

El papel de los hongos degradadores de celulosa presente en el bagazo de caña de azúcar como alternativa industrial en la producción de bioetanol de segunda generación

Serrano, S., Cortés O. , Charris I.!

RESUMEN

En el mundo los residuos vegetales son el recurso renovable más grande que existe y están compuestos en su mayor parte por celulosa y hemicelulosa, sustancias que son degradadas por microorganismos. En Colombia se conoce poco acerca de la biodiversidad microbiana y su función en la naturaleza. Teniendo en cuenta lo expuesto, en el presente artículo, abordaremos los diferentes tipos de biocombustibles como alternativas para sustituir los derivados de petróleo y residuos agroindustriales, generalidades de la caña de azúcar y la importancia del bagazo en Colombia, materiales lignocelulósicos y enzimas degradadoras, microorganismos degradadores de la celulosa.

Palabras claves: Hongos degradadores, caña de azúcar, celulosa, *Trichoderma Reesei*, bioetanol.

Recibido: Septiembre 2018 - Aceptado: Noviembre 2018

¹ Universidad Libre Barranquilla, Programa de Microbiología.

The role of degrading fungi cellulose present in bagazo de caña de sugar as an industrial alternative in la production of bioethanol of second generation

ABSTRACT

In the world, plant waste is the largest renewable resource that exists and is composed mostly of cellulose and hemicellulose, substances that degrade microorganisms. In Colombia, little is known about microbial biodiversity and its role in nature. Taking into account the above, in this article, addressing the different types of biofuels as alternatives to replace oil derivatives and agroindustrial waste, generalities of sugarcane and the importance of bagasse in Colombia, lignocellulosic materials and degrading enzymes, microorganisms cellulose degraders and the different methods currently used to obtain bioethanol.

Keyword: Degradation fungi, sugarcane, cellulose, *Trichoderma Reesei*, bioethanol.

INTRODUCCIÓN

La disminución de las reservas de petróleo junto con el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) ha dado lugar a un creciente interés en buscar alternativas que eviten el deterioro del planeta. De ahí parte la idea de reemplazar los combustibles fósiles por otros más limpios. Sin embargo, la utilización de estos biocombustibles ha provocado “un fuerte debate con respecto a la seguridad alimentaria” ya que las materias primas utilizadas para su producción hacen parte de cultivos alimentarios (biocombustibles de primera generación), generando un impacto negativo en la economía de muchos países¹. La producción de bioetanol a partir de residuos vegetales (biocombustibles de segunda generación), se considera como una buena opción teniendo en cuenta su disponibilidad, bajo costo, alto potencial para su procesamiento en producción de etanol y no compite con el mercado alimentario.²

En el mundo, los residuos vegetales son el recurso renovable más grande que existe y está compuesto en su mayor parte por celulosa. Esta molécula forma el 40- 60 % de la pared celular de las plantas. Su forma nativa consiste en una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosúricos β - 1,4. Por lo que constituye una abundante fuente de carbono limitada a los microorganismos capaces de hidrolizar este enlace, a expensas de un complejo sistema de enzimas denominadas celulosoma o enzimas celulíticas.³

Colombia presenta un gran sector azucarero ubicado en el valle geográfico del río Cauca,

en esta región hay 225 560 hectáreas y cada año genera 6 millones de toneladas de bagazo de caña de azúcar (producto del procesamiento de la caña).⁴ La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), es una planta que pertenece a la familia de las poáceas gramíneas, proveniente del sureste asiático y Nueva Guinea e introducida en países como Colombia por los españoles. Su cultivo y explotación genera grandes cantidades de residuos vegetales de difícil degradación en el ambiente⁵.

GENERALIDADES

BIOETANOL

Es aquel biocombustible que viene de un origen vegetal producido por la fermentación de la glucosa, es utilizado en motores como un sustituto de la gasolina, puede ser producido por medio de la fermentación a partir de la celulosa. Las fuentes de glucosa que más se utilizan son grano de maíz, caña de azúcar, celulosa de la madera, sorgo, patatas, trigo y algunos residuos vegetales⁶.

