

---

# PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ALCOHOL CARBURANTE I: OBTENCIÓN A PARTIR DE DIFERENTES MATERIAS PRIMAS

ÓSCAR JULIÁN SÁNCHEZ  
y CARLOS ARIEL CARDONA

---

El mundo encara el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables. Al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez más crecientes. De otro lado, el consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera. Este tipo de contaminación ha causado cambios en el clima del planeta, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que más preocupan a los gobiernos, las ONG's, las comunidades y la opinión pública en general (FNB, 2004). La única forma de encarar esta problemática es mediante recursos energéticos renovables. Para ello, la biotecnología ofrece múltiples alternativas tecnológicas. Una solución renovable es el uso de energía solar en forma de biomasa, la cual está representada en los materiales lignocelulósicos y los cultivos de plantas ricas en energía. Las emisiones de CO<sub>2</sub> generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO<sub>2</sub> durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales, a partir de los cuales dichos combustibles se producen. Cannell (2003) destaca que una hectárea de cultivos ricos en energía usada para la producción de biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel) puede evitar la emisión de 0,2-2,0 ton de carbono a la atmósfera en comparación con el empleo de combustibles fósiles.

Para un país como los EEUU, la producción masiva de biocombustibles representaría el "regreso" de dinero y puestos de trabajo a la economía, sin mencionar que el desarrollo de cultivos energéticos implicaría un impulso al sector rural (Sheehan y Himmel, 1999). Este argumento es aún más válido para la mayoría de los países latinoamericanos, considerando la perspectiva de una reducción de las reservas comprobadas de petróleo en un plazo de 5-10 años. Una parte importante del PIB de cada país tendría que destinarse a la compra de petróleo cuya perspectiva de precios es muy incierta, a lo que hay que agregar la ferroz competencia que encaran los productos agrícolas de los países latinoamericanos frente a los enormes subsidios destinados al sector primario por los países desarrollados. Por ello es de importancia estratégica la diversificación de la agricultura a través de cultivos ricos en energía (caña de azúcar, palma africana, sorgo, yuca, entre otros).

El biocombustible más importante es el alcohol carburante (etanol, EtOH), el cual puede ser utilizado como oxigenante de la gasolina, elevando su contenido en O<sub>2</sub>, lo que permite una mayor combustión de la misma disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente. El EtOH se obtiene a partir de la caña de azúcar en países tropicales como Brasil e India. En algunos países europeos como Francia se utilizan

melazas de remolacha azucarera. La materia prima principal para la obtención de EtOH en los EEUU es el almidón (Madson y Monceaux, 1995). Se considera que la denominada biomasa lignocelulósica, que incluye residuos agrícolas, forestales y sólidos urbanos, así como residuos agroindustriales, de la industria de alimentos y de otras industrias, comprende aproximadamente el 50% de la biomasa en el mundo (Claassen *et al.*, 1999). Esta biomasa es un recurso que puede ser procesado de diferentes formas para la obtención de una gran variedad de productos además del EtOH como gas de síntesis, metanol, hidrógeno y electricidad (Chum y Overend, 2001).

## Oxigenantes para la Gasolina

La gasolina necesita de aditivos que aumenten su octanaje y así disminuir su capacidad autodetonante, incrementando su resistencia a la compresión. En la primera mitad del siglo pasado, se utilizó el tetraetil plomo (TEP) como antidetonante, pero estudios posteriores sugirieron que por cada litro de gasolina consumida se formaba 1g de óxido de plomo (Nadim *et al.*, 2001). Fue solo en enero de 1996 que la gasolina con plomo fue prohibida en EEUU. En Colombia también fue prohibida, pero en muchos países todavía se utiliza como es el caso de Ecuador, Perú y la mayoría de países africanos (Thomas y Kwong, 2001). La

---

**PALABRAS CLAVE / Aditivos Oxigenantes / Alcohol Carburante / Almidón / Biomasa Lignocelulósica / Caña de Azúcar /**

Recibido: 25/07/2005. Modificado: 10/10/2005. Aceptado: 11/10/2005.

Óscar Julián Sánchez. Ingeniero Químico, M.Sc. en Biotecnología, Academia Estatal de Tecnología Química Fina de Moscú, Rusia. Estudiante del Doctorado en Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales, Colombia. Profesor, Universidad de Caldas, Colombia. e-mail: osanchez@ucaldas.edu.co

Carlos Ariel Cardona. Ingeniero Químico, M.Sc. en Ingeniería Química, Ph.D. en Ingeniería Química, Academia Estatal de Tecnología Química Fina de Moscú, Rusia. Profesor, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia. Dirección: Carrera 27 No. 64-60, Of. F-505. Manizales, Colombia. e-mail: ccardonaal@unal.edu.co

---

adición de oxigenantes a la gasolina empezó en 1979 con el uso del metil *ter*-butil éter (MTBE), el cual permite la reducción en la emisión de compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y de monóxido de carbono (CO) al realizarse una combustión más completa hasta CO<sub>2</sub>. Sin embargo el MTBE tiene baja biodegradabilidad, lo que causa su gran movilidad; se han encontrado trazas de MTBE en cursos de agua naturales y manantiales, por lo que se ha regulado su sustitución por otros oxigenantes (Braids, 2001). Se han explorado otros aditivos como el etil *ter*-butil éter (ETBE), el *ter*-amil metil éter (TAME) y el di-isopropil éter (DIPE; Cardona *et al.*, 2000), pero sus propiedades son muy similares al MTBE (Nadim *et al.*, 2001).

El uso de EtOH como oxigenante representa varias ventajas: mayor contenido de O<sub>2</sub> (menor cantidad de aditivo requerido), mayor octanaje, no es tóxico, reduce más las emisiones de CO y no contamina las fuentes de agua (Thomas y Kwong, 2001). Pero su producción es más costosa, la gasolina mezclada con EtOH conduce la electricidad y su presión de vapor de Reid es más alta, lo que implica una mayor volatilización que contribuye a la emisión de hidrocarburos (HC) no quemados y posterior formación de ozono y de smog (Thomas y Kwong, 2001). De otro lado, el EtOH puede ser utilizado como materia prima en la producción de ETBE (Ancilloti y Fattore, 1998).

