

# EFFECTO DE PRETRATAMIENTOS DESLIGNIFICANTES SOBRE LA CRISTALINIDAD, HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y ULTRAESTRUCTURA DE RESIDUOS DE LA COSECHA DE LA CAÑA DE AZÚCAR

J. G. Salcedo<sup>a\*</sup>, J. M. Rios<sup>b</sup>, A. Ferrer<sup>b</sup>, J. E. López<sup>c</sup>, L. M. Pardo<sup>d</sup>, C. Aiello<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Universidad de Sucre. Sincelejo, Colombia. <sup>b</sup>Fundación Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT), Zulia, Venezuela. <sup>c</sup> Universidad del Valle, El Valle, Colombia. <sup>d</sup> Universidad Autónoma de Occidente, D.F. Colombia. <sup>e</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Zulia, Venezuela.

\*Autor de correspondencia, email: [jairo.salcedo@unisucra.edu.co](mailto:jairo.salcedo@unisucra.edu.co)

Recibido: Octubre 2012. Aprobado: Enero 2013

Publicado: Enero 2013

## RESUMEN

Los materiales lignocelulósicos representan alrededor del 71% de la biomasa total del planeta. Dada su abundancia se están considerando como materia prima potencial para la producción de bioetanol cuyo uso permite reducir el consumo de combustibles fósiles. Una alternativa es el uso de hojas y cogollos que son residuos del cultivo de la caña de azúcar, los cuales pueden ser convertidos en etanol mediante pretratamiento, hidrólisis y fermentación. En esta investigación se evaluó el efecto de dos pretratamientos de deslignificación, enzimático y organosolvente en cuatro sustratos (S1: no tratado, S2: tratamiento enzimático, S3: organosolvente y S4: organosolvente seguido de blanqueo alcalino) sobre la cristalinidad y producción de azúcares por hidrólisis enzimática medidos como índice de cristalinidad (CrI), número relativo de intensidad (Ir), índice global de sacarificación (IGS) y cambios ultra estructurales, mediante las técnicas de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido (MEB). Los resultados mostraron que los sustratos con menores contenidos de lignina y menores números Kappa, presentan los mayores valores de CrI e IGS, evidenciando que los cambios en la estructura cristalina de la celulosa así como la deslignificación favorecen la hidrólisis enzimática. Las micrografías MEB de los sustratos S2 y S3 muestran ligeras modificaciones superficiales con respecto a S1, mientras que en el sustrato S4 se aprecia destrucción de la pared celular y una gran desfibrilación, típico de una gran deslignificación, validada con los espectros FTIR.

**Palabras claves:** Hojas y cogollos de caña de azúcar, índice de cristalinidad, número de intensidad relativa, pretratamiento organosolvente, hidrólisis enzimática.

## EFFECT OF DELIGNIFYING PRETREATMENTS ON THE CRYSTALLINITY, ENZYMATIC HYDROLYSIS AND ULTRASTRUCTURE OF SUGAR CANE CROP RESIDUES

### ABSTRACT

Lignocellulosic materials account for about 71% of the total biomass in the planet. Given their abundance, they are being considered as a potential feedstock for bioethanol production which can reduce the use of fossil fuel consumption. An alternative is the use of leaves and buds which are crop residues from sugar cane, and can be converted into ethanol by pretreatment, hydrolysis and fermentation. In this study, we evaluated the effect of two delignification pretreatments, enzymatic and organosolv of four substrates (S1: untreated, S2: enzymatic treatment, S3: organosolv and S4: organosolv followed by alkaline bleaching) on the crystallinity and sugars production by enzymatic hydrolysis measured as crystallinity index (CrI), relative intensity number (Ir), global hydrolysis rate (IGS) and ultrastructural changes, by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that substrates with the lowest residual lignin content and Kappa number, have the highest CrI and IGS values, showing that changes in the crystalline structure of cellulose as well as delignification enhance enzymatic hydrolysis. SEM micrographs of substrates S2 and S3 show slight surface modifications with respect to S1, while destruction of the substrate cell walls and great defibrillation, typical of a large delignification, validated by the FTIR spectra, are observed in S4.

**Keywords:** Sugar cane leaves and buds, crystallinity index, relative intensity number, organosolv pretreatment, enzymatic hydrolysis.

## INTRODUCCIÓN

En el Valle del Cauca (Colombia) se siembran alrededor de doscientas mil hectáreas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y se cosechan 16 millones de toneladas de caña de azúcar por año [1]. Esta producción genera abundantes desechos lignocelulósicos, concretamente alrededor de 7 millones de toneladas por año, constituidos principalmente por las hojas y cogollos.

