

Producción de bioetanol empleando fermentación tradicional y extractiva a partir de jugo de fique

Bioethanol production employing traditional and extractive fermentation from fique juice

Oscar Vasco-Echeverri*†, Margarita Ramírez-Carmona*, Yesid Vélez-Salazar*, María Giraldo-Ramírez*

RESUMEN

El fique (*Furcraea* sp.) es una planta nativa de Colombia, de la cual se extrae sólo un 4% de fibra natural y el otro 96% lo componen el jugo y los bagazos. El jugo de fique contiene aproximadamente 9,71, 28,74 y 13,51 g/L de sacarosa, fructosa y glucosa respectivamente, azúcares que son aprovechados por algunos microorganismos para la producción de bioetanol. En este trabajo se realizó la fermentación alcohólica empleando dos microorganismos seleccionados, *Clavispora lusitaniae*, aislada del jugo de fique, y *Saccharomyces cerevisiae*, durante 48 h, a 25°C y a un pH de 4,4, obteniéndose 10,68 g/L y 5,26 g/L de bioetanol respectivamente. La temperatura más adecuada para realizar el proceso fermentativo de jugo de fique fue de 30°C, obteniéndose 12,3 g/L de bioetanol con *Clavispora lusitaniae* a las 48 h de fermentación, produciéndose un 103% más bioetanol que la obtenida con *Saccharomyces cerevisiae*. En la fermentación extractiva empleando *Clavispora lusitaniae* durante 48 h a 30°C y a un pH de 4,4, se obtuvieron 7,87 g/L de bioetanol, 6,75 g/L en la fase acuosa y 1,12 g/L en la fase oleosa, un 35% menor que al utilizar fermentación tradicional.

Palabras claves

Bioetanol, jugo de fique, fermentación alcohólica, fermentación extractiva.

ABSTRACT

Fique (*Furcraea* sp.) is a native plant from Colombia. Only 4% of natural fiber is extracted from it, while the other 96% is constituted by juice and bagasse. Fique juice contains about 9.71, 28.74 and 13.51 g/L of sucrose, fructose and glucose respectively, all of which are used by some microorganisms in bioethanol production. Alcoholic fermentation was carried out during 48 h, at 25°C and pH 4.4, by means of two selected microorganisms: *Clavispora lusitaniae*, isolated from fique juice, and commercial *Saccharomyces cerevisiae*; 10.68 g/L and 5.26 g/L of bioethanol were achieved respectively. The most suitable temperature to perform the fique juice fermentation process was 30°C, resulting in 12.3 g/L of bioethanol with *Clavispora lusitaniae*

after 48 h of fermentation, which produced 103% more bioethanol than the produced with *Saccharomyces cerevisiae*. During the extractive fermentation using *Clavispora lusitaniae* at 48 h at 30°C and pH 4.4, 7.87 g/L of bioethanol were obtained, 6.75 g/L in water phase and 1.12 g/L in oil phase, which represents 35% less in comparison to traditional fermentation.

Key Words

Bioethanol, fique juice, alcoholic fermentation, extractive fermentation.

INTRODUCCIÓN

El bioetanol es uno de los combustibles renovables más importantes que contribuye con la disminución

*Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Facultad de Ingeniería Química, Centro de Estudios y de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), Medellín, Colombia. †Contacto: oscar.vasco@upb.edu.co
Recepción: 10-15-2013. Aceptación: 08-06-2014.

de los gases de efecto invernadero generados en el mundo por la utilización de combustibles fósiles. Sin embargo, la producción de bioetanol por medio de la fermentación tradicional se ha visto cuestionada por el requerimiento energético en la separación agua-etanol, dando paso a que algunos gobiernos revisen los subsidios de esta industria para hacerlo más competitivo con la gasolina.¹ El bioetanol es el producto de la fermentación anaerobia de azúcares provenientes de campos de cosecha, entre los que se destacan el maíz, la caña de azúcar, la papa, la yuca, la cebada, entre otros,² productos empleados principalmente para el consumo humano, generando el incremento de los precios y la escasez de reservas alimenticias.³

