

REVALORIZACIÓN DE DESCARTES AGROINDUSTRIALES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL

Nora Aimaretti - Carolina Ybalo - Mercedes Escorcía - Agustín Codevilla*

RESUMEN: En la provincia de Santa Fe (Argentina) se producen diariamente gran cantidad de descartes de masa panaria, afrecho de trigo, zanahoria y levadura de cerveza sin ningún valor agregado. Como solución sostenible e integradora se propuso su utilización como sustratos para la producción de etanol de segunda generación. Aplicando diferentes estrategias de hidrólisis enzimática y fermentación, se obtienen 56, 42 y 120 l de etanol por cada tonelada de masa panaria, zanahoria y salvado de trigo respectivamente.

Palabras claves: bioetanol - descartes agroindustriales – afrecho – zanahoria - masa panaria - hidrólisis enzimática

ABSTRACT: *New value of agro- industrial waste for bioethanol production*

In the province of Santa Fe, Argentina, a large amount of bread dough, wheat bran, carrot and brewer's yeast with no added value is thrown away. The use of these discarded materials as substrates for the production of second generation ethanol was suggested as an integrative and sustainable alternative. Different strategies of enzymatic hydrolysis and fermentation were applied to obtain 56, 42 and 120 l of ethanol per ton of bread dough, carrot and wheat bran respectively.

Key words: bioethanol - agro-industrial waste - bran - carrot - bread dough - enzymatic hydrolysis

Introducción

Debido a la disminución de reservas de combustibles fósiles, han sido revalorizadas las fuentes alternativas de energías renovables, sustituibles, eficientes, efectivas, convenientes y seguras (Chum y Overend, 2001). En este contexto es necesaria la incorporación de materias primas renovables en las cadenas productivas de los productos de elevada demanda, atendiendo a su mejor biodegradabilidad y menor toxicidad.

* *Nora Aimaretti* es Bioquímica, doctorada en Ciencias Químicas por UNED, magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, licenciada en Biotecnología y Bioquímica por UNL y profesora universitaria por UCEL. Es docente e investigadora en la Universidad Nacional del Litoral y en la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Su tarea de investigación se desarrolla en el área del diseño de alimentos innovares y en el área de los biocombustibles, en las cuales ha formado a numerosos estudiantes y graduados. Sus trabajos de investigación son publicados en revistas nacionales e internacionales, como así también en Congresos. Actualmente es Directora de los Proyectos ALI 120 y ALI 121 radicados en UCEL. email: naimaretti@ucel.edu.ar.

Carolina Ybalo es ingeniera en Tecnología de Alimentos por UCEL, es docente e investigadora en la UCEL e integra el grupo responsable del Proyecto ALI 121.

Mercedes Escorcía es alumna de 4° año de la carrera de Ingeniería en Tecnología de los Alimentos, se desempeña como pasante de investigación en el Proyecto ALI 121.

Agustín Codevilla es alumno de 4° año de la carrera Ingeniería en Tecnología de los Alimentos, se desempeña como pasante en docencia y como pasante en investigación en el Proyecto ALI 121.

Los autores agradecen los aportes de UCEL en el proyecto de investigación ALI 121: "Proceso continuo para la obtención de Bioetanol a partir de residuos agroindustriales", en cuyo marco se desarrolló esta investigación.

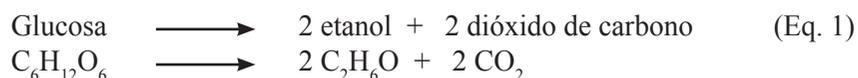
Las cantidades comercializadas de alcohol etílico son importantes debido a que éste tiene muchos y diferentes usos, tales como: combustible, anticongelante, agente de deshidratación, medio de reacción, antiséptico, agente de precipitación, curado de tabaco manufacturado, disolvente y materia prima en la industria química, entre otros (Demain y Davies, 1999). Además, por las legislaciones vigentes, se ha incrementado mundialmente su uso como oxigenante de la nafta, lo que permite una mayor combustión y en consecuencia una disminución de las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente, de CO y de compuestos aromáticos (Sánchez y Cardona, 2008).

Sin bien aún muchas de las vías de obtención de energía y productos químicos a partir de materiales renovables no son competitivas, en los últimos años se ha estado investigando la utilización de materiales de descarte o desecho para la producción de etanol, con el propósito de disminuir su costo, al tiempo que se pretende colaborar con el depósito responsable y tratamiento de algunos residuos (Sulaeman *et al.*, 2001; Acaroglu y Aydogan, 2012). Este proceso de biotransformación se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo en contraposición con los combustibles fósiles. Además, en la medida que se incremente el precio del petróleo y avance la biotecnología, las biotransformaciones de materias primas renovables se tornarán más atractivas (Cardoso *et al.*, 2012).

En síntesis, la fermentación alcohólica puede ser una alternativa viable de ser aplicada al tratamiento y revalorización de los desechos orgánicos de las agroindustrias, dado que se estima que estos comprenden aproximadamente el 50 % de la biomasa en todo el mundo (FAO, 2008).

Fermentación alcohólica

La fermentación puede definirse como un proceso de biotransformación en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos conocidos como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores, en este caso, capaces de convertir las hexosas del mosto en etanol cuando las condiciones son anaeróbicas, tal como Colin y Bjorn (2002) lo indican en la siguiente reacción:



Concretamente en la fabricación de alcohol por fermentación se comprenden tres pasos básicos:

1.- Preparación del mosto

Particularmente el alcohol etílico puede ser producido a partir de cualquier tipo de azúcar fermentable que sea sometido a un proceso de fermentación alcohólica. En consecuencia esta etapa incluye todo el tratamiento que se requiere para extraer de la materia prima los azúcares fermentables a los fines de lograr una fermentación sustentable. Puesto que el almidón y otros hidratos de carbono pueden ser hidrolizados a azúcares fermentables, por

medios biológicos o por medios químicos, se puede disponer de muchas fuentes de azúcar que se clasifican según su composición del siguiente modo:

- **Materias primas sacaroideas:** incluyen azúcar de caña, remolacha, melaza, jugos de fruta, etc. La preparación del mosto es muy parecida para todas ellas, ya que por su alto contenido de azúcares simples requieren poco o ningún tratamiento preliminar, sólo un método eficiente de extracción, una dilución en algunos casos y la inversión de la sacarosa cuando el biocatalizador así lo requiera.
- **Materias primas amiláceas** como los cereales: maíz, trigo, sorgo y cebada y también los tubérculos: yuca, papa, etc. Se diferencian de las anteriores en que la preparación del mosto incluye una etapa previa de hidrólisis del almidón que permita dejar la glucosa disponible para el biocatalizador.
- **Materias celulósicas** como madera, residuos de la fabricación de papel, vegetales, residuos ricos en celulosa, lignina, y quitosanos, etc. Por la estructura química de los polisacáridos, éstas también requieren de una hidrólisis previa a la fermentación. Cuentan con la ventaja de que son las materias primas más abundantes y más baratas procedente de la biomasa, pero en contraposición poseen la desventaja de que como producto de la hidrólisis se obtienen azúcares no fermentables, que dificultan el proceso (Sánchez y Cardona, 2008).