Brasil es el principal productor mundial de EtOH. A través del programa Proalcool (Rosillo-Calle y Hall, 1987) en Brasil se ha utilizado el alcohol hidratado como combustible y el alcohol anhidro como oxigenante (24% v/v). Sin embargo, los ritmos de aumento en la producción y consumo de alcohol carburante en Brasil están disminuyendo, aunque se espera una reactivación de la producción en el mediano plazo (Rosillo-Calle y Cortez, 1998; Wheals *et al.*, 1999). En los EEUU hay también un programa de adición de EtOH a la gasolina que se vio impulsado especialmente por el Clean Air Act Amendments de 1990. La Unión Europea ha expedido varias directivas que prevén una meta de oxigenación de los combustibles del 2% en peso para 2005, y del 5,75% para 2010 (Berg, 2004). Francia tiene un programa de obtención de bio EtOH a partir de remolacha azucarera; la oxigenación de la gasolina se hace en este país a través de la síntesis de ETBE a partir de EtOH (Poitrat, 1999). Se pronostica que Europa se convertirá en el futuro en importadora neta de alcohol (Berg, 2004).

En América Latina, Colombia inicia en noviembre de 2005 la adición de un 10% de EtOH a la gasolina en ciudades con más de 500000 hab. Para los años siguientes, esta disposición se ampliará

a todo el país. Para responder a una demanda interna estimada en cerca de 800mill L por año, se tienen que construir entre siete y nueve plantas con una capacidad entre 150000 y 300000L diarios; algunas de ellas ya iniciaron la fase de construcción y montaje. El gobierno ha otorgado exenciones tributarias a fin de apoyar los proyectos privados, la mayoría vinculados a la industria azucarera (FNB, 2004). Argentina por su parte, planea para los próximos cinco años la transición hacia mezclas de gasolina con un 5% de EtOH. Los gobiernos de varios países han puesto en marcha programas de oxigenación de la gasolina con EtOH, como es el caso de Canadá, China y Tailandia.

### Producción de Etanol como Alcohol Carburante

Según datos de F.O. Licht, la producción mundial de EtOH en 2004 fue de cerca de 41000mill de litros (RFA, 2005; Tabla I). En promedio, el 73% del EtOH producido mundialmente corresponde a alcohol carburante, el 17% a alcohol para bebidas y el 10% es alcohol industrial. Los datos para el alcohol carburante tomados de diversas fuentes indican que Brasil y EEUU contabilizan el 73% de la producción mundial (12600 y 10666mill L en 2003, respectivamente) aunque este porcentaje está cambiando constantemente debido a la dinámica del mercado mundial de este biocombustible.

El microorganismo más utilizado para la obtención de EtOH es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que convierte las hexosas en EtOH en condiciones anaeróbicas, generando 2 moles del compuesto portador de energía en los seres vivos, el adenosín trifosfato (ATP), por cada mol de hexosa consumida (Claassen *et al.*, 1999), además de 2 moles de EtOH. Este microorganismo tiene también la capacidad de convertir las hexosas en CO<sub>2</sub> aeróbicamente, por lo que en dependencia de las concentraciones de O<sub>2</sub> en el medio de cultivo y de la fuente de carbono, se puede favorecer uno de los dos procesos. Las levaduras

tienen la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de EtOH (hasta 150g·L<sup>-1</sup>).

Entre las bacterias, la más promisoría es *Zymomonas mobilis*, la cual convierte 1 mol de hexosa en 1 mol de EtOH, liberando tan sólo 1 mol de ATP, lo que resulta en mayores rendimientos (hasta un 97% del máximo teórico). Esta bacteria tiene una alta tolerancia al alcohol (100g·L<sup>-1</sup>), pero su rango de sustratos fermentables es también muy estrecho (glucosa, fructosa y sacarosa; Claassen *et al.*, 1999; Hawgood *et al.*, 1985). Además, su uso en los cultivos a partir de jarabe de caña de azúcar conlleva a la formación del polisacárido levano, el cual aumenta la viscosidad de los caldos de fermentación, y de sorbitol, lo cual reduce la eficiencia de la conversión de sacarosa a EtOH (Doelle y Doelle, 1989; Grote y Rogers, 1985). Se han evaluado otros microorganismos con capacidad de hidrolizar la celulosa, de asimilar pentosas y de trabajar en condiciones termofílicas, ya que el incremento de la temperatura acelera los procesos metabólicos y disminuye las necesidades de refrigeración. Entre los microorganismos de este tipo se encuentran levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus*, pero su tasa de producción de EtOH a partir de glucosa es por lo menos 5 veces menor a la observada para *S. cerevisiae* (Claassen *et al.*, 1999). Otro grupo importante de microorganismos productores de EtOH son los clostridios termofílicos y sacarolíticos como *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermosaccharolyticum* y *C. thermocellum*, los cuales pueden sintetizar hasta 2 mol de EtOH por mol de hexosa. La principal desventaja es que su tolerancia al alcohol es muy baja, por lo que las máximas concentraciones alcanzadas son de menos de 30g·L<sup>-1</sup>.

La mayor parte del EtOH es producido mediante fermentación por lotes. La concentración de sustrato al inicio de la fermentación es de 15-25% (p/v) y el pH se ajusta a un valor de 4-5 para disminuir los riesgos de infección. El proceso se lleva a cabo a 30-35°C. Generalmente el rendimiento es del 90% del máximo teórico. El resto del sustrato es convertido en biomasa y otros metabolitos. La concentración de EtOH al término de la fermentación es de 80-100g·L<sup>-1</sup> (Claassen, 1999). En la mayoría de las destilerías, el tiempo de fermentación es de 24h, aumentándose 6 h para la sedimentación de las levaduras en los tanques (Pandey y Agarwal, 1993).

