

**UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
CAMILO CIENFUEGOS**

**MONOGRAFIA**

**“ RESIDUOS DE CITRICO UN  
SUSTRATO PROMISORIO PARA  
SU BIOCONVERSION EN  
ETANOL”.**

**AUTORES:**

**MSc. ARIEL GARCIA CRUZ  
Dr. CARLOS O. MARTIN MEDINA**

**DPTO QUIMICA E INGENIERIA QUIMICA  
FACULTAD QUIMICA MECANICA.  
MATANZAS, NOVIEMBRE 2006.**

## **INDICE**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINAS</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>1.1 ¿Que se conoce como Biomasa?</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. Materiales lignocelulósicos.</b>	<b>5</b>
<b>1.2 El Bioetanol</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1. El etanol como combustible automotor.</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2. Ventajas Ecológicas del Bioetanol.</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3. Ventajas Económicas del uso del Bioetanol.</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Producción de Bioetanol.</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1. Materias Primas para la producción de etanol.</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Producción de Etanol a partir de Biomasa.</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1 Hidrólisis Acida</b>	<b>13</b>
<b>1.4.2 Hidrólisis Enzimática.</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Pretratamiento.</b>	<b>15</b>
<b>1.5.1. Formación de compuestos inhibidores de la fermentación.</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2. Pretratamiento por oxidación húmeda</b>	<b>16</b>
<b>1.6. Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos.</b>	<b>17</b>
<b>1.7. Estado actual de la producción de etanol de biomasa en el mundo.</b>	<b>19</b>
<b>1.8. Aplicación del concepto de mejoramiento a los residuales del procesamiento de alimentos. Ejemplo de los residuales citrícolas.</b>	<b>20</b>
<b>1.8.1 Generación y acumulación de residuales citrícolas</b>	<b>21</b>
<b>1.8.2 Los residuos sólidos cítricos como sustrato para producir etanol.</b>	<b>22</b>
<b>1.8.3. Otros usos de los residuos cítricos.</b>	<b>23</b>
<b>1.9. Conclusiones.</b>	<b>24</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>-</b>

## **INTRODUCCION**

La presente monografía está dirigida fundamentalmente al estado del arte de la producción etanol combustible a partir de biomasa. Se hizo especial énfasis en las características de los residuos de frutas cítricas, incluyendo la naranja y en su potencial de utilización como materia prima para la bioconversión a etanol. También se analizó la información existente sobre los distintos procesos de hidrólisis de la celulosa contenida en los recursos de biomasa, así como sobre los diferentes métodos de pretratamiento a que puede ser sometida la materia prima previamente a la hidrólisis enzimática. Se brinda información acerca de la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos por *Saccharomyces cerevisiae* y otros organismos y se resalta el problema de la inhibición de la fermentación por distintos compuestos formados durante el pretratamiento y la hidrólisis de la biomasa.

### **1.1 ¿Que se conoce como Biomasa?**

Mediante la fotosíntesis, las plantas pueden absorber y almacenar químicamente la energía solar. Para ello utilizan agua y dióxido de carbono. Las plantas superiores toman el agua del suelo a través de las raíces y el dióxido de carbono en estado gaseoso del aire a través de las hojas.

Cuando incide un rayo de sol sobre una hoja verde, las diferentes moléculas de dióxido de carbono y de agua se combinan con ayuda de la clorofila formando una pequeña cadena molecular de 6 átomos de carbono, donde se almacena la energía del rayo solar. El oxígeno producto de esa reacción pasa a la atmósfera circundante.

El compuesto que almacena la energía solar es la glucosa. En el metabolismo de las plantas, se forman a partir de la glucosa moléculas aún mayores y complejas con cadenas de carbono aún más larga.

A partir de la glucosa, las plantas producen infinidad de productos entre estos la celulosa y la lignina en la madera de tallos y árboles, así como en otros muchos productos (Cruz, 2000)

Se les llama biomasa a todos los productos vegetales o animales originados a partir de la energía solar y que consideremos "almacenes" de energía solar.

La oxidación de la biomasa es el proceso inverso a la fotosíntesis. Con independencia de que si los productos vegetales se pudren lentamente o son digeridos en el estómago de un animal o se queman por la acción del calor o de las llamas, al final del ciclo se libera aquello que se combinó en un origen: dióxido de carbono, agua y energía.

El oxígeno necesario para ese proceso es igual a la cantidad de oxígeno cedido al aire por la vía de la fotosíntesis durante el crecimiento de la biomasa. Al contrario la oxidación libera exactamente la cantidad de dióxido de carbono que las plantas utilizaron para construir la biomasa utilizada.

Existen portadores energéticos a partir de la biomasa, que se pueden aprovechar racionalmente y en muchas variantes y estados físicos, ya sean sólidos, líquidos y gaseosos. Entre esos portadores energéticos derivados de la biomasa se encuentran el biogás, el carbón vegetal y etanol (Domínguez, 1996).

Ha sido estimado que la producción anual de biomasa celulósica podría suministrar 10 veces los requerimientos globales de energía y 100 veces los alimenticios de la población mundial (Galbe, 1994).

El término biomasa celulósica es usualmente aplicado a tejidos leñosos y lignificados, los cuales son corrientemente subutilizados y subvalorados. No es duda que estos residuos leñosos y de cosecha representan granos de gran reservorio de biomasa lignocelulósica necesaria para suministrar grandes mercados de combustibles (Ashgari, 1996).

Son diversos los métodos que se han desarrollado en el mundo para degradar y transformar los materiales lignocelulósicos en productos que puedan servir como sustrato de fermentación y obtener proteínas de consumo humano o animal, etanol u otros productos como glucosa, xilosa, furfural, 5-hidroximetilfurfural, derivados de lignina, etc.

### **1.1.1. Materiales lignocelulósicos.**

Los materiales lignocelulósicos son la más abundante fuente renovable en la superficie de la tierra, lo cual lo hace una materia prima atractiva para la producción de etanol. Sin embargo, la lignocelulosa ofrece una gran resistencia al ataque biológico, debido precisamente a su composición química. (Schurz, 1997). Los materiales lignocelulósicos están formados por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina. Entre las principales materias primas lignocelulósicas se encuentran los cultivos energéticos, el papel reciclado, los residuos forestales y los desechos agrícolas y de la industria alimenticia, así como los residuos sólidos municipales (Martin, 2002)

Se ha considerado que la producción global de los procesos fotosintéticos es de unos  $10\text{-}50 \times 10^{12}$  toneladas de biomasa seca anualmente, lo que corresponde al 50% de toda la biomasa en el mundo (Claassen *et al.*, 1999) y como se mencionó anteriormente esta cantidad expresada en términos energéticos equivale a 10 veces el consumo global de energía (Galbe, 1994). Sin embargo, solamente entre el 3 y el 4 % de esos materiales son utilizados económicamente en el mundo occidental, fundamentalmente como alimentos, en la producción de pulpa y papel, y en la generación de energía (Galbe, 1994). Estas cifras ilustran la abundancia de los materiales lignocelulósicos y sus ilimitadas potencialidades con vistas a satisfacer las demandas de alcohol combustible sin afectar la alimentación humana.