Durante la extracción de azúcares los compuestos minerales y orgánicos pasan parcialmente al mosto, junto con los azúcares constituyen un excelente sustrato para el desarrollo del biocatalizador. Los más importantes son los fosfatos, las sales de magnesio y de amonio y los aminoácidos: asparagina, glutamina y leucina, que actúan como factores de crecimiento (Crueger y Crueger, 1993). La importancia de los iones magnesio se debe a su función como cofactores de muchas de las enzimas que intervienen en la reacción de fermentación y como restauradores de la estabilidad de la membrana externa de la célula dañada por la presencia del etanol. Todas estas funciones aumentan su importancia cuando se incrementa la concentración de etanol en el medio (Stanbury y Whitaker, 2003). Por estos motivos, a la hora de seleccionar las materias primas para la preparación del mosto, se deben tener en cuenta que éstas deben ser:

- fermentables
- almacenables durante el período requerido
- esterilizables sin ningún inconveniente
- de composición poco variable
- carentes de residuos que no puedan ser tratados o eliminados
- de energía potencial elevada
- abundantes y de bajo costo (Gaden, 2000).

Como ya se ha mencionado cualquier producto que contenga azúcares o hidratos de carbono fácilmente transformables en azúcar fermentable, puede servir de material de partida para la fermentación desde un punto de vista estrictamente teórico. Para que en la práctica éstos puedan utilizarse, es imprescindible considerar su rendimiento en producto final y su costo. En todos los casos, si el mosto formado no es adecuado para el desarrollo del biocatalizador, éste debe ser complementado con sales nutritivas como fosfato amónico y/o sulfato

magnésico (Stanbury y Whitaker, 2003).

2.- Fermentación del mosto preparado

Para que la fermentación proceda, además, del mosto, se requiere de un biocatalizador, que es un catalizador biológico que puede acelerar las reacciones entre 10^6 y 10^8 veces. Este biocatalizador o microorganismo ha de ser capaz de atacar enzimáticamente determinados grupos químicos del sustrato, ya sea por hidrólisis, oxidación, reducción u otros medios. Los sustratos orgánicos sobre los que actúan los microorganismos tienen un doble papel: el primero como fuente de nutrientes para dicho biocatalizador y el segundo como fuente de energía. En general, el valor energético de una sustancia depende del grado de oxidabilidad de la misma. Es decir, la hidrólisis de sustancias nutritivas durante la fermentación no sólo se traduce en desprendimiento de calor, sino que además en una primera etapa viene acompañada de la formación de nuevas células (Gaden, 2000).

Mediante la acción de dichos microorganismos o biocatalizadores, que pueden ser tanto levaduras como bacterias, se transforma el azúcar en alcohol. Esto se debe a que éstos, bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, tienen la habilidad de utilizar la glucosa mediante el complejo camino de Embden-Mereyhof-Parnas (Baily y Ollis, 1986). En el mismo, los carbohidratos son fosforilados durante un curso metabólico de varias etapas dando como productos finales: 2 moles de etanol y 2 de dióxido de carbono por cada mol de glucosa del mosto, tal como se observa en la Eq. 1. Las formas de utilización de estos biocatalizadores pueden clasificarse del siguiente modo:

- Células individuales libres en suspensión, lo que permite que al finalizar el proceso las células de la biomasa puedan ser cosechadas y reutilizadas.
- Células inmovilizadas sobre un soporte adecuado.

Las células enteras pueden ser unidas a un soporte sólido y fijadas en forma de una monocapa activa. De este modo, cuando el sustrato pasa sobre la superficie, la reacción enzimática transforma el sustrato en el producto deseado. Si bien son varias las ventajas de un sistema de células inmovilizadas debido a la capacidad de reutilizar los microorganismos y diseñar un proceso continuo, las células pueden contener numerosas enzimas catalíticamente activas que pueden catalizar reacciones no deseadas y además la membrana celular puede actuar como una barrera difusiva reduciendo la productividad (Sheldon, 2007). De este modo se hace indispensable llevar a cabo una investigación aplicada sobre cada sistema fermentativo propuesto, a fin de analizar las ventajas y desventajas globales del proceso (Ljunggren *et al.*, 2012).

Actualmente, si bien son muchos los microorganismos adaptados a la fermentación etílica, el más utilizado para la obtención de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ya sea en su forma inmovilizada o libre en suspensión (Sánchez y Cardona, 2008).

Todo proceso biotecnológico debe ser controlado para lograr un efectivo desarrollo. En el caso particular de la fermentación, su éxito viene dado por la interacción óptima de variables tales como: concentración de azúcar (Gaden, 2000), pH, concentración de O_2 y temperatura (Stanbury y Whitaker, 2003). Asimismo su progreso se controla mediante el

crecimiento celular del biocatalizador, el consumo de sustratos y la aparición del producto, en este caso etanol.

3.- Destilación del alcohol producido

Esta operación se realiza para concentrar el etanol hasta una riqueza de 95-97%. También se la puede utilizar para depurar y purificar, extrayendo los aldehídos y éteres que acompañan al etanol en el mosto fermentado. Si se desea obtener alcohol absoluto, se debe además deshidratar el alcohol obtenido (Gaden, 2000).

Revalorización y selección de descartes agroindustriales

El tratamiento y la disposición de los descartes y/o residuos plantean problemas específicos para cada país, región y aun para cada localidad. Hoy en día, en donde es extremadamente necesario considerar los factores ecológicos y de conservación de recursos naturales, deben estudiarse todos los posibles métodos de tratamientos para los mismos, considerando tanto los criterios técnico-económicos, como los sociales y medioambientales. Puntualmente la selección de sustratos alternativos para la fermentación etílica debe circunscribirse al área de producción y es por ello que se deben profundizar los estudios particulares, en lo que respecta a la reutilización de materiales descartados, de modo de fomentar la producción de biocombustibles de segunda generación. La FAO asegura desde hace décadas que la transformación agroalimentaria es una actividad que va adquiriendo cada vez más importancia porque permite una utilización completa de las materias primas locales, un aumento del valor agregado, reducción del déficit comercial con el exterior, creación de empleo y generación de divisas (Alegre, 1978; FAO, 2008; Schmitt *et al.*, 2012).

El bioetanol producido actualmente a nivel industrial a partir de las materias primas sacaroideas y amiláceas forma parte de los denominados combustibles de primera generación siendo su principal problema el elevado coste de la materia prima ya que están ligadas al mercado alimentario. Además del dilema moral que puede suponer la utilización de productos alimentarios con fines energéticos. La producción de etanol a partir de materias primas sacaroideas, como melaza de caña y maíz, permiten producir etanol a menores costes que partiendo de materiales amiláceos como los granos. Actualmente el rendimiento de etanol a partir de maíz es más elevado que el de azúcar de caña, pero el bajo rendimiento por hectárea (ha) del primer cultivo, hace necesario el uso de grandes extensiones de tierra (Sánchez y Cardona, 2008; Aimaretti, 2011). Por su parte el bioetanol obtenido de materias lignocelulósicas también puede ser llamado bioetanol de segunda generación y se presenta como alternativa futura que requiere de investigaciones que permitan su aplicación.