### Alcohol a partir de Caña de Azúcar

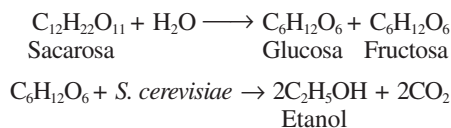
La principal materia prima para la producción de EtOH es la caña de azúcar, ya sea en forma de jugo de caña o como melazas (subproducto de la industria

TABLA I  
PRODUCCIÓN MUNDIAL  
DE ALCOHOL ETÍLICO (2004)

País	Mill. litros
1. Brasil	15098,37
2. EEUU	13379,98
3. China	3648,74
4. India	1748,67
5. Francia	828,91
6. Rusia	749,43
7. Sur África	416,35
8. Reino Unido	401,21
9. Arabia Saudita	299,01
10. España	299,01
Total	40764,45

Adaptado de RFA (2005).

azucarera). Se pueden obtener cerca de 70L de EtOH/ton de caña y 9L EtOH/ton de melaza grado C, además de cerca de 100kg de azúcar (Moreira y Goldemberg, 1999). Para efectos de costo, Murtagh (1995) estimó que se debe esperar un rendimiento de 58 galones de EtOH a partir de 1 ton de melazas que contengan un 46% de azúcares. El microorganismo más utilizado es *S. cerevisiae* por su capacidad de hidrolizar la sacarosa de la caña de azúcar para su conversión hasta glucosa y fructosa, dos hexosas fácilmente asimilables; además puede desarrollarse en condiciones anaeróbicas, pero se necesitan pequeñas cantidades de O<sub>2</sub> para la síntesis de sustancias como ácidos grasos y esteroides. La reacción general de la fermentación se puede representar como



La fermentación alcohólica puede llevarse a cabo por lotes, por lotes alimentados o en forma continua. El proceso típico de producción de alcohol por lotes a partir de melazas o jugo de caña (denominado proceso Melle-Boinot), comprende la esterilización de la materia prima seguida del ajuste del pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y de los °Brix a valores de 14-22. El mosto obtenido se somete a fermentación. El vino resultante se decanta y centrifuga para recuperar el EtOH, mientras la levadura se recicla a los fermentadores. Para la obtención de alcohol anhidro se utiliza mayoritariamente la destilación azeotrópica con benceno (Kosaric y Velikonja, 1995).

La fermentación por lotes alimentados implica bajos niveles de concentración de sustrato en el transcurso de la fermentación, mientras el alcohol se va acumulando en el medio. El proceso más empleado en Brasil para la obtención de bioetanol es el de lotes alimentados con recirculación de células, lo que hace que aumente la productividad volumétrica. El control de la velocidad de alimentación del medio es muy ventajoso por cuanto implica la neutralización del efecto inhibitorio causado por las altas concentraciones de sustrato o de producto en el caldo de fermentación. Se ha observado que la adición de sacarosa en forma lineal o exponencialmente decreciente conlleva a aumentos en la productividad de EtOH entre 10 y 14% (Echegaray *et al.*, 2000).

Los procesos continuos tienen mayores ventajas frente a los procesos por lotes debido a los menores costos del biorreactor, menores requerimientos de mantenimiento y operación, mejor control del proceso y mayor productividad. El 30% de las plantas productoras de bioetanol en Brasil emplean el cultivo continuo (Monte Alegre *et*

*al.*, 2003). La clave de este proceso son las mayores densidades celulares, las cuales se pueden alcanzar por inmovilización de células, recuperación y reciclaje de biomasa o control del crecimiento celular. Sin embargo, las levaduras cultivadas por períodos prolongados en condiciones anaeróbicas disminuyen su capacidad de producir alcohol. Adicionalmente, a tasas de dilución altas que garantizan productividades elevadas, el sustrato no alcanza a ser consumido completamente, por lo que los rendimientos disminuyen. Generalmente en la industria, aunque la productividad es importante, es más relevante la conversión del sustrato considerando que la mayor parte de los costos de producción corresponden a la materia prima (Gil *et al.*, 1991).

La compañía Alfa Laval de Suecia montó el proceso continuo de producción de 150000L EtOH/día en Brasil (proceso Biostill). Este proceso piloto se basa en la fermentación en un tanque del cual se retira una corriente del líquido que va a una centrifuga. De la centrifuga se retira continuamente una corriente de levadura concentrada que se recicla al fermentador y otra corriente sin levadura que se envía a una torre de destilación; se logran así mayores rendimientos de alcohol debido a la baja formación de inhibidores, subproductos y bacterias en razón a los bajos tiempos de residencia alcanzados para el proceso de fermentación (3-6h). Este proceso fue patentado por esta compañía (Ehnstroem, 1984), lo mismo que su modificación que alcanza rendimientos de hasta el 96% del teórico (Da Silva y Vaz, 1989). Un enfoque adicional consiste en la remoción del alcohol del medio de cultivo con vacío o membranas, lo que incrementa notablemente la eficiencia del proceso pero implica un aumento en los costos de capital (Coombs, 1996; Tabla II). Indudablemente el análisis de los métodos de integración de estos procesos puede ofrecer muchas alternativas para reducir los costos y optimizar la producción de alcohol en la etapa de fermentación.

Otros desarrollos incluyen la utilización de células inmovilizadas las cuales permiten la implementación de proce-

TABLA II  
PRODUCTIVIDAD EN  
LA OBTENCIÓN DE ETANOL PARA  
VARIAS CONFIGURACIONES

Proceso	Productividad, g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>
Cultivo por lotes	1,8-2,5
Cultivo continuo	6
Cultivo continuo en cascada de biorreactores	20
Remoción continua de etanol por vacío	89
Remoción continua de etanol por separación con membranas	100

Fuente: Coombs (1996).

solos continuos con mayores rendimientos, a la vez que se posibilita el incremento de la concentración celular (Claassen *et al.*, 1999). Caicedo *et al.* (2003) operaron un biorreactor de columna de 200L alimentado con melazas de caña que emplea células inmovilizadas de *S. cerevisiae* en alginato de Na, obteniendo una conversión del 61%, un rendimiento promedio de 0,45g·g<sup>-1</sup> de glucosa y una productividad de 1,835g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Wendhausen *et al.* (2001) evaluaron un reactor continuo de lecho empacado con levaduras inmovilizadas en microfibras de crisotila (también conocido como asbesto blanco), material que exhibe una capacidad excepcional para fijar las levaduras, obteniendo una productividad promedio de 20-25 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Se ha propuesto también la inmovilización de *Z. mobilis* en alginato de Ca en medios basados en sacarosa (Grote y Rogers, 1985).