### **1.2. El Bioetanol.**

La conversión de biomasa a combustible líquido, tal como etanol ha sido el foco de mucho interés a finales del siglo XX.

El bioetanol fue producido a gran escala durante las dos guerras mundiales, usando hidrólisis ácida, pero después de los años 1940 fue desestimado (de

Armas, 2000). Solamente en la Unión Soviética la producción de etanol basada en la hidrólisis ácida de la madera continuó ininterrumpidamente (Khol'kin *et al.*, 1999). Sin embargo, debido a los bajos rendimientos en los pasos de la hidrólisis y a problemas de corrosión causada por el ácido usado, los procesos no fueron competitivos con los derivados del petróleo (Chang, *et al.* 1981).

A partir de 1973, cuando los precios del crudo se cuadruplicaron debido a la reducción de la extracción por parte de los países miembros de la OPEP, la autosuficiencia energética pasó a ser un objetivo estratégico de muchos países y los combustibles alternativos volvieron a jugar un papel importante y creció el interés por el etanol carburante (revisado por Martín, 2002). Sin embargo, a partir de 1982 ocurrió una disminución de los precios del crudo, lo que provocó una disminución del interés por el etanol combustible (Galbe, 1994).

Las nuevas exigencias hacia la protección del medio ambiente emanadas de la Cumbre de la Tierra (1992) y la incertidumbre sobre un suministro estable de petróleo crudo condujeron a que en la década de los 1990 se incrementase el interés por el etanol combustible. La principal motivación por el etanol esta vez ha sido la preocupación por disminuir el impacto del efecto invernadero sobre el clima de la tierra. Lo atractivo del bioetanol como sustrato potencial para reemplazar los combustibles fósiles estriba en la menor cantidad de dióxido de carbono liberada durante la combustión (Costales, 2000). El CO<sub>2</sub> generado por la combustión del etanol es utilizado en el proceso de fotosíntesis de las plantas de las cuales es obtenido, por lo que se produce un ciclo cerrado (Lynd, 1990)

### **1.2.1. El etanol como combustible automotor**

El uso del etanol como combustible automotor tiene una historia tan larga como la historia del propio automóvil (revisado por Martín, 2002). El motor de combustión interna inventado por Nikolaus Otto en 1887 fue diseñado originalmente para ser propulsado con etanol (Tengborg, 2000). Henry Ford fue un entusiasta del uso del etanol como carburante y su modelo Ford T, de 1908, podía ser propulsado tanto por gasolina como por etanol puro (Di Pardo, 2000). Sin embargo, durante la

mayor parte del siglo XX el etanol combustible solamente resultó atractivo en tiempos de guerra.

Hoy todos los carros pueden trabajar con mezclas de 3-22% de etanol con gasolina sin necesidad de hacer modificaciones en el motor (Berg, 1998). También existen motores que pueden utilizar etanol puro, así como los vehículos flexibles que pueden usar mezclas de 0-100% de etanol en gasolina (Bailey, 1996).

Existen dos alternativas en la forma de empleo del alcohol carburante, la más utilizada es la utilización de mezclas de alcohol (10-20 %) con gasolina, para lo que no se requiere cambios en los motores de explosión de chispas convencionales, la segunda opción, más radical, consiste en el uso de los motores específicamente diseñados para operar con 100 % de alcohol.

Una mezcla de etanol anhidro (10%) y gasolina (90%), puede ser usado para vehículos petroleros sin modificaciones mecánicas significativas.

Para mezclas de 10% de etanol y 90% de gasolina se ha reportado que el efecto de sustitución de 1 L de alcohol es de 0,8 L de gasolina, que resultan de 0,67 L por la relación de los calores de combustión y de 0,13 L ahorrados, por los efectos de empobrecimiento y aumento del octanaje (Martín, 2002). Además, la combustión de las mezclas etanol-gasolina es más limpia y a más baja temperatura que la de gasolina pura. El poder calorífico del etanol equivale al 67 % del de la gasolina y su calor de vaporización es mayor, factores estos muy importantes (Wyman, 1995).

Las alternativas de mezcla que han sido empleados con diversos nombres como Mafuco, (Cuba), Alcoholina (Brasil), Gasohol (USA) requieren de la utilización de alcohol deshidratado (99,2 %), ya que una mezcla que contenga más de 0,3 % de agua se puede separar en dos fases y causar serias fallas en el motor (ICIDCA, 1987).

### **1.2.2. Ventajas ecológicas del bioetanol.**

El principal impacto social del uso del bioetanol está relacionado con la protección del medio ambiente. El empleo de bioetanol como combustible automotor contribuirá notablemente a la disminución de la contaminación ambiental, ya que

este es un combustible biológico, por lo que, como se explicó anteriormente, no aporta dióxido de carbono al efecto invernadero. Ejemplo de esto tenemos que el uso masivo del etanol combustible en Brasil provocó una reducción de la emisión de 46.7 millones t CO<sub>2</sub>/año entre 1985 y 1995 (Macedo, 1998).

Pero la disminución de la acumulación de CO<sub>2</sub> no es la única ventaja del etanol combustible para el medio ambiente. A continuación se destacan otros aspectos que ilustran la conveniencia del uso de este biocombustible. Debido al alto contenido de oxígeno en el etanol, su combustión es más completa que la de la gasolina, por lo que sus emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos son mucho menores. (Cordovés, 2001). Además, como el etanol tiene un alto índice de octano, se reduce la necesidad de utilizar aditivos antidetonantes, como el tetraetilo de plomo, el cual es un compuesto tóxico y persistente en el medio ambiente. Los compuestos de plomo emitidos en los escapes automotores, se distribuyen por el ambiente en forma gaseosa o de pequeñas partículas sólidas que tienden a asentarse en las plantas y en el suelo o que pueden ser inhaladas por las personas. Una parte del plomo aspirado por las personas se acumula en el cuerpo hasta llegar a niveles peligrosos, dañando el cerebro de los niños y provocándoles una disminución del coeficiente intelectual, así como otros trastornos funcionales (GEPLACEA, 1991).