De un análisis global realizado sobre los descartes del sector industrial santafesino se evidenció una gran utilización de los subproductos por parte de las industrias, con el objetivo de recuperar el valor económico, manteniendo una clara conciencia del cuidado de la ecología y del medio ambiente. Sin embargo, el mismo análisis realizado sobre la industria primaria, reveló que los productos descartados principalmente en el sector agroindustrial no reciben ningún tipo de reutilización. Si bien es cierto que los descartes agroindustriales son aptos para la alimentación de animales de invernada, no se debe enmarcar ésta como única posibilidad, ya que poseen todas sus características y su potencial intacto para ser utilizados y/o explotados en otros procesos (Aimaretti, 2006). Entre los descartes agroindustriales

cuantitativamente más destacados en distintas zonas de la provincia de Santa Fe se pueden mencionar:

- *Masa panaria*: se refiere a porciones de masa que no cumplen con los parámetros de calidad requeridos para continuar en la cadena de producción. Son 0,3 toneladas (t) diarias descartadas, no poseen ningún tipo de reutilización en la industria de la ciudad de Rosario.

- *Salvado de trigo*, también llamado afrecho de trigo. La molienda de trigo se realiza durante todo el año, produciendo 76 % de harina de trigo, 14 % de afrechillo, 6% de remolienda de negra y blanca, 2% de harina de baja calidad y 2% de merma. Así, diariamente se obtienen 8 t de afrechillo de trigo como subproducto de la molienda del grano de trigo, en los molinos ubicados en la zona del Gran Rosario. De ellos el 95% se destina a consumo animal y el resto a consumo humano, en virtud de sus propiedades nutricionales (Casini, 2003).

- *Zanahoria*: su cultivo en el Distrito de la Costa ofrece rendimientos de 40 t/ha, siendo la cantidad de producto que cumple con los parámetros de calidad el 65–90 %. Esto implica que durante el período de cosecha, se descartan diariamente entre 20-100 t/día de zanahorias con un óptimo grado de madurez y frescura que no reciben ningún tipo de industrialización.

- *Levadura de cerveza*: en promedio se obtiene como descarte de la industria cervecera en la ciudad de Santa Fe 1 t diaria de levadura filtrada, que ya no es reutilizada en la industria.

Haciendo referencia exclusivamente a los descartes agroindustriales se cree, tal como lo describen Barbieri y Antola (2000), que estamos frente a materiales biotecnológicamente aptos para emprender nuevos desafíos, como la aplicación de distintas tecnologías que permitan revalorizarlos, no sólo con el fin de disminuir los productos descartados, sino también de obtener otros productos económicamente más rentables.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue investigar la posibilidad de reutilizar descartes agroalimentarios cuantitativamente importantes en la región para obtener bioetanol de segunda generación mediante un proceso fermentativo cuyo rendimiento podría ser aumentado a través de la hidrólisis de sus tejidos.

Materiales y métodos

a) Descartes agroindustriales y mostos

El descarte de *masa panaria* se obtuvo directamente de la industria que lo genera. El mismo se trasladó al laboratorio en donde se procesó dentro de las 12 hs. Para la preparación del mosto, 100 g de masa se combinaron con 100 ml de agua destilada y se procesaron durante 2 minutos, logrando una suspensión llamada mosto de masa (MM), con un rendimiento de 2 l/kg masa.

El *afrecho de trigo*, se extrajo de un molino harinero ubicado en la zona el Gran Rosario. Debido a su contenido de humedad promedio (11,4%) se lo almacenó en bolsa de polietileno, cerrado y a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. Para la preparación del mosto de afrecho (MA) se suspendieron 30 g en 180 ml de agua destilada y se agitó manualmente durante 1 minuto. El rendimiento promedio de MA fue 7 l/kg. Previo a la fermentación este mosto fue hidrolizado enzimáticamente. Según sea la enzima seleccionada se corrigió pH del mosto con ácido sulfúrico diluido hasta el valor indicado, se calentó

en un baño de agua termostático y cuando se alcanzó la temperatura óptima se le adicionó la dosis de enzima especificada en la Tabla 1 homogeneizando manualmente (tiempo = 0 de la hidrólisis).

El descarte de *zanahoria* se obtuvo de un galpón de empaque ubicado en la zona del Distrito de la Costa (Santa Fe, Argentina). Para la preparación del mosto éstas se procesaron crudas, previa selección y descarte de las zonas visiblemente atacadas por microorganismos. Se sometieron a la extracción de su jugo mediante un proceso continuo de molienda, prensado y filtrado. El rendimiento de este procedimiento fue de 0,54 l de MZ y de 0,46 kg de bagazo, por cada 1,0 kg de zanahoria de descarte. Como subproducto de esta operación surgió el bagazo de zanahoria, el cual fue utilizado para preparar mosto de bagazo (MB), se suspendieron 35 g de éste en 65 ml de agua destilada y se agitó manualmente durante 1 minuto. Mediante esta preparación se obtuvieron aproximadamente 1,3 l/kg de zanahoria de MB cuya concentración promedio de azúcares reductores fue $5,8 \pm 0,4$ g/l, siendo la concentración de azúcares totales: $29,6 \pm 4,7$ g/l.

En todos los casos los mostos son utilizados inmediatamente después de preparados.

b) Microorganismos y medios de cultivo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* CCUB descartada de la industria cervecera luego de ser utilizada en 5 procesos fermentativos consecutivos, fue utilizada como biocatalizador en todos los casos. Células enteras de levadura filtrada se conservaron en envase estéril, sin agregado de nutrientes, a 4 °C y saturación de humedad. Para la preparación del inóculo, se deslizaron las células en agua y mediante un recuento directo diferencial (Alfenore *et al.*, 2002) en cámara de Neubauer fue posible obtener el inóculo deseado de células viables libres en suspensión.

c) Hidrólisis

De las enzimas específicas actualmente disponibles en nuestro país, se utilizaron las siete preparaciones cuyas especificaciones técnicas se describen en la Tabla 1 junto a las condiciones de hidrólisis utilizadas para cada una.

Tabla 1: Especificaciones de las enzimas utilizadas para la hidrólisis de MB.