El fique es una planta no alimentaria la cual crece de los 1.300 m a los 2.800 m sobre el nivel del mar, es desértica y no necesita de riegos especiales. Esta planta tiene una importancia socio-económica en Colombia debido a la fibra natural extraída de esta, que se utiliza para la elaboración de ropa, cuerdas, costales, hamacas y muchas otras aplicaciones. En la obtención de la fibra se realiza el proceso de desfibrado, en el cual se generan residuos como el bagazo de fique y el jugo de fique que corresponde cerca del 96%.⁴ El jugo de fique es una suspensión con características variables, dependiendo de la edad de la planta, la estación del año y la fertilidad del suelo, es de color verde ocre y corrosivo, está formado por agua (85%), celulosa (6%), materia orgánica (8%) compuesta por clorofila, azúcares, carotenoides, saponinas, sapogeninas, esteroides, ácidos orgánicos, alquitranes, flavonoides, lignina, lipoides, urea, nitrógeno y minerales como el calcio, fósforo y potasio que lo convierte en un insumo industrial que se puede utilizar para la producción de bioetanol.⁵ En Colombia cerca de 85 millones de litros de jugo de fique son desechados en el campo, contaminando receptores de agua, debido al incremento de la demanda química de oxígeno.⁴ De esta forma, el jugo de fique representa un desecho industrial contaminante que debe recibir un tratamiento físico y químico para su vertimiento, o puede ser utilizado como materia prima para la fabricación de bioetanol, jabones o esteroides generando un valor agregado al residuo.

La fermentación extractiva es una técnica alternativa para la reducción en los costos, comparada a la fermentación tradicional que emplea un solvente extractor apolar afín a uno de los componentes

de la solución acuosa. Para la producción de bioetanol empleando la fermentación extractiva y glucosa, Boudreau y Hill, utilizaron ácido oleico como solvente extractor, generando un bajo gasto energético sin presentar toxicidad para la levadura.⁶ El coeficiente de partición indica la capacidad de un solvente para atrapar un soluto determinado, y la longitud de la cadena carbonada del ácido carboxílico utilizado tiene una relación inversamente proporcional al coeficiente de partición y a la toxicidad de éste sobre la levadura. Se encontró que el ácido valérico presenta un coeficiente de distribución de 1,10, mientras que el ácido oleico presenta un coeficiente de distribución de 0,069, lo que indica que su capacidad de extracción de bioetanol se reduce a medida que se incrementa el número de carbonos de la cadena del ácido carboxílico aunque es menos tóxico para la levadura.⁶

Con la realización de este trabajo se propone como alternativa la producción de bioetanol a partir de jugo de fique. Con esta propuesta se plantea ayudar a solventar las necesidades actuales en la industria de biocombustibles a partir de un residuo contaminante, que no es explotado en este campo y que no compite con la industria de alimentos ni la agricultura, debido a que no necesita de siembras en suelos para tal fin. Además se genera un valor agregado a un residuo industrial y el costo del producto sería mucho más económico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustrato

El jugo de fique se obtuvo de la Vereda El Pantanillo del Municipio de Barbosa, Antioquia. Se transportó en recipientes plásticos expandibles refrigerados y se conservó en el mismo recipiente a -18°C durante un tiempo máximo de 8 días.

Caracterización del jugo de fique

Al jugo de fique fresco se le determinó el pH, los sólidos totales, las cenizas, la humedad y la DQO siguiendo métodos normalizados.^{7,8} Además se determinó el DBO_5 utilizando un equipo de biodegradabilidad Sistema OxiTop 115 WTW con 100 mL de medio de cultivo y 1,5 mL de inóculo y se midió la caída de presión durante 5 días. La glucosa, fructosa, saca-

rosa y bioetanol fueron cuantificados empleando un HPLC (Shimadzu, prominence) con una columna IC Pack Ion-exclusión 3,8 mm x 300 mm, fase móvil ácido sulfúrico 0,005N, detector RID en modo isocrático a 25°C, un flujo de 0,6 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL. Los metales pesados se cuantificaron por espectrofotometría de absorción atómica.

Medio de cultivo

El medio de cultivo se preparó con jugo de fique fresco adicionando algunas sales y nutrientes: 5 g de extracto de levadura, 5 g de fosfato de potasio dibásico, 0,7 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 1,5 g de cloruro de amonio, 1,2 g de cloruro de potasio en 1 L de jugo de fique.⁷ Luego se esterilizó en autoclave a 15 bares y 121°C por 15 minutos.

Microorganismos

Los microorganismos empleados en este trabajo fueron, la *Clavispora lusitanae*, aislada del jugo de fique sobre agar sabouraud y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* del cepario del grupo CIBIOT de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB). Los microorganismos fueron liofilizados y conservados durante un periodo inferior a 3 meses. Posteriormente se reactivaron en cajas de Petri utilizando agar jugo de fique (agar sabouraud modificando la fuente de carbono por jugo de fique) en incubadora a 25°C. El inóculo se preparó adicionando 10 mL de una solución de tween 80 a las cajas de Petri, garantizando una concentración de 3×10^7 células mL⁻¹.