Por otro lado, las emisiones producidas durante la combustión de la gasolina y del combustible diesel contienen compuestos aromáticos, muchos de los cuales son cancerígenos, así como otras impurezas, tales como azufre, cloro, compuestos aromáticos y organometálicos, hidrocarburos sin combustionar, óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles (Bailey, 1996). El uso del etanol carburante permite reducir las emisiones de todas esas sustancias dañinas (revisado por Galbe, 1994). Otra de las ventajas es la reducción de la presión de vapor de la gasolina, lo que permite reducir la evaporación de los compuestos formadores de smog. (Blanco, *et al.* 2001).

En caso de que el etanol sea producido a partir de materiales lignocelulósicos, tales como desechos agrícolas y forestales, residuos de la industria de procesamiento de alimentos o residuos sólidos municipales se producirá la

disminución del vertimiento y la acumulación de muchos residuales potencialmente tóxicos y contaminantes del entorno. En opinión del autor, esto representará un beneficio medioambiental adicional del uso del etanol combustible.

### **1.2.3. Ventajas económicas del uso del bioetanol.**

La sustitución de la gasolina por el etanol permitiría reducir los volúmenes de petróleo que actualmente son importados por los países dependientes del mercado mundial de hidrocarburos, lo que conduciría a una mejora de la balanza comercial de esos países (Glasser, 1998).

Para valorar la magnitud del efecto económico del uso del etanol combustible es bueno tener en cuenta que en la sociedad moderna la transportación representa una proporción importante del gasto total de energía. Por ejemplo, en Alemania esa proporción representa el 33% (Basso y Amorim, 2001).

En Cuba, se debe tener en cuenta que la proporción del sector del transporte en el consumo energético nacional se hace cada vez más significativa. Debido a que desde la primavera del año en curso prácticamente la totalidad de la generación eléctrica se realiza a partir de petróleo crudo y gas acompañante de origen nacional y a que el número de vehículos ha aumentado considerablemente a partir del inicio de la reanimación de la economía cubana, el peso del sector automotor en el consumo de combustible se ha elevado y continuará elevándose en un futuro inmediato. El uso del etanol carburante, producido a partir de recursos renovables de origen nacional, permitiría al país disminuir la importación de petróleo, lo que significaría un ahorro en divisas, algo muy importante para la oxigenación de nuestra economía (Martín, 2002).

Por otro lado, teniendo en cuenta la gran disponibilidad de materias primas para su producción, el bioetanol es un combustible renovable que Cuba puede producir en grandes cantidades, lo que, en opinión del autor, permitirá que el beneficio económico sea continuado y no quede remitido a un lapso de tiempo breve. Un ejemplo de las ventajas económicas del etanol combustible se puede apreciar en Brasil, donde desde que se generalizó el uso del etanol en transportación, se han

ahorrado 100 mil millones de dólares por concepto de petróleo que se ha dejado de importar (Basso y Amorim, 2001).

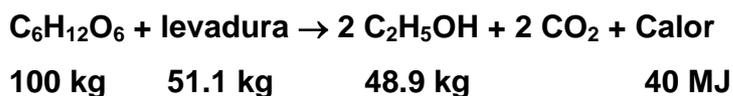
### 1.3. Producción de etanol

El etanol puede ser producido por dos vías, química y bioquímica. La vía química consiste en la hidratación del etileno en presencia de un catalizador. La vía bioquímica se basa en la fermentación de materiales ricos en glúcidos por la acción de microorganismos. Aproximadamente el 91% del etanol producido en el mundo es obtenido por fermentación, mientras que sólo el 9% es producido sintéticamente (Wheeler *et al.*, 1991).

Los organismos más usados en la obtención de etanol por fermentación son las levaduras del género *Saccharomyces* (Hernández *et al.*, 1986 y Ingledew, 1995).

En la producción de etanol por fermentación se emplean materias primas azucaradas, amiláceas y lignocelulósicas. Las materias primas azucaradas tienen la ventaja de que sus carbohidratos componentes están en forma de monosacáridos y oligosacáridos, por lo que el sustrato puede ser fermentado directamente por los microorganismos productores.

El proceso para hacer etanol a partir de la celulosa, en principio es muy simple, una hidrólisis de la celulosa a glucosa, seguida de fermentación, con la consiguiente destilación para refinarlo hasta un 95 wt% y deshidratación para obtener alcohol puro (100%) por destilación azeotrópica. Llevando a cabo una tecnología factible económicamente se podría reducir la dependencia del petróleo crudo (Brizuela, 2000). Durante la fermentación alcohólica ocurren transformaciones enzimáticas que conducen a la liberación de energía. La ecuación general de la fermentación alcohólica se puede escribir de la siguiente manera (Ingledew, 1995; Kelsall, 1995).



Intervienen diferentes levaduras entre las que encontramos la enzima carboxilasa, la cual cataliza la descarboxilación del ácido pirúvico para formar acetaldehído y dióxido de carbono y la alcohol-deshidrogenasa, la cual cataliza la reducción del acetaldehído a etanol (Brizuela, 2000).

Los productos principales de la fermentación alcohólica son el etanol y el dióxido de carbono, así como varios productos colaterales como glicerol, acetaldehído, alcoholes superiores, ésteres, éteres, ácidos, cetonas y otros compuestos. También ocurre la formación de biomasa celular (Ingledew, 1995; Kelsall, 1995).

El etanol producido mediante vía fermentativa puede ser utilizado en diferentes industrias, especialmente en la química, farmacéutica, alimentaria. De sus usos se destacan fabricación de perfumen, solvente, combustible, algunos productos farmacéuticos, bebidas y licores.

### **1.3.1. Materias primas para la producción de etanol.**

La materia prima esencial en la producción de etanol está constituida por la fuente de carbono, la que proporciona la energía requerida para la formación del mismo.

En la producción de etanol por fermentación se pueden emplear materias primas azucaradas, amiláceas y lignocelulósicas. Las materias primas azucaradas tienen la ventaja de que sus carbohidratos componentes están en forma de monosacáridos y oligosacáridos, por lo que el sustrato puede ser fermentado directamente por los microorganismos productores. Las melazas de caña y remolacha, los jugos de caña y los jugos de frutas son materiales que pertenecen a este grupo. En Cuba, al igual que en la mayoría de los países tropicales, las melazas de caña son la materia prima más utilizada en la producción de etanol (Martín, 2002).