### Alcohol a partir de Almidón

Para obtener etanol a partir de almidón es necesario romper las cadenas de este polisacárido para obtener jarabe de glucosa, el cual se puede convertir en EtOH mediante las levaduras. Por ello, se debe incluir una etapa adicional de hidrólisis (rompimiento, degradación) de este biopolímero. De cada 100g de almidón se pueden obtener teóricamente 111g de glucosa, lo que implica una relación estequiométrica de 9:10. En EEUU el EtOH se obtiene en mayor medida a partir de almidón de maíz. El almidón fue tradicionalmente hidrolizado mediante ácidos, pero la especificidad de las enzimas, sus condiciones suaves de reacción y la ausencia de reacciones secundarias han hecho que las amilasas sean los catalizadores usados para esta tarea. Para la hidrólisis del almidón se usa la α-amilasa obtenida de bacterias termo-resistentes como *Bacillus licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, lo que la hace ideal para la primera etapa de la hidrólisis de las suspensiones de almidón que tienen que ser llevadas a altas temperaturas (90-110°C) para el rompimiento de los gránulos de almidón, condición necesaria para el tratamiento enzimático. El producto de esta etapa o licuefacción es una solución de almidón que contiene dextrinas (oligosacáridos compuestos por varias unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de glucosa. El almidón licuado se somete a sacarificación a menores temperaturas (60-70°C) con glucoamilasa obtenida de *Aspergillus niger* o de especies de *Rhizopus* (Nigam y Singh, 1995), la cual hidroliza las dextrinas hasta glucosa:



Para extraer el almidón de los granos de maíz, existen dos tipos de mollienda en la industria, húmeda y seca. En la

**TABLA III**  
**MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

Métodos	Procedimiento/Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
<b>Pretratamientos físicos</b>				
Pulverizado mecánico	Reducción a astillas, trituración, molienda.	Molinos: vibratorio de bolas (tamaño final: 0,2-2mm), de cuchillas o martillo (tamaño final: 3-6mm).	Residuos de madera y forestales (paja, madera dura), desechos de maíz, bagazo de caña, timothy, alfalfa.	Sun y Cheng, 2002; Rivers y Emert, 1988; Cadoche y López, 1989; Papatheofanous <i>et al.</i> , 1998; Alvo y Belkacemi, 1997.
Pirólisis	T>300°C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis ácida suave (1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , T=97°C, 2,5h) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa). Puede realizarse al vacío: 400°C, p=1mm Hg, 20min (algodón de desecho).	Madera, algodón de desecho.	Sun y Cheng, 2002; Yu y Zhang, 2003.
<b>Pretratamientos físico-químicos</b>				
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, p=0,69-4,85 MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica.	Altas concentraciones de sólidos. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de parte de la xilosa obtenida, formación de inhibidores, se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , SO <sub>2</sub> , o CO <sub>2</sub> mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores. Reducción de tamaño con menor gasto energético comparado con pulverización. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.	Bagazo, madera blanda, paja de arroz, madera de aspen, madera de eucalipto.	Sun y Cheng, 2002; Kaar <i>et al.</i> , 1998; Moniruzzaman, 1996; De Bari <i>et al.</i> , 2002; Heitz <i>et al.</i> , 1987; Söderström <i>et al.</i> , 2003; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Agua líquida caliente (LHW)	Agua caliente presurizada, T=170-230°C, 1-46min.	Concentraciones de sólidos <20%. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, >50% oligómeros. Solubilización parcial de la lignina (20-50%). Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90%. Baja o nula formación de inhibidores.	Bagazo de caña.	Lynd, 1996; Laser <i>et al.</i> , 2002; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	Dosis 1-2kg de amoníaco/kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Se requiere recuperación de amoníaco, no produce inhibidores. Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%). Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 0-60% de la hemicelulosa en dependencia de la humedad, más del 90% oligómeros. Ocurre cierta solubilización de la lignina (~10-20%).	Materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascarrilla de arroz, desechos de maíz, switchgrass), residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas de aspen y bagazo.	Sun y Cheng, 2002, Dale <i>et al.</i> , 1996, Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Explosión con CO <sub>2</sub>	Dosis de 4 kg CO <sub>2</sub> /kg de fibra, p=5,62 MPa.	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa >75% (alfalfa). No forma compuesto inhibitorios.	Alfalfa, mezcla de papel reciclado, bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002.

molienda húmeda se obtiene del grano, además de almidón, fibra, gluten, germen y aceite, que son subproductos de alto valor. Los rendimientos de EtOH pueden llegar a 403,1L/ton (Gulati *et al.*, 1996). En la molienda en seco no se fracciona el grano en sus componentes por lo que todos sus nutrientes entran al proceso y son concentrados en un subproducto de destilación empleado para alimentación animal llamados granos secos de destilería (DDG, por sus siglas en inglés), lo que compensa en cierta medida los costos del proceso (McAloon *et al.*, 2000). Cuando los DDG se mezclan con solubles concentrados provenientes de la evaporación de las vinazas ligeras se obtienen los granos secos de destilería con solubles (DDGS; Sánchez y Cardona, 2005). Los rendimientos de alcohol para la molienda en seco son de 419,4-460,6 L/ton (Gulati *et al.*, 1996).

