

## Producción de bioetanol del desecho lignocelulósico "peladilla" de *Asparagus officinalis* L. "espárrago" por *Candida utilis* var. Major. CECT 1430

*Production of bioethanol from lignocellulosic waste "peladilla" Asparagus officinalis "asparagus" using Candida utilis. Var. major. C.E.C.T. 1430.*

BARDALES VÁSQUEZ, Cecilia B<sup>1</sup>; LEÓN TORRES, Carlos A<sup>2</sup>; MOSTACERO LEÓN, José<sup>3</sup>; ARELLANO BARRAGAN, Julio<sup>4</sup>; NOMBERTO RODRIGUEZ, Carlos<sup>5</sup>; SALAZAR CASTILLO, Marco<sup>6</sup>; PRETEL SEVILLANO, Orlando<sup>7</sup>; MARTIN ALVA, Enrique<sup>8</sup>; BARRENA GURBILLON, Miguel<sup>9</sup>.

No fueron encontrados conflictos de interés en este artículo.

### RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue realizar la producción de bioetanol a partir del desecho lignocelulósico "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago" utilizando *Candida utilis* var. *major* CECT 1430. Para ello se procedió a realizar el pretratamiento de la peladilla de espárrago mediante métodos químicos, físicos y físico químicos. Posteriormente, se procedió a realizar la extracción de Azúcares Reductores Totales "ART", determinándose una concentración máxima de 7 g/L con lo cual se constituyó el caldo fermentativo; Antes de iniciar el proceso de fermentación, se construyó un biorreactor de 16 cm de altura tipo tanque agitado con turbina Rushton y se procedió a la preparación del inóculo a partir de la cepa *Candida utilis* var. *major* CECT 1430. El medio de cultivo fue formulado a partir de diluciones de azúcares reductores totales desde 7.0 hasta 0.85 g/L. El bioproceso se llevó a cabo a 25°C, a un pH de 4.0 a 4.5 y durante un tiempo de 72 horas; transcurrido este tiempo se procedió a determinar el porcentaje de etanol. Se encontró que la proteína unicelular y el porcentaje de etanol aumentan progresivamente desde 0.13 hasta 1.80 g/L y desde 0.40 hasta 2.04% respectivamente, a medida que se aumenta la concentración de "ART" provenientes de peladilla de espárrago. Se concluye que la producción de bioetanol aumenta a medida que aumenta la concentración de "ART" proveniente de peladilla; Asimismo, el rendimiento óptimo de *C. utilis* var. *major* correspondiente al 91.66% se obtiene a la concentración de 1.75 g/L disminuyendo conforme se aumenta la concentración de azúcares reductores. El valor más alto en la producción de bioetanol 2.04% es equivalente a 20.4 ml de etanol y se encuentra a una concentración de 7 g/L de A.R.T." de "peladilla" de *Asparagus officinalis*. "espárrago".

**Palabras clave:** Bioetanol, biocombustibles, desechos lignocelulósicos.

### ABSTRACT

The aim of this thesis was to carry out the production of bioethanol from lignocellulosic waste "peladilla" *Asparagus officinalis* "asparagus" using *Candida utilis*. var. *major* C.E.C.T. 1430. This proceeded to the pretreatment methods of asparagus peladilla chemists, physicists and physical chemists. Subsequently, we proceeded to the determination of total reducing sugars, determining a maximum concentration of 7 g/L which was established fermentation broth. Before starting the fermentation proceeded to construct a bioreactor of 16 cm type stirred tank with Rushton turbine and the preparation of the inoculum from the strain *Candida utilis* var. *major* CECT 1430. The culture medium was made from dilutions of total reducing sugars from 0.85 to 7.0 g / L. The process was conducted at 25 ° C, pH 4.0 - 4.5 and for a time of 72 hours, after this time was to determine the percentage of ethanol was found that the single protein and the percentage of ethanol increased progressively from 0.13 to 1.80 g / L and from 0.40 to 2.04%, respectively, as increases the concentration of "ART" of peladilla asparagus. It is concluded that ethanol production increases with increasing concentration of "ART" from peladilla. Also, the yield of *C. utilis* var. *major* is 91.66% at the optimal concentration of 1.75 g/L decrease as increasing the concentration of reducing sugars. The highest value in the production of bioethanol 2.04% equivalent to 20.4 ml of ethanol is at a concentration of 7 g/L of "ART".