Fermentación alcohólica tradicional

La fermentación alcohólica se realizó empleando *Clavispora lusitanae* y *Saccharomyces cerevisiae* en un Bioreactor de 3 L (New Brunswick Scientific, BioFlo 110), controlando la temperatura de 25°C, un valor de pH de 5,5 y una agitación de 200 rpm utilizando un impeller tipo rushton y un 10% de inóculo del volumen de medio de cultivo, durante 48 h.

Fermentación alcohólica extractiva

La fermentación se realizó empleando *Clavispora lusitanae* previo estudio de la temperatura operacional (25°C, 30°C y 34°C), empleando el mismo sistema y las condiciones operacionales de la fermentación tradicional con adición de ácido oleico al 33%, durante 48 h. Las muestras de las fermentaciones fue-

ron tomadas cada 24 h y centrifugadas a 6.000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se filtró mediante una membrana de 0,45 µm y se llevó HPLC para la medición de azúcares y etanol.

RESULTADOS

En la caracterización del jugo de fique se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 1**.

Luego de caracterizar el jugo de fique se realizaron ensayos para la producción de bioetanol con los dos microorganismos preseleccionados, *Clavispora lusitanae* aislada del jugo de fique y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida del cepario de la UPB, a una temperatura de 25°C+/-2°C como se muestra en la **Figura 1**.

Luego de seleccionar la *Clavispora lusitanae* como microorganismo para la producción de bioetanol empleando jugo de fique como fuente de carbono, se evaluaron diferentes temperaturas como se muestra en la **Figura 2**.

Los resultados de la fermentación extractiva empleando *Clavispora lusitanae* durante 48 h a 30°C y a un pH de 4,4 se pueden observar en la **Figura 3**.

Tabla 1. Caracterización físico-química del jugo de fique.

Parámetro	Valor
pH	4,25
Sólidos totales (g/L)	68,8
Cenizas (%)	1,34
Humedad (%)	91,05
Fructosa (g/L)	28,74
Glucosa (g/L)	13,51
Sacarosa (g/L)	9,71
DBO ₅ (mg/L de O ₂)	11.780
DQO (mg/L de O ₂)	86.600
Ca (mg/L)	1.226
Mg (mg/L)	141
Zn (mg/L)	1
Fe (mg/L)	10

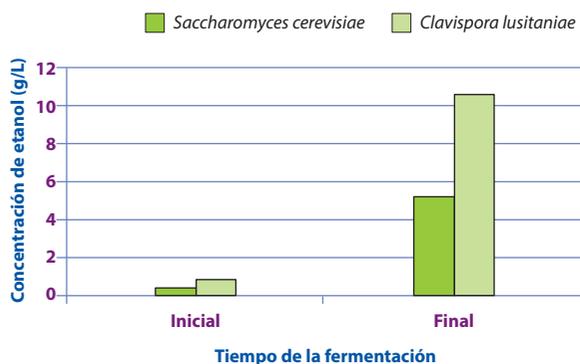


Figura 1. Evaluación de la producción de bioetanol utilizando *S. cerevisiae* y *C. lusitanae* a 25°C y 48 h de fermentación.

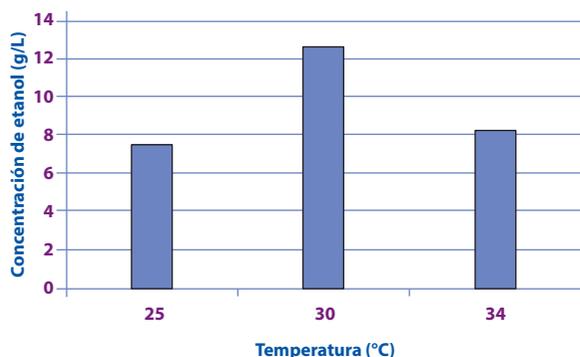


Figura 2. Influencia de la temperatura en la obtención de bioetanol empleando *Clavispora lusitanae*.