Las materias amiláceas contienen almidón, el cual no es fermentable directamente, por lo que requiere ser hidrolizado previamente por vía química o enzimática con el fin de obtener azúcares que puedan ser fermentados por las levaduras. Entre estas materias primas se encuentran cereales, tubérculos y raíces. En los países de clima templado las materias primas amiláceas son las preferidas para la producción de etanol (Ingledew, 1995).

Los carbohidratos contenidos en las materias lignocelulósicas son la celulosa y las hemicelulosas, polisacáridos que pueden ser hidrolizados a azúcares simples, muchos de los cuales a su vez pueden ser fermentados a etanol por las levaduras. El proceso para producir etanol a partir de celulosa, en principio es muy simple: una hidrólisis de la celulosa a glucosa, seguida de fermentación, con la consiguiente destilación para concentrarlo hasta un 95 % y deshidratación para obtener alcohol puro (100%) por destilación azeotrópica. Sin embargo, producir azúcares con altos rendimientos y bajo costo a partir de lignocelulosa es más difícil que producir azúcares a partir de materiales azucarados o amiláceos, lo que encarece significativamente esa alternativa. Las materias primas azucaradas y amiláceas son relativamente más caras, pero más fáciles de convertir en etanol. Por eso, a pesar de que el costo de la biomasa lignocelulósica es mucho más bajo que el costo de otras materias primas, el costo de obtener azúcares a partir de lignocelulosa ha sido históricamente demasiado alto como para atraer el interés para su uso industrial (Tengborg, 2000).

Según Gálvez (2000), los productos vegetales dignos de considerar para la producción de etanol combustible son: yuca y caña de azúcar en zonas tropicales, remolacha forrajera en áreas templadas y sorgo azucarado y diversos granos en regiones secas. Sin embargo, otros autores afirman que la producción industrial de etanol combustible a bajo costo sólo será posible si se utilizan materias primas lignocelulósicas (Galbe, 1994; Wheals et al., 1999). En opinión del autor, el desarrollo de tecnologías eficientes para la hidrólisis de la celulosa será un factor clave para lograr que los materiales lignocelulósicos puedan ser usados industrialmente para la producción de etanol.

#### **1.4. Producción de etanol a partir de biomasa**

Existen tres técnicas principales aplicables a la conversión de los azúcares en etanol, ellas son hidrólisis ácida diluida, hidrólisis ácida fuerte, hidrólisis enzimática (Szengyel, 2000).

### **1.4.1. Hidrólisis ácida.**

La hidrólisis ácida, como su nombre lo indica es el uso de ácidos concentrados y diluidos para destruir la coraza de lignina y hemicelulosa, encontradas en la pared celular.

Muchos polisacáridos en paredes celulares de plantas ricas en pectina son susceptible a la hidrólisis catalizada por ácidos. Los tratamientos con ácidos calientes también rompen los enlaces de estos polisacáridos y depolimerizan y solubilizan la hemicelulosa dando xilosa, manosa, arabinosa, galactosa y glucosa. Solamente las fibras celulósicas son bastante resistentes a la acción de ácidos minerales diluidos. El tratamiento con ácido sulfúrico diluido ha sido usado para la solubilización parcial de cáscara de naranjas en aplicaciones donde los carbohidratos solubilizados han sido usados para la producción de proteína celular simple o en pretratamientos para mejorar la sacarificación de carbohidratos (Grohmann, 1995).

En la hidrólisis se pueden usar ácidos fuertes como son el clorhídrico, sulfúrico, fluorhídrico a bajas temperaturas, el principal inconveniente de este tratamiento es que requiere equipamiento de acero inoxidable, lo cual incrementa considerablemente el costo (Wyman, 1999). Otro inconveniente es que la fracción hemicelulósica es fermentada mas rápidamente que la fracción celulósica por lo que los monosacáridos liberados de la hemicelulosa se mantienen mas tiempo bajo condiciones no adecuadas, lo cual provoca la formación de productos de degradación varios azúcares y pérdidas de material.

Cuando se usa ácido diluido, se aplica altas temperaturas (alrededor de 200<sup>0</sup>C) y considerable cantidad de productos de degradación de azúcar y lignina son formados (Bashir y Lee, 1994), lo que, por supuesto, es un factor negativo.

Ejemplo de hidrólisis ácida son los siguientes: hidrólisis con ácido diluido (4%) a 100 <sup>0</sup>C durante 60 min y una hidrólisis con ácido concentrado (85%) a 100 <sup>0</sup>C durante 10 min (Szengyel, 2000).



Las principales limitaciones de la hidrólisis enzimática son el alto costo de las enzimas (Saddler, 1993) y el requerimiento de grandes reactores debido a la lentitud de la reacción (Olsson, 1994). Además, la celulosa en las fibras vegetales está protegida por las hemicelulosas y la lignina, por lo que se dificulta el acceso de las enzimas. Por eso se requiere que el material lignocelulósico sea pretratado antes de la hidrólisis enzimática para que la celulosa resulte accesible por las enzimas (Galbe, 1994; Tengborg, 2000).

### **1.5. Pretratamiento**

La celulosa en la pared celular se encuentra rodeada por capas de hemicelulosa y lignina, por lo que para favorecer la hidrólisis enzimática es necesario realizar un pretratamiento, el cual hidroliza las hemicelulosas, rompe la asociación de la lignina con la celulosa y disminuye la cristalinidad de la celulosa. Como resultado del pretratamiento, se incrementa la susceptibilidad de la celulosa a ser hidrolizada por las enzimas celulolíticas (Torget, 1990).

Existen diferentes tipos de pretratamientos, los cuales pueden agruparse dentro de cuatro categorías: físicos, químicos, biológicos y combinados. Los pretratamientos físicos (vapor, radiación, vibración) no incluyen la aplicación de sustancias químicas (Azuma, 1985., Beardmore, 1980., Schell, 1994). En los pretratamientos químicos participan sustancias químicas, tales como dióxido de azufre, ácido acético, solventes (Varshney, 1988), amoníaco (Holtzaple, 1992) y álcalis (Playne, 1984). Los pretratamientos biológicos, en los cuales participan microorganismos degradadores de lignina, tienen el inconveniente de ser muy lentos. Entre los combinados tenemos la explosión por vapor, en la cual se pueden combinar  $\text{SO}_2$  y vapor. Este pretratamiento es eficiente, pero tiene el inconveniente de que debido a las altas temperaturas aplicadas a los materiales lignocelulósicos, los azúcares liberados de las hemicelulosas son sujetas a degradación térmica, además que bajo esas condiciones la lignina es parcialmente hidrolizada. Así la degradación de los mismos puede inhibir varios pasos de la hidrólisis, mayormente aquellos donde estén involucrados agentes biológicos, por

ejemplos producción de enzimas, hidrólisis enzimática de celulosa, y fermentación de etanol.