Ref.	Actividad enzimática	Nombre comercial	Origen	Temp.	pH	Dosis
1	Amiloglucosidasa	Spirizyme Fuel	<i>Aspergillus niger</i>	65 °C	4,5	0,25%v/v
2	α -amilasa	Fungamyl	<i>Aspergillus oryzae</i>	55 °C	4,7	0,32%p/v
3	celulasa, betaglucanasa, xylanasa	Rohalase OS	<i>Trichoderma reesei</i>	55 °C	5,5	0,05%v/v
4	celulasa	IndiAge MAX L	<i>Trichoderma reesei</i>	50 °C	5,0	0,05%v/v
5	1 endo-1,4- β -glucanasa	Rohament CL	<i>Trichoderma reesei</i>	50 °C	5,0	0,05%v/v
6	celulasa experimental	Enzigrex	<i>Trichoderma reesei</i>	50 °C	5,5	0,02%p/v
7	Xylanasa termoestable	OptimaseCX255L	<i>Trichoderma reesei</i>	70 °C	5,5	0,05%v/v

El pH se ajustó con ácido sulfúrico diluido según sea el pH óptimo de la enzima a utilizar. La temperatura se modificó mediante la utilización de un baño termostatizado. Cuando el mosto logró la temperatura deseada, se le adicionó la dosis de enzima correspondiente, se homogeneizó manualmente y se controló el tiempo de hidrólisis.

d) Fermentación

Las fermentaciones alcohólicas, se realizaron utilizando mosto recién preparado, respetando las siguientes condiciones de cultivo:

- Inóculo: 10^8 céls/ml (Aimaretti, 2006).
- Temperatura de incubación: 29 ± 1 °C.
- Volumen de trabajo: 75% del volumen nominal del reactor utilizado (Stanbury y Whitake, 2003).

En todos los cultivos realizados, la evolución de la fermentación alcohólica se siguió mediante la producción de CO_2 . Este gas se recogió en probeta gasométrica y se consideró como final de la fermentación al momento en el que se detuvo su producción. Las fermentaciones se desarrollaron en un sistema de cultivo de frascos erlenmeyers. El volumen nominal de los mismos fue de 125 ml o alternativamente de 250 ó 500 ml. Las bocas de los frascos fueron cerradas con tapones de goma horadados centralmente. A través del orificio y mediante una manguera de silicona, se conectó la cámara superior del erlenmeyer con la probeta gasométrica. La termostatación del cultivo se realizó por inmersión del frasco en baño de agua con control de temperatura constante. La agitación del cultivo se realizó en forma manual cada 10 minutos. En el momento en que fuera requerido, para la toma de muestras de los cultivos, se sometieron a centrifugación durante 10 min a 5000 rpm. El sobrenadante se trasvasó a tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad para su almacenamiento y conservación a -20°C .

e) Parámetros de cultivo

- *Rendimiento de etanol por cantidad de sustrato* (Y_p/s): está dado por la concentración de etanol (g/l) que se produce a partir de una concentración específica de sustrato del mosto (base húmeda) (Colin y Bjorn, 2002).

- *Rendimiento de etanol por cantidad de materia prima* (Y_p/mp): representado por la cantidad de etanol producido (g/l) por cada gramo de materia prima expresado en base seca.

- *Eficiencia*: la eficiencia de un proceso fermentativo fue definida como la relación entre la concentración total de etanol producida en un cultivo sobre la concentración teórica de etanol que debería haberse producido, la cual se calculó de forma estequiométrica considerando que por cada 100 g de hexosa se producen 51,1 g de etanol y 48,9 g de CO_2 (ver Eq. 1).

f) Determinaciones analíticas

- *Humedad*: se determina de forma indirecta, mediante secado térmico, según el método homologado 44-15A (AACC, 2005).

- *Concentración de azúcares*: como método de valoración rápida de los azúcares presentes en el mosto, se empleó la variación del índice de refracción, determinado en forma directa con un refractómetro manual (Cosmo, mod. K32, Japón). La determinación de la concentración de azúcares reductores y azúcares fermentables totales se realizó mediante

la técnica colorimétrica del ácido 3,5-dinitrosalicílico modificada por Aimaretti (2011). La mencionada técnica considera como azúcares fermentables totales a la sacarosa, además de los azúcares reductores.

- *Concentración de etanol*: se utilizó un cromatógrafo gaseoso (PERKIN-ELMER, Sigma 3B, Dual FID Chromatograph, EE.UU.) con detector de ionización de llama (FID) equipado con una columna capilar de 2 m de longitud, empacada con Chromosorb 102, el cual se operó con nitrógeno como carrier a un caudal de 30 ml/min y las siguientes condiciones: temperatura de la columna: 150 °C (isotérmica), temperatura de inyección: 195°C, temperatura del detector: 220 °C. Para la determinación de la concentración de etanol en las muestras, previa homogenización se separaron 100 µl del descongelado y se mezclaron con 100 µl del estándar interno (isopropanol al 1,5 %) y 1 ml de agua destilada. De esta dilución se emplearon 3 µl para ser inyectados en el cromatógrafo (Mabud, 2000).

Resultados

La evaluación de la fermentabilidad y rendimientos de los mostos preparados con descartes de masa panaria, zanahoria y afrecho de trigo responde a las conclusiones a las cuales se arribó luego de realizar un análisis de los materiales renovables existentes en la región que pudieran reunir las propiedades necesarias para ser propuestos como sustratos de fermentación alcohólica. A continuación se describen los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados sobre cada una de estas materias primas.

Masa panaria

Dado que al momento no se han encontrado antecedentes bibliográficos que indiquen el uso de masa panaria como sustrato, se evaluó en primer lugar la fermentabilidad del mosto preparado (MM). Para ellos se realizó una fermentación en el dispositivo descrito anteriormente, en el que comenzó la producción de gas a los 10 minutos y se obtuvo una concentración de etanol de 2,14 g/l en un tiempo total de 150 minutos. Al finalizar la fermentación, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 5 minutos y se reconstituyeron dos sistemas fermentativos similares al inicial: por un lado se inoculó nuevamente el mosto fermentado (sobrenadante) y por otro se agregó mosto fresco a la biomasa celular. En el cultivo realizado con mosto fresco, la fermentación se reinició aproximadamente a los 10 minutos obteniéndose una concentración de etanol final de 2,56 g/l en un tiempo de 140 minutos. Por otro lado, en el mosto formado por el sobrenadante (mosto fermentado) re-inoculado con nuevas células de biocatalizador, no se produjo fermentación durante un lapso de 140 minutos que se caracterizó por la ausencia de gas en la probeta y de etanol en el sobrenadante. Coincidiendo con lo propuesto por Cáceres-Farfán et al. (2008), cuando a este cultivo se le agregó melaza de caña de azúcar (Melrico, Albuin y Cía. S.R.L., Argentina), producto de descarte en la producción de azúcar refinado rico en azúcares simples, se reinició el proceso fermentativo.

Los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de fermentación se debe a una baja concentración de sustratos fermentables. Esto se evidencia ya que al agregar más sustrato (melaza) se retomó la actividad de las levaduras en presencia del mismo mosto ya fermentado. Por otro lado la actividad de las levaduras continuó cuando se le adicionó mosto fresco. Estos resultados coinciden con antecedentes bibliográficos que señalan que la producción de etanol posee mayor dependencia de deficiencias nutricionales que de la toxicidad propia del

etanol (Sanches Peres y Laluece, 1998). De este modo se puso en evidencia también la posibilidad de reutilizar la biomasa luego de finalizada la fermentación.