**Key words:** Bioetanol, biocombustibles, wastes lignocellulosic.

<sup>1</sup>Doctor en Ciencias Biológicas. Docente de bioquímica de la Facultad de medicina Universidad Privada. Antenor Orrego, Trujillo, Perú.  
E-mail: cartavio\_labs@hotmail.com

<sup>2</sup>Doctor en Ciencias Biológicas. Docente de bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

<sup>3</sup>Doctor en Ciencias Ambientales. Docente de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

<sup>4,5,6</sup>Doctor en Ciencias biológicas. Docente de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

<sup>7</sup>Doctor en Ciencias Biológicas. Docente de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

<sup>8</sup>Doctor en Ciencias Biológicas. Docente de la escuela de post grado de la Universidad Nacional de Trujillo.

<sup>9</sup>Doctor en Ciencias Ambientales. Docente de Química de la Facultad de Ingeniería Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Amazonas, Perú

## INTRODUCCIÓN

El bioetanol es el etanol obtenido a partir de materiales vegetales muy diversos como almidón contenido en semillas de trigo, maíz, azúcares contenidos en la caña de azúcar o remolacha y celulosa contenida en la paja de cereales, en la madera y en residuos agrícolas, urbanos e industriales<sup>1</sup>.

La utilización de biomasa lignocelulósica es, a mediano plazo, la opción más prometedora para la obtención de bioetanol a bajos costos, posibilitando que este producto pueda ser adoptado por la industria, propuesta reforzada por<sup>2,3</sup>.

El material lignocelulósico debe ser sometido a procesos de prehidrólisis e hidrólisis para solubilizar hemicelulosas y liberar la glucosa que será finalmente fermentada por el microorganismo adecuado<sup>4,5</sup>.

Se han evaluado otros microorganismos con capacidad de hidrolizar la celulosa, asimilar o fermentar pentosas y de trabajar en condiciones termofílicas con la finalidad de evitar problemas asociados al sobrecalentamiento de los fermentadores y evitar el recalentamiento, con lo cual se espera reducir los costos de producción<sup>6</sup>. Entre las levaduras capaces de fermentar a temperaturas mayores a 40°C se han seleccionado a *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y *Candida utilis* las cuales están siendo empleadas en trabajos de investigación a fin de optimizar su tasa de producción de etanol<sup>7</sup>.

Como parte del proceso de pelado de espárrago en las plantas conserveras, se obtiene la peladilla lo que constituye aproximadamente el 25% en peso del espárrago adquirido. Una planta conservera de mediana infraestructura, procesa al día 60 TM de espárrago y desecha 15TM de "peladilla"; este subproducto crudo es usado como alimento al ganado, sin embargo es necesario antes enriquecer el producto adicionándole proteínas<sup>8</sup>.

Teniendo en cuenta que La Libertad es un departamento líder en la producción de espárrago y que debido a las políticas implantadas por el gobierno para impulsar la agroexportación y la producción de bioetanol, ambos rubros tenderán a crecer significativamente en las próximas décadas, por ello la presente investigación plantea utilizar el desecho lignocelulósico "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago" como materia prima para la producción de bioetanol reemplazando en el proceso a *S. cerevisiae* por *C. utilis*, su desarrollo ofrece la ventaja de reducir el costo de producción de bioetanol debido a los bajos costos de la materia prima. Esto permitirá centrar la atención de los investigadores y políticas de reutilización de los desechos y residuos lignocelulósicos que abundan en nuestro medio en forma de rastrojos agrícolas de caña de azúcar, maíz, paja de arroz, trigo, hierbas y madera de mala calidad presente en los bosques nativos del país y otros que en la actualidad no tienen mayor uso comercial y que podrían convertirse en bioetanol brindando la gran oportunidad de generar no solo biocombustible para el transporte sino también productos de alto valor comercial a partir de la biomasa lignocelulósica como el furfural, con una importante aplicación industrial como materia prima para la producción de alcohol fufurílico, que a su vez es el producto de partida para la producción de resinas furánicas y disolventes.