La caña de azúcar y sus residuos presentan un alto contenido de polisacáridos y varios azúcares solubles que les confieren un gran potencial [2]. La cosecha de caña de azúcar en verde genera 30 ton de biomasa por cada tonelada de caña sembrada; actualmente estos residuos se pican y se esparcen sobre el campo de siembra o se colocan sobre surcos o calles para su descomposición [3], a pesar de ser una fuente alternativa de azúcares fermentables, y que pueden ser aprovechados en la producción de combustibles de segunda generación, como lo es el bioetanol. La producción de etanol está tomando cada vez más importancia dada su creciente demanda, ya que su uso permite reducir el consumo de combustibles fósiles, las emisiones de gases de efecto invernadero, la competencia con la industria alimentaria y permite generar un valor agregado a los residuos de la agroindustria [4, 5 y 6].

La biomasa lignocelulósica puede ser convertida a etanol mediante pretratamientos, hidrólisis y fermentación [7]. Sin embargo estas etapas son costosas [8] y por ello se requieren importantes avances técnicos en diversos campos, para reducir los costos de producción a un nivel competitivo con la gasolina [9]. La naturaleza recalcitrante de la pared celular de los materiales lignocelulósicos representa el mayor desafío en ese campo. La matriz lignocelulósica, formada por la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, le confiere resistencia al ataque de microorganismos, enzimas y agentes químicos [10]. La asociación de la hemicelulosa con la lignina,

constituye una auténtica barrera física a la penetración de las enzimas, unida a la cristalinidad y al grado de polimerización de las moléculas de celulosa, se requiere por tanto aplicar pretratamientos para alterar la estructura de la biomasa y hacerla más accesible a las enzimas que convertirán a las cadenas poliméricas en azúcares fermentables. La meta es romper la barrera que forma la lignina (disminuyendo su presencia por solubilización) e irrumpir en la estructura cristalina de la celulosa, aumentando el área superficial de la fibra de celulosa. Una alternativa son los pretratamientos organosolventes que atacan el interior de la lignina y pueden romper ciertos enlaces que la unen con la hemicelulosa (se emplean disolventes orgánicos como el etanol y catalizadores alcalinos o ácidos) y los pretratamientos enzimáticos que permiten degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa [11].

La hemicelulosa y la lignina son polímeros amorfos, a su vez, la celulosa tiene regiones amorfas y cristalinas, estas últimas más difíciles de hidrolizar por las enzimas. Sin embargo, la cristalinidad puede aumentar si las regiones amorfas son solubilizadas por el pretratamiento. Además, existen varias formas amorfas de la celulosa. La Celulosa I es la más abundante en la naturaleza. Las Celulosas II y III pueden ser preparadas por diferentes pretratamientos tales como álcalis, solubilización – recristalización y tratamiento con amoníaco líquido [12], cambios en los amorfos pueden también originar cambios en el índice de cristalinidad, lo cual afecta la velocidad de hidrólisis de la celulosa.

La microscopía electrónica de barrido no distingue las regiones amorfas de las cristalinas en la misma fibra de celulosa. Sin embargo, examinar la morfología antes y después del pretratamiento y la hidrólisis, puede contribuir a explicar este tipo de procesos.

En este trabajo se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la estructura del material lignocelulósico, obtenido de los residuos de la cosecha de caña de azúcar (hojas y cogollos) a través de técnicas de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (MEB).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de sustratos

El sustrato S1 corresponde al material seleccionado en el campo (control), después de la cosecha y previo muestreo. Este material se sometió a secado hasta una humedad de 3,9 % (base húmeda). Posteriormente, se redujo de tamaño hasta que el 94,5% del material pasara una malla 10 y el 22% por una malla 60.

El sustrato S1 se sometió a una deslignificación enzimática con la enzima comercial Suberasa® de Novozyme para la preparación del sustrato S2. La deslignificación se realizó en un reactor por lotes de 4 litros en acero inoxidable con control de temperatura y agitación. La temperatura se mantuvo en 40 °C, con una agitación de 200 rpm y 10% de sólidos (sustrato seco). La reacción se realizó durante 23 horas en una solución buffer de acetato de sodio 50 mM a pH 4,8 [15 y 16]. La dosificación de la enzima fue de 0,33 ml/g de material seco. La actividad enzimática lacasa (0,83UI/ml) se midió por el método descrito por Jong-Rok y col. [17].

El sustrato S1, se sometió a un proceso de deslignificación por organosolvente para obtener los sustratos S2 y S3. Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor de 10 litros a temperaturas de 160 °C durante 120 min, con relaciones sólido líquido 1:8 p/v, las fases líquidas estuvieron compuestas de un 45 % v/v de alcohol etílico. Además se adicionó como catalizador NaOH al 0,5 y 3 % para los sustratos S3 y S4, respectivamente. Para este último sustrato (S4), el material que resultó de la deslignificación, se filtró y se le adicionó ácido sulfúrico

1N hasta un pH de 5, manteniendo una relación sólido/líquido de 85/15. Seguidamente, se agregó EDTA en relación de 1/1000 (p/p) con respecto al material sólido. La mezcla se agitó a 1000 rpm durante 10 minutos, luego se filtró y se lavó el sólido con abundante agua. Este sólido se disolvió con hidróxido de sodio 1N, hasta llevar la mezcla a un pH de 10,8, manteniendo una relación sólido/líquido de 85/15. En estas condiciones se realizó un blanqueo agregando 4% de peróxido de hidrógeno con respecto al sólido, durante dos horas. Después, se separó por filtración el sólido, se lavó y secó [18].

