

Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar¹

Kinetics of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse pith

J. R. Ferrer², G. Páez², L. Arenas de Moreno³,
C. Chandler², Z. Mármol² y L. Sandoval³

Resumen

Se estudió la producción de azúcares reductores (AR) a partir de la hidrólisis ácida del bagacillo de caña, ya que ellos representan una fuente fundamental de carbohidratos para procesos biotecnológicos, orientados a la producción de proteína unicelular y compuestos orgánicos. El bagacillo tratado (BT) y no-tratado (BNT) con inmersión en agua (TA) a temperatura ambiente, se hidrolizó, mediante ebullición a reflujo, con diferentes concentraciones (C) de ácido sulfúrico diluido (2%, 4%, 6% y 8 % v/v) a diferentes tiempos de reacción (TR) (4, 8 y 12 h.), en una relación líquido: sólido de 30/1. La determinación cuantitativa de AR se realizó por espectrofotometría UV-Vis por el método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS). El experimento involucró un diseño totalmente al azar con un arreglo factorial 2 x 3 x 4 con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza con el paquete estadístico "Statistical Analysis System" (SAS); se utilizó la prueba HSD de Tukey para los efectos principales y el método de mínimos cuadrados para las interacciones. Los resultados demostraron que todos los factores en estudio y sus interacciones, excepto la interacción (TA x TR), afectaron significativamente ($P < 0,01$) la concentración (g/L) de AR. La concentración de AR varió de 2,58 a 20,45 g/L, con un promedio general de 10,53 g/L. La mayor producción de AR ($16,76 \pm 1,71$ g/L) se obtuvo en la hidrólisis de BNT con ácido sulfúrico al 6% y 4 horas de reacción. **Palabras clave:** Caña de azúcar, bagacillo, hidrólisis ácida, azúcares, material lignocelulósico.

Recibido el 18-6-2000 ● Aceptado el 15-10-2001

1 Proyecto No. 02580-97 financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES). LUZ

2 Laboratorio de Fermentaciones Industriales. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Facultad de Ingeniería. La Universidad del Zulia (LUZ).

3 Facultad de Agronomía. Instituto de Investigaciones Agronómicas. LUZ

Abstract

The production of reductive sugars (AR) through acid hydrolysis of sugar cane bagasse was performed in order to study reducing sugar production, because they represent a basic carbohydrate source in biotechnological processes for single cell protein and organic compound production. The study involved hydrolysis of treated (BT) and non-treated (BNT) bagasse pith immersed in water at environmental temperatures through reflux boiling with different concentrations of diluted sulphuric acid (2%, 4%, 6%, 8%, v/v) with different reaction times (TR) (4, 8 and 12 hrs) in a liquid/solid ratio of 30/1. Reducing sugars concentrations (AR) were determined by UV-Vis spectrum-photometry using the 3.5 dinitrosalisilic acid method. The experiment utilized a factorial arrangement (2 x 3 x 4) in a completely random design with three replicates. Variance analysis was performed with Statistical Analysis System (SAS) using the Tukey HSD method for main effects and the minimum squares method for interactions. The results showed that all the factors significantly affected the AR concentration ($P < 0,01$) except the interaction (TA x TR). The greatest AR concentration was (16.76 ± 1.71 g/L) when using bagasse pith without aqueous treatment, with a 6 % sulfuric acid solution and 4 hours of reaction time. AR concentration varied between 2.58 and 20.45 g/L, with an general average of 10.53 g/L.

Key words: Acid hydrolysis, bagasse pith, sugar cane, sugar, lignocellulosic material.

Introducción

El bagacillo de caña de azúcar es un material ligno-celulósico, obtenido en las centrales azucareras como desecho, representando el 25% del total de la caña de azúcar procesada.