En Francia, aunque se obtiene alcohol a partir de melazas de remolacha azucarera, también se produce a

partir de trigo alcanzando rendimientos de 0,357L EtOH/kg de trigo mediante el proceso Biostill (Ehnstroem, 1984). Se ha reportado la producción de EtOH a partir de otros vegetales que ofrecen una alta concentración de almidón como sorgo (du Preez *et al.*, 1985), papa, papa dulce, yuca (Nigam y Singh, 1995; Hosein y Mellowes, 1989), harina de yuca y ñame (Hosein y Mellowes, 1989). La yuca representa una importante fuente alternativa de almidón no sólo para la producción de EtOH sino para la obtención de jarabes glucosados, considerando además que es uno de los diez cultivos tropicales más importantes. Se ha propuesto la hidrólisis de la harina de yuca para obtener soluciones de glucosa mediante un reactor enzimático de membrana de fibra hueca con conversiones de 97,3% (López-Ulibarri y Hall, 1997). Uno de los cultivos más перспекivos es el sorgo dulce, el cual produce granos con altos contenidos de almidón, ta-

llos con altos contenidos de sacarosa y hojas y bagazo con alto contenido de lignocelulosa. Esta planta se puede cultivar tanto en países templados como tropicales, requiere 1/3 del agua necesaria para el cultivo de la caña de azúcar y la mitad de la cantidad necesaria para el maíz, y es muy resistente a la sequía, a las inundaciones y a condiciones de salinidad alcalina (Winner Network, 2002; du Preez *et al.*, 1985).

### Alcohol a partir de Biomasa Lignocelulósica

En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios para desarrollar la producción a gran escala de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica. Los materiales que más se han investigado son madera y residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas,



El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten de menos del 20% de los rendimientos teóricos a valores mayores al 90% (Lynd, 1996). Para el pretratamiento se han propuesto y desarrollado diferentes métodos, los cuales se relacionan en la Tabla III de acuerdo a la clasificación de Sun y Cheng (2002). Sin embargo, ninguno de los métodos de pretratamiento propuestos se puede aplicar en forma genérica a las diferentes materias primas (Claassen *et al.*, 1999). Esto justifica la realización de análisis detallados de estas tecnologías en cada caso en particular. La síntesis de procesos puede aportar las herramientas necesarias para descartar las opciones con menos perspectivas en forma preliminar, teniendo en cuenta nuevos procedimientos, esquemas y alternativas que se planteen en la etapa de diseño.

Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se forman, junto con los azúcares fermentables, gran cantidad de compuestos que pueden inhibir la fermentación subsiguiente. Las sustancias inhibitorias se originan como resultado de la hidrólisis de los diferentes componentes, de los ácidos orgánicos esterificados a la hemicelulosa, y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina. Así mismo, los inhibidores se forman a partir de productos de degradación de los azúcares solubles y de la lignina (Lynd, 1996; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a, b). Por eso, y dependiendo del tipo de pretratamiento e hidrólisis utilizados, es necesario llevar a cabo la destoxicación de las corrientes que van a ser sometidas a fermentación. En la Tabla IV se condensan las principales características de los métodos de destoxicación más empleados para la obtención de bioetanol con base en la información compilada para hidrolizados de madera.

Luego del pretratamiento, la celulosa liberada es degradada hasta glucosa (sacarificación), lo cual puede hacerse con ácidos o enzimas (celulasas). La mayoría de las celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*, del cual se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas (Lynd *et al.*, 2002; Zhang y Lynd, 2004). Las primeras hidrolizan los enlaces  $\beta(1,4)$  de la cadena de celulosa a partir de los extremos no reductores o reductores liberando celobiosa o inclusive glucosa, mientras las endoglucanasas rompen estos mismos enlaces en forma aleatoria dentro de la cadena. Desafortunadamente, las celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa, por lo que se agrega  $\beta$ -glucosidasa de otra fuente para complementar la acción de las celulasas de este hongo. La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza

la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.

Las etapas de hidrólisis y fermentación se pueden realizar en forma secuencial (hidrólisis y fermentación separadas, SHF por sus siglas en inglés) o llevando a cabo en una sola unidad la hidrólisis y la fermentación al mismo tiempo (sacarificación y fermentación simultáneas; SSF). El microorganismo más utilizado para este proceso es *S. cerevisiae* que fermenta las hexosas presentes en el hidrolizado mas no las pentosas. La SSF muestra mayores rendimientos de EtOH y menores consumos energéticos, pero las temperaturas de operación no son óptimas para la hidrólisis y se requiere de mayores dosis de enzimas. Wyman *et al.* (1992) realizaron una evaluación de los rendimientos de alcohol a partir de diferentes materiales lignocelulósicos en procesos de SSF y de SHF por lotes a 37°C con diferentes dosis de enzima y tiempos de proceso de 7-8 días. La tusa de maíz, los tallos y hojas de maíz, la paja de trigo y el pasto llorón, en su orden, alcanzaron altas tasas de hidrólisis y altos rendimientos de EtOH durante la SSF; los diferentes tipos de madera pretratada estudiados mostraron conversiones similares de celulosa a EtOH y rendimientos ligeramente inferiores a los desechos de maíz, los cuales presentaron los mayores valores (92-94%).

South *et al.* (1993) llevaron a cabo ensayos de SSF en reactores por lotes adicionando celulasas a mezclas de madera dura y de álamo pretratadas con ácido diluido utilizando *S. cerevisiae*. La conversión de celulosa alcanzó a los 3 días valores de 91% y 96% para la mezcla de madera dura y de álamo, respectivamente. Se estudió también el comportamiento de un reactor CSTR para la SSF continua de la mezcla de madera dura alcanzando conversiones del 83% y concentraciones de EtOH de 20,6g-L-1 para tiempos de residencia de 2-3 días. Se ensayó además la conversión microbiana directa (DMC, por sus siglas en inglés) de celulosa utilizando *C. thermocellum* que produce celulasas y a la vez fermenta la glucosa hasta EtOH obteniendo mayores conversiones para tiempos de residencia de 0,5 días en comparación con la SSF continua.

