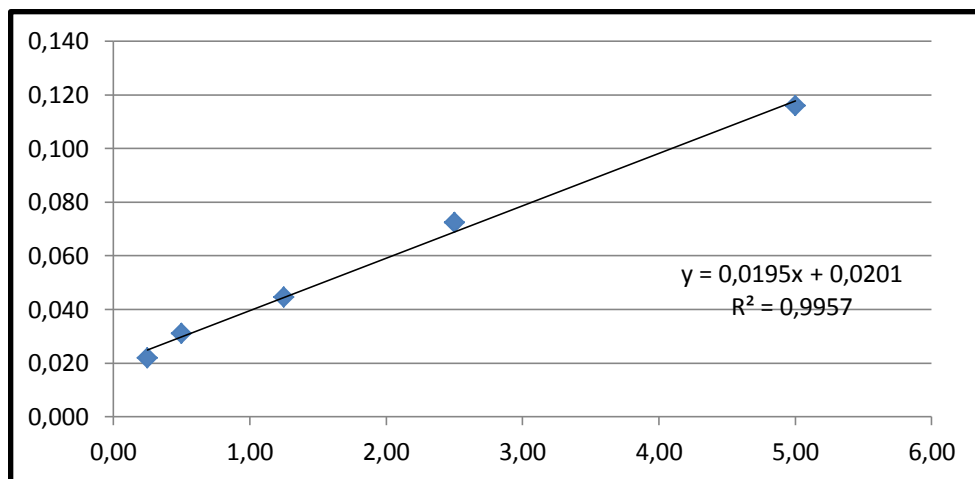


Figura 8. Representación gráfica de la curva de calibración para etanol

Se elaboró la curva patrón donde se graficó en el eje de las abscisas el promedio de la absorbancia determinada a 630 nm y en el eje de las ordenadas el promedio de la concentración de alcohol etílico determinada en g/L. Se determinó la ecuación de la recta que relaciona a los dos parámetros:

$$Y = b + bx$$

En donde “y” representa la absorbancia que se determinó a 630 nm, “x” representa la concentración de alcohol etílico que se determinó en g/L, “m” es el coeficiente de regresión o tasa de incremento de absorbancia dependiendo de la concentración y “b” es la intersección al origen.

2.11 EVALUACIÓN DE CONTENIDO DE ETANOL POR MICRODIFUSIÓN

El proceso de cuantificación se realizó mediante el método Microdifusión utilizando una cámara de Conway. La cual consistió en colocar 2 mL de solución ácida de $K_2Cr_2O_7$ en la parte interna de la cámara y 1 mL de solución de K_2CO_3 con 1 mL de muestra en la parte externa. Se incubó por 20 min a 40°C, se recogió la fracción líquida del compartimento interno y se aforó con 10 mL con agua destilada y leído por espectrofotometría a 630nm.

2.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de medias (HSD $\alpha=0,05$) donde se analizaron los tratamientos (Concentración de ácido sulfúrico) contra las variables (azúcares reductores del pre tratamiento ácido, azúcares del tratamiento enzimático y etanol producido). Todos los experimentos fueron realizados con tres repeticiones.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pre tratamiento físico de la materia prima lignocelulósica tiene como finalidad la reducción del tamaño de partícula, facilitar la eliminación de la lignina presente y posibilitar la acción enzimática. Es por ello que durante la realización de este trabajo la biomasa de cebada y trigo fue reducida a un tamaño de 2 mm en ambos casos.

De acuerdo a lo citado por Sánchez *et al.*, (2010), el pre tratamiento es indispensable para la biomasa lignocelulósica ya que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos de azúcares.

Las diferencias que existen entre los valores medios de la cantidad de azúcar cuantificada posterior al tratamiento ácido y posterior al tratamiento enzimático en las dos especies vegetales evaluadas. Donde la cebada presenta mayor cantidad de azúcares reductores en comparación con el trigo; sin embargo, la cantidad de alcohol producido es mayor en el trigo, la cual tuvo como concentración promedio de 10.07 mL de alcohol / Kg de biomasa (Cuadro 3).