Los sustratos se caracterizaron fisicoquímicamente. Se les determinó el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa por el método descrito por Van Soest [13] y el número Kappa [14].

### Hidrólisis enzimática

En la hidrólisis enzimática se utilizó una mezcla de enzimas comerciales [18] con las siguientes actividades enzimáticas: hemicelulasas de 52,75 unidades globales/ml, celulasas de 27,53 FPU/ml, endoglucanasas de 1782,1 CMC/ml, exoglucanasa de 0,377 UI/ml, beta-glucosidasa de 550 pNPG U/ml, xilanasas de 28,23 UI/ml, galactosidasa de 7,1 UI/ml, manasa de 2,76 UI/ml y ramnasa de 14,63 UI/ml.

Se obtuvieron curvas de progreso de la reacción a partir de diferentes relaciones enzima/sustrato E/S (0,05; 0,1; 0,2 y 0,3) para los sustratos (S1, S2, S3 y S4). La reacción se realizó en soluciones buffer acetato a pH 4,8 con una relación sólido/líquido de 6:100 a una temperatura de 40°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción (0, 2, 6, 9, 24 y 28 horas), a las que se les determinó azúcares reductores por el método de DNS [19]. Se construyeron las curvas de progreso con base en la producción de azúcares reductores en función del

tiempo. El cálculo del porcentaje de sacarificación se realizó según la Ecuación 1 [20].

$$\% S = \frac{\text{Azúcares reduct.} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \times 0,9}{\text{Concentración de sust.} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)} \times 100 \quad (1)$$

Además, Se evaluó el índice de sacarificación y el Índice Global de sacarificación, representados por las Ecuaciones 2 y 3, respectivamente.

$$IS = \frac{\Delta \% S}{\Delta \log \left(\frac{E}{S}\right)} \quad (2)$$

$$IGS = \overline{\% S} \times \overline{IS} \quad (3)$$

Donde:

$$\overline{\% S} = \frac{\sum_{i=1}^4 \% S_{E/S_i}}{4} \quad \overline{IS} = \frac{\sum_{i=1}^5 IS_{t_i}}{5}$$

E/S: relación enzima/sustrato

### Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción de infrarrojo con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada marca Shimadzu, modelo IR Prestige 21. Para el análisis de información se utilizó el software IR solution versión 2. El espectro fue recolectado con 10 scans desde 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$

### Difracción de rayos X

Se midió la difracción de rayos X en un rango de  $2\theta$  de  $10^\circ - 40^\circ$  para los diferentes sustratos, en forma de polvo, en un difractómetro Bruker (Madison, USA). Modelo D8 con radiación de Cobre. Se calculó el índice de

crystalinidad, CrI [19] y el número de intensidad relativa [21 y 22].

### Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se utilizó un equipo MEB modelo 200F Quanta con una resolución de 1,2 nm, de bajo vacío con un cañón de emisión de campo. Las condiciones del equipo fueron: voltaje de aceleración electrónica de 4000-30000 Kv con una presión en el rango de 40,5318 PA.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de los diferentes sustratos que se utilizaron en el presente estudio se muestra en la Tabla 1. Se puede observar que los residuos de la caña de azúcar antes de los pretratamientos, tenían un contenido de celulosa de 37,36% y de lignina residual de 7,12% (S1). Después de los pretratamientos, alcanzaron contenidos hasta de 82,6% y 1,83%, respectivamente (S4). Se puede observar como los sustratos S1 y S2 contienen el mayor contenido de lignina residual (7,12 y 7,18) y mayor número Kappa (47 y 38,56), respectivamente. También se demuestra que el contenido de lignina disminuyó con los pretratamientos, especialmente con los organosolventes, y entre éstos, con el de mayor concentración de álcali.

