

EVALUACIÓN DE LA SACARIFICACIÓN DE YUCA MEDIANTE EL PROCESO CONVENCIONAL Y EL PROCESO LOW-ENERGY, PARA SU POSTERIOR DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN

LILIA C. ROJAS PÉREZ¹

LUIS A. CAICEDO MESA²

JAIME L. AGUILAR ARIAS³

LILIANA R. MARTÍNEZ RAMÍREZ⁴

Resumen

En este trabajo se evaluaron los ensayos para la obtención de azúcares fermentables a partir de materias amiláceas, en este caso particular yuca, los cuales comprendieron el seguimiento de la reacción de hidrólisis enzimática para la posterior determinación de la cinética de reacción (formación de producto en función del tiempo). En una primera etapa se consideró el proceso convencional que consta de licuefacción y sacarificación, a cargo de una alfa-amilasa y una gluco-amilasa comerciales respectivamente. Y en una segunda etapa la acción bifuncional de una única enzima comercial, analizándose por separado las dos partes constitutivas de la yuca: el parénquima interno y el parénquima externo. La

1 Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia.
e-mail: lcrojasp@unal.edu.co

2 Ingeniero Químico M. Sc., D. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Profesor. e-mail: lacaicedom@unal.edu.co

3 Ingeniero Químico M. Sc., Universidad Nacional de Colombia.
Profesor. e-mail: jlaguilara@unal.edu.co

4 Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia.
e-mail: lrmartinezr@unal.edu.co

materia prima se caracterizó en cuanto a su composición, porcentaje de humedad, proteína y por último contenido de almidón en base seca.

Palabras clave

Yuca, parénquima interno, parénquima externo, hidrólisis enzimática, proceso convencional, proceso Low-energy.

Abstract

This work evaluated the attempts to obtaining fermentable sugars took from starchy materials; in this particular case starch, which cover the tracing of the reaction of enzymatic hydrolysis for the subsequent determination of the kinetic reaction (formation of product in function of time); the first step considered the conventional process that consists in liquefaction and saccharification, in uncharged to a commercial alpha-amylase and gluco-amylase respectively, the second step was the action bi-functional by only one commercial enzyme, this was analyzed separating the two constitutive parts of the starch: the inside parenchyma and the extern parenchyma. Finally the raw material was distinguished as far as its composition, moistness percent, protein and for last contend of starch in dry low.

Key words

Starch, inside parenchyma, extern parenchyma, enzymatic hydrolysis, conventional process, Low-energy process.

1. INTRODUCCIÓN

En el marco actual de la creciente producción de biocombustibles por vía fermentativa, de la obtención de este producto por materias primas agrícolas de alta producción en Colombia, y de la reciente aprobación de la Ley 693 de 2001 en el territorio colombiano, se ha tenido en cuenta para la producción de etanol carburante como materia prima no sólo la caña de azúcar sino, también, el almidón de yuca. La yuca es un cultivo abundante en los trópicos como alimento suplementario básico; pero mucho de lo producido es inutilizado debido a su contenido de cianuro (Roble *et al.*, 2003). La yuca es una planta que presenta buena resistencia a las enfermedades, a las plagas, tolerancia a los suelos y condiciones climáticas adversas (Romero L., 1988). Para una planta de etanol con una capacidad anual de 33,4 millones de galones de etanol desnaturalizado (95% de etanol anhidro y 5% de gasolina en volumen) se necesitan alrededor de 780.000 toneladas de tubérculos de yuca fresca como materia prima, los cuales requieren por lo menos de 20.000 hectáreas de plantaciones de yuca (Zhang *et al.*, 2003).