Una posible explicación al incremento de la concentración de alcohol producido en el trigo, puede estar relacionada al porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina presentes de acuerdo a lo publicado por Lee *et al.*, (2007), donde corresponde a 42% celulosa, 28 % hemicelulosa y 0 % lignina para cebada, mientras que para el trigo los porcentajes son de 38 % celulosa, 29% hemicelulosa y 15 % de lignina en base a materia seca.

La diferencia en la presencia de lignina entre ambas materias primas, puede ser la responsable del incremento en el contenido de alcohol, debido a que las enzimas *Cellobiase* y *Cellulase* realizan la ruptura de los enlaces 1 β -glucosídico en la estructura de la lignina y por lo tanto existe un incremento tanto de moléculas de glucosa y fructosa disponibles para la fermentación.

Cuadro 3. Producción de azúcares promedio (media $\pm$ desviación estándar) posteriores al pre tratamiento ácido y enzimático así como la concentración de alcohol en trigo y cebada.

Variable	Trigo	Cebada
Azúcares Pre tratamiento	14.6531 $\pm$ 6.6337	15.9362 $\pm$ 7.3007
Azúcares posterior al Tratamiento Enzimático mg Kg⁻¹	16.1561 $\pm$ 6.2262	16.5063 $\pm$ 6.4232
Concentración Alcohol mL Kg⁻¹	10.0771 $\pm$ 1.1490	8.5386 $\pm$ 0.8968

El método de cuantificación de Benedict es para azúcares totales presentes, considerando entre estos la glucosa, fructosa, galactosa, manosa y xilosa. Cabe señalar que este método, no es selectivo para determinar la concentración de un azúcar específico, esto solo permite identificar los azúcares reductores los cuales tienen su grupo hidroxilo (OH) del carbono (C) anomérico libre.

Para el caso de los azúcares reductores producidos durante el pre tratamiento (ácido y enzimático) demuestran que no hay diferencia estadística entre las dosis de ácido sulfúrico, aunque el contenido de los mismos si se incrementa significativamente, independientemente de la dosis utilizada, con respecto a

cuando no se adiciona ácido sulfúrico (testigo). Como se muestro en los cuadros 4 y 5.

Las concentraciones bajas de H_2SO_4 (1 y 2%) en la cebada no tienen ningún efecto en la concentración de alcohol producido; en tanto que las tres últimas (3, 4 y 5 %) disminuyen la concentración de alcohol significativamente, respecto al testigo.

Donde de acuerdo a los resultados obtenidos para la etapa de pre tratamiento ácido para trigo y cebada, existe una diferencia significativa ($\alpha=0,05$) entre los tratamientos de cebada con respecto al control durante el pretratamiento acido, estableciendo valores de $1.0376 \text{ mg Kg}^{-1}$ en el testigo y $19.1808 \text{ mg Kg}^{-1}$ en el tratamiento 4 como valor máximo en cebada (Cuadro 4) y valores de $1.1916 \text{ mg Kg}^{-1}$ para el testigo del trigo y un máximo de $18.474 \text{ mg Kg}^{-1}$ (Cuadro 5).

El descenso en la producción de etanol en el trigo pudiera estar asociado con la formacion de algunos ácidos orgánicos o inhidores. Así como lo reportado por Erdei *et al.* (2010) y Doran *et al.* (2008), donde ponen de manifiesto que la presencia de algunos inhibidores como el ácido acético, hidroximetilfurfural y furfural se encuentran presentes en 2.5 g /100 g de materia seca de trigo. Con lo cual se disminuye la eficiencia del microorganismo fermentador, por ello disminuye su rendimiento para la producción de etanol.

Para el caso del trigo, la concentración de 4 % de ácido sulfúrico es estadísticamente mayor al resto, donde es más alta, pero estadísticamente igual a las concentraciones 3 y 5 %; en tanto que las concentraciones 1 y 2 %

no se diferencian del testigo, es decir no produce un incremento en la concentración de alcohol (Cuadro 5).