A partir de los xilanos, podría obtenerse xilitol para su utilización en la industria alimentaria como edulcorante. De la fermentación de la xilosa también puede obtenerse acetona, ácido acético y butanol que son la base de numerosos productos. De la fracción de lignina podrían obtenerse quelantes, lignosulfonatos y productos químicos como el catecol, vainillina y diferentes aditivos de la gasolina, lo cual significaría un enorme potencial económico para el país.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material.

#### 1.1. Material Biológico.

- Se utilizó una cepa liofilizada de *Candida utilis* var. *major* C.E.C.T. 1430, adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) Valencia, España.
- "Peladilla" de *Asparagus officinalis* proveniente de la Empresa Agroindustrial JOSYMAR SAC. ubicada en la Provincia de Trujillo Departamento de La Libertad - Perú.

### 2. Métodos y técnicas.

#### 2.1. Acondicionamiento de los biorreactores.

Según<sup>9</sup>.

#### 2.2. Tratamiento del sustrato.

La peladilla de *Asparagus officinalis* fue tratada según<sup>10,11</sup>. Se determinó la concentración de "ART" azúcares reductores totales según el método de Folin-Wu<sup>12</sup>. Preparándose las concentraciones siguientes 7.0, 3.5, 1.75, 0.85, (g/L de ART), las mismas que constituyeron el caldo fermentativo. A éste caldo fermentativo se le adicionó 0.70 g de sulfato de amonio q.p.<sup>13</sup>.

#### 2.3. Reactivación de la cepa.

La cepa fue reactivada según<sup>13,14</sup>

#### 2.4. Preparación del inóculo.

Según<sup>9,15</sup>

## 2.5. Proceso de producción de bioetanol: Fermentación.

En cada biorreactor se adicionó 630 mL del caldo fermentativo a las concentraciones de estudio (7.0, 3.5, 1.75 y 0.85) (g/L. ART), la fuente nitrogenada (sulfato de amonio, a 1 g/L.) y 70 mL del inóculo previamente preparado; El bioproceso se realizó a un pH de 4.5 – 5.0 y durante un lapso de 72 horas a una temperatura de 25° C 3° C<sup>16</sup> Además se realizó un ensayo control (630 mL de melaza diluida a 7.0 g/L. ART, 70 ml de inóculo y 0.7g de sulfato de amonio.). Todo este proceso se repitió 2 veces más<sup>17</sup>

## 2.6. Determinación del producto.

Según<sup>16</sup>.

## 2.7. Determinación de la influencia de la concentración de azúcares reductores totales de "peladilla" de *A. officinalis* en la producción de bioetanol por *Candida utilis* var. *major*.

## 2.7.1. Cuantificación de la Proteína unicelular.

Según<sup>15</sup>.

## 2.7.2. Cuantificación de los azúcares reductores totales residuales

Según<sup>12</sup>

## 2.7.3. Determinación del rendimiento (Y) en base a azúcares reductores totales suministrados

Según<sup>18</sup>

## 2.7.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las variables producción de etanol, rendimiento y productividad fueron evaluados mediante la estimación de medidas de tendencia central y dispersión, ANOVA y comparación de medidas según el método "t"<sup>19</sup>



## RESULTADOS

En la tabla 1 se aprecia la producción de proteína unicelular "X" (g/L), notándose que a 7 g/L de ART se produce 1.8 g/L de proteína unicelular, disminuyendo progresivamente a medida que disminuye la concentración de ART suministrado tal como se ve en la figura 2. También, se detalla en la misma tabla y figura 3 la producción de etanol (%) y (g/L), en la cual existe una relación directa entre concentración de ART y producción de etanol. Así

tenemos que a 7 g/L de ART se produce 2.04% de etanol disminuyendo progresivamente hasta 0.4% a la concentración de 0.85 g/L de ART. En contraste con su testigo melaza diluida a 7 g/L de ART, donde supera ampliamente a los tratamientos con 1.8 g/L de proteína unicelular y 3.47% de bioetanol. En la misma tabla se presenta el rendimiento "Y" (%) de producción de proteína unicelular y bioetanol por *C. utilis* var. *major* CECT 1430 en