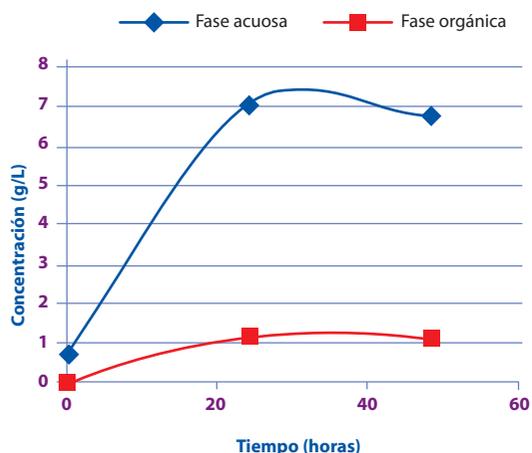


Figura 3. Producción de bioetanol por fermentación extractiva con jugo de fique a 30°C y a un pH de 4,4.

DISCUSIÓN

Se empleó el jugo de fique como fuente de carbono para la producción de bioetanol debido al contenido de azúcares reductores y no reductores, además de otras fuentes de carbono, que actúa como fuente de energía, y con la adición de algunas sales, se dieron las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo metabólico del microorganismo. El pH del jugo de fique es de 4,25, valor que coincide con el rango de pH óptimo para el desarrollo de levaduras, especialmente los géneros *Candida* (*Clavispora*), *Zigosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Pichia*, evitando la necesidad de ajustar el valor de pH. De hecho, la alcalinización extracelular interfiere con el correcto transporte de nutrientes y cationes necesarios para su supervivencia y por ello la exposición a pH alcalino le supone una situación de estrés.⁹

El contenido de sólidos totales en el jugo de fique, mostrados en la *Tabla 1*, corresponde a un valor de 68,8 g/L que interfieren con la cuantificación de la biomasa microbiana cuando se desarrolla la fermentación, impidiendo la medición de ésta. Para estimar el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo y realizar las diferentes cinéticas, se podría realizar un blanco de sólidos al inicio de la fermentación cuando no se ha inoculado el medio y realizar las mediciones posteriores substrayendo el blanco inicial, aunque se tendría que considerar que los sólidos del jugo de fique permanecen constantes en el tiempo de la fermentación. Las cantidades de materia orgánica presentes en el jugo de fique estimadas a partir de la DBO₅ y DQO son de 11,8 y 86,6 g/L respectivamente.

Las trazas de metales presentes en el jugo de fique no son suficientes para proveer las condiciones necesarias para su crecimiento. Por eso fue necesario suplementar el jugo de fique con K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, NH₄Cl, KCl y extracto de levadura, debido a que estos compuestos proveen los requerimientos nutricionales y energéticos necesarios para el desarrollo del microorganismo, facilitando su proceso de adaptación. Estas condiciones para el medio de cultivo coinciden con el estudio realizado por Rivera y colaboradores, quienes optimizaron la producción de bioetanol en un medio con 50 g/L de glucosa y evaluaron los parámetros cinéticos.⁷

En la selección del jugo de fique se aislaron más de 6 microorganismos, entre ellos *Artbrobacter* sp., *Ochrobactrum* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Cunninghamella* sp., *Aspergillus niger* y la levadura *Clavispora lusitaniae*, encontrándose que este último fermenta algunas hexosas como la glucosa, pero además es capaz de metabolizar xilosa, sacarosa, ribosa, entre otras.¹⁰ Adicionalmente, este microorganismo, al ser aislado del jugo de fique, hace que disminuya el tiempo de adaptación en el mismo sustrato empleado. El otro microorganismo seleccionado para la producción de bioetanol fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual convierte las hexosas en bioetanol en condiciones anaeróbicas, generando dos moles del compuesto por cada mol de hexosa consumida.¹¹

Las levaduras en general son de rápido crecimiento, rápida dispersión de células y facilidad para replicar cultivos,¹² lo que hace que el tiempo de fermentación sea corto para ambos microorganismos. Se evaluó cuál de los dos microorganismos tenía un mejor rendimiento en la producción de bioetanol empleando jugo de fique (Figura 1) y así seleccionar el microorganismo más apto para la obtención de bioetanol.