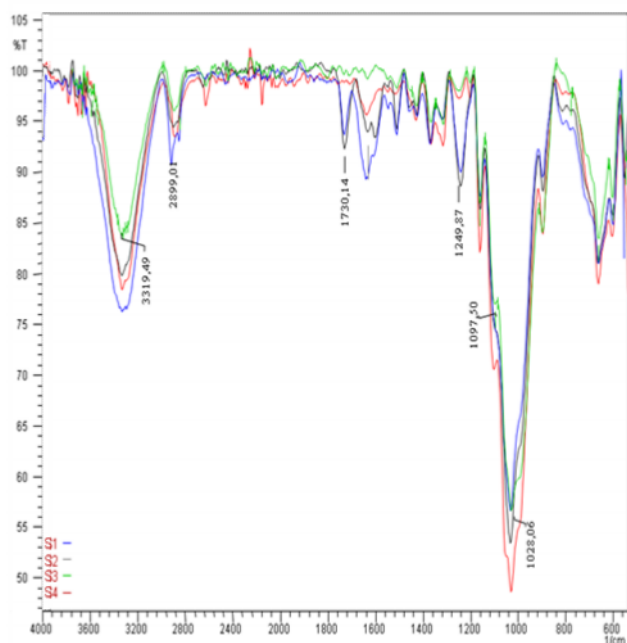
**Tabla 1.** Análisis composicional (porcentaje en base húmeda) de los sustratos de materiales pretratados a partir de residuos de cosecha de caña de azúcar.

	S1	S2	S3	S4
Celulosa	37,36	44,50	82,35	82,60
Hemicelulosa	34,60	37,30	3,01	7,37
Lignina	7,12	7,18	1,93	1,83
N° Kappa *	47,00	38,56	27,39	6,21

\*No entra en análisis porcentual.

La Fig. 1, permite comparar el espectro infrarrojo del sustrato S1 que corresponde al material recogido del campo sin ningún pretratamiento. Este sustrato es tomado como línea base, para comparar el efecto de los pretratamientos sobre el espectro infrarrojo de los

sustratos pretratados S2, S3 y S4. Por lo general, los grupos funcionales del sustrato S1, son los que presentan mayor intensidad de absorbancia en el rango de banda de 600 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ . En las bandas de 3020  $\text{cm}^{-1}$  a 3600  $\text{cm}^{-1}$  donde se presentan tensiones OH [23 y 24], la intensidad de absorción de mayor a menor se discrimina así: S1, S2, S4 y S3. Con esta información, se puede afirmar que el sustrato S1 muestra la existencia de altas tensiones de grupos OH, debido a que existe una gran interrelación entre moléculas que forman enlaces de hidrógeno. El sustrato S4 que fue sometido a pretratamiento organosolvente y a un tratamiento adicional de blanqueo presentó las más bajas tensiones OH. Es posible que esta disminución esté relacionada con la eliminación de las tensiones OH que se encuentran en la lignina y hemicelulosa.



**Fig. 1.** Espectro infrarrojo para los sustratos S1, S2, S3 y S4.

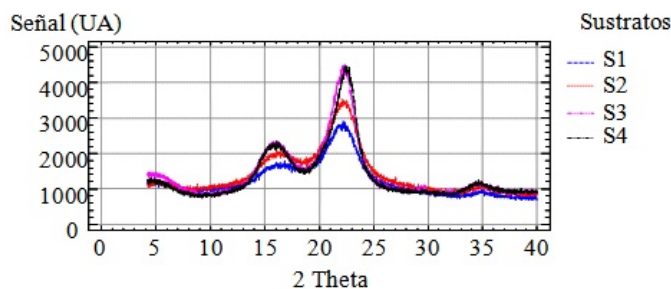
La banda 3010  $\text{cm}^{-1}$  representa la vibración =CH del anillo aromático, la banda 2936  $\text{cm}^{-1}$  la vibración asimétrica -CH<sub>2</sub> (guaiacil, siringil) y la banda 2840  $\text{cm}^{-1}$  la vibración simétrica -CH<sub>2</sub> de guaiacil -siringil [25]. La mayor intensidad de absorción de estos grupos ligados a la lignina se presenta en el sustrato S1, seguido de los

sustratos S2, S4 y S3. Esta información es un indicador de la pérdida de lignina durante los pretratamientos, debido a la remoción de la estructura aromática de lignina.

Los picos 1246  $\text{cm}^{-1}$  y 1201  $\text{cm}^{-1}$  se encuentran dentro del rango de banda 1250  $\text{cm}^{-1}$  - 1050  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a enlaces C-O del anillo siringil en la estructura de lignina [25], se nota una disminución de la intensidad de absorbancia de esta banda desde los sustratos S1 y S2, seguido del sustrato S3 hasta el sustrato S4, el cual presenta el menor valor. Igualmente, la disminución de esta banda representa eliminación de lignina. Además, se pueden observar que los valores de intensidad de la señal a 1730  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a las elongaciones C=O no conjugados al anillo aromático de la lignina, tienen valores semejantes para los sustratos S1 y S2. Caso contrario, al comportamiento de esta banda con respecto a S3 y S4.

En los espectros aparecen otras señales, pero no están relacionadas con la lignina y no se discuten en este trabajo.