relación a la concentración de azúcares reductores totales ART consumidos destacando nítidamente el tratamiento a la concentración de 1.75 g/L con un 52.10 y 91.66% del rendimiento para la proteína unicelular y bioetanol respectivamente, seguido de un 44.79% a la concentración de 1.75 g/L de ART para la proteína unicelular y 82.36% para el bioetanol. Tal como se demuestra para mayor

detalle en las figuras 4, 5 y 6

Referente a la productividad "P" del sistema para la producción de proteína unicelular y bioetanol se tiene que ésta aumenta directamente proporcional a la producción de proteína unicelular y bioetanol respectivamente, hallazgos que se presentan e ilustran en la tabla 1.

**Tabla 1. Resultados promedio de la producción, aprovechamiento, rendimiento y productividad del bioproceso de producción del bioetanol del desecho lignocelulósico "peladilla" de *asparagus officinalis* "espárrago" por *candida utilis*. Var.mayor c.e.c.t. 1430 durante 72 horas de fermentación a 25°C.**

So	Sf	Sc	"X"				"E"					
			[ART g/L]	x (g/L)	A(%)	$y_{x/s}$ (%)	$p_x$ (g/L-h)	E (g/L)	E(%)	A(%)	$Y_{p/s}$ (%)	$P_E$ (g/L-h)
0.85	0.18	0.67	0.13	15.30	18.98	0.0014	3.14	0.40	47.06	58.54	0.044	0.005
1.75	0.72	1.03	0.53	30.47	52.10	0.007	8.07	1.03	53.90	91.66	0.113	0.014
3.50	1.50	2.00	0.89	25.43	44.79	0.013	12.81	1.64	46.76	82.36	0.178	0.023
7.00	4.16	2.84	1.02	14.62	36.02	0.014	16.00	2.04	29.14	71.78	0.222	0.029
Testigo	1.93	5.07	1.80	25.76	35.77	0.025	27.18	3.47	49.52	68.47	0.378	0.049

Leyenda:

Testigo: Concentración de ART de melaza a 7 g/L

ART: Azúcares reductores totales en (g/L)

So: Concentración inicial de sustrato (g/L)

Sf: Concentración final de sustrato (g/L)

Sc: Concentración de sustrato consumido (g/L)

A: Aprovechamiento de azúcares suministrados (%)

$Y_{x/s}$ : Rendimiento de la biomasa con relación al sustrato consumido (%)

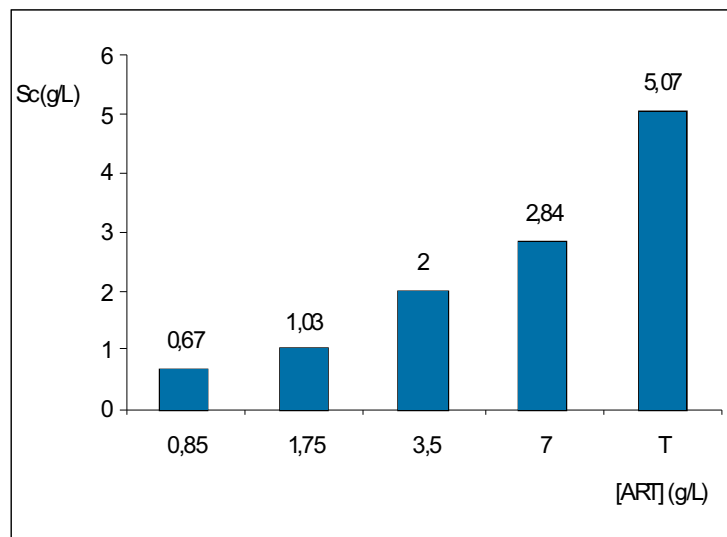
$Y_{p/s}$ : Rendimiento del producto "bioetanol" con relación al sustrato consumido (%)

E: Producto "Bioetanol" formado en (g/L) ó (%)