Por otro lado, el jugo de fique está compuesto por carotenoides, saponinas, sapogeninas, esteroides, entre otros. Las saponinas son un grupo de glucósidos oleosos naturales que forman una espuma abundante y relativamente estable cuando se agitan con agua, debido a la disminución de la tensión superficial de éstas.¹³ Las saponinas al igual que los taninos han sido reportadas con actividad herbicida, fungicida y bactericida. Tal como lo reportan Sliwinski y colaboradores, quienes utilizaron extractos de saponinas en el control de los microorganismos presentes en el rumen.¹⁴ Es por esto que este medio de cultivo es agresivo para la mayoría de los microorganismos y que la producción de bioetanol sea mayor con la levadura aislada del jugo de fique, *Clavispora lusitaniae* en comparación a *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose 10,68 g/L y 5,26 g/L de bioetanol respectivamente.

En la Figura 2 se observa que la temperatura a la cual el microorganismo produjo una mayor cantidad de bioetanol fue de 30°C, dado que en estas condiciones el microorganismo metaboliza la mayor cantidad de azúcares presentes para producirlo, obteniéndose una concentración de 12,3 g/L. Rivera y colaboradores (2006), realizaron un estudio donde informan que pequeños cambios en la temperatura,

afectan la cinética y por tanto la productividad y la conversión a bioetanol. Esto debido a que el proceso de fermentación alcohólica es exotérmico, y por tanto, pequeñas variaciones en la temperatura pueden desviar el proceso de las condiciones operacionales.⁷ La temperatura de 30°C, coincide con la temperatura óptima de crecimiento de diferentes levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y la *Candida shehatae* utilizadas para la producción de bioetanol. Siqueira y colaboradores (2008), estudiaron la producción de bioetanol a escala de laboratorio, piloto e industrial a partir de melaza utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.¹ Las condiciones de trabajo fueron 30°C y 150 rpm en todos los experimentos, obteniéndose 39 g/L de bioetanol a escala de laboratorio y 10 m³/día de bioetanol escala industrial para un total de 8 tanques de fermentación, cada uno de los cuales con un volumen de 20 m³ de sustrato.¹ Investigadores como Jeffries y Alexander (2012), estudiaron la producción de bioetanol a partir de xilosa utilizando *Candida shehatae* obteniendo 25 g/L de bioetanol en condiciones operacionales de 30°C y un pH de 4,5.¹⁵

En la fermentación extractiva se utilizó solo la levadura *Clavispora lusitaniae* como inóculo para desarrollar la fermentación alcohólica de jugo de fique debido a su compatibilidad con el ácido oleico y su reconocida capacidad para metabolizar los azúcares generando altos rendimientos en la producción de bioetanol.¹⁵ Freer y Greene (1990), evaluaron el mecanismo general a través del cual la *C. lusitaniae* metaboliza la Celobiosa (disacárido formado por dos moléculas de glucosa), encontrando que la *C. lusitaniae* no presenta fase log durante la fermentación alcohólica lo que indica que este microorganismo tiene la capacidad de transportar estos azúcares al interior de la célula.¹⁶ En este caso no se empleó la levadura *S. cerevisiae* ya que no favorece su metabolismo lo cual confirma la decisión de trabajar con la *C. lusitaniae*.

En la Figura 3 se observa que luego de 24 h de fermentación se alcanza una concentración de bioetanol de 7,03 g/L, de los cuales se transfieren a la fase orgánica 1,17 g/L que corresponde a un 14,2% y 48 h después se detectaron 6,8 g/L de bioetanol, del cual se transfirió a la fase orgánica un 14,1% equivalente a 1,11 g/L.

Bajo las condiciones de operación descritas anteriormente para la fermentación extractiva, se ob-

tuvo un valor de coeficiente de distribución, de la fase acuosa al ácido oleico, de 0,16, valor que es 10 veces superior al reportado por Boudreau y Hill.⁶ Esto probablemente se deba a las propiedades físico-químicas del jugo de fique, como la viscosidad, la temperatura de trabajo, superior en 8°C y a la baja concentración de bioetanol producido, lo que puede favorecer la transferencia de masa entre la fase acuosa a la fase orgánica.^{17,18}

La producción de bioetanol a partir de diversos sustratos no tradicionales, **Tabla 2**, que pueden o no requerir procesos hidrolíticos, muestran rendimientos que oscilan entre 0,20 y 0,50. El rendimiento de la fermentación tradicional es un 32% mayor comparado con la melaza de soya.

Tabla 2. Rendimientos de producción de bioetanol con sustratos no convencionales.