Cuadro 4. Concentración media de azúcares en el tratamiento enzimático, pre tratamiento ácido y concentración de alcohol en cada tratamiento de ácido sulfúrico para cebada.

Tratamientos [% H₂SO₄]	Azúcares Pre- tratamiento (mg Kg⁻¹)	Azúcares Enzimático (mg Kg⁻¹)	Concentración Alcohol (mL Kg⁻¹)
Testigo (0)	1.0376 b	3.44 b	9.8572 a
Tratamiento 1 %	18.8932 a	19.5692 a	9.0187 ab
Tratamiento 2%	18.9216 a	19.9788 a	8.8383 ab
Tratamiento 3 %	18.6556 a	18.5548 a	8.2987 bc
Tratamiento 4%	19.1808 a	18.7924 a	7.3098 c
Tratamiento 5%	18.9288 a	18.6988 a	7.9094 bc

Las letras diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa (HSD α = 0.05)

Entre los tratamientos de trigo y cebada se presentó una variación muy ligera, la misma pudiera estar asociada a la actividad enzimática, donde la acción de corte de moléculas es continua durante las 72 horas del proceso de hidrolisis, en este las enzimas siguen desdoblando estructuras hasta que no haya más enlaces que cortar, por lo tanto, estas pequeñas moléculas que son por lo general triosas, no pueden ser cuantificables por el método de Benedict, de esta manera es posible asumir la escasa variación entre los azúcares producidos a partir del pre tratamiento ácido y el enzimático.

Es importante señalar que, para el tratamiento enzimático se utilizó un testigo positivo para verificar la actividad enzimática sin haber tenido un pre tratamiento

ácido. La mejor actividad del tratamiento enzimático la mostró el testigo de la cebada.

Cuadro 5 . Concentración media de azúcares en el tratamiento enzimático, pre tratamiento ácido y concentración de alcohol en cada tratamiento de ácido sulfúrico para trigo.

Tratamientos [% H ₂ SO ₄]	Azúcares Pre- tratamiento (mg Kg ⁻¹)	Azúcares Enzimático (mg Kg ⁻¹)	Concentración Alcohol (mL Kg ⁻¹)
Testigo (0)	1.1916 b	3.572b	9.2281 a
Tratamiento 1%	17.7712a	19.3172 a	8.3886 ab
Tratamiento 2%	17.0088 a	17.0376 a	9.7972 ab
Tratamiento 3%	17.0952 a	18.6988 a	10.5768 bc
Tratamiento 4%	16.376 a	18.8068 a	11.3258c
Tratamiento 5%	18.474 a	19.5044 a	11.1459 bc

Las letras diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa (HSD A = 0.05)

Comparado con los resultados obtenidos por Alarcón (2010), el punto máximo de producción de azúcares reductores para la harina de malanga es de 0,795 g de azúcares / g de harina de malanga y de 0, 526 g de azúcares / g de harina de yuca, en un experimento realizado a 95 °C por 5 horas a una concentración de H₂SO₄ al 5% (v/v), transcurrido este tiempo, los azúcares reductores disminuyeron, probablemente por la descomposición de los azúcares reductores en ácidos orgánicos, furfural o algún otro compuesto fenólico.

El tratamiento de H₂SO₄ al 4% produjo de 0.342 a 0.487 g/g de azúcares reductores en 24 horas para *Water hyacinth*, la cual es una planta flotante de vida libre en Sudamérica (Satyanagalakshmi *et al.*, 2011).

Mientras Alarcón (2010), indica que la concentración del 5% fue la más efectiva, Satyanagalakshmi *et al* (2011) señalo en su caso el 4% de H_2SO_4 como una concentración eficiente, en este trabajo se señala de la misma manera que las concentraciones del 4% para el caso de la cebada y del 5% para el trigo son las que presentaron las mayores concentraciones de azúcares.

En cebada el testigo fue significativamente superior a los tratamientos con 3, 4 y 5% de H_2SO_4 en cuando a la producción de alcohol. Para el trigo en los tratamientos 4 y 5% de H_2SO_4 presentaron una mayor concentración, aunque no muestra una diferencia estadística significativa. (Figura 9).