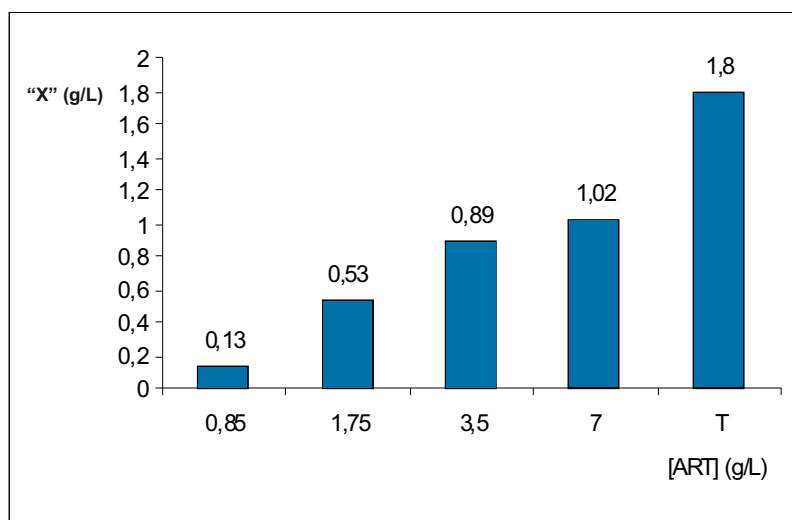
P: Productividad del sistema en base a "X" y "E" producido (g/L-h)

X: Proteína unicelular: Biomasa (g/L)

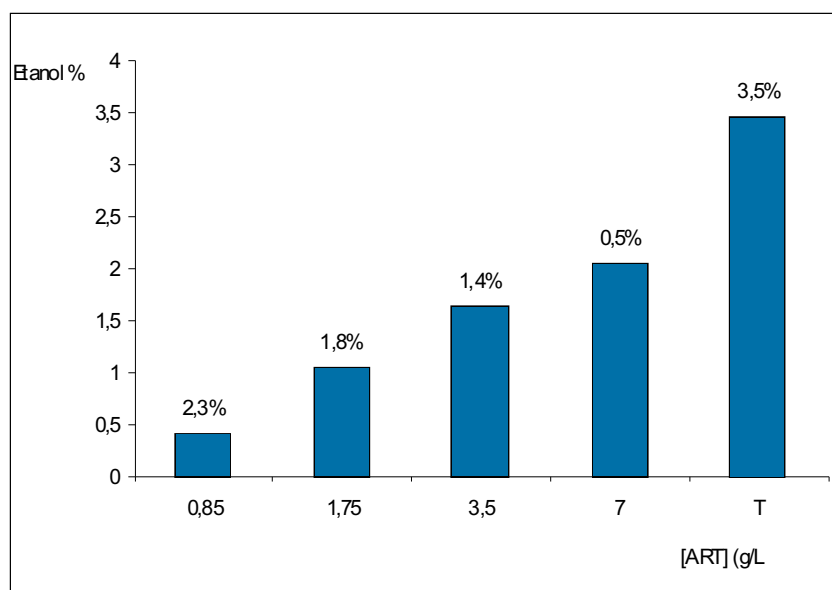
**Figura 1. Consumo de los azúcares reductores totales "ART" g/L de "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago" durante 72 horas de fermentación.**