Generar bioetanol con productos agrícolas tiene como ventaja fácil almacenamiento y producción. Es una fuente de combustible renovable, ayuda a la no contaminación del medio ambiente y con su producción ayuda a que se reduzcan los residuos⁷.

El bioetanol puede usarse como biocombustible único, mezclado con gasolina en diferentes proporciones o también puede emplearse como un aditivo de la misma en forma de etilterbutil éter (ETBE), que es un derivado del petróleo.

Existen distintos tipos de biocombustibles diferenciados por las materias primas desde la cual se producen. Se definen entonces aquellos de primera, segunda y tercera generación.⁸

BIOCOMBUSTIBLE DE PRIMERA GENERACIÓN

Los biocombustibles de primera generación se producen directamente de cosechas que pueden destinarse a la alimentación humana o del ganado, y por lo tanto su producción es muy polémica teniendo en cuenta los millones de personas en el mundo que mueren por hambre.⁹ Esta generación de biocombustibles es la más estudiada y desarrollada por países productores como EEUU, Brasil, Argentina.

BIOCOMBUSTIBLE DE SEGUNDA GENERACIÓN

Los combustibles de segunda generación también se conocen con el nombre de biocombustibles avanzados¹⁰. Lo que les diferencia de los de primera generación es el hecho de que la materia prima usada para su producción no son cosechas que pueden destinarse para alimentación en primera instancia¹¹. También se diferencia en que se cultivan aprovechando áreas marginales improductivas en cultivos para alimentación y que no se requiere agua o fertilizantes para su cultivo¹².

Las fuentes principales de los biocombustibles de segunda generación contienen gran cantidad de lignina y celulosa, por lo que necesita procesos previos a su fermentación.¹³

BIOMASA Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

La biomasa es toda sustancia orgánica renovable de origen tanto animal como vegetal¹⁴. La energía de la biomasa proviene de la energía que almacenan los seres vivos. En primer lugar, los vegetales al realizar fotosíntesis utilizan la energía del sol para formar sustancias orgánicas¹⁵. Después los animales incorporan y transforman esa energía al alimentarse de las plantas. Los productos de dicha transformación pueden utilizarse como recurso energético¹⁶.

Mundialmente solo se utiliza el 7% de la biomasa producida y otros son quemados e incorporados al suelo.¹⁷ La biomasa de las plantas es un material crudo común y reproducible. Su enorme cantidad se acumula cada año, y su valor calórico total es tan alto como aquel de la producción anual de petróleo, gas y carbón.¹⁸ No obstante, se habla de que la pared celular de las plantas esta compuestas por estructuras complejas, algunos de los compuestos de la pared celular y la matriz son tridimensional que se entrelaza por los polisacáridos, la lignina y los compuestos fenólicos, estos compuestos limitan la digestión de la pared celular por los microorganismos, sin embargo, algunos microorganismos actúan sobre compuestos específicos para degradar celulosa, hemicelulosa y lignina¹⁹.

CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar pertenece a la familia de las gramíneas y al género *Saccharum*, está constituida por jugo y fibra. La fibra es la parte soluble en agua y está formada

principalmente por celulosa, la cual, a su vez, está constituida por azúcares sencillos como glucosa (Dextrosa)²⁰.

IMPORTANCIA DE BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR.

Colombia es uno de los países del mundo privilegiado en el sector azucarero por contar con las mejores características biofísicas para la producción de caña de azúcar. Este sector azucarero se encuentra ubicado en 5 departamentos. Cauca, Risaralda, Caldas, Quindío y Valle del Cauca, en esta última se encuentra uno de los clúster agroindustriales más importantes del país, donde se producen aproximadamente 24 millones de toneladas de caña de azúcar al año.²¹

El residuo más importante derivado del procesamiento de la caña de azúcar luego de que es prensada para extraer la sacarosa es el bagazo, éste representa el 30% de la caña molida donde para el año 2015 los ingenios del Valle del Cauca generaron 7 261 526 toneladas²².