En este trabajo se evaluará la conversión de almidón a azúcares fermentables a través de dos procesos: el primero convencional y el segundo denominado low-energy, innovador en su género al permitir el contacto enzima-sustrato sin requerimientos energéticos, o sea a temperatura ambiente, empleándose enzimas comerciales. El orden para facilitar la producción de etanol a partir del almidón de yuca es el pre-tratamiento del almidón, consiste en realizar una gelatinización, licuefacción y sacarificación, lo que toma lugar previamente a la fermentación. (Russell *et al.*, 1986). Se han realizado estudios similares para el proceso convencional; Nellaiah *et al.*, (1988) evaluaron la hidrólisis de una alfa-amilasa termostable Termamyl por 1,5 h a 90° C y de una amiloglucosidasa (AMG) por 20 h a 37° C y encontraron conversión del 86%. Similarmente Rhee *et al.*, (1984) evaluaron estas dos enzimas con una concentración de sustrato de 30% w/v, reportando después de 5 horas rendimientos promedio de 75% Equivalente de Dextrosa. De manera semejante, Ejiofor

et al., (1996) encontraron que el 80,7% de hidrolizado era glucosa, utilizando enzimas comerciales. Pero existe otra metodología que consiste en el no empleo de enzimas comerciales a través del uso directo de microorganismos, de esta forma se busca reducir el costo de las amilo-glucosidasas y el tiempo de fermentación evitando el paso de la sacarificación (Amutha *et al.*, 2001), del Rosario *et al.*, (1984) emplearon *Aspergillus awamori* y *Saccharomyces cerevisiae* en un fermentador airlift y un fermentador tower respectivamente, reportan eficiencias del 88% de sacarificación y una concentración de 5,3% de alcohol en la segunda etapa. Sarathi *et al.*, (1996) utilizaron un cultivo mezclado por *Endomycopsis fibuligera* NRRL 76 y *Zymomonas mobilis* ZM4 los cuales fermentaron (22,5 w/v) de almidón de yuca más eficientemente hasta 10,5% v/v de etanol. En otras investigaciones se ha evaluado la hidrólisis enzimática de yuca por celulasas y gluco-amilasas en el contexto de alta eficiencia. Si se hidroliza la celulosa el rendimiento de unidades D-glucosa se incrementa según estudios de Kumakura *et al.*, (1983), por ejemplo Kosugi *et al.*, (2008) reportan que la pulpa de yuca contiene aproximadamente 60% de almidón y 20% de fibra de celulosa; para convertir efectivamente los componentes hasta etanol, hidrolizaron la celulosa a través de *Trichoderma reesei cellulase* y luego fermentaron con *Saccharomyces cerevisiae* *Kyokai no. 7*, ellos utilizaron relaciones de pulpa de yuca de 5% y 10%, con lo cual se obtuvo 91% y 80% del rendimiento teórico, respectivamente.

De esta forma se hace necesario desarrollar un estudio para la evaluación del proceso de obtención de azúcares fermentables mediante la hidrólisis enzimática de tres variedades colombianas de yuca, por dos procesos diferentes con tres enzimas comerciales, discriminando las dos partes constitutivas de la raíz: parénquima externo y parénquima interno, lo que permitirá establecer el efecto global del rendimiento del proceso al hidrolizarse por separado.

2. MATERIALES, METODOLOGÍA Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.1 Materiales

La materia prima fue yuca en tres variedades diferentes provenientes de los llanos orientales de Colombia (Cantaclaro-Meta). Como catalizadores de la reacción se evaluaron tres enzimas comerciales, una alfa-amilasa, una gluco-amilasa y una enzima de acción bifuncional. Las primeras dos enzimas actúan por separado en el proceso denominado convencional, el cual comprende una etapa de licuefacción y una etapa de sacarificación. Y la tercera enzima es considerada para el proceso innovador denominado: low-energy.

2.2 Tratamiento de la yuca

Las tres variedades de yuca fueron caracterizadas en sus tres partes principales: periderma o cascarilla, parénquima cortical o interno y parénquima externo (figura 1); realizando un lavado para retirar la tierra y material proveniente del cultivo, luego se retiró y se pesó cada una de sus partes. Posteriormente se determinó el contenido de humedad de una porción representativa del parénquima interno y externo, a través de una mufla a 30° C hasta conseguir peso constante. Luego se procedió a moler la yuca en húmedo, para disponerla en un secador de bandejas; una vez seca la yuca se tomaron porciones de ésta para molerla en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partícula de 400 µm, aproximadamente, y se realizó un análisis de tamizado con mallas que comprendieron de la número 20 a la 50. La yuca se caracterizó en base seca en cuanto su contenido de proteína por el método Kjeldahl y el contenido de almidón mediante hidrólisis ácida por 2,5 horas en ebullición y reflujo constante; posteriormente, se neutralizó y se procesaron las muestras por el método DNS (determinación de azúcares reductores) para, finalmente, correlacionar este valor con el contenido de almidón.