### **1.5.1. Formación de compuestos inhibidores de la fermentación.**

Como se mencionó anteriormente, durante el pretratamiento de la biomasa se pueden formar compuestos tóxicos que inhiben la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica. Los compuestos inhibidores, pueden dividirse dentro de tres grupos principales de acuerdo a su naturaleza química. El primer grupo consiste en derivados furánicos, ejemplos el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), los cuales se forman por la deshidratación de las pentosas y hexosas, respectivamente, por la acción de ácidos y temperaturas altas. El segundo grupo de compuestos inhibidores son ácidos alifáticos de cadenas cortas. Típicamente los hidrolizados lignocelulósicos contienen varias cantidades de ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico. El ácido acético se forma por la desacetilación de las hemicelulosas. El ácido fórmico y el levulínico son productos de degradación del HMF y el furfural. El tercer grupo de inhibidores comprende varios compuestos fenólicos liberados de la degradación parcial de la lignina.

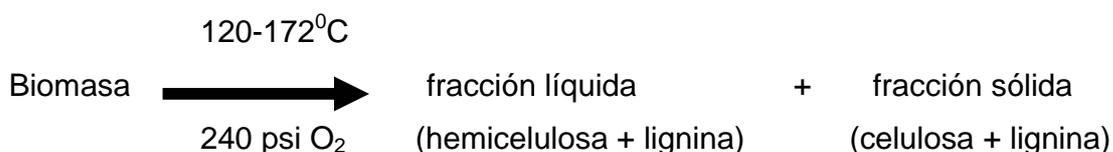
### **1.5.2. Pretratamiento por oxidación húmeda**

El pretratamiento utilizado en el presente trabajo para facilitar la hidrólisis enzimática fue la oxidación húmeda, el cual es un proceso, en el cual la biomasa es tratada con agua y aire u oxígeno a temperaturas por encima de 100°C.

El tratamiento de la biomasa con agua y vapor a temperaturas por encima de 185°C, causa la formación de ácidos orgánicos por la ruptura de los grupos ésteres lábiles presentes en las fracciones de hemicelulosa. Los ácidos orgánicos liberados, principalmente ácido acético, catalizan la hidrólisis de las hemicelulosas a polisacáridos solubles. La efectividad del método depende de muchos factores, entre los cuales tenemos: temperatura, tiempo, presión de oxígeno, tipo de biomasa y presencia de catalizador.

Estudios preliminares indican que altas presiones de oxígeno contribuyen al incremento de la relación de formación de ácidos y ruptura de la lignina, aspectos estos que son favorables para el método.

Durante la oxidación húmeda ocurren dos tipos de reacciones: reacciones hidrolíticas, las cuales ocurren a bajas temperaturas, y reacciones de oxidación, las cuales ocurren a altas temperaturas (McGinnis *et al.*, 1983a,b; Mishra *et al.*, 1995).



Este proceso ha sido comercialmente usado para la producción de vainilla a partir de lignina pulpeada. Estudios en diferentes laboratorios han mostrado que la oxidación húmeda puede ser usada para la conversión de biomasa tanto para producir etanol a partir de madera, como para la conversión de madera a ácidos carboxílicos. Se ha demostrado que la combinación de la oxidación húmeda con un pH alcalino permite disminuir la formación de compuestos inhibidores de la fermentación (Bjerre *et al.*, 1996<sup>a</sup>).

### **1.6. Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos.**

La etapa de fermentación en la producción de etanol a partir de biomasa presenta la particularidad de que el sustrato es generalmente un hidrolizado, en el cual se encuentran presentes varios azúcares incluyendo pentosas y hexosas. Como el costo de la materia prima representa aproximadamente el 30% del costo total de producción de etanol a partir de lignocelulosa se requiere convertir en etanol todos los azúcares contenidos en la materia prima para dar una utilización óptima a esta y de esa forma reducir el costo de producción del etanol. Además, el hecho de que durante la preparación de los hidrolizados ocurre la formación de sustancias tóxicas impone exigencias especiales para la selección del microorganismo a usar en la fermentación.

Un microorganismo ideal debe cumplir los siguientes requisitos para ser usado en fermentación de hidrolizados lignocelulósicos: (1) fermentar glucosa y xilosa simultáneamente y con alta productividad; (2) metabolizar la xilosa anaeróbicamente; (3) fermentar a un pH bajo y (4) ser tolerante a etanol y a los inhibidores. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene una serie de ventajas para la producción de etanol a partir de lignocelulosa: convierte eficientemente la glucosa en etanol, no requiere oxigenación, tiene un bajo pH óptimo y una alta tolerancia a etanol e inhibidores. Su único inconveniente es que no es capaz de utilizar la xilosa.

Existen levaduras, mohos y bacterias capaces de fermentar xilosa, la principal pentosa en los hidrolizados lignocelulósicos, a etanol. Los mayores rendimientos se han obtenido con levaduras como *P. stipitis*, *C. shehatae*, y *P. tannophilus*. Sin embargo, estos organismos tienen varios inconvenientes, como son formación de xilitol, baja tolerancia a inhibidores y necesidad de oxigenación, además de que no pueden fermentar simultáneamente pentosas y hexosas, por lo que no son apropiados para las fermentaciones industriales (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1993).

La Ingeniería Metabólica permite ampliar el rango de sustratos que un microorganismo puede utilizar. Una forma de hacerlo es transformando organismos fermentadores de xilosa con genes de un organismo etanológico. Otra forma es la introducción en un organismo fermentador de hexosas, de una ruta para el metabolismo de xilosa de un organismo utilizador de xilosa. De los organismos recombinantes creados hasta ahora el más eficiente es la bacteria *Escherichia coli* KO11, a la que se le ha introducido la ruta del etanol de *Z. mobilis* (Hahn-Hägerdal, 1993).