Se han desarrollado muchos tratamientos para hacer los materiales ligno-celulósicos más susceptibles a la sacarificación, que incluyen los tratamientos físicos, químicos y enzimáticos. Como tratamiento físico, la molienda disminuye el índice de cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, aunque permite aumentar la superficie de contacto con reactivos y enzimas (6,17). De la misma manera, la molienda húmeda favorece la hidrólisis enzimática de la celulosa, según lo

reporta Chang *et al.* (5). Investigaciones han demostrado que el molino de bolas vibratorio causa un incremento importante en la velocidad de hidrólisis ácida y enzimática de sustratos celulósicos (17,20,23).

Respecto a los tratamientos químicos en este tipo de materiales, Tsao *et al.* (24), utilizando una combinación de solventes (cadoxen y ácido sulfúrico), lograron remover la estructura cristalina y la lignina, permitiendo obtener la celulosa reprecipitada de fácil uso para hidrólisis ácida o enzimática, con alta producción de glucosa.

El hinchamiento del material ligno-celulósico ha demostrado ser un tratamiento efectivo para aumentar la

posibilidad de ataque de los compuestos químicos a los carbohidratos monómeros componentes de sus estructuras. Los efectos de los tratamientos alcalino y acuoso del bagacillo de caña de azúcar, sobre la producción de proteína microbiana, por fermentación sólida con *Trichoderma reesei* y *Chaetomium cellulolyticum*, respectivamente, permitieron incrementar la producción de proteína, obteniéndose los mejores resultados para el tratamiento alcalino (4).

Los métodos enzimáticos han sido ensayados en diferentes investigaciones con resultados satisfactorios. Así, Andren *et al.* (1) estudiaron la sacarificación enzimática con celulasa de *T. viride* QM9414, a una concentración de 2 unidades internacionales/ml sobre un grupo de sustratos lignocelulósicos, encontrando que la concentración de azúcares reductores fue de 26,3 g/l., cuando se usó bagazo de caña de azúcar. Diferentes resultados fueron reportados por Fox (9), cuando estudió la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar tratado con hidróxido de sodio, utilizando un concentrado enzimático sólido de *T. reesei* C30. En dicha investigación se obtuvieron concentraciones de azúcares reductores del orden de 136 g/l.

La hidrólisis de los materiales lignocelulósicos ha sido intensamente investigada y desarrollada en la mayor parte del siglo XX. Sin embargo, hasta el presente, diferentes problemas asociados a este proceso no han sido resueltos completamente. La factibilidad económica de estos procedimientos depende

principalmente de bajos costos en la materia prima, en energía y operación y bajos costos de inversión (3,19). Por lo tanto, procesos a pequeña y mediana escala, utilizando tecnologías simples, son los más recomendables (6,12). La hidrólisis enzimática requiere de la aplicación de tratamientos a la lignocelulosa, ya que el requisito para la hidrólisis es la accesibilidad a la superficie celulósica por la enzima celulolítica (14). Sin embargo, los costos de molienda y deslignificación son prohibitivos, y el empleo de solventes orgánicos tales como cadoxen, presenta peligros de carácter ambiental, en este caso por la presencia de cadmio (22).

El costo de recuperación de los reactivos es también un factor clave para contribuir a la economía del proceso. Hasta el presente la hidrólisis enzimática no ha tenido éxito como para ser desarrollada a nivel industrial y se requerirá, previamente, un esclarecimiento de manera integral, de los aspectos económicos del proceso (19). La hidrólisis ácida, en cambio, ha sido llevada a escala comercial desde 1909 en USA y otros países de Europa y Asia, para fermentar la glucosa en alcohol, utilizando madera como sustrato (24). Utilizando esta metodología se han desarrollado procesos biotecnológicos para obtener proteína unicelular de microorganismos y compuestos químicos, usando como sustrato diferentes desechos agropecuarios (4,6,18,22,25) y desechos de la industria de mariscos (8,10).

Basados en los antecedentes antes expuestos, el objetivo del presente

trabajo se centró en el estudio de la cinética de la hidrólisis del bagacillo de caña de azúcar con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico

diluido, utilizando condiciones de ebullición a reflujo, a presión atmosférica.