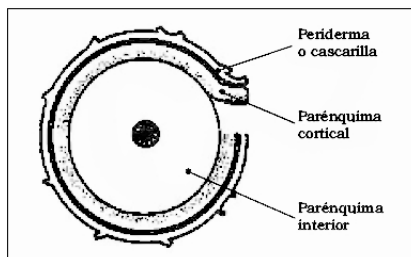


FIGURA 1. CORTE TRANSVERSAL DE LA RAÍZ DE YUCA

2.3 Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis de yuca se realizaron 12 ensayos en total, como se observa en la tabla 1. A su vez, para el parénquima interno se estableció una relación de sólidos: agua de (25:75) y para el parénquima externo de (30:70).

TABLA 1. DEFINICIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS ENSAYOS

ENSAYO	VARIEDAD I		VARIEDAD II		VARIEDAD III	
	P. INTERNO	P. EXTERNO	P. INTERNO	P. EXTERNO	P. INTERNO	P. EXTERNO
Proc. Convencional	1	2	3	4	5	6
Proc. Low-Energy	7	8	9	10	11	12

2.3.1 Proceso Convencional

En el proceso convencional se consideró la etapa de licuefacción y sacarificación por separado, a cargo de una alfa-amilasa y una gluco-amilasa comerciales, respectivamente. Para la hidrólisis enzimática se procedió a realizar primero una etapa de gelatinización en un rango de temperatura entre 50-65° C (Badui D., 2006) y agitación manual; posteriormente, se adecuó un reactor encaquetado con una tapa de tres bocas, un motor con turbina

Rushton y un baño termostataado Julabo. En la primera etapa de hidrólisis, conocida como licuefacción, se ajustó la agitación, el pH con una solución de H_2SO_4 1 N y la temperatura, luego de esto se adicionó la proporción de alfa-amilasa correspondiente; estas últimas tres variables según lo especificado por la ficha técnica. El seguimiento se realizó cualitativamente (reacción con solución de yodo) y se extrajeron muestras a diferentes intervalos de tiempo, para la primera etapa fueron de aproximadamente 10 min. y para la segunda etapa de 1 hora, datos que posteriormente se analizaron por el método DNS. La etapa de licuefacción se dio por terminada cuando la prueba de solución de yodo fue negativa. Finalmente para la última etapa denominada sacarificación se volvió a ajustar la agitación, el pH, temperatura y se adicionó la gluco-amilasa comercial, según lo recomendado por la ficha técnica. Igualmente se tomarán muestras a diferentes tiempos inactivando la actividad enzimática en un baño de hielo, para posterior determinación de la formación del producto mediante el método DNS (Miller, 1959).

2.3.2 Proceso Low-energy

La enzima comercial de acción bifuncional permite realizar la etapa de licuefacción y sacarificación simultáneamente a temperatura ambiente (requerimientos energéticos bajos). El procedimiento para realizar el seguimiento a esta reacción comprendió una etapa de gelatinización previa al contacto enzima-sustrato, luego se adecuó la agitación y el pH, según lo especificado en la ficha técnica y finalmente se adicionó la enzima y se tomaron muestras a diferentes tiempos (inactivándolas) para luego ser analizadas empleando el método DNS.

2.4 Seguimiento cualitativo y cuantitativo de la reacción

2.4.1 Seguimiento cualitativo (solución de yodo)

El seguimiento cualitativo de la hidrólisis enzimática de yuca correspondió al análisis del complejo almidón-yodo que se establece con la cadena de amilosa evidenciándose una coloración azul

intensa; cuando esta coloración cambia es resultado negativo de la prueba y por tanto se puede dar por terminada la primera etapa del proceso convencional correspondiente a la licuefacción.

2.4.2 Seguimiento cuantitativo (método DNS)

Cuantificar la formación del producto a través del tiempo se realizó mediante el método analítico DNS, el cual consistió en hacer reaccionar las muestras problema a diferentes diluciones con el ácido 3,5-dinitrosalicílico; el producto se analizó con la densidad óptica del color producido en un espectrofotómetro Spectronic 20 a 540 nm, reportándose diferentes valores de absorbancias, los cuales se correlacionaron con la curva de calibración ajustada a este equipo (figura 2).

