
Aprovechamiento de paja de sorgo RB-cañero para producción de etanol por *Pichia stipitis*

Víctor-Hugo Salazar-Segura¹, Edgar Ledezma-Orozco¹, Noé Montes-García², Guadalupe Bustos-Vázquez¹, San-Juana Alemán-Castillo¹, Guadalupe Rodríguez-Castillejos^{1*}

¹Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. Reynosa, Tamaulipas, México.

²Instituto de Ciencias Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Río Bravo, Tamaulipas, México.

Artículo recibido 3 de junio de 2020 y aceptado el 11 de junio de 2020

Exploitation of sorghum straw RB-Cañero for ethanol production by Pichia stipitis.

Abstract

The state of Tamaulipas is the first sorghum producer nationwide, in recent years interest in different types of this crop has increased; lignocellulosic biomass that is generated as crop residue are generally burned, causing greater contamination. The objective of this work was to obtain hydrolyzed acids from sweet sorghum straw and then evaluate the production of bioethanol by *Pichia stipitis* using the hydrolysates as a carbon source. The variables for the hydrolysis were acid concentration, temperature, solid-liquid ratio and reaction time. For the fermentation, temperature, agitation speed and hydrolysates were evaluated with and without detoxification. The highest concentration of ethanol was found with non-detoxified hydrolysates, 25 °C and 200 rpm.

Key words: biotechnology, agricultural residue, xylose, ethanol, straw, sweet sorghum hydrolysates, *P. stipitis*.

Resumen

El estado de Tamaulipas es el primer productor nacional de sorgo, en los últimos años ha aumentado el interés por los diversos tipos de este cultivo; la biomasa lignocelulósica que se genera como residuo del cultivo son generalmente quemados provocando una mayor contaminación. El objetivo de este estudio fue obtener hidrolizados ácidos de paja de sorgo dulce y posteriormente evaluar la producción de bioetanol por *Pichia stipitis* utilizando los hidrolizados como fuente de carbono. Las variables utilizadas para la hidrólisis fueron concentración de ácido, temperatura, relación sólido-líquido y tiempo de reacción. Para la fermentación fueron evaluadas la temperatura, velocidad de agitación e hidrolizados con y sin detoxificación. La mayor concentración de etanol se encontró con hidrolizados no detoxificados, 25 °C y 200 rpm.

Palabras claves: biotecnología, residuo agrícola, xilosa, etanol, paja, sorgo dulce, hidrolizado, *P. stipitis*.

*Autor de correspondencia

Email: gcastillejos@uat.edu.mx

ISSN 2594-0384 (Electrónica)

DOI: <https://doi.org.1033154/rlrn.2020.02.02>

Introducción

El rápido incremento de la población y sus necesidades demandan un elevado consumo de recursos energéticos de diversa índole; por ello, la producción de combustibles no fósiles, como el bioetanol, representan una opción viable al uso de petróleo y sus derivados (Saini *et al.*, 2015; González-Leos *et al.*, 2017). El petróleo es el combustible más utilizado, sin embargo, se sabe que su combustión genera un grave problema de contaminación ambiental y contribuye al calentamiento global (Aditiya *et al.*, 2016; Vanhala *et al.*, 2016). Como sustituto del petróleo se ha estudiado la producción y uso de biocombustibles; este término se aplica para referirse compuestos obtenidos a partir de biomasa; comúnmente se trata combustibles líquidos, aunque también se consideran gaseosos y sólidos (Kumar *et al.*, 2010; Chaturvedi y Verma, 2013). Por ello, el bioetanol representa una alternativa amigable con el medio ambiente dado que para su producción de utilizan fuentes renovables y el CO₂ resultado de la combustión y utilizado por las plantas para la fotosíntesis (Saini *et al.*, 2015). Para la obtención de este biocombustible pueden utilizarse diversos recursos que se clasifican de manera general en azúcares, almidón y lignocelulosa; la conversión de la biomasa en etanol varía dependiendo de la naturaleza de la materia prima (Zabed *et al.*, 2017). Dentro de los materiales más utilizados para la producción de etanol se encuentran la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el sorgo dulce; estos tienen alto rendimiento de producción, pero baja disponibilidad estacional como factor limitante común (Vohra *et al.*, 2014). Por otro lado, dentro de la biomasa lignocelulósica se encuentran los residuos agrícolas y materiales forestales; los cuales tienen como ventajas la fácil disponibilidad y bajo costo (Zhu y Pan, 2010; Limayem y Ricke, 2012). La biomasa lignocelulósica no forma parte de la cadena alimentaria humana, por ello son una alternativa al uso de materiales azucarados y con almidón.