La levadura *S. cerevisiae* debido a que es capaz de fermentar xilulosa (un isómero de la xilosa) a etanol, puede ser transformada por Ingeniería Metabólica con la introducción de las enzimas xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH), lo que permitiría que la xilosa sea transformada a xilulosa, la que posteriormente sería metabolizada a etanol. Sin embargo, la expresión de los genes *XYL1* y *XYL2* que codifican las enzimas XR y XDH de *P. stipitis* en *S. cerevisiae* no ha resultado en altos rendimientos de etanol y la xilosa ha sido convertida fundamentalmente a

xilitol debido a imbalances de cofactores enzimáticos y a los bajos niveles de expresión del gen *XKS1*, el cual codifica la enzima xilulosa quinasa (XK) (Meinander, 1997; Anderlund, 1998). La sobre-expresión del gen *XKS1* mejora la producción de etanol a partir de xilosa (Eliasson, 2000) y xilulosa.

### **1.7. Estado actual de la producción de etanol de biomasa en el mundo.**

La producción mundial de etanol en el año 1998 se estimó en 33.3 millones m<sup>3</sup>. Brasil, produjo unos 14 millones m<sup>3</sup> en el año 2000 (Basso y Amorim, 2001), con lo que se mantiene como el líder de la producción mundial, seguido por los EE.UU. con una producción de 5.3 m<sup>3</sup> en 1998 (Wheals, *et al.*, 1999). En Brasil, la mayor parte del etanol es producido a partir de la caña de azúcar y en los EE.UU. a partir de maíz, pero en ambos países se hacen esfuerzos para producir etanol a partir de biomasa. Para los próximos años se espera que la Unión Europea aumente sustancialmente la producción de etanol, pues recientemente se ha legislado que para el año 2010 el 5.75% de los combustibles fósiles deben haber sido sustituidos por biocombustibles. Para satisfacer la inmensa demanda de biocombustibles, Europa ha apostado por el etanol y se espera que dentro de un período breve decenas de plantas estén produciendo etanol a partir de biomasa en el Viejo Continente.

Una nueva época se anuncia con la construcción de una planta demostrativa de producción de etanol a partir de bagazo y cáscaras de arroz en Louisiana, EE.UU. Esta será la primera planta comercial para producir etanol de lignocelulosa en Norteamérica. Utilizará la tecnología Katzen basada en la hidrólisis ácida. El microorganismo productor será la bacteria recombinante *E. coli* KO11. Otro de los proyectos en desarrollo en los EE.UU que encontramos son dos plantas en California que producirán etanol y energía eléctrica a partir de paja de arroz y residuos forestales, una planta para la producción de etanol a partir de desechos forestales en Alaska y otra en la Florida, cuya materia prima será papel reciclado (Bioenergy Update, 1999).

Otros países del continente americano donde se están dando pasos importantes son Canadá y Brasil. En Canadá se está concluyendo la primera planta comercial para producir etanol por hidrólisis enzimática de lignocelulosa. La planta producirá

1 millón de galones de etanol al año a partir de vainas de avena, paja de trigo, hierba y tucas de maíz (Bioenergy Update, 1999). En Brasil, se están construyendo dos plantas que producirán etanol a partir de bagazo, las cuales utilizarán el bagazo sobrante de plantas ya existentes como son una destilería autónoma y un central azucarero con una destilería anexa.

En España, la empresa Bioetanol Galicia está ejecutando un proyecto para la producción anual de 126 000 t de bioetanol y 120 000 t de proteína unicelular (para alimentación animal) a partir de paja de trigo. La planta incorpora una central de cogeneración que, además de suministrar toda la energía térmica necesaria para la producción de bioetanol, genera 200 millones de kWh anuales de energía eléctrica (Bioenergy Update, 2003).

En la India recientemente se aprobó el inicio de tres proyectos a nivel de planta piloto para producir etanol combustible a partir de materiales lignocelulósicos, principalmente bagazo, en Maharashtra, Uttar Pradesh y Tamil Nadu. En Hawaii y Filipinas se están ejecutando proyectos para producir etanol a partir de bagazo usando la tecnología de Arkenol, Inc. (Cuzens y Miller, 1997).

La mayoría de estos proyectos tendrán un efecto ambiental doblemente positivo. Producirán un combustible dirigido a reducir el efecto invernadero y eliminarán grandes cantidades de desechos agrícolas y forestales, así como otros residuales como papel usado.

### **1.8. Aplicación del concepto de mejoramiento a los residuales del procesamiento de alimentos. Ejemplo de los residuales citrícolas.**

La sociedad moderna, en la cual existe una gran exigencia por los estándares nutricionales apropiados, está caracterizada por (i) el aumento de los costos, (ii) la disminución de la disponibilidad de materias primas, y (iii) la preocupación creciente por la contaminación ambiental. Por eso, es muy importante hacer énfasis en la recuperación, reciclado y aprovechamiento de los residuos generados por la actividad del hombre. Esto es especialmente importante para la industria de procesamiento de alimentos, en la cual se generan gran cantidad de residuos, desechos, efluentes, residuales y subproductos, cuyo vertimiento

representa, además de problemas de contaminación, pérdidas de biomasa y nutrientes. Debido a la alta demanda de alimentos, la formación de estos residuales crece continuamente llegando a niveles alarmantes.

En el pasado, los residuales del procesamiento de alimentos han sido vertidos o usados sin tratamientos previos para alimento animal o fertilizantes. Un enfoque muy actual es la aplicación del concepto de mejoramiento (concepto de upgrading) a estos residuales, lo que consiste en la recuperación y aprovechamiento de los mismos para la obtención productos útiles y de alto valor agregado. El concepto de mejoramiento tiene como meta obtener productos con propiedades reproducibles y deseables, diseñados bajo condiciones económicas y ecológicas óptimas. El concepto de mejoramiento trata de adicionar valor a los subproductos y residuos, favoreciendo la fabricación en concordancia con el medio ambiente (Laufenberg *et al.*, 2003).

La estrategia del concepto de mejoramiento consta de diferentes etapas, entre los que encontramos: (i) caracterización de la sustancia, (ii) definición de objetivos, (iii) diseño de productos, y (iv) diseño de procesos. La primera etapa consiste en la caracterización de la sustancia basada en posibles áreas de aplicación y análisis químico y fisico-químico.

El trabajo experimental de la presente tesis se enmarca en la primera etapa del concepto de mejoramiento aplicado a los residuales generados por la industria procesadora de frutas cítricas.

### **1.8.1 Generación y acumulación de residuales cítricos**

Los frutos cítricos contienen entre 35-55% de jugos. Con la extracción de los jugos, los residuos del fruto que incluyen cáscaras, membranas, vesículas de jugo y semillas son descartadas como residuos (Grohmann *et al.* 1994). Los residuos son aproximadamente la mitad en peso del fruto y debido a su alto contenido de azúcar son fácilmente degradados. El procesamiento de naranjas para jugos genera anualmente millones de toneladas de residuos, los cuales son vendidos a bajos precios como alimento animal o son vertidos causando severas problemas de contaminación ambiental.