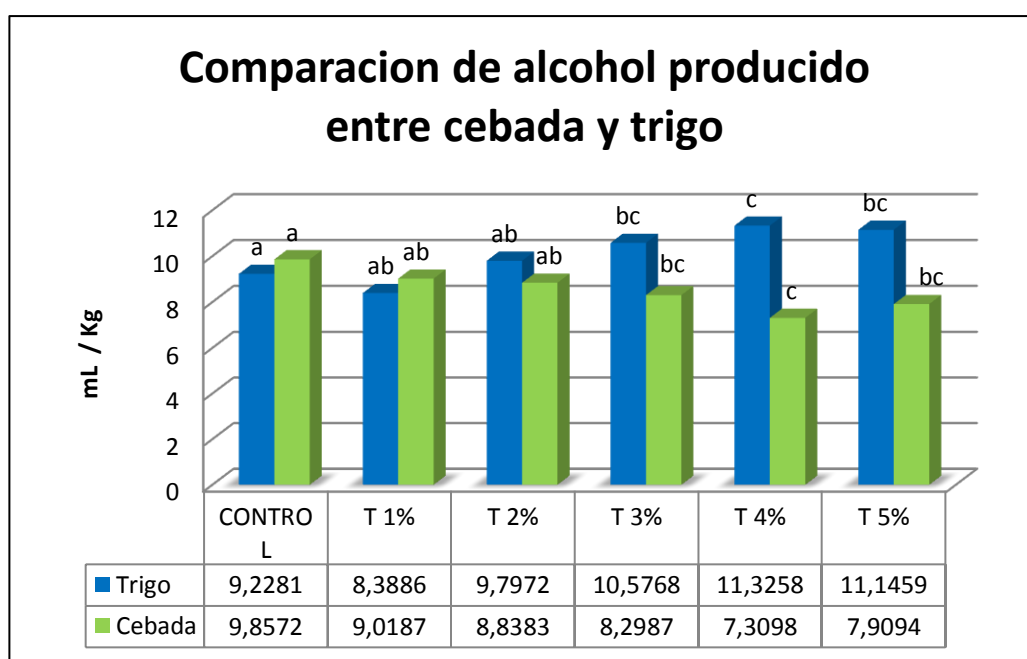


Figura 9. Medias con letras desiguales en pares de columnas indican diferencia significativa de alcohol producido entre cebada y trigo (mL kg⁻¹).

A nivel estadístico tanto en trigo como en cebada no fue posible visualizar una correlación significativa entre los valores de la concentración de alcohol y la cantidad de azúcares, tanto en el tratamiento enzimático como en el pre

tratamiento ácido. En ambas especies se presentó una correlación altamente significativa entre los valores de azúcares del pre tratamiento ácido y los del tratamiento enzimático (Cuadro 6 y 7). Cabe señalar que la correlación entre azúcares del pre tratamiento y los del tratamiento enzimático en trigo, presenta una correlación de $r=0.9939$, siendo altamente significativa, mientras que en esta misma relación pero en cebada se tiene un valor de $r=0.9962$ teniendo esta un mayor grado de correlación. Lo cual nos indica que, a una mayor concentración de ácido sulfúrico la concentración de azúcares reductores disponibles incrementan, esto es posible mientras se mantengan las condiciones del pre tratamiento.

Cuadro 6. Correlación de Pearson entre la concentración de azúcares reductores presentes posteriores al tratamiento ácido y posterior al tratamiento enzimático así como la concentración de alcohol en el caso del trigo.

	Azúcares Pre tratamiento		Azúcares posterior al Enzimático	Concentración Alcohol
Azúcares tratamiento	Pre	1,000	0,9939	0,3402
P(r=0)		0.000***	0,0001 ***	0,5094 ns
Azúcares Enzimático			1,000	0,3697
P(r=0)			0.000***	0,4707 ns
Concentraciön Alcohol				1,000
P(r=0)				0.000***

Cuadro 7 Correlación de Pearson entre la concentración de azúcares reductores presentes posteriores al tratamiento ácido y posterior al tratamiento enzimático así como la concentración de alcohol para cebada.