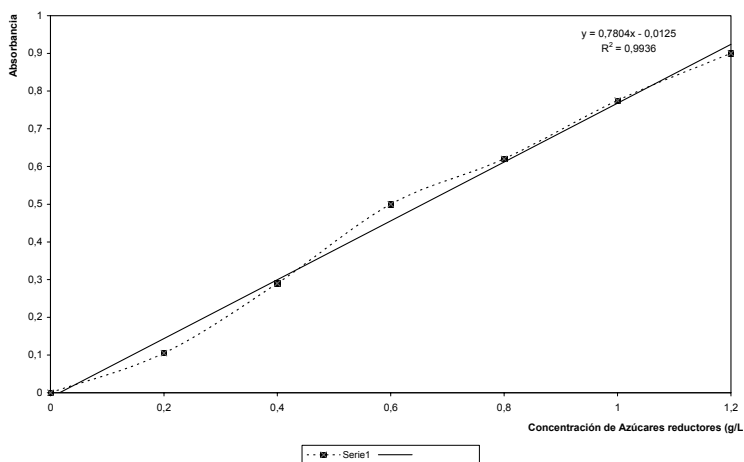


FIGURA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA AZÚCARES REDUCTORES

2.5 Ajuste de curvas cinéticas (análisis de datos experimentales)

Para ajustar curvas representativas al avance de reacción se procedió a utilizar el programa Statgraphics Centurion, que permite analizar datos experimentales estadísticamente, modelando en primera medida una regresión lineal de la cual se desprende una

comparación de modelos alternativos, donde se arrojan valores de correlación ordenados de mayor a menor (con los posibles modelos matemáticos que se ajustan a los datos), de aquí se procede a escoger la mejor tendencia para los datos ajustados, obteniéndose la ecuación que relaciona la concentración o g azúcar/g sólidos en función del tiempo, además se cuenta con parámetros, tales como coeficiente de correlación (r) el cual es un número entre -1 y $+1$ y mide la fuerza de la relación entre dos variables y el P-valor que se utiliza para determinar si dos variables están relacionadas significativamente la una con la otra. Los pares de variables para los cuales el P-valor es menor que 0.05 exhiben una correlación estadísticamente significativa a un nivel de 5% de significancia. Los modelos pueden también ser usados como una herramienta en el diseño de biorreactores, debido a la información que proveen por la simulación del proceso (Morales *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Caracterización de la yuca

Luego del análisis de la composición de la yuca se estableció que presenta porcentajes de cáscara, parénquima interno y externo equivalente entre las variedades, los resultados se presentan en la tabla 2, con un promedio de $3,51\%$ para la cáscara, $81,35\%$ para el parénquima interno y $14,85\%$ para el parénquima externo. El valor promedio para el contenido de humedad, almidón y proteína es mayor en las tres variedades para el parénquima externo sobre el parénquima interno; los resultados se presentan en la tabla 3.

TABLA 2. COMPOSICIÓN DE LA YUCA

PARTE	VARIEDAD I	VARIEDAD II	VARIEDAD III
Cáscara (%)	3,73	3,29	3,51
Parénquima Externo (%)	14,91	15,40	14,24
Parénquima Interno (%)	81,25	80,82	82,01

TABLA 3. CONTENIDO DE HUMEDAD, ALMIDÓN Y PROTEÍNA DE LA YUCA

Contenido	VARIEDAD I		VARIEDAD II		VARIEDAD III	
	P. Interno	P. Externo	P. Interno	P. Externo	P. Interno	P. Externo
Humedad (%)	60,72	73,41	58,32	65,94	59,96	71,76
Almidón (%)	79,43	74,48	83,69	88,66	73,10	76,29
Proteína (%)	1,30	4,10	1,00	2,30	1,40	4,90

3.2 Hidrólisis enzimática

3.2.1 Proceso convencional

Los modelos ajustados para establecer la cinética de reacción por medio del programa estadístico, correspondieron a ecuaciones no lineales de los tipos mostrados en la tabla 4. A su vez se observa en la tabla 5 el valor de los parámetros evaluados como el coeficiente de regresión y el P-valor. Al evaluar el coeficiente de regresión se encontró un promedio de 0,933 para el proceso convencional, valor aceptable al ser cercano al valor absoluto de 1. En cuanto al parámetro P-valor se hallaron valores tolerables al encontrarse por debajo de 0,05, lo que representa un 95% de confiabilidad; finalmente las curvas encontradas son características del avance de reacción enzimática (figura 3) ejemplo del ensayo No. 4.