El bagazo es uno de los desechos más generados, habitualmente es utilizado en las molineras como combustible para generar una limitada fuente de energía. En base al estudio realizado por “The Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology” (EMPA) de Suiza, el Centro Nacional de Producción Más Limpia y Tecnologías Ambientales de Medellín (CNMPL) y la Universidad Pontificia Bolivariana (sede Medellín), indican que el bioetanol colombiano a partir de caña de azúcar es más eficiente que otros cultivos en el almacenamiento de energía proveniente de la radiación solar²³. La caña de azúcar

almacena esta energía en forma de biomasa, liberando 40 toneladas de oxígeno hacia la atmósfera y fijando 60 toneladas de dióxido de carbono. Es así como la producción de bioetanol con base en caña de azúcar tiene un mejor desempeño medioambiental que el alcohol elaborado a partir de otras materias primas.²⁴

MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS CELULOSA

La celulosa es una biomolécula con un grado alto de polimerización y elevado peso molecular, es una parte fundamental de las paredes de las células vegetales, formada por repetición de unidades de anhídrido glucosa (β -D-glucopiranososa) que se unen por medio de un enlace glicosídico entre el carbono 1 y 4 de la molécula siguiente en la cadena.²⁵

La celulosa es el compuesto más abundante en la naturaleza, constituye una fuente de glucosa prácticamente inagotable que se renueva de forma continua mediante la fotosíntesis, la descomposición de estos carbohidratos tiene una importancia en el ciclo del carbono, consecuentes de los microorganismos del suelo que catalizan la hidrólisis del material vegetal (40-60% de los desechos de plantas), que producen energía desde este hasta la formación de CO₂ y su liberación en la atmósfera. Los microorganismos juegan un papel importante, tanto así que el cambio de números de estos puede cambiar la materia orgánica del suelo.²⁶

DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

Las paredes vegetales comprenden una matriz hidratada, que contiene una fase

organizada de fibrillas de celulosa, la cual están concentradas en una matriz constituida por glucanos y pectinas, que pueden pertenecer a paredes celulares de dicotiledóneas y la mayoría de ellas que están constituidas de monocotiledóneas de paredes tipo I o de las gramíneas de tipo II. Existe un consorcio de enzimas microbianas, que actúan conjuntamente en la hidrólisis enzimática de celulosa y hemicelulosa, que conforman principalmente las paredes vegetales. Las celulosomas, Endoxilasas y poligalacturosanas son las más investigadas²⁷.

ENZIMAS DEGRADADORAS DE CELULOSA

Para la degradación de la celulosa se debe tener en cuenta la susceptibilidad de hidrólisis enzimática ya que está afectada significativamente por los rasgos estructurales de los materiales celulósicos. La hidrólisis de celulosa a glucosa necesita la combinación de múltiples enzimas con diferencias específicas de sustrato, la celulosa es atacada primero por la endoglucanasa, operando al azar sobre las microfibrillas en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosídicos, creando múltiples sitios de ataque para las exo-1,4 β -D-glucanasas, actuando sobre los extremos no reductores de la cadena fragmentando una unidad de celobiosa (disacáridos).⁷ Existe una cooperación continuada entre la acción de ambas enzimas y la de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros, produciéndose así moléculas de glucosa²⁸.

MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CELULOSA HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos son un grupo diverso que usualmente se conoce con el nombre de “mohos”, Es común observarlos en alimentos en descomposición y sobre detritus. Su estructura está descrita como un agregado de hilos ramificados (hifas) las cuales se organizan para dar soporte a los procesos de producción y diseminación de esporas.⁸ La mayoría de las especies de hongos prosperan en condiciones cálidas con valores cercanos a los 25 °C, ambientes dulces con presencia de azúcares en el medio, condiciones ácidas prefiriendo valores entre 4 y 6 y atmósferas aeróbicas.⁹ Estos organismos son utilizados en una gran cantidad de procesos industriales, como producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, pigmentos, lípidos, entre otros. Principalmente el uso de hongos filamentosos se destaca en la producción de enzimas y secreción de enzimas hidrolíticas.²⁹

TRICHODERMA REESEI

El microorganismo celulolítico más extensamente estudiado a escala preindustrial para la degradación de celulosa, ha sido el hongo aerobio y mesofilo *Trichodenna reesei*. Se aisló en 1944 en la isla de Bougainville (Nueva Guinea), dentro de una prospección realizada por el cuerpo científico del Ejército de los Estados Unidos, que estudiaba la alarmante degradación de los tejidos de algodón (tiendas, vestimenta, cordajes) en las unidades desplegadas en el Pacífico Sur. Inicialmente se clasificó como *T. viride*.

E. Simmons consideró que se trataba de una nueva especie, y la bautizó en 1977 con su denominación actual, en honor de Elwyn T. Reese, pionero en el estudio de las celulasas junto con su colaboradora Mary Mandeis; ambos seleccionaron este hongo, entre 14000 microorganismos, por su extraordinaria capacidad celulolítica.^{30, 31, 32}

Trichoderma reesei es uno de los más estudiados y se caracteriza por su efectividad en la degradación de la celulosa nativa y cristalina mediante su complejo celulolítico que presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa). Otra ventaja que presenta el uso de este microorganismo es su estabilidad en reactores agitados bajo condiciones de pH ácido y a 50 °C durante 48 horas³³.

OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CELULOSA FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso metabólico de algunos hongos que transforman compuestos químicos orgánicos en azúcares y otras sustancias como el etanol para producir energía.³⁴

Algunos de los organismos que se usan para la fermentación deben ser capaces de crecer rápidamente en el sustrato y ambiente adecuado, y de cultivarse fácilmente en grandes cantidades, mantener constancia fisiológica bajo las condiciones de cultivo y producir con abundancia las enzimas esenciales para que ocurran los cambios deseados, los microorganismos

que predominan en la fermentación para la producción son principalmente miembros del género *Saccharomyces*.³⁵

HONGO FERMENTADOR

Saccharomyces cerevisiae es la especie utilizada por excelencia para la obtención de etanol por medio del proceso fermentativo a nivel industrial debido a su fácil manipulación y recuperación. Tolera concentraciones elevadas de etanol, es osmotolerante y utiliza altas cantidades de azúcares.³⁶

El bioetanol es el producto del metabolismo anaerobio de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo este parte de su metabolismo energético con unos requerimientos nutricionales como son el: carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, elementos traza, potasio, magnesio entre otros.³⁷

Saccharomyces cerevisiae utiliza la vía de la glicólisis para convertir la glucosa en etanol. Cada molécula de hexosa se convierte en piruvato, obteniendo una producción neta de 2 ATP a partir de ADP + Pi y dos moléculas de NAD se reduce a NADH.³⁸

CONCLUSIONES

Actualmente el mundo busca incorporar de la forma más rápida diferentes materias primas tales como: caña de azúcar, soya, maíz, colza, remolacha, etc., a la producción de biocombustibles como substitutos perfectos de los derivados de petróleo. En Colombia la disponibilidad de la tierra para agricultura es mucho mayor que en otros países, por eso se acopla a este objetivo

para realizar esfuerzos tecnológicos para el desarrollo e implementación de desechos agroindustriales en la industria de biocombustibles.³⁹

El aprovechamiento de hongos con actividad celulítica representa una de las opciones con mayor viabilidad en la solución de esta problemática, su capacidad de degradar la sólida estructura de celulosa a azúcares mono y disacáridos sin producir inhibidores, resaltando además aspectos de interés económico y ambiental, como bajo consumo energético, bajos costos de inversión, empleo de reactivos baratos, eficientes, reciclables y aplicables e igualmente efectivos en diferentes clases de sustrato, y es ahí, como microbiólogos nos debemos innovar esas técnicas en el procesamiento de la biomasa.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la producción de etanol es su competencia con el uso de la tierra para la producción de alimentos, se debe impulsar estudios a la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, haciendo usos de los hongos degradadores de celulosa, presentando una mayor alternativa para la sustitución progresiva de los combustibles fósiles.