	Azúcares Pre tratamiento	Azúcares posterior al Enzimático	Concentración Alcohol
Azúcares Pre tratamiento	1,000	0,9962	-0,7285
P(r=0)	0.000***	0,0000 ***	0,1005 ns
Azúcares Enzimático		1,000	-0,673
P(r=0)		0.000***	0,1427 ns
Concentración Alcohol			1,000
P(r=0)			0.000***

La cantidad de alcohol producido se encuentra ligada a dos factores, uno de ellos es la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina contenida en cada una de las materias primas que ha sido convertida a azúcares simples después del proceso enzimático, y a la alta es especificidad del microorganismo fermentador. En este caso *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28858 con selectividad por glucosa y tolerancia a altas concentraciones de etanol.

Además es importante la conservación de las condiciones (pH, temperatura y tiempo) de la fermentación, debido a que en un sistema continuo de fermentación esto permitirá el éxito o el fracaso.

Zaldivar et al (2001), realizó la producción de etanol a gran escala con *Saccharomyces cerevisiae*, a un pH de 5.0 y 30°C, lo cual permite al microorganismo fermentar los azúcares de acuerdo a su biotipo.

Tomando en cuenta, que el incremento en la concentración de etanol está relacionado con el incremento en la concentración de glucosa, como lo observado por Erdei *et al.* (2010), quien reportó que la concentración de etanol más alta se encontró a las 96 horas posteriores de la fermentación, siendo esta de 56,5 g L⁻¹ usando trigo como materia prima. De igual manera el tiempo marco una diferencia significativa en el trabajo realizado por Da Silva *et al.*, (2010), con el uso de vainas de mezquite para la producción de etanol en un tiempo de 36 horas en un cultivo estático, obteniendo valores de 141. 1 g L⁻¹ de etanol.

En referencia a otros trabajos realizados para observar la producción de etanol a partir de residuos vegetales se encuentra el realizado por Malagon (2008), donde la cantidad de alcoholes producidos por residuos vegetales está ligada a la concentración de celulosa presente, como es el caso de la cáscara de arveja que posee un 43% de celulosa y tiene la capacidad de producir 4.50 mL de alcohol por litro, el brócoli 30 % y producir 5.21 mL de alcohol y la lechuga con 20% un total de 5.05 mL.

Con lo cual se puede presumir que las vegetales de *Triticum vulgare* y *Hordeum vulgare* pueden ser considerados como sustratos potenciales para la producción de etanol por la vía de la fermentación con el uso de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema de fermentación continuo debido a la cantidad de azúcares reductores que se producen durante el proceso de pre-tratamiento.

IV. CONCLUSIONES

- Se determinó la cantidad de azúcares reductores presentes en trigo y cebada posterior a un pre tratamiento con ácido sulfúrico obteniéndose $14,6531 \pm 6,6337 \text{ mg Kg}^{-1}$ y $15,9362 \pm 7,3007 \text{ mg Kg}^{-1}$ para trigo y cebada respectivamente. Lo cual nos indica que ambos materiales lignocelulósicos son sustratos potenciales para su bioconversión a bioetanol.
- No se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de azúcares reductores producidos durante el pre tratamiento ácido y el tratamientos enzimático.
- Se demostró que los azucars generados en trigo y cebada son fermentables por acción de *Saccharomyces cerevisiae*
- Las concentraciones promedio de alcohol cuantificadas en trigo y cebada corresponden a valores de $10.0771 \pm 1.1490 \text{ mL Kg}^{-1}$ y $8.5386 \pm 0.8968 \text{ mL Kg}^{-1}$ respectivamente.
- La concentración media de azúcares en el pre tratamiento ácido y el tratamiento enzimático solo mostraron diferencias con respecto al testigo mas no entre si, además se logró observar que una mayor concentración de ácido sulfúrico durante el pre tratamiento acido disminuye la concentración de alcohol producido en el caso de la cebada.