TABLA 4. MODELOS AJUSTADOS VS. ECUACIONES REPRESENTATIVAS⁵

MODELO	ECUACIÓN REPRESENTATIVA
1. Reciprocal Y-log X	$CAR = \frac{1}{A + B \times \ln(t)}$
2. Double squared	$CAR = \sqrt{A + B \times t^2}$

→

⁵ Resultados tomados del programa estadístico Statgraphics Centurion

TABLA 4 (CONTINUACIÓN)

MODELO	ECUACIÓN REPRESENTATIVA
3. Double recíprocal	$CAR = \frac{1}{A + \frac{B}{t}}$
4. S-curve	$CAR = \exp\left(A + \frac{B}{t}\right)$
5. Square root X	$CAR = A + B \times \sqrt{t}$
6. Reciprocal Y-square root X	$CAR = \frac{1}{A + B \times \sqrt{t}}$

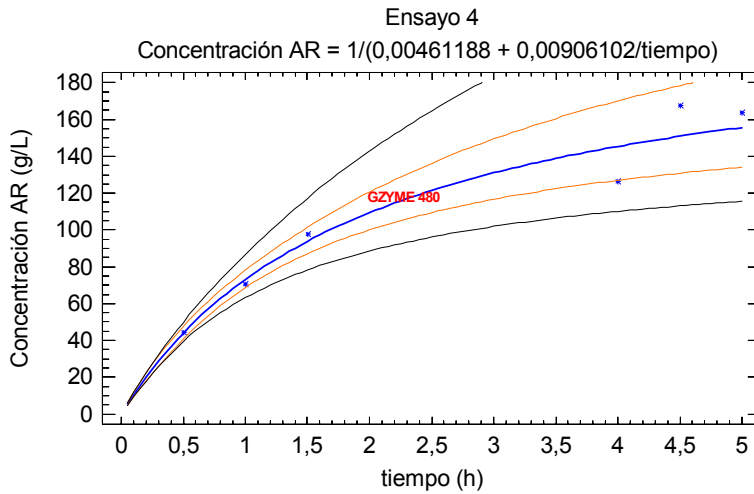


FIGURA 3. CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES VS. TIEMPO

TABLA 5. RELACIÓN DE MODELOS Y PARÁMETROS AJUSTADOS A LAS CURVAS REPRESENTATIVAS ENCONTRADAS

PRO- CESO	ENSA- YO	VARIABLE DEPEN- DIENTE	MODE- LO ⁶	CONS- TANTE A	CONS- TANTE B	COEFI- CIENTE CORRELA- CIÓN	P- VALOR
Convencional	1	Concentra- ción AR (g/L)	1	0,00823	-0,00108	-0,727	0,001
	2	g AR/g sólidos	2	0,03627	0,01072	0,987	0,102
	3	Concentra- ción AR (g/L)	3	0,00411	0,00311	0,902	0,009
	4	Concentra- ción AR (g/L)	3	0,00461	0,00906	0,995	0,000
	5	Concentra- ción AR (g/L)	3	0,00296	0,00946	0,987	0,000
	6	Concentra- ción AR (g/L)	4	5,21865	-0,59847	0,993	0,001
Low-energy	7	g AR/g sólidos	3	4,08629	4,98505	0,771	0,015
	8	g AR/g sólidos	5	0,03981	0,09207	0,895	0,007
	9	g AR/g sólidos	6	3,66100	-0,66990	-0,665	0,072
	10	g AR/g sólidos	3	5,09223	2,13685	0,667	0,219
	11	g AR/g sólidos	1	2,50860	-0,25992	-0,709	0,049
	12	g AR/g sólidos	3	6,95764	2,46197	0,481	0,334

⁶ Modelos relacionados con la tabla 4.