Sustrato	YPS (g bioetanol / g sustrato)	Referencia
Jugo de fique (Ferm. Extractiva)	0,28	Este estudio
Jugo de fique (Ferm. Tradicional)	0,58	Este estudio
Almidón	0,40	19
Paja de cebada	0,40	20
Melaza de soya	0,44	1

CONCLUSIONES

Se obtuvo bioetanol a partir de jugo de fique empleando *Clavispora lusitaniae* y *Saccharomyces cerevisiae* en una cantidad de 10,68 g/L y 5,26 g/L respectivamente, a 25+/-2°C, 150 rpm y 48 h de fermentación en un biorreactor de 3 L. Empleando fermentación tradicional y extractiva se obtuvieron 12,1 y 8,03 g/L respectivamente a 30+/-2°C, 150 rpm y 48 h de fermentación en un biorreactor de 3 L. La levadura *C. lusitaniae* produce un 103% más bioetanol que *Saccharomyces cerevisiae* empleando jugo de fique como sustrato. En la fermentación tradicional se obtuvo un 50,7% mayor cantidad de etanol que en la fermentación extractiva.

CONFLICTO DE INTERESES

El autor primer firmante del manuscrito de referencia, en su nombre y en el de todos los autores firmantes, declara que no existe ningún potencial conflicto de interés relacionado con el artículo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Compañía de Empaques y las diferentes agremiaciones de figueros por su constante apoyo en la ejecución de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Siqueira P, et al.** Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at Laboratory, pilot and industrial scales. En: *Bioresource Technology*. Vol. 99, No.17. 2008; p. 8156-63.
- Cheng H, Wang F.** Optimal process/solvent design for ethanol extractive fermentation with cell recycling. En: *Biochemical Engineering Journal*. Vol.41, No.3. 2008; p. 258-65.
- Murray D.** El potencial del etanol: mirando más allá del maíz <En línea> 2005 <http://www.terra.org/articulos/art01335.html> <Consulta 15 agosto 2012>
- Ministerio de Ambiente.** Guía ambiental del sub-sector figuero. 2ª Ed. Bogotá (Colombia). 2006; 128 p.
- Karunanidhi, Anuradha.** Extractive Fermentation of Ethanol in an aqueous two-phase system by *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3288. *Advanced Biotech*, Vol. 11. 2008; p.11-5.
- Boudreau T, Hill G.** Improved Ethanol-water separation using fatty acids. En: *Process Biochemistry* 41; 2006.
- Rivera E, et al.** Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. En: *Process Biochemistry* 41. 2006; p.1682-7.
- APHA.** Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington DC: American Public Health Association. 1998.
- Pretorius I, et al.** Designer Yeasts for the Fermentation Industry of the 21st Century. En: *Food Technol. Biotechnol.* 2003; 41(1). p.3-10.
- Lloret S, Carmina, Gutiérrez U, Olivia, Borrell S, Nuria.** *Candida lusitaniae*. <En línea> <http://www.seimc.org> <Consulta: 4 de agosto de 2012>
- González A, Valenzuela L.** *Saccharomyces Cerevisiae*. México <En línea><http://www.microbiologia>.

- org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_20/Capitulo20.pdf. <Consulta: 9 de octubre de 2008>
12. **Sánchez O, Cardona.** Producción biotecnológica de alcohol carburante I: A partir de diferentes materias primas. En: *Interciencia*. 2005; p. 671-7.
 13. **Conrad J, et al.** A novel furostanol saponin from *Tribulus terrestris* of Bulgarian origin. In: *Fitoterapia*, Vol.75, No.18. 2004.
 14. **Sliwinski B, et al.** Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. In: *Animal Feed Science and Technology*, Vol.101, No. 23. 2002.
 15. **Jeffries TW, Alexander MA.** Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. En: *Biotechnology in pulp and paper manufacture*. <En línea> <http://www.fpl.-fs.fed.us/documnts/pdf1990/jeffr90a.pdf>. <Consulta: 31 de julio de 2012>.
 16. **Freer S, Greene R.** Transport of Glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitanae*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, No. 22, August 5, 1990, p.12865.
 17. **Treybal R.** Operaciones de transferencia de masa, 2ª Ed. Mc Graw-Hill, México 1988; 858 p.
 18. **Offeman R, et al.** Extraction of ethanol with higher alcohol solvents and their toxicity to yeast. *Separation and Purification Technology* 63. 2008; p. 444-451.
 19. **Kutluo O, et al.** Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB. En: *Process Biochemistry*. Vol.37, No.10. 2002; p.1157-68.
 20. **Linde M, Galbe M, Zacchi G.** Simultaneous saccharification and fermentation of steampretreated barley Straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Vol.40, No.5. 2007; p.1100-7.