En virtud de que la producción de etanol se detuvo cuando las condiciones no eran adecuadas, se investigó la influencia de diferentes concentraciones de sustratos en el mosto, hidrolizando la masa como paso previo a la fermentación. Dado que se trata de una materia prima amilácea, se realizaron hidrólisis multienzimáticas utilizando diferentes concentraciones de las enzimas 1 y 2, por su actividad amiloglucosidasa y α -amilasa respectivamente, bajo las condiciones descritas en la Tabla 1.

En la Tabla 2 se muestran los resultados comparativos de la cantidad de etanol y del rendimiento de materia prima (Yp/mp) obtenidos para los mostos hidrolizados con distintas concentración de enzimas, acompañados por su desviación estándar.

Tabla 2: Rendimientos etílicos de MM sometidos a hidrólisis multienzimáticas.

ENSAYO	Enzima 1	Enzima 2	Azúcares totales (g/l)	Etanol (g/l)	Eficiencia %	Yp/mp
a	-	-	2,4	0,5 ± 0,1	40	0,013
b	0,025 %v/v	0,03 %v/v	4,3	0,8 ± 0,1	38	0,021
c	0,25 %v/v	0,3 %v/v	13,6	2,2 ± 0,3	32	0,057

Como se desprende de la tabla anterior, conforme aumenta la concentración de enzimas, aumenta la hidrólisis del almidón y aumenta el rendimiento etílico, sin presentar la misma proporcionalidad en la eficiencia. Además los resultados de las experiencias de fermentación muestran que el rendimiento etílico es bajo como para implementar un proceso sostenible que permita valorizar este descarte, ya que considerando que la humedad de la masa es del 22,3 %, en las condiciones “c” se obtendrían aproximadamente 17 l de etanol diarios, al utilizar todo el descarte de masa panaria de dicha empresa. Si bien es certero que el proceso de hidrólisis enzimática podría ser estudiado con mayor profundidad con el fin de optimizar el rendimiento etílico y disminuir el efecto negativo provocado por la presencia de lípidos en la masa, también se podrían evaluar otros métodos de revalorización de este descarte, o de disminución en origen.

Zanahoria

La zanahoria (*Daucus carota*) es una fuente importante de pro-vitamina A, fibra y otros componentes nutricionales, siendo uno de los cultivos más eficientes en acumulación de biomasa (Diamantopoulou *et al.*, 2011). En las plantas superiores, las semillas almacenan principalmente almidón, proteínas y lípidos, mientras que las raíces de acumulación, tubérculos y rizomas, normalmente depositan carbohidratos en forma de almidón. Sin embargo, las zanahoria es uno de los pocos vegetales que acumula azúcares libres en vacuolas (40-60 % de los carbohidratos totales), como los principales carbohidratos de reserva. El 95 % del total de azúcares libres está compuesto por sacarosa, fructosa y glucosa, y junto a los terpenos son los principales determinantes de su sabor. De ellos, los azúcares reductores (AR): fructosa y glucosa, están presentes en forma equimolar, siendo la relación sacarosa/AR creciente conforme la raíz llega a su madurez y decreciente luego de la cosecha y durante el almacenaje en frío (Simon, 2000).

Tal como indica Aimaretti (2011) de resultados anteriores, la cantidad de etanol obtenido es proporcional a la cantidad de sólidos solubles aportados por el mosto, no encon-

trándose en la fermentación regiones de saturación o de inhibición por sustrato, en el rango de 25 a 152 g/l. Considerando que en promedio la concentración de azúcares reductores del mosto de zanahoria fue $49,8 \pm 13,4$ g/l, sobre un total de azúcares de $94,0 \pm 11,7$ g/l se obtiene un rendimiento (Y_p/s) constante e igual a 0,47g/g. Este valor es comparable al rendimiento obtenido utilizando cebollas como sustratos, que poseen 67,3 g/l de azúcar total en el jugo y rinden 30,6 g/l de etanol ($Y_p/s= 0,45$ g/g) (Horiuchi et al., 2000), o ananás cuyo contenido de sacarosa es de 125 g/l y producen 59,0 g/l de etanol ($Y_p/s= 0,47$ g/g) (Tanaka *et al.*, 1999).

Ya conocida la fermentabilidad de la zanahoria, se estudió la posibilidad de aumentar el contenido de azúcares fermentables genuinos mediante la hidrólisis enzimática de los tejidos del bagazo, al dejar disponibles los azúcares componentes de las fibras para que pudieran ser utilizados por el biocatalizador. Para ello, conforme a que la composición de la fibra del bagazo es principalmente de celulosa y sólo el 1% es almidón (Yoon y cols., 2005), se ensayaron las enzimas 1 y 2 con actividad amiloglucosidasa y α -amilasa, además de complejos enzimáticos de celulasas como las enzimas 3 y 4, en las condiciones mencionadas (ver Tabla 1). Los resultados comparativos de la cantidad de etanol y del rendimiento de producto sobre sustrato (Y_p/s) obtenidos para los mostos hidrolizados con distintas enzimas, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Rendimientos etílicos de MB sometidos a hidrólisis enzimática.

	Azúcares totales (g/l)	Etanol (g/l)	Y_p/s (g/g)
Sin hidrolizar	28,7	$5,9 \pm 0,4$	0,205
Enzimas 1 y 2	44,1	$9,5 \pm 0,7$	0,216
Enzima 3	39,8	$9,1 \pm 0,6$	0,228
Enzima 4	46,2	$11,0 \pm 0,5$	0,239

El análisis de estos datos, permite concluir acerca de las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática y así llevar a cabo la optimización de la metodología utilizada para preparar el mosto de bagazo y la utilización integral del descarte de zanahoria. En este sentido, tal como puede observarse en la Tabla 3, todas las enzimas son capaces de hidrolizar, en diferentes proporciones, el tejido vegetal del bagazo de la zanahoria, transformándolo en azúcares simples. En consecuencia es posible incrementar, mediante esta metodología, la concentración de sustratos fermentables en MB. No obstante, estos resultados no son suficientes como para poder inferir que el incremento se vería reflejado en el rendimiento etílico, por lo que los mostos fueron sometidos a un proceso fermentativo en condiciones estándares y los resultados se muestran en la misma Tabla. Así pudo determinarse que tal como ocurre en MZ, el rendimiento etílico aumenta conforme lo hace la concentración de azúcares del mosto. De este modo se descarta la posibilidad de que entre los productos de la hidrólisis se obtengan sustancias inhibitoras del biocatalizador o derivados de azúcares que no sean fermentables.