3.2.2 Proceso Low-energy

Para el proceso low-energy se observa que tanto las ecuaciones y sus parámetros no se ajustaron significativamente al comportamiento propio de una cinética enzimática (figura 4) presentándose el Ensayo 8, el promedio del coeficiente de regresión correspondió a 0,698, valor bastante alejado del límite de confianza; y el 66,67% de los ensayos presentaron un P-valor bastante desviado ($> 0,05$) del aceptable estadísticamente. La explicación a que estos modelos no se ajustaron a curvas estadísticamente representativas de cinéticas de reacción, puede verse sujeta a dos hechos, el primero de ellos contempla la posibilidad de que la velocidad de reacción es lenta para la enzima de acción bifuncional empleada en este proceso, por esto al tiempo promedio dejado para reacción (6,73 h) aún no se ha alcanzado el fin de la hidrólisis y, por tanto, no se pueden ajustar modelos significativos de una cinética enzimática hasta el punto evaluado en los ensayos. Como segundo hecho, puede contemplarse la posibilidad de que esta enzima presenta una inhibición por producto y al no verse éste retirado del sistema no permite continuar con el avance de la reacción, de esta manera no se alcanza tampoco el fin de la hidrólisis. En estudios desarrollados por Poosaran *et al.*, (1986) se realizó una sacarificación y fermentación simultánea empleándose enzimas comerciales, aunque se evaluó en el proceso convencional, demostraron rendimientos del 95% y 90% del teórico, empleando *Zymomonas mobilis* ZM4 y *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602, respectivamente. Esto podría aplicarse tanto a la parte de la sacarificación en el proceso convencional como a la hidrólisis completa para el proceso Low-energy.

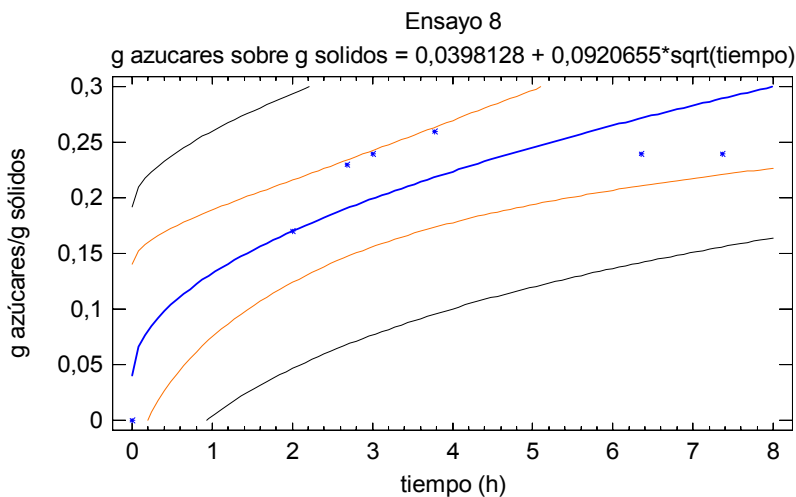


FIGURA 4. GRAMOS AZÚCAR/GRAMOS SÓLIDOS VS. TIEMPO

3.3 Rendimientos de reacción

Como se observa en la “Fig. 5-a” el rendimiento global promedio alcanzado en el proceso convencional correspondió a 76,75%, siendo mayor para el parénquima interno que para el externo; en cuanto al rendimiento promedio alcanzado para las dos etapas, se encontró un valor mayor para la primera de ellas: licuefacción (51,86%) sobre la etapa de sacarificación (24,89%). Y, a su vez, para las dos partes constitutivas de la yuca se encontró para la primera etapa mayor el rendimiento para el parénquima interno que para el externo. Mientras que para la segunda etapa el resultado fue al contrario.

Finalmente, para el proceso low-energy, como se observa en la “Fig. 5-b”, se alcanzó un rendimiento global promedio de 38,75%, siendo mayor para el parénquima interno que para el externo.