Materiales y métodos

Sustrato

El bagacillo de caña de azúcar, subproducto del procesamiento de caña de azúcar (variedad Cuba 323-68), se obtuvo del Centro de Investigaciones de Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE), ubicado en San Felipe, estado Yaracuy, Venezuela. Después de su recolección, el material fue secado en una estufa marca Memmert a una temperatura de 80 °C, molido en un molino marca Tomas Wiley y cernido en un tamiz de 20 mesh, para homogeneizar las partículas a un tamaño < 0,84 mm. Las muestras así preparadas, se conservaron en bolsas plásticas de cierre hermético a temperatura ambiente hasta su utilización. La caracterización del bagacillo de caña de azúcar tratado (BT) y sin tratar (BNT), en lo relativo a su composición en materia seca, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo, lignina, celulosa y hemicelulosa, se realizó mediante la metodología descrita por la A.O.A.C. (2).

Tratamiento acuoso

Con el propósito de producir el hinchamiento del material, las muestras de bagacillo se sumergieron en agua, utilizando una relación líquido: sólido igual a 5/1, a temperatura ambiente, por una hora. Una vez transcurrido este tiempo, el material fue lavado tres veces con agua destilada, filtrado y secado en una estufa a 80 °C, durante 24 h. Estas

muestras fueron caracterizadas de la misma manera que el bagacillo sin tratamiento, por triplicado (2).

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó con muestras de bagacillo tratado (BT) y bagacillo no tratado (BNT), por triplicado, mediante ebullición a reflujo y a presión atmosférica a nivel de laboratorio. Se utilizó ácido sulfúrico diluido a diferentes concentraciones (2, 4, 6 y 8% v/v), una relación líquido:sólido de 30/1, y diferentes tiempos de reacción (4, 8 y 12 h.). Un enfriamiento rápido de la mezcla de reacción se utilizó para detener la reacción de hidrólisis. El hidrolizado se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se ajustó el pH de 2,0 a 4,5 con una solución 2N de NaOH. Posteriormente, se decoloró con carbón activado y se guardó bajo refrigeración (8 °C) hasta su utilización (26).

Determinación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores en los hidrolizados se determinó utilizando el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar (15,16). Las lecturas de absorbancia se midieron en un colorímetro Bausch & Lomb, Spectronic 20, a 584 nm.

Análisis estadístico

El experimento involucró un diseño totalmente al azar con un arreglo factorial 2 x 3 x 4 con tres

repeticiones. Se realizó un análisis de varianza con el paquete estadístico "Statistical Analysis System" (SAS) (21); se utilizó la prueba HSD de Tukey

para los efectos principales y el método de mínimos cuadrados para las interacciones significativas.

Resultados y discusión

Caracterización del bagacillo de caña de azúcar

En el cuadro 1 se puede observar la composición del bagacillo de caña de azúcar no tratado (BNT) y tratado (BT).

El análisis de dicha tabla permite establecer que los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina del bagacillo de caña de azúcar original y tratado, se encuentran dentro de los rangos correspondientes a la composición de los materiales lignocelulósicos (40-60%; 20-40%; y 10-25%, para celulosa, hemicelulosa y lignina, respectivamente) reportados por otros investigadores (4,6,7, 11, 14, 15, 22, 23, 24, 26).

De la comparación de los resultados obtenidos para el bagacillo

tratado (BT) y no tratado (BNT), se puede inferir que el tratamiento acuoso de hinchamiento, disminuyó la disponibilidad de celulosa y hemicelulosa, en forma relativa, en 24,35 % y 37,21 %, respectivamente. Esto no es deseable ya que se limita la posibilidad de hidrólisis de dichos polímeros y por consiguiente, la producción de azúcares reductores. Por otro lado, se obtuvo una disminución en el contenido de lignina del 28 %, lo cual si resulta un aspecto positivo en el ataque del ácido a la estructura polimérica de la celulosa y la hemicelulosa.