Además de la caña de azúcar, el sorgo dulce ha cobrado importancia en la producción de etanol; aunque es un cultivo nativo del trópico se adapta fácilmente a climas templados y resiste sequía y salinidad, tiene un alto rendimiento en biomasa y rápido crecimiento; por ello la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la

Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization of the United Nations) reconoce al sorgo como un cultivo prometedor en China y otros países (Gnansounou *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2010; Ratnavathi *et al.*, 2011). El jugo de los tallos de sorgo dulce contiene entre 10 % a 18 % de azúcares fermentables, principalmente sacarosa, fructosa y glucosa; los cuales son utilizados para la conversión a etanol por diferentes levaduras, principalmente del género *Saccharomyces* sp. (Goshadrou *et al.*, 2011; González-Leos *et al.*, 2017; Wijaya *et al.*, 2018).

La producción de bioteanol a partir de materiales azucarados y almidón, conocido como de primera generación, es limitada debido a que se busca no competir con la disponibilidad de alimento; por ello, el interés por el uso de materiales de desecho ha aumentado. Estos son de fácil adquisición y compiten por la cadena alimenticia (Ragauskas *et al.*, 2014; Zabed *et al.*, 2016). Aunque el uso de estos materiales también presente desventajas, la principal es el pre-tratamiento que debe llevar para la conversión de lignocelulosa en azúcares fermentables y un menor número de microorganismos capaces de fermentar las pentosas obtenidas (Goshadrou *et al.*, 2011; Taha *et al.*, 2016). Para la obtención de etanol de biomasa lignocelulósica se han evaluado microorganismos como *Mucor hiemalis* (Goshadrou *et al.*, 2011), *Pichia stipitis* (Okonkwo *et al.*, 2016) *P. guilliermondii* (Qi *et al.*, 2015), *Zymomonas mobilis* (Gonçalves *et al.*, 2016); entre otros.

Dado que el estado de Tamaulipas el principal productor de sorgo a nivel nacional y a la introducción de variedades de sorgo grano y dulce, la cantidad de material lignocelulósico de este cultivo ha aumentado; una parte de este es aprovechado como forraje y el resto es quemado o dejado en el suelo; lo cual genera mayor contaminación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de etanol por *P. stipitis* utilizando paja de sorgo dulce “RB-Cañero” como fuente de carbono, para su aprovechamiento como residuo lignocelulósico.

Materiales y Métodos

Materia prima

El bagazo de sorgo dulce “RB-Cañero” fue proporcionada por el INIFAP campo experimental Río Bravo, ubicado en la ciudad de Río Bravo,

Tamaulipas. La paja fue cortada en trozos de aproximadamente 5 cm; posteriormente, se secó a 55 °C por 24 h en una estufa (Zenith lab, Dry Oven DHG-9240[®], China); una vez seca se procedió a moler y tamizar. La harina obtenida fue mantenida en recipientes herméticamente cerrados hasta su uso. La humedad fue determinada por el método de secado (AACC método 44-01.01) en estufa; mientras que para las cenizas se utilizó el método de cenizas en seco (AACC método 08-03.01) en una mufla (Mufla FE-340, México).

Microorganismo

Para la producción de etanol se utilizó la cepa liofilizada *Pichia stipitis* proporcionada por National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USDA (Peoria, Illinois, USA). La cepa liofilizada de *P. stipitis* fue rehidratada con agua destilada estéril, posteriormente se hicieron resiembras sucesivas en placas de agar conteniendo 20 gL⁻¹ de peptona, 10 gL⁻¹ de extracto de levadura, 20 gL⁻¹ xilosa y 20 gL⁻¹ de agar. Para preparar el inóculo se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de medio que contenía 10 gL⁻¹ de extracto de levadura, 50 gL⁻¹ de glucosa, 1 g/L-1 KH₂PO₄, 1 gL⁻¹ MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, 0.1 gL⁻¹ MnSO₄ y 0.01 gL⁻¹ de FeCl₃.