Se ha explorado la producción de EtOH a partir de residuos sólidos urbanos (RSU). Se estima que más del 70% de los materiales enterrados en los rellenos sanitarios de EEUU son lignocelulósicos (papel, cartón, desechos de jardín, entre otros). El proceso de obtención de bioetanol a partir de estos residuos por hidrólisis ácida ya se ha patentado (Titmas, 1999) y se ha reportado que la compañía Masada Resource Group planea iniciar antes de 2006 la operación de la

primera planta productora de EtOH en EEUU a partir de RSU (Ames y Werner, 2003). Otro enfoque comprende la hidrólisis enzimática del almidón y la celulosa presentes en forma mayoritaria en los RSU de origen vegetal procedentes de plazas de mercado para su conversión posterior a EtOH (Cardona *et al.*, 2004), resultando difícil la conversión de la celulosa mas no la del almidón y verificándose la posibilidad de obtener alcohol a partir de estos residuos vegetales.

## Conclusiones

La posibilidad de obtener una fuente renovable de energía de fácil acceso, segura y efectiva es una de las metas que la humanidad debe alcanzar. El alcohol etílico obtenido por métodos biotecnológicos se constituye en una importante alternativa frente a los combustibles fósiles. La producción de EtOH a partir de caña de azúcar muestra los menores costos de producción, seguida por el proceso a partir de almidón de maíz. Finalmente, los costos del EtOH a partir de biomasa lignocelulósica siguen siendo elevados, razón por la cual no se ha puesto en funcionamiento hasta el momento una planta comercial que transforme esta materia prima. Sin embargo, muchos centros de investigación de diferentes países están adelantando estudios con miras a disminuir estos costos y llevarlos a niveles rentables para una operación industrial. La globalización del empleo del bioetanol requiere que la tecnología de su obtención a partir de biomasa sea desarrollada completamente. Esta necesidad de desarrollo es mucho más penitosa para aquellos países que, como los de Europa o Norte América, no poseen las condiciones agroecológicas requeridas para el cultivo de especies ricas en azúcares como la caña.

Colombia y otros países latinoamericanos presentan una situación privilegiada en este campo, al exhibir una gran disponibilidad de los tres tipos de materia prima analizados. Aunque la opción más lógica es la caña, se deben considerar los beneficios sociales que pueda tener el empleo de otros cultivos alternativos como la yuca o el maíz, o inclusive el aprovechamiento de una gran diversidad de residuos y desechos agrícolas típicos del trópico y de las actividades agroindustriales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (Colciencias), a la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales y a la Universidad de Caldas, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

TABLA IV  
MÉTODOS DE DESTOXIFICACIÓN DE HIDROLIZADOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA  
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Método	Procedimiento/Agentes	Fundamento	Ejemplos
<b>Métodos físicos</b>			
Evaporación	Evaporación, separación de fracciones volátiles y no volátiles y dilución de la fracción no volátil.	Los inhibidores volátiles son removidos del hidrolizado.	Hidroliz. de sauce: se debe reducir el contenido de ácido acético y compuestos fenólicos en la fracción no volátil; roto-evaporación; m.o. <i>S. cerevisiae</i> . Hidroliz. de aspen: aumento del rendimiento de alcohol de 0 a 93% del rendim. de la fermentación de referencia; m.o.: <i>Pichia stipitis</i> ; remoción de: ácido acético 54%, furfural 100%, vanillina 29%; roto-evaporación.
Extracción	Solventes orgánicos.	Los inhibidores se transfieren a la fase del solvente y son removidos con el extracto.	Hidroliz. de pinabete: dietil éter (solv.); rendimiento comparable con la fermentación de referencia; m.o. <i>S. cerevisiae</i> ; extracto etéreo contiene ácido acético, fórmico y levulínico, furfural, hidroximetil furfural (HMF); segunda extracción del extracto etéreo con solución de NaHCO <sub>3</sub> neutralizó el efecto inhibitorio de las fases resultantes. Hidroliz. de aspen: acetato de etilo (solv.); aumento del rendimiento de alcohol de 0 a 93% del rendim. de la fermentación de referencia; m.o.: <i>Pichia stipitis</i> ; remoción: de ácido acético 56%, furfural 100%, vanillina 100%, ácido hidroxibenzoico 100%. Hidroliz. de pino: acetato de etilo (solv.); principales inhibidores en el extracto - compuestos fenólicos de bajo peso molecular; m.o. <i>S. cerevisiae</i> .
<b>Métodos químicos</b>			
Neutralización	Ca(OH) <sub>2</sub> ó CaO, pH=6, luego filtración con membranas o adsorción.	Precipitación o remoción de compuestos tóxicos.	Hidroliz. ácido de algodón de desecho pretratado por pirólisis: rendimiento de etanol: <i>S. cerevisiae</i> 0,44 g/g, <i>Pichia</i> sp. 0,40 g/g; diferentes materiales adsorbentes (Yu y Zhang, 2003).
Destoxificación alcalina (alcalinización)	Ca(OH) <sub>2</sub> , pH=9-10,5, luego reajuste de pH hasta 5,5-6 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	Precipitación de compuestos tóxicos, inestabilidad de algunos inhibidores a pH altos.	Hidroliz. ácido de pinabete: rendimiento comparable con la fermentación de referencia, reducción de furfural y HMF del 20%. Hidroliz. de bagazo de caña pretratado por explosión a vapor: remoción de ácido acético, furfural y parte de compuestos fenólicos (Martín <i>et al.</i> , 2002). Hidroliz. ácido de algodón de desecho pretratado por pirólisis: rendimiento de etanol: <i>S. cerevisiae</i> 0,40 g/g, <i>Pichia</i> sp. 0,37 g/g; diferentes materiales adsorbentes después de alcalinizar (Yu y Zhang, 2003).
Destoxificación alcalina combinada	KOH, pH=10, luego reajuste de pH hasta 6,5 con HCl y adición de 1% de sulfito de sodio.	Disminución de cetonas y aldehídos, remoción de compuestos volátiles cuando se calienta el hidrolizado (90°C).	Hidroliz. de bagazo de caña; m.o.: <i>Pichia stipitis</i> . Hidroliz. ácido de pinabete; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> . Hidroliz. de sauce; m.o.: <i>Escherichia coli</i> recombinante.
Intercambio iónico	Resinas de base débil Amberlyst A20, regeneradas con amoníaco (Wooley <i>et al.</i> , 1999).	Remoción de inhibidores al quedar adsorbidos electrostáticamente a una resina de intercambio iónico.	Hidroliz. ácido de pinabete; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> ; remoción: de compuestos fenólicos >80%, ácidos levulínico, acético y fórmico casi 100%, furfural y HMF 70%; pérdidas considerables de azúcares fermentables. Hidroliz. ácido de álamo: m.o.: <i>Z. mobilis</i> recombinante; remoción: de ácido acético 88%, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100%; recuperación de azúcares 100% (Wooley <i>et al.</i> , 1999).
<b>Métodos biológicos</b>			
Destoxificación enzimática	Lacasa y peroxidasa de <i>Trametes versicolor</i> .	Oxidación enzimática; la lacasa remueve selectivamente los compuestos fenólicos de bajo peso molecular y los ácidos fenólicos, posiblemente por polimerización oxidativa.	Hidroliz. de sauce: aumenta la productividad de alcohol de 2 a 3 veces en comparación con hidrolizados no destoxificados; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> . Hidroliz. de bagazo de caña pretratado por explosión a vapor: remoción del 80% de los compuestos fenólicos (Martín <i>et al.</i> , 2002).
Destoxificación microbiana	<i>Trichoderma reesei</i> .	Degradación de inhibidores por el hongo; remoción de ác. acético, furfural y deriv. de ácido benzoico.	Hidroliz. de sauce pretratado por explosión a vapor: aumenta la productividad y el rendimiento de alcohol 3 y 4 veces respectivamente en comparación con hidrolizados no destoxificados; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> .