La variación general de las concentraciones (g/L) de azúcares reductores de la totalidad de las muestras analizadas se ubicó entre 2,58

Cuadro 1. Caracterización del bagacillo de caña de azúcar tratado (BT) y no tratado (BNT)

Componente (% en base seca)	Tratamiento	
	BNT	BT
Materia seca	92,50 ± 1,46	90,35 ± 0,49
Cenizas	9,53 ± 0,16	10,11 ± 0,08
Lignina	12,86 ± 0,28	9,41 ± 0,88
Celulosa	52,25 ± 0,34	40,47 ± 0,98
Hemicelulosa	19,27 ± 1,58	12,39 ± 0,71
Proteína cruda	2,31 ± 0,04	2,36 ± 0,01
Extracto etéreo	0,91 ± 0,23	1,04 ± 0,33

y 20,45 g/l con una media general de 10,53 g/L, valores que se encuentran en los rangos reportados por otros investigadores (13, 15, 22, 26).

Dado que los efectos de los factores principales, según indica el análisis de varianza y corroboran las pruebas de medias y figuras adjuntas, se manifestaron interrelacionados afectando significativamente la concentración de azúcares reductores (interacciones cruzadas), se hace necesaria una discusión detallada de los mismos.

Efecto de la interacción concentración del ácido sulfúrico * tratamiento con inmersión en agua.

El análisis de varianza detectó diferencias significativas ($P < 0,01$) para la interacción C*TA sobre el contenido de AR. El comportamiento de las muestras de bagacillo de caña utilizadas en este estudio (BNT y BT), se muestran en la figura 1, donde se observa que, para ambos tipos de muestra, las mayores concentraciones de AR se produjeron a una concentración del ácido igual al 4 %, disminuyendo paulatinamente en la medida en que aumentó la concentración del ácido sulfúrico. No obstante, la prueba de medias demostró que la mayor concentración ($p < 0, 01$) de AR se obtuvo en el bagacillo no tratado (BNT).

Efecto de la interacción del tiempo de reacción * concentración de ácido sulfúrico.

La figura 2 muestra los resultados de la prueba de medias para el efecto de la interacción TR*C sobre la producción de azúcares reductores

con bagacillo de caña.

Los resultados demostraron que las mayores concentraciones (g/L) de azúcares reductores se obtuvieron en la hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% v/v a las 4 h y 8h ($15,29 \pm 2,63$ y $14,57 \pm 2,42$ g/L, respectivamente) y con ácido sulfúrico al 6% v/v a las 4h ($14,47 \pm 2,95$ g/L).

Del estudio del comportamiento de la hidrólisis para un tiempo determinado y variando las concentraciones del ácido, en general se observa que la concentración de azúcares aumentó con la concentración del ácido, hasta una concentración óptima, a partir de la cual se hizo evidente la degradación de los azúcares debido a la disminución brusca en su concentración. Estos resultados se corresponde con las observaciones establecidas por diferentes investigadores, en las que un aumento de la concentración del ácido produjo aumento de la velocidad de hidrólisis y de la velocidad de degradación de los azúcares producidos (4, 25,26).

Efecto de la interacción del tratamiento * tiempo de reacción * concentración de ácido sulfúrico.

Los valores medios de la concentración de azúcares reductores en las muestras de bagacillo de caña respecto a la interacción TA * TR * C se muestran el cuadro 2. La existencia de esta interacción indica que el comportamiento de la variable AR está gobernado por la combinación de todos los efectos estudiados. Sin embargo, el BNT presenta mejores posibilidades de aprovechamiento para la obtención de azucares, debido a que no hubo