Obtención de hidrolizados

El bagazo fue tratado con ácido clorhídrico al 1 %, 3 % y 5 % a 122 °C y un tiempo de reacción de 80 min, con una relación sólido-líquido 1:10. Una vez hidrolizado el jarabe se separó mediante filtración al vacío y se concentró aproximadamente hasta un 70 % de su volumen original, con un rotavapor (R-300 Buchi, Suiza) a 50 °C, esto con la finalidad de concentrar la xilosa presente. Posteriormente, se neutralizó con CaCO₃ hasta alcanzar un pH 5 ± 0.2. Con el fin de comparar el efecto de los compuestos inhibidores producidos en la hidrólisis, parte del hidrolizado fue detoxificado con carbón activado (1.5 %, 60 min a 45 °C).

Producción de bio etanol

Una vez activada la levadura *P. stipitis* se procedió al crecimiento en medios de cultivo con los jarabes obtenidos mediante hidrólisis ácida. Se evaluó una concentración de xilosa 30 gL⁻¹, 5 gL⁻¹ de peptona y 3 g/L-1 de extracto de levadura. La cepa fue crecida a dos diferentes temperaturas (25 °C y 28 °C), dos velocidades de agitación (150 rpm y 200 rpm). Con

el fin de evaluar la influencia de estos factores en el crecimiento y producción de etanol. Además, se evaluaron estas condiciones utilizando jarabes detoxificados (HD) y sin detoxificar (HND).

La concentración de xilosa, etanol y ácido acético fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), utilizando un HPLC (Agilent HP 1100 series, CA, USA), con una columna de *Transgenomic ION-300* (temperatura de horno de 40 °C), con elusión isocrática (flujo de 0.4 mL por min, fase móvil H₂SO₄ 0.002 5 M), y un detector de índice de refracción. Por otro lado, la concentración de furfural fue determinada mediante el método de espectrofotometría UV-Vis (Shimadzu UV-1800, USA), a una longitud de onda de 230 nm. La medición de etanol se realizó en los tiempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h; la productividad volumétrica (Qp), o concentración de etanol producido (gL⁻¹), por hora fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación: gL⁻¹.

$$Qp = \frac{Pf - Pi}{Tf - Ti}$$

Dónde:

Pf = Concentración final de etanol (gL⁻¹)

Pi = Concentración inicial de etanol (gL⁻¹)

Ti = Tiempo cero (h)

Tf = Tiempo final de fermentación (h)

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio de estas; posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar que variables tuvieron efecto sobre la composición del hidrolizado y la producción de etanol. Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó una prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95 %.

Resultados

Análisis de hidrolizados

Se realizaron hidrolizados con el bagazo de sorgo de la variedad RB-Cañero, empleando las condiciones mencionadas anteriormente; los resultados mostraron que, en este caso, el TS13 fue uno de los mejores (HCl al 1 %, 80 min a 120 °C, relación S:L de 1:8), dando una concentración de 29.4 gL⁻¹ de xilosa. Por otro lado, con el TS19 (HCl al 1 %, 100 min a 120 °C, con relación S:L de 1:8; Tabla 1), se obtuvo una concentración de xilosa 30.067 gL⁻¹ (Tabla 1). Sin embargo, el TS13 involucra menos tiempo de reacción; por lo cual las

Tabla 1. Concentración de xilosa y ácido acético (gL⁻¹), obtenidas en los hidrolizados de paja de sorgo RB-Cañero