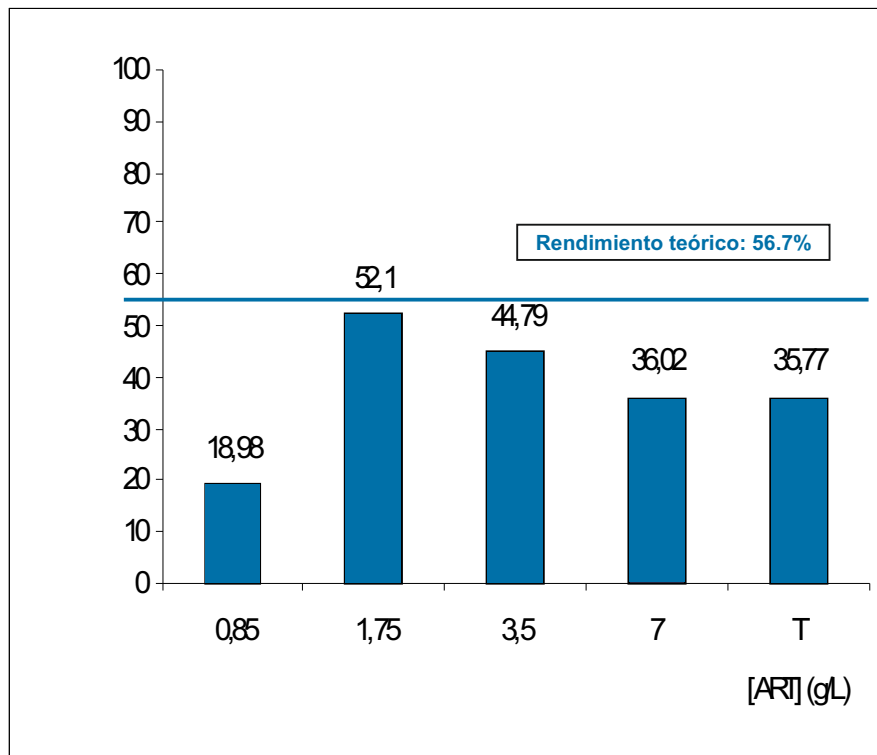
**Figura 2. Producción de proteína unicelular "X" g/L de *Candida utilis. var. major* C.E.C.T. 1430 a partir de azúcares reductores totales "ART" de "peladilla" de *Asparagus officinalis*, durante 72 horas de fermentación.**



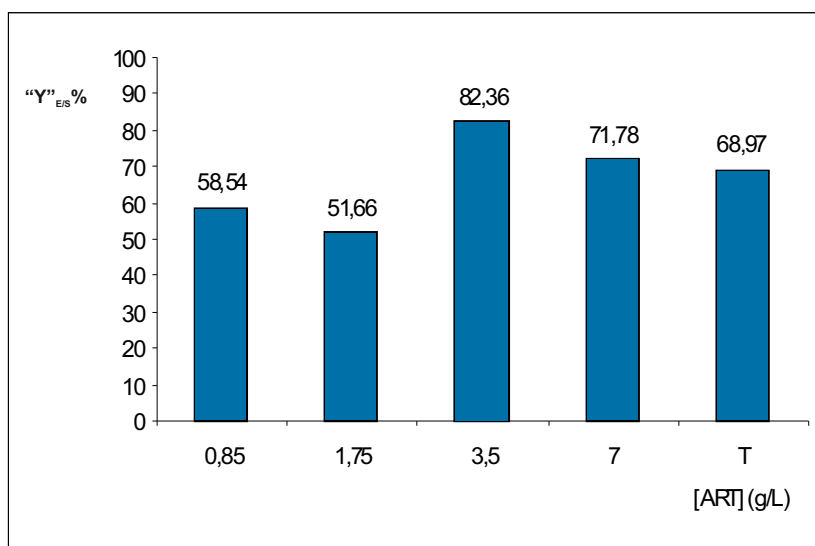
**Figura 3. Producción de etanol "E" (%) por *Candida utilis. var. major* C.E.C.T. 1430, a partir de azúcares reductores totales "ART" de "peladilla" de *Asparagus officinalis*, durante 72 horas de fermentación.**



**Figura 4. Rendimiento "Y" (%) de la proteína unicelular de *Candida utilis. var. major* C.E.C.T. 1430, en relación a la concentración de azúcares reductores totales "ART" consumidos de "peladilla" de *Asparagus officinalis*, "espárrago" durante 72 horas de fermentación.**