Observaciones: Fermentación de referencia se refiere a la realizada en un medio basado en glucosa y sin inhibidores; m.o. - microorganismo utilizado en la fermentación alcohólica. Adaptada de Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a.

#### REFERENCIAS

- Alvo P, Belkacemi K (1997) Enzymatic saccharification of milled timothy (*Phleum pratense* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bioresource Technol.* 61: 185-198.
- Ames J, Werner C (2003) *Reaching the environmental community: Designing an information program for the NREL biofuels program*. National Renewable Energy Laboratory. Golden, CO, EEUU. 93 pp.
- Ancillotti F, Fattore V (1998) Oxygenate fuels: Market expansion and catalytic aspect of synthesis. *Fuel Process. Technol.* 57: 163-194.
- Berg C (2001) *World Fuel Ethanol. Analysis and Outlook*. www.agra-europe.co.uk/FOLstudies/FOL-Spec04.html
- Berg C (2004) *World Fuel Ethanol. Analysis and Outlook*. www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html
- Braids O (2001) MTBE - panacea or problem. *Environ. Forensics* 2: 189-196.
- Cadoche L, López GD (1989) Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biol. Waste* 30: 153-157.
- Caicedo LA, Cuenca MM, Díaz M (2003) Escalado de la producción de etanol a nivel de planta piloto empleando un reactor con células inmovilizadas. En *XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química*. Bucaramanga, Colombia. pp. 43-46.
- Cannell MGR (2003) Carbon sequestration and biomass energy offset: theoretical, potential and achievable capacities globally, in Europe and the UK. *Biomass Bioenerg.* 24: 97-116.
- Cardona CA, Pisarenko Yu A, Serafimov LA (2000) DIPE as an alternative additive for motor fuel. *Sci. Technol. Hydrocarb.* 4: 72-73.
- Cardona C, Sánchez O, Ramírez J, Alzate L (2004) Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado. *Rev. Col. Biotechnol.* 6: 78-89.
- Chum HL, Overend RP (2001) Biomass and renewable fuels. *Fuel Process. Technol.* 71: 187-195.
- Claassen PAM, van Lier JB, López Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741-755.
- Coombs J (1996) *Bioconversion assessment study*. Science, Research and Development. EC, DG XII, Bruselas, Bélgica.
- Cuzens JC, Miller JR (1997) Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. *Renew. Energ.* 10: 285-290.
- Da Silva ACS, Vaz CM (1989) *Continuous process of optimized fermentation for the production of alcohol*. Patent US4889805.