Tratamiento	Relación S:L	HCl (%)	Tiempo (min)	T (°C)	Xilosa (gL ⁻¹)	Ácido acético (gL ⁻¹)
TS1	1:8	1	80	100	5.97 ± 1.68 ^j	3.09 ± 0.003 ⁱ
TS2	1:8	3	80	100	7.45 ± 0.024 ^{ij}	3.33 ± 0.003 ^h
TS3	1:8	5	80	100	5.66 ± 1.454 ^j	3.15 ± 0.002 ^h
TS4	1:10	1	80	100	5.255 ± 0.011 ^j	3.03 ± 0.002 ⁱ
TS5	1:10	3	80	100	7.178 ± 0.009 ^{ij}	3.26 ± 0.002 ^h
TS6	1:10	5	80	100	5.44 ± 0.017 ^j	3.21 ± 0.002 ^h
TS7	1:8	1	100	100	5.97 ± 0.091 ^j	3.19 ± 0.017 ^h
TS8	1:8	3	100	100	7.45 ± 2.037 ^{ij}	3.07 ± 0.036 ⁱ
TS9	1:8	5	100	100	5.66 ± 0.050 ^j	2.95 ± 0.004 ^j
TS10	1:10	1	100	100	5.26 ± 0.016 ^j	2.91 ± 0.001 ^k
TS11	1:10	3	100	100	7.19 ± 0.060 ⁱ	2.91 ± 0.002 ^k
TS12	1:10	5	100	100	5.44 ± 0.058 ^j	2.93 ± 0.007 ^k
TS13	1:8	1	80	120	29.40 ± 0.067 ^b	4.02 ± 0.002 ^a
TS14	1:8	3	80	120	16.11 ± 0.015 ^e	3.47 ± 0.001 ^e
TS15	1:8	5	80	120	25.13 ± 0.012 ^c	3.76 ± 0.000 ^d
TS16	1:10	1	80	120	17.33 ± 2.032 ^{fg}	3.52 ± 0.385 ^{d,e,f,g,h}
TS17	1:10	3	80	120	18.35 ± 0.014 ^f	3.57 ± 0.005 ^f
TS18	1:10	5	80	120	24.16 ± 0.029 ^d	3.67 ± 0.004 ^e
TS19	1:8	1	100	120	30.07 ± 0.008 ^a	3.92 ± 0.002 ^b
TS20	1:8	3	100	120	26.68 ± 2.190 ^c	3.87 ± 0.001 ^c
TS21	1:8	5	100	120	20.13 ± 2.101 ^f	3.58 ± 0.045 ^f
TS22	1:10	1	100	120	13.10 ± 0.001 ^h	3.22 ± 0.001 ^h
TS23	1:10	3	100	120	17.05 ± 0.001 ^g	3.30 ± 0.001 ^h
TS24	1:10	5	100	120	23.02 ± 0.001 ^e	3.15 ± 0.001 ^h

^{a-k} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

condiciones mencionadas para este último fueron seleccionadas para la obtención de jarabes utilizados en la fermentación.

Por otra parte, la concentración de ácido y el tiempo de reacción no tuvieron efectos significativos en la xilosa; no obstante, la relación S:L y la temperatura fueron las variables que tuvieron un efecto significativo en la concentración de xilosa. Una vez seleccionadas las condiciones de hidrólisis, se procedió a la fermentación de los jarabes para la obtención de etanol, alcanzando una producción máxima de etanol de 3.76 gL⁻¹ y 3.75 gL⁻¹ a las 60 h y 36 h de fermentación respectivamente. Siendo el mejor tratamiento el Tx4, ya que se utilizó un medio de cultivo con hidrolizado no detoxificado. Para el caso de Tx5, se trató un medio con HD a una temperatura de 28 °C y una velocidad de agitación de (150 rpm). Sin embargo, el análisis estadístico no

arrojó diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos; por lo que se puede considerar al tratamiento TX4 como el mejor, ya que resulta más económico debido el tratamiento de detoxificación; además, el valor de Qp fue mayor al alcanzar la producción máxima en menos tiempo (Tabla 2).

Discusión

El sorgo es un cultivo reconocido por su rápido crecimiento y resistencia a condiciones extremas, en las que no otros cereales no crecen regularmente. Las variedades de sorgo dulce están siendo aprovechadas para la obtención de azúcares para consumo humano o para fermentación; sin embargo, el bagazo o paja es un residuo que no suele aprovecharse, por lo que evaluar posibles

Tabla 2. Parámetros fermentativos de la producción de etanol utilizando hidrolizados de paja de sorgo.

Tx	T (°C)	Agitación (rpm)	Detox.	Tiempo (h)**	Etanol (g/L ⁻¹)*	Qp (g/L ⁻¹ h ⁻¹)
1	25	150	HD	60	1.21 ± 0.003 ^d	0.02 ± 0.003 ^c
2	25	200	HD	60	1.83 ± 0.013 ^d	0.02 ± 0.013 ^{c,d}
3	25	150	HND	84	2.42 ± 0.0005 ^b	0.03 ± 0.0005 ^d
4	25	200	HND	36	3.75 ± 0.005 ^a	0.10 ± 0.005 ^a
5	28	150	HD	60	3.76 ± 0.019 ^a	0.06 ± 0.019 ^b
6	28	200	HD	36	2.25 ± 0.020 ^b	0.06 ± 0.020 ^b
7	28	150	HND	36	1.91 ± 0.0334 ^c	0.05 ± 0.034 ^b
8	28	200	HND	36	1.94 ± 0.006 ^c	0.04 ± 0.006 ^c

*Máxima concentración obtenida; **Indica el tiempo en el que se obtuvo la máxima concentración; HD: Hidrolizado detoxificado; HND: Hidrolizado no detoxificado.