La combinación de los resultados de las experiencias de fermentación de MB junto a los valores ya conocidos de rendimiento etílico de MZ permiten predecir que si por cada tonelada de zanahoria descartada se obtienen 540 l de MZ que poseen en total 50,8 kg de azúcares, entonces podrían obtenerse 30,6 l de etanol. Además, si el bagazo se usa para preparar MB hidrolizado ($\eta=1,3$ l MB/Kg zanahoria) y se lo fermenta, se lograría una producción de 11,9 l de etanol. En consecuencia la cantidad de etanol obtenida por cada tonelada de zanahoria descartada e hidrolizada en las condiciones indicadas utilizando la enzima 4 es de 42,5 l.

En función de estos resultados, se estima que a partir de la zanahoria descartada diariamente podrían obtenerse entre 850 y 4250 l de etanol. En función de estos resultados, actualmente continua el estudio de la hidrólisis de MB con el fin de aumentar el rendimiento etílico y disminuir los desechos ocasionados por el proceso.

Afrecho de trigo

Con el nombre de afrechillo de trigo o salvado se conoce a uno de los subproductos provenientes de la industrialización de trigo. Éste se obtiene luego de separar, por medio de tamices, el producto obtenido de la molienda de los granos limpios y libres de tegumento. Consecuentemente está integrado por la cáscara (pericarpio) desmenuzada por la molienda y un pequeño porcentaje de la parte superficial del albumen (endosperma), eventualmente también puede contener una porción muy pequeña del germen (Casini, 2003).

Por su composición físico-química, puede clasificarse como un material rico en celulosa. La celulosa es un polisacárido formado por unidades de glucosa, unidas mediante enlaces β -1,4 glucosídicos que le permiten formar cadenas largas y lineales unidas mediante puentes de hidrógeno intermoleculares, formando una estructura supramolecular ordenada y cristalina, resistente a la hidrólisis.

Como se describió anteriormente, la preparación de un mosto a partir de este tipo de materias primas requiere de una hidrólisis previa con el fin de aumentar el contenido de azúcares fermentables. Si bien son muchas las alternativas actuales que permiten la hidrólisis de los tejidos vegetales, los métodos principalmente aplicados sobre este tipo de sustratos son: hidrólisis ácida y enzimática. Al respecto, varios investigadores coinciden en que la hidrólisis enzimática ha demostrado mejores resultados en la posterior fermentación, debido a que por su especificidad no se forman componentes de degradación de la glucosa. Sin embargo el inconveniente principal de este método es que la velocidad de reacción es mucho menor (Tomás, 2009; Ovando y Waliszewski, 2005). Además diversos estudios comparativos demuestran que la hidrólisis enzimática puede dar un producto puro con un rendimiento cuantitativo mayor, consumiendo menos energía y generando menos efluentes con respecto a la hidrólisis ácida.

Por estos motivos, se utilizaron diferentes enzimas específicas para el sustrato a ensayar que fueron oportunamente donadas por las empresas comercializadoras y por otros centros de investigación. Así, se ensayó la eficiencia de la hidrólisis sobre una suspensión de afrecho en agua, medida a través del aumento de la concentración de azúcares provocada por la actividad catalítica de cada una de las enzimas descriptas en la Tabla 1. Para el seguimiento del proceso de hidrólisis se prepararon 600 ml de MA, se acondicionó según se describe en el apartado Materiales y métodos y se analizó la evolución de la concentración de azúcares reductores (AR) y azúcares totales (AT) en MB, durante el transcurso de la hidrólisis, para cada una de las enzimas ensayadas. Los resultados de estas experiencias se muestran en los gráficos de la Figura 1.

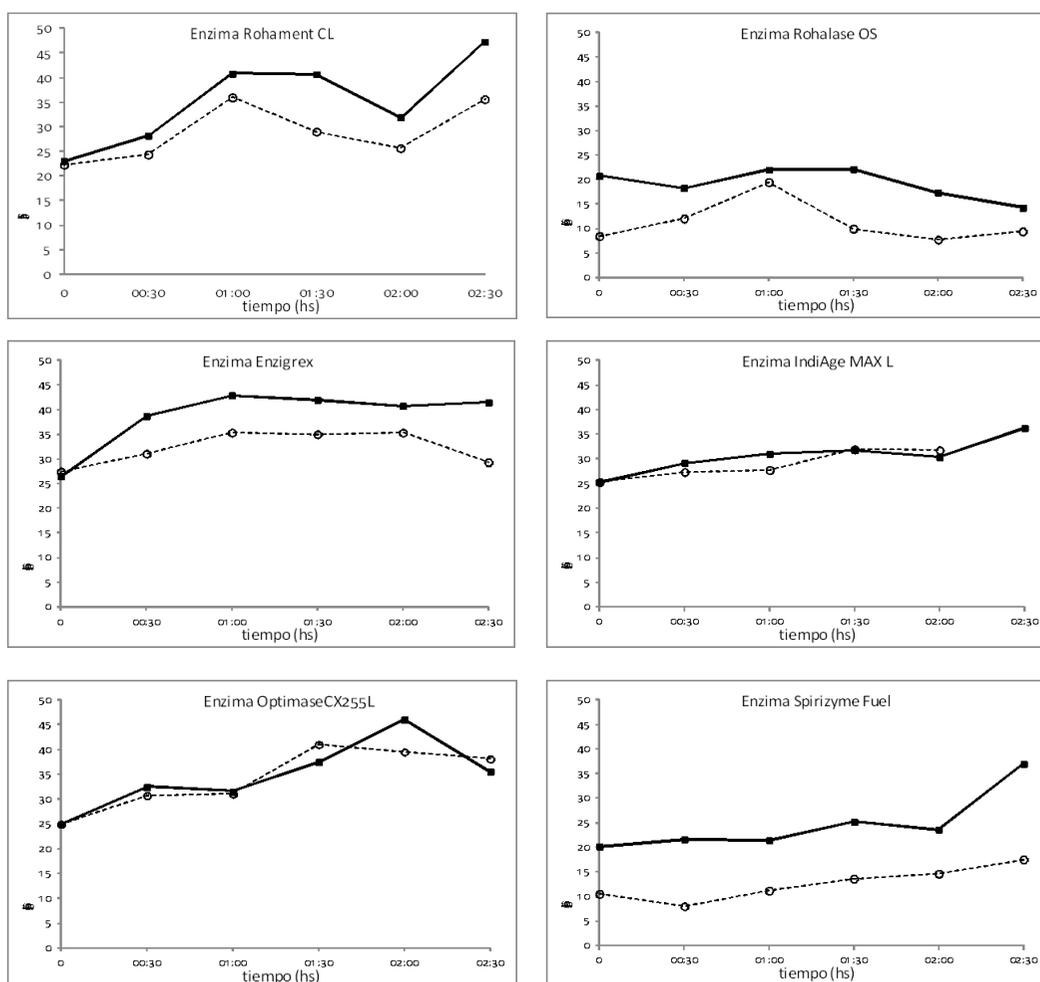


Figura 1: Evolución de la concentración de azúcares totales (—) y reductores (- - -) en función del tiempo en cada proceso de hidrólisis enzimática.