- En el caso del trigo las concentraciones de azúcares posterior a los pre tratamientos tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas, Para este material lignocelulósico una mayor concentración de ácido durante el pre tratamiento muestra una diferencia estadística para el alcohol producido al final de la fermentación.
- La cantidad de azúcares reductores no varía con el uso de un tratamiento enzimático, por lo tanto, se plantea la posibilidad de realizar el proceso de fermentación sin necesidad de realizar un proceso de hidrólisis enzimática.

V. LITERATURA CITADA

1. Abideen Z., Ansari R., y Ajmal K.M. 2011. Halophytes: Potential source of ligno-cellulosic biomass for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 1, 5.
2. Aden A., Ruth M., Ibsen K., Jechura J., Neeves K., Sheehan J., y Wallace B. 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. National Renewable Energy Laboratory. Technical report. NREL/TP-510-32438.
3. Aguilar R, N. 2007. Bioetanol de la caña de azúcar. *Avances en Investigación Agropecuarias*. Vol. 11, número 3. pp. 25-39. ISSN:0188-7890
4. Alarcón E. A.V. 2010. Producción de Bioetanol con *Zymomonas mobilis*. Tesis de Maestría. Unidad Profesional interdisciplinaria en biotecnología. Mexico, DF. Instituto Politecnico Nacional. 92 pp.
5. Álvarez M. C. 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa UNAM*. No. 359.
6. Balan V., da-Costa S.L., Chundawat S.P., Vismeh R., Jones .AD. y Dale B.E. 2008. Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 293-301.

7. Ballesteros I., Negro M.J., Oliva J.M., Cabañas A., Manzanarez P. y Ballesteros M. 2006. Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 129-132. pp.496-508
8. Barroso C.M. 2011. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Tesis de Grado. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Madrid, España.
9. Bhat MK. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18: 355-383.
10. Buitrago E.J.C. y Tenjo C.D.G. 2007. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Bogotá, Distrito Capital.
11. Carey F. 2000. Química Orgánica. Mc Graw Hill. Tercera Edición. España. Pág 785 - 796 .
12. Carrillo L. 2004. Energía de Biomasa. Edición del autor, S.S. Jujuy. ISBN 987-43-8679-7 82p.
13. Detroy R.W., Lindenfelser L.A., Sommer S. y Orton W.L. 1981. Bio conversion of wheat straw to ethanol: chemical modification, enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, Vol XXIII. Pag 1527 – 1535.
14. Dien B.S., Miller D.J., Hector R.E., Dixon R.A., Chen F., McCaslin M., Reisen P., Sarath G. y Cotta M.A. 2011. Enhancing alfalfa conversion

efficiencies for sugar recovery and ethanol production by altering ligning composition. BioResource Technology. 102; 6479-6486.

15. Digman M.F., Shinnars K.J., Casler M.D., Dien B.S., Hatfield R.D., Jung H.J., Muck R.E. y Weimer P.J. 2010. Optimizing on farms pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. BioResource Technology 101, 5305-5314
16. Dinneen B. y Vierhout R. 2007. Renewable Fuels Association. European Bioehanol fuel Association. Carta a la OCDE. Revisado on line(10/10/2012)
www.abengoabioenergy.com/export/sites/abg_bioenergy/resources/pdf/a_cerca_de/noticias/es/20070920_carta_OECD.pdf
17. Dongowski G., Sembries S., Bauckhage K., Will F. y Dietrich H. 2002. Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. Nahrung/Food. 46(2): 105-111.
18. Doran P.J., Cook D.M. y Brandon S.K. 2008. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. Plant Journal 54(4), 582-592. DOI: 10.1111/j. 1365-313X.2008.03480.x
19. Eggeman T. y Elander R.T. 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. Bioresource Technology. Vol 96(18): 2019-2025.
20. Erdei B., Barta Z., Sipos B., Réczey K., Galbe M., y Zacchi G. 2010. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. Biotechnology for Biofuels 3.16 DOI: 10.1186/1754-6834-3-16