^{a,b,c,d} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

alternativas permitirá un aprovechamiento completo de la planta. Morales *et al.* (2011), realizaron un estudio con bagazo de caña de azúcar, del cual se buscaron las mejores condiciones para la obtención de xilosa; evaluaron concentraciones de H₂SO₄ de 1 % a 1.5 % con temperaturas de 120 °C a 175 °C, tiempo de reacción de 40 min a 60 min y con un rango de relación S:L de 1:2 a 1:4. Encontraron que la concentración de ácido y la relación S:L fueron las variables más importantes para la materia prima estudiada. La concentración máxima de xilosa encontrada fue 25 g/L-1 utilizando una temperatura de 120 °C con una relación S:L de 1:4, y una concentración de 1.5 % de H₂SO₄, esto es debido a que a mayor relación S:L se obtiene mayores porcentajes de xilosa y lignina. Por otro lado, Saucedo *et al.* (2010), hidrolizaron bagazo de *Agave tequilana* Weber, dicha hidrólisis fue llevada a cabo en dos etapas; la primera a 151°C, ácido sulfúrico al 2 % con un tiempo de 10 min, obteniendo una concentración de 26.9 g/L⁻¹ de azúcares reductores; mientras que en la segunda etapa la hidrólisis fue a 175 °C, 2 % de ácido sulfúrico y 30 min de reacción, con una concentración de 15 g/L⁻¹ de los azúcares. Demostrando con esto que durante la descomposición de los azúcares, en especial la glucosa y la xilosa, están relacionadas tanto la temperatura y los tiempos aplicables, así como las concentraciones del ácido. Mientras que González-García *et al.* (2015), encontraron azúcares fermentables a partir de residuos de cartón, alcanzando una concentración máxima de azúcares fermentables de 20 g/L⁻¹, utilizando ácido sulfúrico al 10 % a una temperatura de 125 °C, con un tiempo de 180 min. Estos autores mencionan que el tiempo y la temperatura son los factores con mayor influencia en la obtención de xilosa. Por lo tanto, Herrera *et al.* (2004), encontraron que el ácido

clorhídrico es más eficaz como catalizador para la hidrólisis de paja de sorgo, en comparación del ácido sulfúrico; sin embargo, la eficacia para la obtención de los azúcares depende no solo de la concentración de ácido, sino de la combinación con el tiempo de reacción y temperatura; las condiciones cambiarán de acuerdo con la materia prima utilizada. Bustos *et al.* (2003), mencionan también que el HCl es un buen catalizador para la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar, en el que se obtienen soluciones de xilosa con bajas concentraciones de ácido acético y furfural.

Por otro lado, Liu *et al.* (2012), realizaron una hidrólisis en la paja de sorgo dulce, en el que sus condiciones óptimas fueron de H₂SO₄ al 3 %, 140 °C por 50 min obteniendo un rendimiento del 60 % de xilosa del cual, las temperaturas altas ablandan la capa protectora de lignina alrededor de las fibras de la hemicelulosa, permitiendo al ácido hidrolizar para obtener xilosa. Sin embargo, al utilizar tiempos y temperaturas mayores causan fácilmente la degradación de la xilosa, concluyendo que una temperatura alta y tiempo de reacción más corto debe de ser seleccionado para la obtención de xilosa.