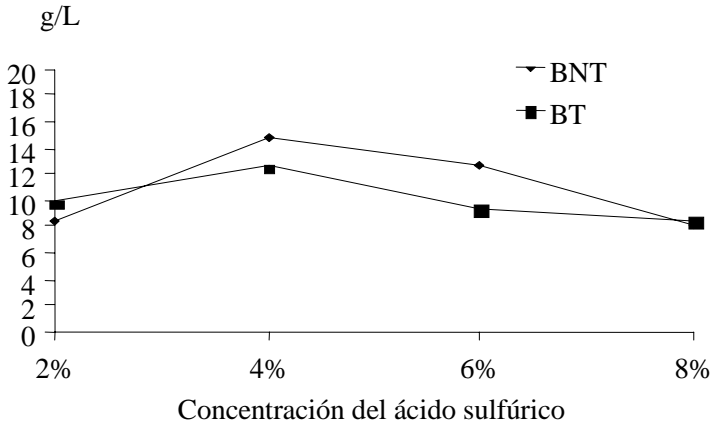


Figura 1. Tendencias de la concentración de AR en las diferentes muestras de bagacillo de caña en función de la concentración del ácido

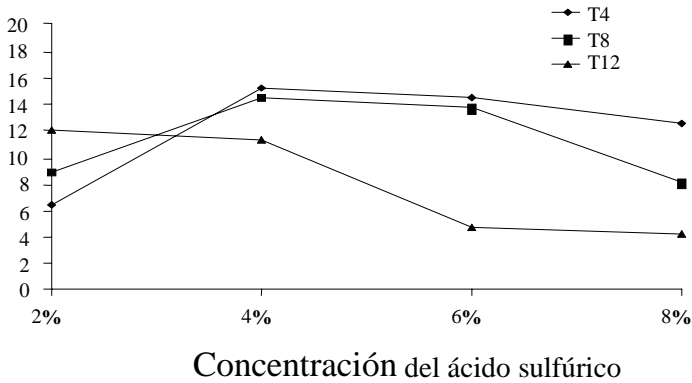


Figura 2. Tendencias de la concentración de AR para la interacción TR * CA

Cuadro 2. Comparación de medias de la concentración (g/L) de azúcares reductores respecto al tratamiento, tiempo de reacción y a la concentración de ácido sulfúrico.

	Tratamiento					
	BNT			BT		
Tiempo, h						
Conc. de H ₂ SO _{4,V/V}	4	8	12	4	8	12
2	6,64 ^{c/ef}	9,95 ^{b/d/f}	8,76 ^{b/de/g}	6,09 ^{b/ef}	7,91 ^{c/ef}	15,58 ^{a/d/f}
4	16,19 ^{a/d/f}	13,36 ^{a/ef}	15,12 ^{a/de/f}	14,38 ^{a/d/f}	15,77 ^{a/d/f}	7,55 ^{b/e/g}
6	16,76 ^{a/d/f}	15,20 ^{a/d/f}	5,84 ^{c/ef}	12,18 ^{a/d/g}	12,28 ^{b/d/g}	3,71 ^{c/ef}
8	10,69 ^{b/d/g}	9,14 ^{b/d/f}	4,37 ^{c/ef}	14,35 ^{a/d/f}	6,95 ^{c/ef}	4,03 ^{c/ef}

a,b,c: letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,01$) para un mismo tratamiento a un determinado tiempo de reacción, a diferentes concentraciones de ácido.

d,e: letras distintas en una misma fila, indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,01$) para un mismo tratamiento a una determinada concentración de ácido, en los diferentes tiempos de reacción.

f,g: letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,01$) en los diferentes tratamientos a un mismo tiempo de reacción y a una misma concentración.

disminución de las concentraciones de celulosa y hemicelulosa en su estructura, porque en este caso el bagacillo no fue sometido a tratamiento acuoso. Esto permite establecer que, las concentraciones de azúcares reductores obtenidas en el hidrolizado BT son inferiores a las obtenidas en hidrolizados BNT.

Las tendencias relativas de las muestras en los diferentes ensayos de hidrólisis, muestran un comportamiento opuesto en las muestras de BNT y BT cuando son hidrolizadas con ácido al 2%. La concentración de AR en BT aumenta con el TR mientras que para BNT disminuyen.