De este modo, tal como puede observarse en los gráficos de la figura anterior, todas las enzimas, excepto ROHALASE OS, son capaces de hidrolizar el mosto de afrecho y en consecuencia podrían ser utilizadas para aumentar el contenido inicial de azúcares. De todas las enzimas ensayadas, Rohament CL, Optimase CX255L y Spirizyme Fuel han logrado mayores porcentajes de incremento de azúcares en el mosto hidrolizado: 105; 84; y 83 % respectivamente. Además se puede destacar que el tiempo óptimo de acción enzimática de las enzimas Rohament CL y Spirizyme Fuel es de 2,5 horas, mientras que Optimase CX255L lo alcanza en 2 hs. Por su parte, otra alternativa visible es la hidrólisis realizada por la enzima Enzigrex, dado que si bien el incremento no es máximo, logra aumentar 15 g% en sólo 1 hora de actividad catalítica, lo que representa un incremento del 57 % de los azúcares iniciales del mosto. El análisis de estos datos, permite concluir acerca de las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática y así llevar a cabo la optimización de la metodología utilizada para preparar el mosto.

A posteriori, con el fin de optimizar el proceso de fabricación del mosto, se verificó la fermentabilidad de los azúcares de los diferentes mostos de modo de evaluar la posibilidad de aumentar así los rendimientos etílicos. Para ello se filtraron los mostos hidrolizados y se los fermentó en las condiciones ya descriptas. Los resultados comparativos de la cantidad de etanol y del rendimiento de producto sobre sustrato (Yp/s) obtenidos para los mostos hidrolizados con distintas enzimas el tiempo adecuado, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Rendimientos etílicos de MA sometidos a diferentes hidrólisis enzimáticas.

	Azúcares totales (g/l)	Etanol (g/l)	Yp/s (g/g)	Eficiencia %
Rohament CL, 150 min	47,3	15,2 ± 0,4	0,321	63
Optimase CX255L, 120 min	46,0	12,8 ± 0,7	0,278	54
Spirizime Fuel, 150 min	37,1	11,3 ± 0,6	0,305	60
Enzigrex, 60 min	41,5	9,0 ± 0,5	0,216	62

Así, del análisis de estos datos surge que, tal como sucede con los otros sustratos, el rendimiento etílico aumenta conforme lo hace la concentración de azúcares del mosto mostrada en los gráficos anteriores, pero sin mantener el mismo rendimiento de producto sobre sustrato. Estos resultados indican que es necesario seguir estudiando el perfil de azúcares provenientes de la hidrólisis de modo de descartar la posibilidad de que entre los productos de la hidrólisis se obtengan sustancias inhibitorias del biocatalizador. De este modo, la hidrólisis enzimática de MA, utilizando Rohament CL se consideró un paso más de la preparación del mosto en las experiencias posteriores.

El análisis integrado de los resultados de las experiencias anteriores permite considerar que la cantidad de etanol obtenida por t de afrecho utilizado para preparar MA hidrolizado con la enzima Rohament CL es 136 l. De este modo, si se utilizara todo el descarte diario de afrecho de trigo para la producción de bioetanol, podrían obtenerse 1088l. Resultaría también interesante el estudio de la posibilidad de reutilizar el material remanente de la preparación del mosto como alimento para el ganado.

Discusión

Si bien se ha demostrado que es posible aumentar el rendimiento etílico de todos los mostos mediante la hidrólisis enzimática, sería conveniente seguir trabajando en el tema a fin de poder comprender con mayor profundidad la influencia de cada uno de los factores intervinientes sobre el proceso de hidrólisis enzimática, considerando que un exceso en la concentración de azúcares también puede disminuir la eficiencia, al igual que la presencia de pentosas o el exceso de etanol producido. Otras alternativas que podrían ser ensayadas para aumentar el rendimiento etílico son: la implementación de modificaciones en el proceso de preparación del mosto (Aimaretti, 2011), el uso de los biocatalizadores con capacidades particulares (Horiuchi *et al.*, 2000b; Guo *et al.*, 2010), la implementación de hidrólisis ácida (Staniszewski *et al.*, 2009) o de etapas de pretratamiento (Voca *et al.*, 2009), así como también los procesos de sacarificación-fermentación simultáneas (SSF) (Mielenz *et al.*, 2009; Patle y Lal, 2008; Suresh, *et al.*, 1999).

Considerando las concentraciones de azúcares de los mostos preparados con los tres sustratos evaluados y su respectivo rendimiento de etanol, en comparación con el rendimien-

to etílico de otros sustratos alternativos, puede observarse que los valores son comparables (Horiuchi *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 1999). Sin embargo, comparando los resultados obtenidos en esta investigación con rendimientos etílicos de los cultivos comúnmente utilizados para la obtención de bioetanol de primera generación, expresados por tonelada de materia prima (base húmeda), puede observarse (Tabla 5) que si bien el rendimiento que se obtiene con estas materias primas de descarte es un tanto inferior, se debe resaltar la elevada disponibilidad de las mismas a un costo mínimo y la no utilización de productos destinados para la alimentación humana.

Tabla 5: Rendimientos etílicos de MA sometidos a diferentes hidrólisis enzimáticas.

Materia prima	Rendimiento etílico	
	(l/t)	
Caña	70*	
Bagazo de caña	140*	
Maíz	370*	
Bagazo de maíz	227*	
Yuca	180*	
Sorgo dulce	86*	
Remolacha	100*	
	Producción diaria etanol (l)	
Masa panaria	56,2	17
Zanahoria	42,5	850 - 4250
Afrecho de trigo	136	1088

*Fuente: Sánchez y Cardona, 2008.

Asimismo, al utilizar la biomasa regional se evitarían los costos de traslado que a veces pueden llegar a ser contraproducentes, según indican Cardoso *et al.*, 2012 y se conduce al desarrollo de un proceso industrial sostenible. Además de ello es muy importante destacar que luego de revalorizar estos descartes, obteniendo biocombustible de segunda generación, surge además un remanente de fermentación que podría ser utilizado para alimentación animal, luego de su adecuación (Castillo y Gallardo, 1989).

Conclusiones

Es posible obtener bioetanol de segunda generación a partir de desechos provenientes de la comercialización de zanahoria, de la molienda de trigo y de la elaboración de productos panificados, utilizando como biocatalizador *S. cerevisiae* descartada de la elaboración de cerveza. Además, es viable incrementar el contenido de azúcares de los mostos por medio de la incorporación de la hidrólisis enzimática como paso previo a la fermentación. Si bien la hidrólisis enzimática permitió aumentar también el rendimiento etílico de estos sustratos, son muchas las variables de este proceso y en consecuencia se están estudiando actualmente los factores intervinientes con el fin de incrementar aún más el rendimiento. Como consecuencia, siguiendo la directriz del objetivo del trabajo, es muy importante realizar un análisis global del proceso de obtención sustentable de etanol, ya que luego de extraer éste de los mostos MA y MZ fermentados, surge un remanente de mosto rico en levaduras y fibras que posible-

mente pueda ser utilizado para alimentación animal luego de que sus componentes se hayan aprovechado para obtener un biocombustible de segunda generación.