El pretratamiento con ácidos es un proceso ampliamente utilizado para la bioconversión de biomasa lignocelulósica y la obtención de etanol. Lin *et al.* (2016), estudiaron la obtención de etanol utilizando hidrolizados ácidos de madera terciada (triply), bagazo, bambú y paja de arroz por *P. stipitis*; encontrando que el aumento de biomasa celular incrementaba la cantidad de alcohol, y la concentración de metabolitos fue mayor al agregar paja de arroz (14 % a 32 % de aumento). Morales-Martínez *et al.* (2014), evaluaron el aprovechamiento de aserrín de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), realizando una hidrólisis

enzimática; una vez obtenidos los hidrolizados se procedió a la fermentación con *Z. mobilis* NRRL-806, obteniendo una concentración de 37 gL⁻¹ y productividad de 1.16 gL⁻¹h⁻¹, a las 27 h de cultivo. Sin embargo, cuando la concentración de ácido acético aumentó (12.8 gL⁻¹), la productividad disminuyó a 0.99 gL⁻¹h⁻¹. Por otro lado, Adelabu *et al.* (2018), evaluaron el potencial de *C. tropicalis* y *C. shehatae* para la obtención de etanol a partir de paja de sorgo; las levaduras mostraron mayor actividad en soluciones que contenían 7.5 % de paja de sorgo; *C. tropicalis* produjo una concentración máxima de 38.12 gL⁻¹, mientras que con *C. shehatae* fue 30.32 gL⁻¹. La concentración de etanol encontrada en el presente estudio es inferior a los reportados en los estudios mencionados; sin embargo, los hidrolizados obtenidos muestran una concentración de xilosa adecuada que puede ser utilizada por otras levaduras y aumentar la cantidad de bioetanol. Los resultados de diversos estudios muestran el potencial de la biomasa lignocelulósica para obtener bioetanol, y no solo representa una ventaja por los bajos costos de la materia prima, sino es una manera eficaz de evitar la acumulación de residuos agrícolas que generalmente son quemados generando una gran cantidad de gases (Dadi *et al.* 2018)

Conclusiones

Las condiciones evaluadas para la hidrólisis ácida de paja de sorgo RB-Cañero mostraron un buen rendimiento de xilosa, la cual es una fuente de carbono adecuada para el crecimiento de levaduras productoras de bioetanol. La mayor concentración de etanol se encontró en los medios con hidrolizados no detoxificados, lo que indica que *P. stipitis* es capaz de crecer en presencia de ácido acético en concentraciones bajas. Sin embargo, la concentración de bioetanol obtenida fue baja comparada con lo reportado en otros estudios; por ello es importante evaluar estos hidrolizados con cepas que tengan mayor capacidad de fermentación de xilosa para aumentar el rendimiento y productividad del proceso de producción de bioetanol.

Referencias

Adelabu, B.A.; Kareem, S.O.; Adeogun, A.I.; Ademolu, K.O. (2018). Direct Bioconversion of Sorghum Straw to Ethanol in a Single-step Process by Candida species. Jordan Journal

- of Biological Sciences (JJBS). 11(1): 57-63.
- Aditiya, H.B.; Mahlia, T.M.I.; Chong, W.T.; Nur, H.; Sebayang, A.H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. Renewable and sustainable energy review. 66: 631-653.
- Bustos, G.; Ramírez, J.; Garrote, G.; Vázquez, M. (2003). Modeling of the Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse with Hydrochloric Acid. Applied Biochemistry and Biotechnology. 104: 0273-2289.
- Chaturvedi, V.; Verma, P. (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. 3 Biotechnology. 3(5): 415-431.
- Dadi, D.; Beyene, A.; Simoens, K.; Soares, J.; Demeke, M.M.; Thevelein, J.M.; Van-der-Bruggen, B. (2018). Valorization of coffee byproducts for bioethanol production using lignocellulosic yeast fermentation and pervaporation. International Journal of Environmental Science and Technology. 15(4): 821-832.
- Gnansounou, E.; Dauriat, A.; Wyman, C.E. (2005). Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. Bioresource technology. 96(9): 985-1002.
- Gonçalves, F.A.; Ruiz, H.A.; dos Santos, E.S.; Teixeira, J.A.; de Macedo, G.R. (2016). Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. Renewable Energy. 94: 353-365.
- González-García, Y.; Meza, J.; Anzaldo, J.; Sanjuán, R. (2015). Obtención de azúcares fermentables desde residuos de cartón para cultivar levaduras de interés biotecnológico. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. 6: 88-105.
- Gonzalez-Leos, A.; Del-Angel-Del Angel, J.A.; Gonzalez-Castillo, J.L.; Rodríguez-Duran, N.; Bustos-Vázquez, G. (2017). Evaluation of producing ethanol native yeasts present in sugar cane bagasse. CienciaUAT. 11(2): 80-92.
- Goshadrou, A.; Karimi, K.; Taherzadeh, M.J. (2011). Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. Industrial Crops and Products. 34(1): 1219-1225.
- Herrera, A.; Tellez, S.; González, J.; Ramírez, J.; Vázquez, M. (2004). Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. Journal of Food Engineering. 63: 103-109.
- Kumar, G.; Panda, A.K.; Singh, R.K. (2010). Optimization of process for the production of bio-oil from eucalyptus wood. Journal of Fuel Chemistry and Technology. 38(2): 162-167.
- Limayem, A.; Ricke, S.C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in energy and combustion science. 38(4): 449-467.
- Lin, T.H.; Guo, G.L.; Hwang, W.S.; Huang, S.L. (2016). The addition of hydrolyzed rice straw in xylose fermentation by *Pichia stipitis* to increase bioethanol production at the pilot-scale. Biomass and bioenergy. 91: 204-209.
- Liu, X.; Lu, M.; Ai, N.; Yu, F.; Ji, J. (2012). Kinetic model analysis of dilute sulfuric acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis in sweet sorghum bagasse for xylose production. Industrial Crops and Products. 38, 81-86.
- Morales, M.; Espino, I.; Mesa, L.; Acosta, D.; González, E.; Castro, E. (2011). Evaluación de residuales de la hidrólisis ácida del bagazo como productos de alto valor añadido. Afinidad. 68: 453-458.