Cuando la concentración del ácido es 4%, el comportamiento es diferente.

En las muestras de BNT la concentración de AR aumenta con el tiempo de reacción mientras que las de BT disminuye. Para las concentraciones de ácido sulfúrico equivalentes a 6 y 8 % v/v, el comportamiento es el mismo, ésto es, las concentraciones de azúcares reductores disminuyen con el tiempo, a una velocidad acelerada.

En general, para el bagacillo tratado (BT), la cinética en cuanto a la producción de azúcares reductores, muestra una disminución de la misma a medida que transcurre el tiempo. Esta disminución indica que los azúcares sufrieron reacciones de degradación a productos de descomposición (26).

Del análisis del cuadro 2, se observa que el contenido de azúcares reductores (16,76 g/l), obtenido de la hidrólisis de BNT para una concentración de ácido sulfúrico del 6% v/v y un tiempo de reacción de 4 horas, superó al indicado por Tewari *et al* (23) de 13,10 g/l al hidrolizar bagacillo de caña de azúcar, utilizando ácido sulfúrico al 5% v/v; sin embargo es similar al establecido por Singh *et al* (22), de 16,45 g/l, al realizar la hidrólisis del bagacillo de caña con ácido sulfúrico al 1 % v/v y una temperatura de 220 °C.

Otros investigadores, utilizando sacarificación enzimática del bagazo de caña de azúcar, obtuvieron concentraciones de azúcares reductores de 2,75 g/l (24), 14,42 g/gl (17) y 24,59 g/l (11), lo cual demuestra que los resultados obtenidos en este estudio de sacarificación ácida de bagacillo de caña de azúcar, utilizando ebullición a reflujo a presión atmosférica, se encuentran dentro del rango encontrados en estudios de mayor complejidad operacional y económica, al usar equipos de alta tecnología para llevar a cabo la sacarificación enzimática.

Conclusiones

El bagacillo de caña de azúcar es un desecho agro-industrial con escaso valor para aprovecharlo como combustible o como alimento animal, pero posee concentraciones adecuadas de celulosa ($52,25 \pm 0,34$ %) y hemicelulosa ($19,27 \pm 1,58$ %), las cuales son fuentes importantes de carbohidratos simples útiles para producir alcoholes, ácidos orgánicos y/o proteína unicelular.

El tratamiento acuoso implementado en este estudio permitió disminuir el contenido de celulosa y hemicelulosa, en forma relativa, en un 24,35 % y 37,21 %, respectivamente. Al mismo tiempo, provocó una disminución en el contenido de lignina del 28 %. Estos cambios en la estructura no fueron efectivos para

mejorar la producción de azúcares reductores en el bagacillo de caña de azúcar, provocando por el contrario un efecto totalmente adverso.

La hidrólisis ácida a ebullición a reflujo, simple y con pocos problemas operacionales, desarrollada en esta investigación, demostró ser eficiente para la separación de los monómeros constituyentes de los polímeros celulosa y hemicelulosa, los que fueron identificados como azúcares reductores.

Los resultados obtenidos demostraron que la cinética de la hidrólisis ácida del bagacillo de caña, es un proceso multifactorial, que a escala de planta piloto debe ser cuidadosamente controlado para obtener un alto rendimiento de azúcares reductores.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del

Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación.