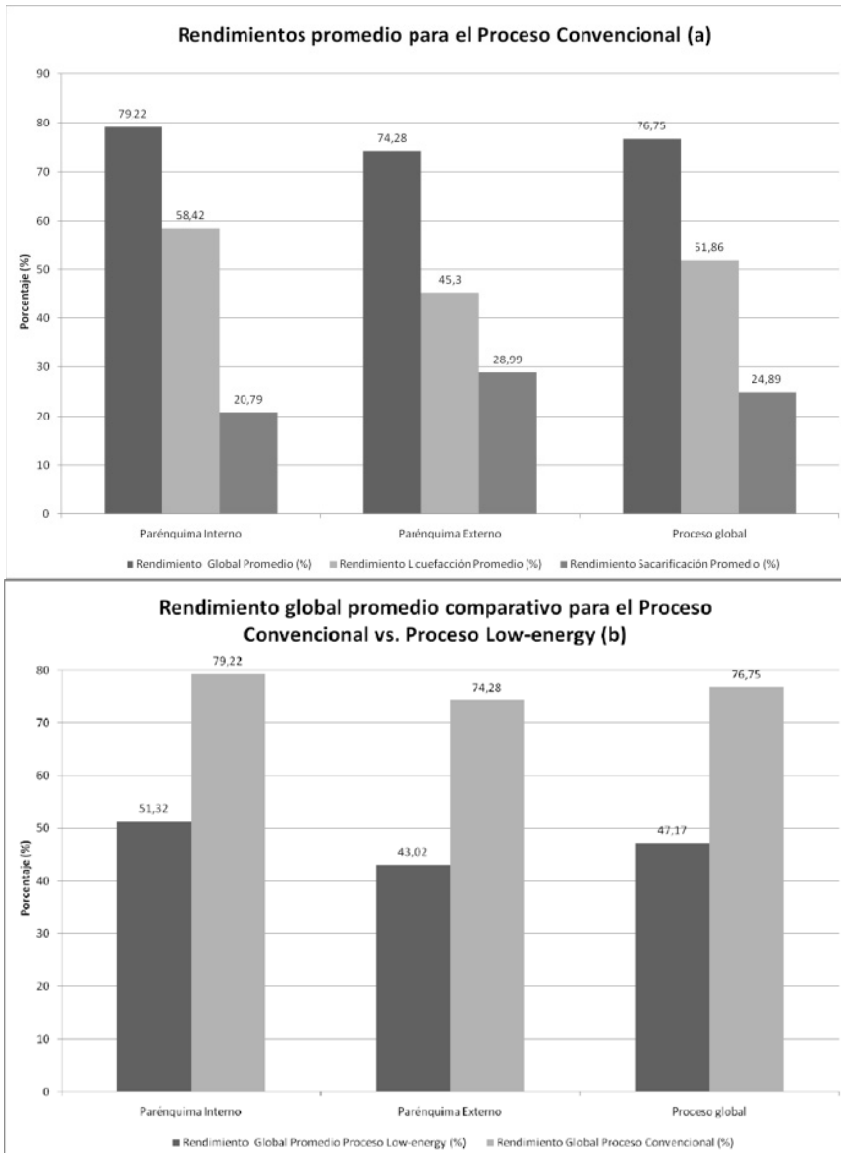


FIGURA 5. RENDIMIENTOS PROMEDIO PARA LAS DIFERENTES ETAPAS Y PARTES DE LA YUCA
 A) PROCESO CONVENCIONAL B) COMPARATIVO PROCESO CONVENCIONAL VS. LOW-ENERGY

4. CONCLUSIONES

El efecto global de la hidrólisis de yuca, al tratarse por separado el parénquima interno y externo de la misma, arroja diferencias en la producción de azúcares fermentables. En el proceso convencional para el parénquima interno se encontró mayor rendimiento en la etapa de licuefacción y para el externo mayor rendimiento en la etapa de sacarificación, lo que evaluado como un todo nos reduce eficiencias en el proceso. Comparando los dos procesos se encontró mayor rendimiento para el proceso convencional, pero se recomienda no descartar el proceso low-energy antes de investigar y evaluar mayores tiempos de reacción de los ajustados en este trabajo y si se presenta inhibición por producto realizar la etapa de hidrólisis simultáneamente con la etapa de fermentación y/o ajustar cinéticas representativas de este comportamiento.