- Morales-Martínez, T.K.; Rios-González, L.J.; Aroca-Arcaya, G.; Rodríguez-de la Garza, J.A. (2014). Ethanol production by *Zymomonas mobilis* NRRL B-806 from enzymatic hydrolysates of *Eucalyptus globulus*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 13(3):779-785.
- Okonkwo, C.C.; Azam, M.M.; Ezeji, T.C.; Qureshi, N. (2016). Enhancing ethanol production from cellulosic sugars using *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 39(7): 1023-1032.
- Qi, K.; Xia, X.X.; Zhong, J.J. (2015). Enhanced anti-oxidative activity and lignocellulosic ethanol production by biotin addition to medium in *Pichia guilliermondii* fermentation. *Bioresource technology*. 189: 36-43.
- Qiu, H.; Huang, J.; Yang, J.; Rozelle, S.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Y. (2010). Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy. *Applied Energy*. 87(1): 76-83.
- Ragauskas, A.J.; Beckham, G.T.; Biddy, M.J.; Chandra, R.; Chen, F.; Davis, M.F.; Langan, P. (2014). Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science*. 344(6185): 1246843.
- Ratnavathi, C.V.; Chakravarthy, S.K.; Komala, V.V.; Chavan, U.D.; Patil, J.V. (2011). Sweet sorghum as feedstock for biofuel production: a review. *Sugar Technology*. 13(4): 399-407.
- Saini, J.K.; Saini, R.; Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotechnology*. 5(4): 337-353.
- Saucedo, J.; Castro, A.; Rico, J.; Campos-García, J. (2010). Optimización de hidrólisis ácida de bagaso de *Agave tequilana* Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 9: 1665-2738.
- Taha, M.; Foda, M.; Shahsavari, E.; Aburto-Medina, A.; Adetutu, E.; Ball, A. (2016). Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. *Current opinion in biotechnolog.* 38: 190-197.
- Vanhala, P.; Bergström, I.; Haaspuro, T.; Kortelainen, P.; Holmberg, M.; Forsius, M. (2016). Boreal forests can have a remarkable role in reducing greenhouse gas emissions locally: Land use-related and anthropogenic greenhouse gas emissions and sinks at the municipal level. *Science of the Total Environment*. 557: 51-57.
- Vohra, M.; Manwar, J.; Manmode, R.; Padgilwar, S.; Patil, S. (2014). Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2(1): 573-584.
- Wijaya, H.; Sasaki, K.; Kahar, P.; Kawaguchi, H.; Sazuka, T.; Ogino, C.; Kondo, A. (2018). Repeated ethanol fermentation from membrane-concentrated sweet sorghum juice using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* F118 strain. *Bioresource technology*. 265: 542-547.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Boyce, A.N.; Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 66: 751-774.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Suely, A.; Boyce, A.N.; Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 71: 475-501.
- Zhu, J.Y.; Pan, X.J. (2010). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource technology*. 101(13): 4992-5002.