Las mayores cantidades de residuos cítricos se encuentran en países tales como Brasil (líder mundial), México, España, China, EE.UU. e Israel. Solamente en la Florida se generan anualmente 3 300 000 t de residuos de naranja (Laufenberg *et al.*, 2003)

En Cuba existen varios planes cítricos, como son los de Jagüey Grande, Ceballos e Isla de la Juventud, donde se generan cantidades importantes de residuales. Solamente en la Empresa de Cítricos Victoria de Girón de Jagüey Grande se generan anualmente unas 20 000 t de residuos sólidos, que por su composición constituyen un peligro para el ecosistema. De esa cantidad de residuos, solamente la mitad es usada, aunque la efectividad económica del uso no es óptima, pues esos residuos son comercializados a sólo 4 pesos/t con vistas al plan de ceba de ganado. La otra mitad de los residuales es vertida afectando de esta forma al medio circundante. Estos residuales por su elevada DQO, pH ácido y por el enorme caudal diario constituyen una carga altamente peligrosa para el medio ambiente.

### **1.8.2 Los residuos sólidos cítricos como sustrato para producir etanol.**

Una forma de aplicar el concepto de mejoramiento a los residuales cítricos es utilizarlos para producir etanol, un producto de gran importancia social y económica. Los residuos del procesamiento de naranjas contienen compuestos como azúcares fermentables solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y carbohidratos insolubles como son pectinas, celulosa y hemicelulosas, los cuales pueden ser hidrolizados a carbohidratos simples como ácido galacturónico, glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa (Grohmann, 1994).

Debe destacarse el alto contenido de pectinas en estos residuos. La celulosa es el segundo más abundante polímero en la pared celular de los tejidos de cítrico. La lignina aparece en estos tejidos en baja concentración (Grohmann, 1994).

La fructosa y glucosa están en cantidades casi iguales, ya que ellos se producen por la hidrólisis de la sacarosa transportada por la savia al fruto. No se ha detectado presencia de almidón en estos frutos. Otros componentes solubles en

estos tejidos son las proteínas, minerales y ácidos orgánicos, comúnmente llamado ácido cítrico.

La presencia de contenidos altos de carbohidratos y contenidos bajos de lignina hacen de los residuos de naranja un material apto para ser convertido en etanol.

En la Florida existen plantas donde los residuos de naranja son procesados para la producción de etanol, como es la Florida Distillers Company, donde se extraen, concentran y almacenan alrededor de 70 000 t/a de melazas de cítricos y caña, con vista a producir diferentes productos derivados del etanol (Grohmann, 1994).

### **1.8.3. Otros usos de los residuos cítricos.**

La aplicación del concepto de mejoramiento a los residuales citrícolas puede conducir a la producción de una gran variedad de derivados, pues se han demostrado múltiples aplicaciones. Un uso que se le puede dar a los residuos cítricos es como fuente de fotoquímicos a ser usados en la horticultura. Las cáscaras de mandarina son de interés debido a su actividad fungistática y pueden ser aplicadas como protección natural de vegetales y frutos del ataque de los hongos. Se ha demostrado que los compuestos limonoides en las cáscaras y semillas de frutas cítricas tienen importantes propiedades farmacológicas y en la protección de plantas. Son usados también como agentes floculantes en bebidas la pectina, como estabilizadores, espesantes y gelatizantes (Widmer y Montanari, 1995).

## 1.9. Conclusiones

- Los residuales generados por el procesamiento de cítricos constituyen un problema de afectación al medio ambiente.
- Los materiales lignocelulósicos son un sustrato con potencialidad para producir etanol en grandes cantidades a bajo costo.
- La hidrólisis enzimática combinada con pretratamiento por oxidación húmeda es un método promisorio para obtener azúcares fermentables a partir de la biomasa.
- Los residuos cítricos, debido a que poseen azúcares simples, carbohidratos insolubles en la pared celular y tienen bajo contenido de lignina, son un sustrato promisorio para las producciones de etanol combustible.
- La pectina constituye uno de los componentes principales en la pared celular de estos tejidos.
- El pretratamiento por oxidación húmeda, utilizando naranja como sustrato, no ha sido aún reportado en la literatura.

## BIBLIOGRAFIA

- Ashgari A, Bothast RJ, Doran JB, Ingram LO. (1996) Ethanol production from hemicellulosic hydrolysates of agricultura) residues using genetically engineered Escherichia coli strain K011. J. Ind. Microbio)., **16**, 42-47.
- Azuma, J-I., Asaj, T., Isaka, M. and Koshijima, T. (1985) Effects of microwave irradiation on enzymatic susceptibility of crystalline cellulose. J. ferment. Technol.**63**, 529-536.
- Bailey, B.K. (1996) Performance of ethanol as a transportation fuel. En Handbook on bioethanol: Production and utilization. Ed. Wyman, C.H., Taylor & Francis Inc, Bristol, PA pp 37-60.
- Bashir, S. and Lee, S. (1994) Fuel ethanol production from agricultura), lignocellulosic feedstocks. A review. Fuel Science Technol. Int"**1.12**,1427-.
- Basso, L.C., Amorim, H. (2001) Industrial ethanol in Brazil: technological advances. Memorias del III Taller Internacional de Producción de Alcohol. Varadero, Cuba. ISBN 959-160095X.
- Beardmore, D. H., Fan, L. T. and Lee, Y-H. (1980) Gamma-ray irradiation as a pretreatment for the enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Lett. **2**, 435-438.
- Berg, C. (1998) Towards a world ethanol market? F.O.Licht Commodity Analisis, Germany.
- Bjerre, A.B., Olesen, A.B., Fernqvist, T., Plöger, A., Schmidt, A.S. (1996a) Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. Biores. Technol., **49**, 568-577.
- Bioenergy Update. (1999). Vol. 1 No. 4. Bajado de Internet en Noviembre 2000. Disponible en:<http://www.bioenergyupdate.com/Newsletter/Security/NL1199/NL1199.html>
- Blanco, G., Herryman, M. (2001) El alcohol carburante: su uso en el mundo, actualidad y tendencias. Memorias del 111 Taller Internacional de Producción de Alcohol. Varadero, Cuba. ISBN 959-160095X.
- Brizuela, M.A., González, P., La Serna, G., Santiesteben, C. (2000) Enzima celulasa. En Manual de los derivados de la caña de azúcar (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba.
- Chang, M.M., Chou, T.Y.C. and Tsao, G.T. (1981) structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. Adv. Biochem.Eng. **14**, 15-43
- Claassen, P.A., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., Weusthuis, R.A. (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Appl. Microbiol. Biotechnol., **52**, 741-745.
- Cordovés, M. (2001) Consideraciones ambientales sobre el uso del etanol carburante. Memorias del 111 Taller Internacional de Producción de Alcohol. Varadero, Cuba. ISBN 959-160095X.
- Costales, R., Namer, I. (2000) Residuos de cosecha procesados. En Manual de los derivados de la caña de azúcar (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba.