- Dale BE, Leong CK, Pham TK, Esquivel VM, Ríos I, Latimer VM (1996) Hydrolysis of lignocellulose at low enzyme levels: Application of the AFEX process. *Bioresource Technol.* 56: 111-116.
- De Bari I, Viola E, Barisano D, Cardinale M, Nanna F, Zimbardi F, Cardinale G, Braccio G (2002) Ethanol production at flash and pilot scale from concentrated slurries of steam-exploded aspen. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41: 1745-1753.
- Doelle MB, Doelle W (1989) Ethanol production from sugar cane syrup using *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 11: 25-36.
- du Preez JC, de Jong F, Botes PJ, Lategan PM (1985) Fermentation alcohol from grain sorghum starch. *Biomass* 8: 101-117.
- Echegaray O, Carvalho J, Fernandes A, Sato S, Aquarene E, Vitolo M (2000) Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Biomass Bioenerg.* 19: 39-50.
- Ehnstroem LKJ (1984) *Fermentation method*. Patent US4460687.
- Esteghlalian A, Hashimoto AG, Fenske JJ, Penner MH (1997) Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technol.* 59: 129-136.
- FNB (2004) *ABC de los Alcoholes Carburantes*. Federación Nacional de Biocombustibles. www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf/0/6ac90c0c61c39de005257005004e2edc?OpenDocument
- Gil GH, Jones WJ, Tornabene TG (1991) Continuous ethanol production in a two-stage, immobilized/suspended-cell bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 390-399.
- Grote W, Rogers PL (1985) Ethanol production from sucrose-based raw materials using immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Biomass* 8: 169-184.
- Gulati M, Kohlman K, Ladish MR, Hespell R, Bothast RJ (1996) Assessment of ethanol production options for corn products. *Bioresource Technol.* 5: 253-264.
- Hari Krishna S, Prasanthi K, Chowdary G, Ayyanna C (1998) Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochem.* 33: 825-830.
- Hawgood N, Evans S, Greenfield PF (1985) Enhanced ethanol production in multiple batch fermentations with an auto-flocculating yeast strain. *Biomass* 7: 261-278.
- Heitz M, Carrasco F, Rubio M, Brown A, Chornet E, Overend RP (1987) Physico-chemical characterization of lignocellulosic substrates via autohydrolysis: an application to tropical woods. *Biomass* 13: 255-273.
- Hosein R, Mellows WA (1989) Malt hydrolysis of sweet-potatoes and eddoes for ethanol production. *Biol. Waste* 29: 263-270.
- Kaar WE, Gutiérrez CV, Kinoshita CM (1998) Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass Bioenerg.* 14: 277-287.
- Kosaric N, Velikonja J (1995) Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 111-142.
- Laser M, Schulman D, Allen SG, Lichwa J, Antal Jr MJ, Lynd LR (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technol.* 81: 33-44.
- López-Ulibarri R, Hall GM (1997) Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 398-404.
- Lynd LR (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 21: 403-465.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66: 506-577.
- Madson PW, Monceaux DA (1995) Fuel ethanol production. En Lyons TP, Kelsall DR, Murtagh JE (Eds.). *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido. pp. 257-268.
- Martín C, Galbe M, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B, Jönsson LJ (2002) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 274-282.
- McAloon A, Taylor F, Yee W, Ibsen K, Wooley R (2000) *Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks*. National Renewable Energy Laboratory Golden, CO, EEUU. 35 pp.
- Moniruzzaman M (1996) Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw. *Bioresource Technol.* 55: 111-117.
- Monte Alegre R, Rigo M, Joekes I (2003) Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysothile. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 751-757.
- Moreira J, Goldemberg J (1999) The alcohol program. *Energ. Policy* 27: 229-245.
- Murtagh JE (1995) Molasses as a feedstock for alcohol production. En Lyons TP, Kelsall DR, Murtagh JE (Eds.). *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press. Nottingham, RU. pp. 89-96.
- Nadim F, Zack P, Hoag G, Liu S (2001) United States experience with gasoline additives. *Energ. Policy* 29: 1-5.
- Nigam P, Singh D (1995) Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 770-778.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000a) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.* 74: 17-24.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.* 74: 25-33.
- Pandey K, Agarwal PK (1993) Effect of EDTA, potassium ferrocyanide, and sodium potassium tartarate on the production of ethanol from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 887-898.
- Papatheofanous MG, Billa E, Koullas DP, Monties B, Koukios EG (1998) Optimizing multisteps mechanical-chemical fractionation of wheat straw components. *Ind. Crop. Prod.* 7: 249-256.
- Poitrat E (1999) The potential of liquid biofuels in France. *Renewable Energy* 16: 1084-1089.
- Prakash R, Henham A, Bhat IK (1998) Net energy and gross pollution from bioethanol production in India. *Fuel* 77: 1629-1633.
- RFA (2005) *Homegrown for the homeland. Ethanol Industry Outlook 2005*. Renewable Fuels Association. www.ethanolrfa.org/outlook2005.html
- Rezzoug SA, Capart R (1996) Solvolysis and hydrotreatment of wood to provide fuel. *Biomass Bioenerg.* 11: 343-352.
- Rivers DB, Emert GH (1988) Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw. *Biol. Waste.* 26: 85-95.
- Rodríguez-Chong A, Ramírez JA, Garrote G, Vázquez M (2004) Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *J. Food Eng.* 61: 143-152.
- Rosillo-Calle F, Cortez L (1998) Towards Proalcohol II - a review of the Brazilian ethanol programme. *Biomass Bioenerg.* 14: 115-124.
- Rosillo-Calle F, Hall DO (1987) Brazilian Alcohol: Food versus Fuel? *Biomass* 12: 97-128.
- Sánchez OJ, Cardona CA (2005) Producción biotecnológica de alcohol carburante II: Integración de procesos. *Interciencia* 30: 679-686.
- Schell DJ, Farmer J, Newman M, McMillan JD (2003) Dilute-sulfuric acid pre-treatment of corn stover in pilot-scale reactor. Investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105: 69-85.
- Sheehan J, Himmel M (1999) Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnol. Prog.* 15: 817-827.
- Söderström J, Pilcher L, Galbe M, Zacchi G (2003) Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomass Bioenerg.* 24: 475-486.
- South CR, Hogsett DA, Lynd LR (1993) Continuous fermentation of cellulosic biomass to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39/40: 587-600.
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.
- Teixeira LC, Linden JC, Schroeder HA (1999) Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. *Renew. Energy.* 16: 1070-1073.
- Tengerdy RP, Szakacs G (2003) Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 169-179.
- Thomas V, Kwong A (2001) Ethanol as a lead replacement: phasing out leaded gasoline in Africa. *Energ. Policy* 29: 1133-1143.
- Titmas JA (1999) *Apparatus for hydrolyzing cellulosic material*. Patent US5879637.
- Wendhausen R, Fregonesi A, Moran P, Joekes I, Augusto J, Rodrigues R, Tonella E, Althoff K (2001) Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 48-52.
- Wheals A, Basso L, Alves D, Amorim H (1999) Fuel ethanol after 25 years. *TIBTECH* 17: 482-487.
- Winner Network (2002) *Village Level Bioenergy System Based on Sweet Sorghum*. www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224/loose.dtd/
- Wooley R, Ruth M, Sheehan J, Ibsen K, Majdeski H, Gálvez A (1999) *Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis. Current and futuristic scenarios*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, EEUU. 123 pp.
- Wyman CE, Spindler DD, Grohmann K (1992) Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass Bioenerg.* 3: 301-307.
- Yu Z, Zhang H (2003) Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. *Biomass Bioenerg.* 24: 257-262.
- Zhang YHP, Lynd LR (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol. Bioeng.* 8: 797-882.