La difracción de rayos X, fue otro criterio que se utilizó en esta investigación. La Fig. 2 presenta los perfiles de difracción para los sustratos ensayados. Esta información se usó para determinar el índice de cristalinidad. Además, se evaluó el efecto de los diferentes pretratamientos sobre el grado de cristalinidad, basado en la conversión de celulosa (CI) a celulosa (CII) mediante el valor de intensidad relativa [26]. Se aplica el valor de cero a la celulosa pura nativa (CI) y 1 para la celulosa completamente mercerizada (CII); valores intermedios indican mercerización parcial [20 y 21].



**Fig. 2.** Perfiles de difracción de rayos X para los sustratos S1, S2, S3 y S4.

En la Tabla 2, se observa que el mayor índice de cristalinidad (CrI) corresponde al sustrato, que además del pretratamiento organosolvente se le realizó un tratamiento adicional como es el sustrato S4 (64,24). El menor CrI corresponde al sustrato S1 (4,41), que es el material al cual no se le ha realizado ningún pretratamiento. Estos resultados indican que se puede estar perdiendo material amorfo, como lignina, hemicelulosa y celulosa amorfa, por lo tanto, el valor del índice de cristalinidad aumenta.

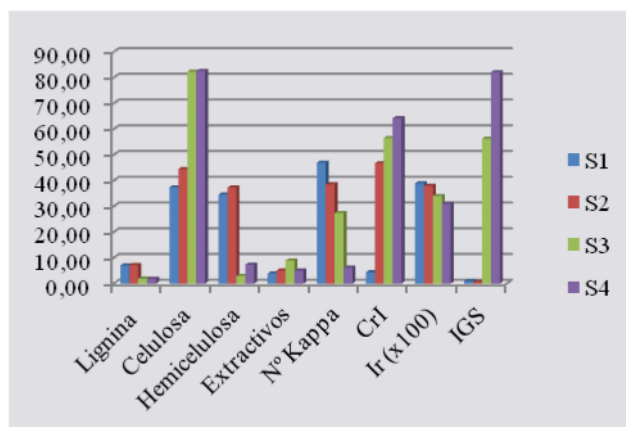
**Tabla 2.** Evaluación del índice de cristalinidad (CrI), número de intensidad relativa ( $I_r$ ) e índice global de sacarificación (IGS) para los sustratos S1, S2, S3 y S4.

Sustrato	CrI	$I_r$	IGS
S1	4,41	0,39	1,01
S2	46,76	0,38	0,65
S3	56,54	0,34	56,34
S4	64,24	0,31	82,09

En la misma tabla, se observa que el valor del número de intensidad relativa ( $I_r$ ) que más se aproxima a cero corresponde al sustrato S4 (0,31) y el de mayor valor es el sustrato S1 (0,39). Este indicador revela que los pretratamientos eliminan celulosa CII. El material de las hojas y cogollos sin pretratar deberían tener solo CI. Es posible que el secado al que se sometieron estos residuos produjera la conversión de CI a CII. Por otra parte, se esperaba que el uso de álcali en los pretratamientos

organosolventes aumentara la proporción de CII a expensas de CI.

En la Fig. 3 se puede observar que los sustratos que presentan el menor contenido de hemicelulosa, lignina y N° Kappa, presentan los mayores contenidos de celulosa, extractivos, índice de cristalinidad (CrI), menor Intensidad relativa ( $I_r$ ), y una alta susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, expresada en altos índices globales de sacarificación (IGS), correspondiendo a los sustratos S3 y S4, siendo este último el que mejores resultados presenta. El sustrato S4 tuvo mayor concentración del catalizador alcalino y un blanqueo adicional.