- Cruz, R., Dopico, D., Villamil, G., Reyes, M. (2000) Pharmaceuticals from bagasse lignin. En Handbook of sugarcane derivatives (Ed. L.O. Gálvez). Third Edition. Havana, Cuba.
- Cuzens, J. C., Miller, J. R. (1996). Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. *Renewable Energy*, **10**, 285-290.
- de Armas, C. (2000) Energía en la producción de azúcar de caña, sus requerimientos y reservas. En Manual de los derivados de la caña de azúcar (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba.
- Di Pardo, J. (2000) Outlook for biomass ethanol production and demand. Disponible en: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>.
- Domínguez, J.M., Gong, C.S., Tsao, G.T. (1996) Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57/58**, 49-56.
- Gálvez L.O. (2000) La producción diversificada de la agroindustria de la caña de azúcar. En Manual de los derivados de la caña de azúcar (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba. pp. 3-17.
- GEPLACEA (1991) Boletín sobre derivados de la caña de azúcar. México.
- Glasser W. G., Wright, R. S. (1998) Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass and Bioenergy*, **14**, 219-235.
- Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S. (1995) Fermentation of sugars in Orange peel Hydrolysates to Ethanol by Recombinant *Escherichia coli* K011. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **51**. 423-435.
- Hahn-Hägerdal, B., Hallborn, J., Jeppsson, H., Olsson, L., Skoog, K., Walfridson, M. (1993) Pentose fermentation to alcohol. En: *Bioconversion of forest and agricultural residues*. (J. N. Saddler, ed.), CAB International, Wallingford, pp. 231-290.
- Hernández, M.T., Sais, T., Sánchez, O. (1986) *Microbiología de la Producción Azucarera. Producciones Microbianas Derivadas*. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Holtzapple, M. T. Lundeen, J., Sturgis, R., Lewis, J. E. and Dale, B. E. (1992) Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by the ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **34/35**, 5-21.
- ICIDCA. (1987) *La industria de los derivados de la caña de azúcar*. Editorial Científico-Técnica. La Habana
- Ingledew, W.M. (1995) The Biochemistry of alcohol production. En *The Alcohol Textbook* (Eds. Lyons, T., Kelsall, D., Murtagh, J.). Nottingham University Press, pp. 76-87.
- Kelsall, D.R. (1995) The management of fermentation in the production of alcohol. En *The Alcohol Textbook* (Eds. Lyons, T., Kelsall, D., Murtagh, J.). Nottingham University Press, pp. 89-101.

- Khol'kin, Y. I., Makarov, V.L., Vyglazov, V.V., Elkin, V.A., Mettee, H.D. (1999) Technological and ecological aspects of ethanol production from wood. Proc. Biomass Conf. Am., 4<sup>th</sup>. (Overend, R.P., Chornet, E., eds.) 1, 881-885.
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. Bioresource Technol., **87**, 167-198.
- Lynd, L.R. (1999) Large-scale fuel ethanol from [lignocellulosic. Appl. Biochem. Biotechnol. 24/25](#), 695-719.
- Macedo, I.D. (1998) Greenhouse gas emissions and energy balances in bio-ethanol production and utilization in Brazil. Biomass and Bioenergy, 14, 1, 77-81.
- Martín, C. (2002) Tesis Doctoral, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química Mecánica, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.
- Mc Ginnis, G.D., Wilson, W.W., Prince, S.E., Chen, Ch.Ch. (1983b). Conversion of biomass into chemicals by high-temperature wet oxidation. Ind Eng Chem Prod Res Dev. **22**, 633-636
- Mes-Hartree, M., Saddler, J. N. (1983) The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Lett. 5, 531-536.
- Olsson, L. (1994) Ethanol production from lignocellulosic materials: Fermentation and on-line analysis. PhD. Thesis. Department of Applied Microbiology, Lund University, Sweden.
- Playne, M. J. (1984) Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. Biotechnol. Bioeng. **26**, 426-433 104. Puls J. (1993) Substrate analysis of forest and agricultural wastes. In: Saddler JN, editor. Bioconversion of forest and agricultural residues. CAB International, Wallingford, p. 13-32.
- Saddler, J. N., Ramos, L.P. and Breuill, C. (1993) Steam pretreatment of lignocellulosic residues. En: Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Saddler, J. N. (ed.), CAB International, Wallingford, UK, Chapter 3, 73-92
- Schell, D. J. and Haewood, C. (1994) Milling of lignocellulosic biomass;
- Results of pilot-scale [testing. Appl. Biochem. Biotechnol. 45/46](#), 159-168.
- Schurz, J. (1997) How to make native lignocellulosic materials accessible to chemical and microbial attack. Proc. Bioconversion. Symp. IIT Delphi, 37-5
- Szengyel, Z. (2000) Ethanol from wood: cellulase enzyme production. PhD Thesis. Department of Chemical Engineering 1, Lund University, Sweden.
- Tengborg, C. (2000) Ethanol from biomass: optimisation of pretreatment and hydrolysis. PhD Thesis. Department of Chemical Engineering 1, Lund University, Sweden.

- Torget, R., Werdene, P., Himmel, M. and Grohmann, K. (1990) Dilute acidpretreatment of short rotation woody and herbaceous crops. Appl. Biochem.
- Varshney, A. K. and Patel, D. P. (1988) Biomass delignification -Organosolv approach. J. Sci. Ind. Research. 47, 315-319.
- Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M.G., Amorim, H.V. (1999) Fuel ethanol after 25 years. Trends Biotechnol., 17, 482-487.
- Wheeler, K., Janshekar, H., Sakuma (1991) Ethyl alcohol, en Chemical Economics Handbook. SRI International, USA..
- Widmer, W., Montanari, A.M., 1995. Citrus waste stream as source of phytochemicals. In: 107<sup>th</sup> Annual Meeting of the Florida State Horticultura; Society, Orlando/Florida, USA, 107. 284-288.
- Wyamn, C.E. (1999) Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. Bioresourse. Technol. 50 3-16.