Estos resultados son muy promisorios ya que este proceso, parte de residuos agroindustriales disponibles en nuestra región para obtener bioetanol, al tiempo que se colabora con la disposición responsable de esos residuos. Además generan el marco para continuar con investigaciones que permitan obtener productos biotecnológicos de relativo valor agregado como bioetanol de segunda generación, una bebida alcohólica o un condimento innovador.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Dr. Francisco Gasca, Dra. María Luisa Rojas y Dr. Juan Carlos Yori por la colaboración en la ejecución de este proyecto. Además se agradece a la Ing. Adriana Clementz por la colaboración en la redacción del mismo.

Recibido: 12/12/11. Aceptado: 07/03/12

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. "Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists" *American Association of Cereal Chemistry*. St. Paul, MN: Autor. 2005. (12° ed).
- Aimaretti N. "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales para la Obtención de Nuevos Productos Alimenticios". M.Sc. Tesis. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina. 2006.
- Aimaretti N. "Desarrollo de un Proceso Sostenible para la Producción de Bioetanol a partir de Desechos Agroindustriales". Dr. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid. España. 2011.
- Acaroglu M, Aydogan H. "Biofuels energy sources and future of biofuels energy in Turkey" en *Biomass and Bioenergy*. 2012, Vol. 36, pp. 69-76.
- Alegre M. "Consideraciones sobre las conclusiones del simposio regional sobre desechos sólidos". 5° Congreso Argentino de Saneamiento: *Saneamiento es Salud, Desarrollo*. Buenos Aires. 1978, pp. 633 - 638.
- Alfенore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, Uribelarrea JL, Goma G, Benbadis L. "Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process" en *Applied Microbiology Biotechnology*. 2002, Vol. 60, pp. 67-72.
- Baily J, Ollis D. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York, McGraw-Hill, 1986. Cfr. Chapter 3.
- Barbieri C, Antola M. "Las industrias y los programas de minimización de residuos" en *Nueva Industria*. 2000, Vol. L, enero/marzo, pp. 5-7.
- Cáceres-Farfán, M., Lappe, P., Larqué-Saavedra, A., Magdub-Méndez, A. "Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by mixture of two yeasts" en *Bio Tech*. 2008, Vol. 99, pp. 9036-9039.
- Cardoso R, Ozdemir E, Eltrop L. "Environmental and economic assessment of international ethanol trade options for the German transport sector" en *Biomass and Bioenergy* 2012, Vol 36, pp. 20-30.
- Casini C., Rodríguez J., Bartosik R., Peiretti J., Cabral G. "Trigo. Eficiencia de cosecha y postcosecha" en *Manual Técnico N°1*. Buenos Aires: INTA Manfredi. 2003.
- Castillo, A., Gallardo, M., 1989. Alimentos no tradicionales en ganado lechero. Consideraciones prácticas para su utilización. E.E.A INTA Rafaela. *Información para extensión*, 88, 25-32.
- Chum L, Overend R. "Biomass and renewable fuels". *Fuel Bioprocess Technol*. 2001, Vol. 17, pp. 187-195.
- Colin R., Bjorn K. (Eds). "Basic Biotechnology. Second Edition". Cambridge. University Press. Cambridge. United Kingdom. 2002.
- Crueger W, Crueger A. "Biotecnología", en *Manual de microbiología industrial*. Zaragoza, Acribia S.A., 1993.

- Demain A, Davies J. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington, American Society for Microbiology Press, 1999. Second Edition.
- Diamantopoulou LK, Karaoglou LS, Koukios EG. "Biomass Cost Index: Mapping biomass-to-biohydrogen feedstock costs by a new approach" en *Bioresource Technology*. 2011, Vol 102, pp. 2641–2650.
- FAO. "El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades." Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma: Autor. 2008.
- Gaden E. "Fermentation Process Kinetics" en *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, Vol 67 (6), pp. 629:635.
- Guo Y, Xu J, Zhang Y, Xu H, Yuan Z, Li D. "Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source" en *Bioresource Technology*. 2010, Vol. 101, pp. 8784–8789.
- Horiuchi, J., Kanno, T., Kobayashi, M. "Effective onion Vinegar production by a two-step fermentation system" en *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000^a, Vol 90, pp. 289-293.
- Ljunggren M, Wallberg O, Zacchi G. "Techno-economic comparison of a biological hydrogen process and a 2nd generation ethanol process using barley straw as feedstock" en *Bioresource Technology*. 2011, vol 102, pp. 9524–9531
- Mabud A. "Malt Beverages and Brewing Materials. Bureau of Alcohol Official Method 984.14. Ethanol in Beer. Gas Chromatographic Method., Tobacco, and Firearms." USA: AOAC: Autor. 2000.
- Ovando S., Waliszewski K. "Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos" en *Universidad y Ciencia*. 2005, Vol. 21 (42), pp. 113-122.
- Sánchez O, Cardona C. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks" en *Bioresource Technology*. 2008, Vol 99, pp. 5270–5295.
- Sanches Peres, M., Laluece, C. "Ethanol tolerance of Thermotolerant yeast cultivated on mixture of sucrose and ethanol" en *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1998, Vol. 85(4), pp. 388-397.
- Schmitt E, Bura R, Gustafson R, Cooper J, Vajzovic A. "Converting lignocellulosic solid waste into ethanol for the State of Washington: An investigation of treatment technologies and environmental impacts" en *Bioresource Technology*. 2012, Vol. 104, pp. 400–409.
- Sheldon R. "Enzyme Immobilization: the quest for optimum performance" en *Adv. Synth. Cata.* 2007, Vol. 349, pp. 1287-1307.
- Simon P. "Domestication, historical development, and modern breeding of carrot" en *Plant Breeding*. 2000, Vol. 19, pp. 157–190.
- Stanbury P, Whitaker A, Hall S. "Principles of Fermentation Technology". Editorial Butterworth-Heinemann. Elsevier Science. Oxford. Gran Bretania. 2003, pp. 94:108.
- Sulaeman A, Keeler L, Taylor S, Giraud D, Driskell J. "Carotenoid content, physicochemical, and sensory qualities of deep-fried carrot chips as affected by dehydration/rehydration, antioxidant, and fermentation" en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, Vol. 49 (7), pp. 3253-3261.
- Tanaka K., Hilary Z., Ishizaki, A. "Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*" en *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, Vol. 87, pp. 642-646.
- Tomás Pejó, M. "Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid, Universidad Complutense de Madrid, 2009.
- Voca N, Varga B, Kricka T, Curic D, Jurisic V, Matin A. "Progress in ethanol production from corn kernel by applying cooking pre-treatment" en *Bioresource Technology*. 2009, Vol. 100, pp. 2712–2718.
- Yoon K., Cha M., Shin S., Kim K. "Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition" en *Food Chemistry*. 2005, Vol. 92, pp.151-157.