Literatura citada

1. Andren, R.K., M. Mandels y J.E. Modeiros. 1976. Production of sugars from waste cellulose by enzymatic hydrolysis: Primary evaluation of substrates. *Proc. Biochem.* 10: 1-11.
2. Asociacion of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th edition. Arlington. Virginia.
3. Bulchholz, K., J. Puls, B. Godelmann y H. Dietrichs. 1980. Hydrolysis of cellulosic wastes. *Proc. Biochem.* 12: 37-43.
4. Carrizales, V y D. Sáenz. 1986. Enriquecimiento proteínico del bagacillo de caña mediante cultivo semi-sólido de *Chaetomium cellulolyticum*. *Ac. Cient. Vziana*, 37: 580-586.
5. Chang, M., T. Chou y G. Tsao. 1981. Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Adv. Biochem. Eng.* 20: 15-40.
6. Colina, G., J. Ferrer, G. Páez, Z. Mármol, G. Urbaneja, L. Arenas y L. Sandoval. 1998. Tratamiento de los desechos generados en la producción del grano de café (pulpa de café) para la obtención de carbohidratos por hidrólisis ácida. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 21 (3): 179- 187.
7. Ferrer, J., G. Páez, Z. Mármol, E. Ramones, C. Chandler, M. Marin y A. Ferrer. 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Biores. Technol.* 76: 39-44.
8. Ferrer, J., G. Páez, Z. Mármol, E. Ramones, H. García y C. Forster. 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Biores. Technol.* 57: 55-60.
9. Fox, D., N. Dunn, P. Gray y W. Marsden. 1983. Saccharification of bagasse using a counter-current plug flow reactor. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 33 B: 114-118.
10. García, H., G. Páez, J. Ferrer, Z. Mármol y E. Ramones. 1996. Conversión del desecho de conchas del camarón a glucosamina por hidrólisis ácida. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 19 (2): 131-136.
11. Gharpuray, M. y Y. Lee. 1983. Structural modification of lignocellulosic by pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 157-172.
12. Gretghlein, H. 1978. Chemical breakdown of cellulosic materials. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 28: 296-308.
13. Harris, J. 1975. Acid hydrolysis dehydration reactions for utilizing plant carbohydrates. *Appl. Polym. Symp.* 28:131-14.
14. Krisna, S.H., K. Prasanthi, G. Chowdary y C. Ayyanna. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Proc. Biochem.* 33: 825-830.
15. Marsden, W., P. Gray, and M. Quinlan. 1982. Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32:1016-1022.
16. Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
17. Millet, M., M. Effland, y D. Caulfield. 1979. Influence of fine grinding on the hydrolysis of cellulosic materials. *Adv. Chem. Series.* 181: 84-96.
18. Quintero, H., M. Rodríguez, G. Páez, J. Ferrer, Z. Mármol y M. Rincón. 2001. Producción continua de proteína microbiana (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. *Rev. Cient., FCV-LUZ.* XI (2): 87-94.
19. Rugg, B., Arsntrong y R. Stanton. 1981. Preliminary results and economics of the New York University process: continuous acid hydrolysis of cellulose. Producing glucose for fermentation. *Dev. Ind. Microbiol.* 22: 131-142.
20. Santiago, B., J. Ferrer, N. Colmenares y G. Páez. 1993. Los desechos de uva y su posible uso industrial. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 16(3): 199-208.

21. SAS. 1985. Statistical Analysis System. User's Guide: Statistics (5th ed.) Edited by SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, USA.
22. Singh, A., K. Das, y D. Sharma. 1984. Production of xilose, furfural fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. J. Chem. Biotechnol. 34: 51-56.
23. Tewari, H., L. Singh, S. Marwaha, y J. Kennedy. 1987. Role of pretreatments on enzymatic hydrolysis of agricultural residues for reducing sugar production. J. Chem. Biotechnol. 38: 153-165.
24. Tsao, G., M. Ladisch, T. Hsu, B. Dale y T. Chou. 1978. Fermentation substrate from cellulosic material: Production of fermentable sugars from cellulosic materials. Ann. Rep. Ferment. Proc. 2: 1-21.
25. Ullal, V., R. Mutharasan, y E. Grossmann. 1984. New insights into high solids acid hydrolysis of biomass. Biotechnol. and Bioeng. Symp. 14: 69-93.
26. Urbaneja, G., J.R. Ferrer, G. Páez, L. Arenas de Moreno, G. Colina y L. Sandoval. 1997. Hidrólisis y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 14:265-275.