21. Financiera rural. 2008. Monografía de la Cebada y Trigo. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y análisis sectorial. Reporte Técnico. Pag 1-8
22. García Guerrero M. y Losada M. 1983. Conversión biológica de la energía solar. Mundo Científico 26: 616-630.
23. Gomes M.S.C., Montenegro S.T.L., Cardoso A. S. A., Leite S.E., De-Araújo J.M. 2010. Production of ethanol from mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) pods mash by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 DOI: 10.2225/vol13
24. Gómez T.F. 2008. Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. San Luis Potosí.
25. González A.S., A. Bragues. A.R. 2010. Producción de biocombustibles con Maíz: un análisis de bienestar en México. Ra Ximhai 6(1): 73-85.
26. Gray K.A., Zhao L. y Emptage M. 2006. Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol*. 10(2):141-146.
27. Gujjari P., Suh S.O., Houseknecht J., Beck B., McKee M. y Zhou J. 2009. Engineering of Yeast Strains for Broad Substrates Utilization in Alcohol Production. Part I: Identification of Founder Strains and Gene Candidates. 31st Symposium on Biotechnology of Fuels and Fine Chemicals, San Francisco, May 2009.

28. Hart H., Craine L. y Hart. D. 1997. Química Orgánica. McGraw Hill. Novena edición. España..
29. Karimi, K., Emtiazi G. y Taherzadeh M.J. 2006. Production of ethanol and mycelia biomass from rice Straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. Process Biochemistry. 41(3): 653-658. ISSN 1359-5113, 10.1016/j.procbio.2005.08.014.
30. Keshwani D.R. y Cheng J.J. 2009. Switchgrass for Bioethanol and Other Value-Added Applications: A Review. Biological System Engineering: Papers and Publications. Revisado (11/08/2012) <http://digitalcommons.unl.edu/biosysengfacpub/77>
31. Kim S. y Dale B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass Bioenergy, 26, 361-375
32. Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M. y Stroeve P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for eficiente hydrolysis and biofuel production. Ind. Eng. Chem. Res. 48(8) 3713–3729 DOI: 10.1021/ie801542g
33. Kumar, R., Singh, S. y Singh, O.V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35(5), 377 -391 DOI: 10.1007/s10295-008-0327-8
34. Lee D., Owens V.N., Boe A. y Jeranyama P. 2007. Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks. Plant Science Department

35. Lee J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56(1): 1-24. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00073-4
36. Legge, T. (2008). The Potential Contribution of Biofuels to Sustainable Development and a Low-carbon Future. Chatham House.
37. Lesly P.T., Candelaria T., Villabona Á., Alvear M.R., Castillo C.R., Henao D.L., Marimón W., Madariaga N., y Tarón A. 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*. N°. 10. pp 120-125. ISSN 1900 -8260.
38. Leveau J.Y., y Bouix M. 2000. *Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés industrial*. Ed. Acribia. España. ISBN 978842000209
39. Li L., Li X.Z., Tang W.Z., Zhao J. y Qu Y.B. 2008. Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(5):415-420.
40. Malagon Mica. ML. 2008. Hidrolisis enzimática de la celulosa de residuos vegetales, por modo de celulasas para producir bioetanol. *Revista de Investigación – Universidad de América* 1, 25-29.
41. Marquina D.D. 1991. Producción de biomasa de hongos celulósicos para la degradación de residuos celulósicos. Universidad Complutense de Madrid. Tesis de grado. Madrid 1991. pp. 42-58

42. McMurry, J. 2001. Química Orgánica. Quinta edición, Thomson editores, México.
43. Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 1959, 31 (3), pp 426–428
DOI: 10.1021/ac60147a030
44. Montiel M. J. 2010. Potencial y riesgo ambiental de los bioenergéticos en México. Ra Ximhai 6(001).
45. Oliva D.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. Departamento de Microbiología III. Madrid, España. ISBN: 84-669-1709-8.
46. Openshaw K. 2010. Can Biomass Power Development?. Gatekeeper. 144: 1-19.
47. Ovando C.S.L. y Waliszewski K.N. 2005. Preparativos de Celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia. Trópico húmedo. 21 (42): 111-120.
48. Palmqvist E. y Hahn-Hägerdal B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology. Vol. 74(1): 25-33.
49. Perlack. 2007. The billion ton report, USDA, DOE, 2005. EEA, Technical Report. 2007. G. Fischer et al, Assessment of biomass potentials for