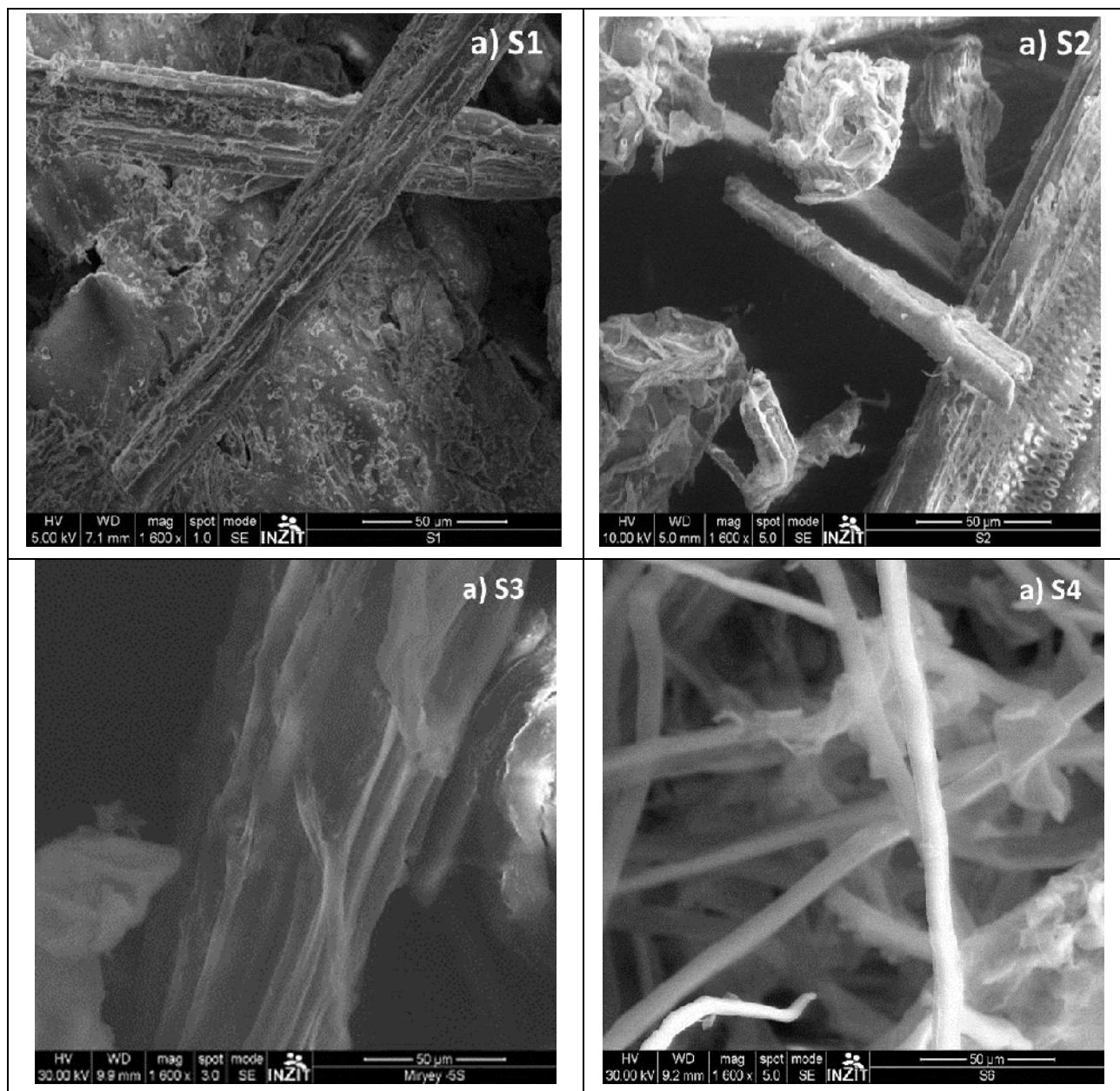


**Fig. 3.** Resultados comparativos de la composición química de los sustratos y el efecto de los pretratamientos.

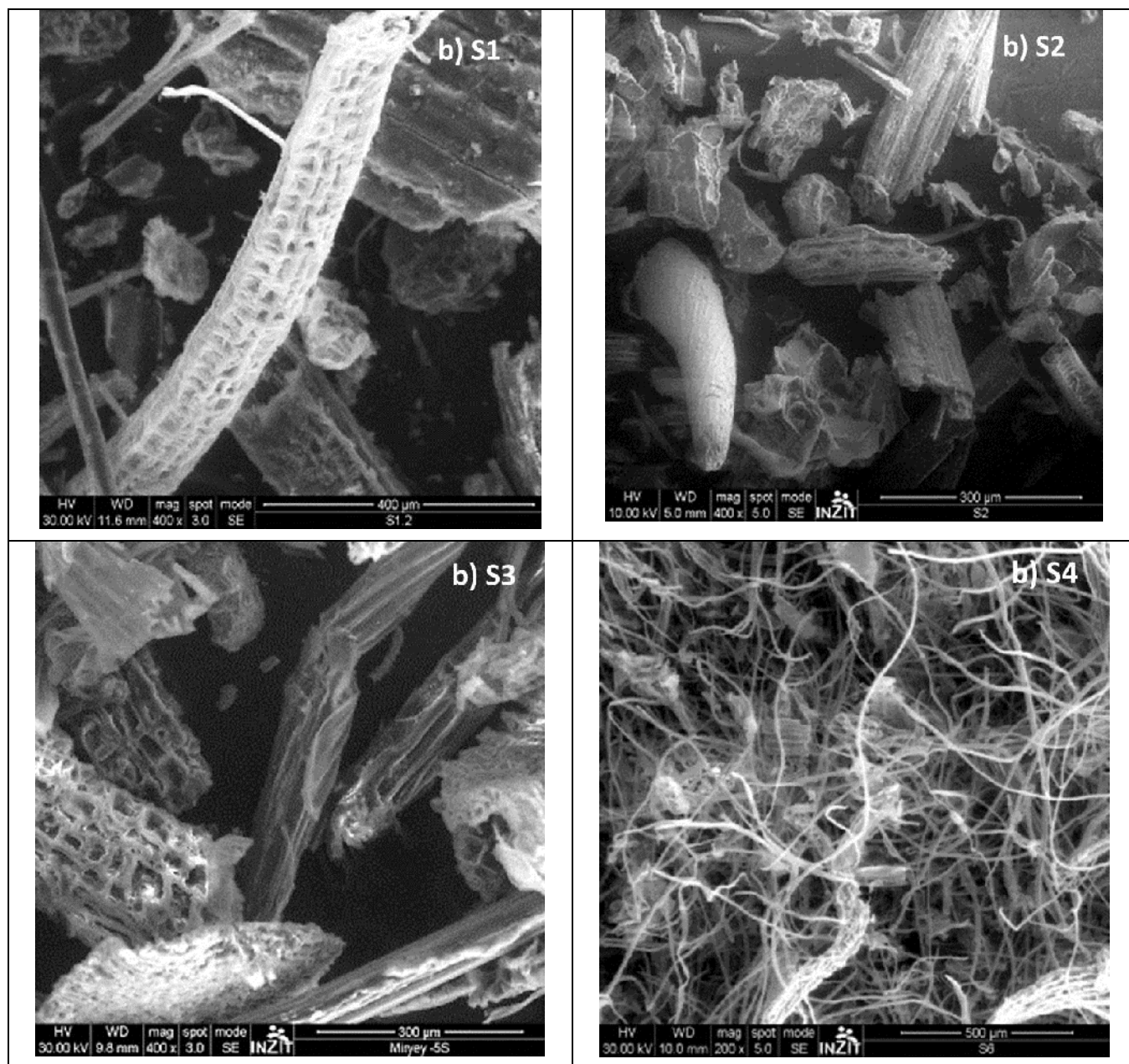
La Fig.4, muestra las micrografías de los diferentes sustratos que se utilizaron en esta investigación. A simple vista, se notan diferencias entre el sustrato S1 y los sustratos pretratados. Las microfotografías de los sustratos S2 y S3 muestran pequeñas diferencias a nivel superficial con respecto a S1. Caso contrario a las microfotografías del sustrato S4, que muestra una alta liberación de microfibrillas con respecto al sustrato sin pretratamiento S1. Sin embargo, S4 presentó un contenido de lignina similar al S3, por lo que no se esperaba una diferencia tan marcada. No obstante, es importante destacar que S3 presentó un valor más elevado del Número Kappa, sugiriendo que en el sustrato S4 hubo pérdida de

compuestos fenólicos, aunque no necesariamente asociados a la lignina. Estos resultados refuerzan la afirmación sobre el efecto del contenido de lignina y el pretratamiento sobre la velocidad de hidrólisis. Igualmente, que el objetivo del pretratamiento de materiales lignocelulósicos es intentar desorganizar la

estructura cristalina de macro y micro fibrillas, para liberar las cadenas poliméricas de celulosa y hemicelulosa y modificar los poros en el material para permitir a las enzimas penetrar dentro de las fibras y hacer más eficiente la hidrólisis enzimática [27 y 11].