En cuanto al porcentaje de humedad, contenido de almidón y proteína en base seca, se presentaron valores mayores para el parénquima externo que para el interno.

En cuanto a las curvas representativas obtenidas para modelar las cinéticas se encontró que para el proceso convencional el coeficiente de regresión promedio fue estadísticamente aceptable (0,933) y el P-valor estuvo por debajo del valor tolerable ($<0,05$) encontrándose de esta manera que las curvas y ecuaciones allí encontradas se ajustaron adecuadamente al modelo de una cinética enzimática. Mientras que el resultado arrojado para el análisis de datos experimentales del proceso low-energy, demuestra que la velocidad de reacción para esta enzima de acción bifuncional es lenta o presenta inhibición por producto.

Como se mostró en la bibliografía consultada se puede incrementar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, hidrolizando no solamente el almidón sino también la celulosa presente en la fibra de la yuca, esto debe evaluarse en próximos trabajos, especialmente en la parte del parénquima externo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Romero G., L., (1988). Estudio preliminar para la producción de etanol a partir de una variedad de yuca, Trabajo dirigido de grado en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- [2] Rodríguez, A., Rodríguez G., (2003). Propuesta de acondicionamiento de la planta piloto de producción de bioetanol de la Universidad Autónoma de Colombia para emplear variedades de yuca de los llanos orientales, Trabajo dirigido de grado en Ingeniería Química, Universidad América, Bogotá.
- [3] Pardo, M., Rivera, P., (2001). Diseño de un bioreactor piloto para hidrólisis enzimática de almidones. Trabajo dirigido de grado en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- [5] Keith J. Laidler, (1958) The chemical kinetics of enzyme action. Oxford.
- [6] Badui D., S., (2006). Química de los alimentos. México. Pearson Education, Cuarta edición.
- [7] Amutha R., Gunasekaran P., (2001). Production of Ethanol from Liquefied Cassava Starch Using Co-Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 92, No. 6, 560-564.
- [8] del Rosario E., Wong R., (1984). Conversion of dextrinized cassava starch into ethanol using cultures of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol., vol. 6, 60-64.
- [9] Ejiofor A., Chisti Y., Moo-Young M., (1996). Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. Enzyme and Microbial Technology. 519-525.
- [10] Kosugi A., Kondo A., Ueda M., Murata Y., Vaithanomsat P., Thanapase W., Arai T., Mori Y., (2008). Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. Renewable Energy. 1-5.
- [11] Kumakura M., Kaetsu I., (1983). Pretreatment of starch raw materials and their enzymatic hydrolysis by immobilized glucoamylase. Enzyme Microb. Technol., vol. 5, 199-203.
- [12] Miller G., (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry Vol. 31 No. 3. 426-428.

- [13] Monsalve J., Medina V., Ruíz A., (2006). Producción de etanol a partir de cáscara de banano y de almidón de yuca. *Dyna*, Año 79, Nro. 150. 21-27.
- [14] Morales S., Álvarez H., Sánchez C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch". *Food and bioproducts processing*. 25-30.
- [15] Nellaiah H., Karunakaran T., Gunasekaran E. (1988). Ethanol Fermentation of Cassava Starch by *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286. *Biomass*. 201-207.
- [16] Poosaran N., Heyes R., Rogers P., (1985). Ethanol Production from Cassava Starch Using a Highly Productive Strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. *Biomass*. 171-183.
- [17] Rhee S., Lee G., Han Y., Mohd Z., Yusof I., Han M., Lee K., (1984). Ethanol production from cassava and sago starch using *Zymomonas mobilis*" *Biotechnology Letters*, vol. 6 No. 9 615-620.
- [18] Roble N., Ogbonna J., Tanaka H., (2003). A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 671-678.
- [19] Russell I., Crumplen C., Jones R., Stewart G., (1986). Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextrinized cassava starch. *Biotechnology Letters*, vol. 8 No. 3. 169-174.
- [20] Vljaya O., Reddy S., Basappa S., (1996). Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis*: synergism and limitations. *Biotechnology Letters* Volume 18. 1315-1318.
- [21] Zhang C., Han W., Jing X., Pu G., Wang G., (2003). Life cycle economic analysis of fuel ethanol derived from cassava in southwest China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 353-366.