- biofuel feedstock production in Europe: Methodology and results, IIASA, parte del proyecto REFUEL, patrocinado por la UE.
50. Peters, D. 2007. Raw materials. Advances in biochemistry engineering and biotechnology. 105: 1-30
51. Prinsen P. 2010. Composición de diversas materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Trabajo de fin de Master. Universidad de Sevilla.
52. Quaak, P., Knoef H., Stassen H. 1999. Energy from biomass. A review of combustion and gasification technologies. World Bank Technical Paper No. 42. Energy series. ISBN 0-8213-4335-1
53. Quiroz C.R.E., Balcázar L.E., Dantán G. E., Martinez A., Folch M.J.L. y Martínez A.C. 2009. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. DOI.10.2225/vol12
54. Rojas B.R., Cabanillas A.J. 2008. Producción de alcohol de residuos lignocelulósicos – cáscaras de arroz (*Oriza sativa*). Revista Virtual de REDESMA. 13.
55. Ryu, D.D. y Mandels, M. 1980. Cellulases: Biosynthesis and Applications. Enzyme Microbiology and Technology. 2: 92-102.
56. Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., y Wu V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biotechnology 40, 3693-3700.

57. Saha, B.C. 2003. Hemicellulos bioconversion. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology* 30 (5):279-291. DOI:10.1007/s10295-033-0049-x
58. Sánchez R.A. M., Gutiérrez M.A.I., Muñoz H.J.A. y Rivera B.C.A. 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Ciencias- Químicas. Revista Tumbaga*. 5, 61-91
59. Satyanagalakshmi K., Sindhu R., Binod P., Usha K., Sukumaran R.K., Pandey A. 2011. Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 70, pp 156-161.
60. Scheller H.V. y Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61, 263-289.
61. Silva, C.G., Stamford T.L., de Andrade S.A., de Souza E. y de Araújo, J. 2010. Production of ethanol from mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) pods mash by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.13 No.5. <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-21> South Dakota State University
62. Sun Y. y Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1–11.
63. Taherzadeh M.J., Karimi K. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* 2(3), 472-499. ISSN: 1930-2126

64. Tejeda L., Quintana J., Pérez J., Harold Y.H. 2011. Etanol a partir de residuos de poda, mediante hidólisis ácida e hidrólisis enzimática. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 14 (1): 111-116
65. Tomas P.E, Oliva J.M. y Ballesteros M. 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose. A review. Journal of Scientific & Industrial Research. 67, 874-884
66. Walter A., Dolzan P., y Piacente E. 2008. Biomass Energy and Bio-energy Trade: Historic Developments in Brazil and Current Opportunities. Sustainable Bio-energy Trade; securing Supply and Demand.
67. Wang Z., Keshwani D.R., Redding A.P. y Cheng J.J. 2010. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. Biological Systems Engineering: Papers and Publications. Paper 143. <http://digitalcommons.unl.edu/biosysengfacpub/143>
68. Yoosin S, Sorapipatana C. 2007. A Study of ethanol production cost for gasoline substitution in Thailand and its competitiveness. Thammasat Int. J. Sc. Tech., Vol . 12, No. 1.
69. Zaldivar J., Nielsen J. y Olson L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Mini-review. Applied Microbiol Biotechnol 56:17-34 DOI 10.1007/s002530100624
70. Zaldivar J., Roca C., Foll C., Hahn-Hagerdal B. y Olsson L. 2005. Ethanol fermentation of acid pre-treated starch industry effluents by

recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. Bioresources technology. 96: 1670-1676

71. Zhang X., Xu C. y Wang H. 2007. Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. J. Biosci. Bioeng. 104: 149-51.

72. Zhao X., Cheng K. y Liu D. 2009. Organosolvent pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 815–827.