**Fig. 4. a)** Microscopía electrónica de barrido (MEB) de residuos de cosecha (hojas y cogollo) de caña de azúcar. Micrografías a 1600 x de magnificación. S1: material sin pretratar. S2: después de pretratamiento enzimático. S3 y S4: después de pretratamiento organosolvente.



**Fig. 4. b)** Microscopía electrónica de barrido (MEB) de residuos de cosecha (hojas y cogollo) de caña de azúcar. Micrografías a 400 x de magnificación. S1: material sin pretratar. S2: después de pretratamiento enzimático. S3 y S4: después de pretratamiento organosolvente.

## CONCLUSIONES

En este estudio, se observa una influencia del contenido de lignina sobre la facilidad para hidrolizar los sustratos para las diferentes enzimas, lo que concluye que la lignina puede actuar como un inhibidor en la hidrólisis enzimática de los residuos de la caña de azúcar. También, es importante el pretratamiento previo que se le haga al material original.

Los pretratamientos organosolventes producen fuertes cambios en la estructura del material lignocelulósico obtenido de los residuos de la caña de azúcar, ya que eliminan lignina y coadyuvan a cambios en la estructura cristalina de la celulosa, generando aparentemente disminución de celulosa II. Caso contrario a la



deslignificación enzimática, donde los cambios no son apreciables comparados con los otros pretratamientos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero dado al proyecto 2007D-3719-346-07 por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Universidad Autónoma de Occidente (Laboratorio de Bioprocesos), la Universidad del Valle y el Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas “INZIT”, lo mismo que a la Agencia de Cooperación Suiza a través del proyecto: EPFL DDC 2009-2012 SCIENTIFIC COOPERATION FUND.