Trichoderma reesei se destacan entre las más utilizadas por su viabilidad y menor costo en la degradación de celulosa y hemicelulosa, componentes que hace parte de la estructura del bagazo de la caña. Debido a la maquinaria enzimática presente en este microorganismo, puede ser utilizado para la obtención de azúcares fermentables y posterior proceso de producción de un combustible con menos emisión de gases

que causan el efecto invernadero. Y a su vez contribuir en bajar los índices de desechos agroindustriales causantes de contaminación ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Villar J. Consideraciones sobre la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar.2008. Pp 8-17
- 2 Zambrano P, Rivera RD, Guzmán AM, Rondón AJ, Laurencio M, Pérez A. Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. 2015 (36) 1.pp. 7-16
- 3 Asocaña. Informe Anual. 2013.pp 173
- 4 Ulloa J. Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Santiago de Chile: Universidad de Chile.2014
- 5 Quintero J, Quintero. Perspectivas del potencial energético de la biomasa en el marco global y latinoamericano. Gestión y Ambiente. 2015, 18 (1): 179-188
- 6 Jaimes J, Lopez R. Biomasa y abundancia de Copepoda (Crustacea) en aguas superficiales del océano Pacífico colombiano durante septiembre de 2007. Revista de biología marina y oceanografía. 2014, 49(1): 31-41
- 7 Asocaña. El Sector Azucarero Colombiano, mas que azúcar, una fuente de energia renovable.2015

- 8 Badui D, Química de los Alimentos. 4a ed. México: Pearson Educación; 2006.p. 78-80
Kavanagh K. Fungi biology and applications. 2005. P.267
- 9 Walker G and White N. Introduction to fungal physiology.2005, pp 1-34
- 10 Sanchez S, Alarcón K, Ferrera A, Sanchez C, Cruz J. Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental. 2015, 31(1): 23-37
- 11 Simmons EG. *Trichoderma reesei*. International Mycological Congress. 1977.p-618.
- 12 Carballo F. Microbiología Industrial: Microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia. 2000, p. 20-31
- 13 Nelson D and Cox MM. Principles of Biochemistry. 5ed New York: Freeman.2008
- 14 Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, Nikawa J and Shimizu K. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. Bioeng.1998 (86) :284-289.
- 15 Aimaretti N, Canesini M, Diruscio I, Martins L. Agregado de valor: un diagnóstico preliminar.2016
- 16 Agency IE. World Energy Outlook. International Energy Agency. 2012.1-2.
- 17 Aragon G. Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente. Disponible es: <http://www.aragon.en>
Bacterias Autóctonas De Manabí-Ecuador Con Actividad Celulolítica. 2015. (36) pp. 7-16
- 18 Benz J, Protzko RJ, Andrich JM, Bauer S, Dueber JE, Somerville CR. Identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. Biotechnol Biofuels. 2014 7(1):20
- 19 Cavka, A, Alriksson, B, Rose, SH, et al. Production of cellulosic ethanol and enzyme from waste fiber sludge using SSF, recycling of hydrolytic enzymes and yeast, and recombinant cellulase-producing *Aspergillus niger*.2014
- 20 Cardona CA, Sanchez OJ, Montoya MI, Quintero JA. Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. Sci. Tech. 2005 (28). pp. 187-192
- 21 Cardona A, Sánchez J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. Bioresour Technol. 2007(12): 2415-2457
- 22 Cárdenas V, Gómez M, Padilla L. Ddegradación de celulosa y producción de etanol a partir del aserrín de guadua utilizando el sistema biológico (*Aspergillus niger* - *Saccharomyces cerevisiae*). Siquia. 2009.
- 24 Razo C, Astete-Miller S, Saucedo A, Ludeña C. Biocombustibles y su impacto

- potencial en la estructura agraria, precios y empleo en América Latina. 2007.
- 25 Martínez C, Valverde ME, Paredes O. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *ide@s concyteg*. 2009 (54). pp. 1246–1270
- 26 Delfín A, Durán C. Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 2003 (19) 1.pp. 37–45
- 27 Gaitán D, Pérez L. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo *Dentranthema grandiflora*. 2007.p. 114
- 28 Departamento Nacional de Planeación DNP – DDRS. Política para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad-conpes 3697
- 29 Zambrano P, Rivera RD, Guzmán AM, Rondón AJ, Laurencio M, Pérez A. Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. 2015 (36) 1.pp. 7–16
- 30 Cataño EH. Obtección y Caracterización de Nanofibras de Celulosa a partir de desechos Agroindustriales. 2009.p.30
- 31 Proyecto SICA, Banco Mundial. Indicadores de laZafra Ecuador. Disponible en:www.sica.gov.ec/cadenas/azucar/docs/indicadores.htm
- 32 Serna F, Barrera L, Montiel H. Impacto Social y Económico en el uso de Biocombustibles. *J. Technol. Manag. Innov* 2011 (6)1.pp. 100–114
- 33 Ortega GM, Carbajal A, Bueno G, Betancourt D, Álvarez I and González AL. Biotransformacion de residuos lignocelulosicos con Hongos *Pleurotus*. *Rev. CENIC Ciencias Biol*. 2005 (36). p. 1
- 34 Canché E, De los Santos JM, Andrade-Canto S, Gómez R. Obtención de celulosa a partir de los desechos agrícolas del Banano. 2005 (16). pp. 1–8
- 35 Gutiérrez L, Perez J, Uribe M. Evaluación in vitro de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*. *Arch Med* 2013.
- 36 Vázquez H and Dacosta O. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ing. Investig. y Tecnol*. 2007.pp. 249–259
- 37 Monta H. Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de Moringa Oleífera. 2014
- 38 Hugot E. Manual para ingenieros azucareros. Edición Revolucionaria. 2010. Pp 803
- 39 Maeda RN, Barcelos CA, Anna LM, Pereira N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by

- fed batch operation. *J Biotechnol Elsevier*. 2013 163(1):38–44
- 40 Lee R, Paul J, Willem H. *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002 (66) pp. 506–577
- 41 Monsalve JF, Medina V and Ruiz C. Ethanol production of banana shell and cassava starch. *Dyna*. 200 (150) pp. 21–27
- 42 Zhang Y and Lynd L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed
- 43 Ossa JA, Vanegas MC, Badillo AM. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* Rev. U.D.C.A. 2010. pp. 97–104
- 44 Benítez LT, Tovar CT, Ortiz AV, Dunoyer AT, Alvear M, Castillo C, et al. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Rev. Educ. en Ing.* 2010. pp. 120–125
- 45 Montoya MI, Quintero JA, Sánchez OJ, and Cardona CA. Evaluación económica del proceso de obtención de alcohol carburante a partir de caña de azúcar y maíz. *Revista Universidad EAFIT*. 2012 (139): 76–87
- 46 Mora J, Garzon E. Analysis of grasses of the farm livestock garcia abajo in corinto 2014.
- 48 Fonseca NA. Obtención de etanol por la fermentación alcohólica del hidrolizado enzimático del bagazo de caña de azúcar. *Esc. Ing. Química*. 2007
- 49 Sanchez J and Cardona CA. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*. 2005. pp. 671–678
- 50 Ramírez P, Cocha JM. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista peru biol*. 2003. pp. 67–77, 2003