## REFERENCIAS

- [1] CENICAÑA (2007) “Indicadores de productividad de la industria azucarera colombiana entre enero y agosto de 2006 – 2007” *Informe Anual*, Florida, Valle del Cauca.
- [2] Ruíz R., Ruiz G., Salgado J., Beltrán M. (2005) “Relación entre la temperatura de la masa fermentativa, temperatura ambiental y el contenido de proteína cruda durante la elaboración de Saccharina rústica” I Congreso Internacional de Producción Animal. La Habana, p.p. 272-279.
- [3] Serna C. L., Rodríguez A. (2007) “Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Sacharum officinarum L.*)” *Agricultura Técnica* 67(1):29-38.
- [4] Simmons B.A. Loque D., Blanch, H. W. (2008) “Next-generation biomass feedstocks for biofuel production” *Genome Biology* 9(12):242.
- [5] Ragauskas A.J. (2006) “The path forward for biofuels and biomaterials” *Science* 311(5760):484-489.
- [6] Banerjee S., Sen R., Pandey R.A., Chakrabarti T., Satpute D., Giri B.S., Mudliar S. (2009) “Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice hulk and process optimization” *Biomass and Bioenergy* 33:1680-1686.
- [7] Kumar, R. Singh, S., Singh, O.V. (2008) “Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(5):377-391.
- [8] Wen, F., Nair, N.U., Zhao H. (2009) “Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production” *Current Opinion in Biotechnology* 20(4):412-9.
- [9] International Energy Agency (2010) “Sustainable Production of Second-Generation Biofuels” Paris.
- [10] Aro N., Pakula T., Penttila M. (2005) “Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi” *FEMS Microbiology Reviews* 29: 719–739.
- [11] Mosier N. (2004) “Features of promising Technologies for pretreatment of biomass” *Bioresource Technology* 96(6):673-86.
- [12] Atalla R.H., Vanderhart D.L. (1984) “Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms” *Science* 223:283-285.
- [13] Van Soest P. (1983) “Use of detergents in the Analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content” *Journal of the AOAC* 46:829 – 835.
- [14] TAPPI. (1993) “Kappa number of Pulp” Technical Association of the Pulp and Paper Industry, México (TAPPI T 236 cm-85).
- [15] Bourbonnais R., Paice M.G. (1990). “Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role of laccase in lignin biodegradation” *FEBS Letters* 267(1):99-102.
- [16] Silva R., Gonzáles A., Villar J. (2002) “Delignificación enzimática de pasta al sulfato de *E. globulus* empleando lacasas fúngicas” *Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*, CIADICYP.
- [17] Jong-Rok J., Murugesan K., Kim Y., Kim E., Chang Y. (2008) “Synergistic effect of laccase mediators on

- penta chloro phenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase” *Appl Microbiol Biotechnol* 81:783–790.
- [18] Salcedo J., López J.E., Pardo L.M. (2011) “Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (Hojas y cogollos) de cosecha de caña de azúcar” *Dyna* 168:182-190.
- [19] Miller G. (1959) “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars” *Analytical Chemistry* 31:426- 426.
- [20] Ghose T.K. (1987) “Measurement of cellulase activities” *Pure and Applied Chemistry* 59: 257268.
- [21] B.G. Ranby (1952) “The mercerization of cellulose” *Acta Chemica Scandinavica* 6:116-127.
- [22] Zhang J., Dongli L., Zhang X., Yuguan S. (1993) “Solvent effect on carboxymethylation of cellulose” *Journal of Applied Polymer Science* 49:741-746.
- [23] Gurgel L.V.A., Marabezi K., Ramos L.A., Da Silva Curvelo A. A. (2012) “Characterization of depolymerized residues from extremely low acid hydrolysis (ELA) of sugarcane bagasse cellulose: Effects of degree of polymerization, crystallinity and crystallite size on thermal decomposition” *Industrial Crops and Products* 36:560–571.
- [24] Colom X., Carrillo F., Nogues F., Garriga P. (2003) “Structural analysis of photo degraded wood by means of FTIR spectroscopy” *Polymer Degradation and Stability* 80: 543–549.
- [25] Carballo-Abreu L.R., Orea U. Cordero E. (2004) “Composición química de tres maderas en la provincia de Pinar del Rio, Cuba a tres alturas del fuste comercial. Parte I *Corymbia Citriodora*” *Chapingo* 10(001):57-62.
- [26] Mansikkamaki P., Lahtinen M., Rissanen K. (2007) “The conversion from cellulose I to cellulose II in NaOH mercerization performed in alcohol–water systems: An X-ray powder diffraction study” *Carbohydrate Polymers* 68: 35–43.
- [27] Galbe M., Zacchi G. (2002) “A review of the production of ethanol from softwood” *Appl. Microbial Biotechnol* 59:618- 628.