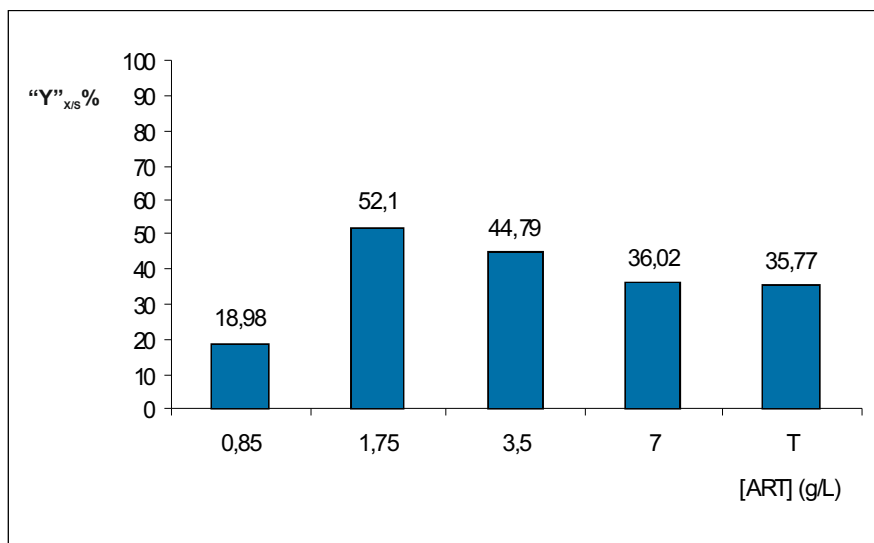


**Figura 5. Rendimiento "Y" (%) de bioetanol producido por *Candida utilis. var. major* C.E.C.T. 1430, en relación a la concentración de azúcares reductores totales "ART" y consumidos de "peladilla" de *Asparagus officinalis*, "espárrago" durante 72 horas de fermentación.**





**Figura 6. Comparación entre el rendimiento teórico y experimental de la producción de proteína unicelular de *Candida utilis*. var. *major* C.E.C.T. 1430, en relación al sustrato consumido "ART" (g/L) de "peladilla" de *Asparagus officinalis*, "espárrago".**



## DISCUSIÓN

La "peladilla" del espárrago al igual que cualquier otro material de naturaleza lignocelulósica y tal como fuera ya admitido por<sup>11</sup>, necesita como fase previa al proceso de fermentación, un pretratamiento; que haga accesible los azúcares reductores al ataque enzimático del microorganismo responsable de la fermentación. En este bioproceso se ha utilizado los métodos de extracción física y físico-química con la finalidad de extraer los azúcares reductores presentes en la peladilla de espárrago, métodos que hacen uso de ácidos, álcalis y factores físicos como presión y temperatura.

Los métodos de extracción mencionados, permiten solubilizar la hemicelulosa y la celulosa quedando prácticamente inalterada la lignina<sup>20</sup>. Asimismo, indican que la celulosa representa el componente mayoritario aproximadamente un 45% de la materia prima suministrada, seguida por la hemicelulosa con un 30% compuesta principalmente por la xilosa, la cual representa aproximadamente entre el 60 y 70% del total de la hemicelulosa<sup>20</sup>. La xilosa es un azúcar de cinco carbonos que no puede ser fácilmente fermentada a etanol por los microorganismos tradicionalmente utilizados tales como *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo en el presente trabajo se utilizó a *Candida utilis* una levadura que ha demostrado utilizar eficientemente hexosas y pentosas así como soportar temperaturas elevadas durante el bioprocesos, resultados encontrados previamente por<sup>21</sup>.

Esto es fácilmente observable si se comparan los valores obtenidos cuando a la levadura se le suministró dos sustratos diferentes: melaza y la fracción líquida obtenida después del pretratamiento de la peladilla de espárrago. Los

resultados obtenidos y mostrados en la Figura 3 indican que con 7 g/L de azúcares reductores presentes en la fracción líquida en los que posiblemente existe gran cantidad de xilosa, la levadura logró producir 2.04 % de etanol mientras que con 7 g/L de azúcares reductores totales provenientes de melaza, de los cuales gran cantidad corresponden a glucosa, la levadura produjo 3.47% de etanol, valor no muy distante al primero. Esto confirma que *Candida utilis* es capaz de utilizar con similar eficiencia tanto hexosas como pentosas como material de partida en la producción de etanol.

Es importante recalcar, que no todo el sustrato suministrado a las levaduras, en este caso los azúcares provenientes de la peladilla de espárrago, puede ser convertido a etanol; las levaduras lo utilizan además para su crecimiento y mantenimiento. Si bien es cierto, las levaduras crecen en condiciones aeróbicas y fermentan en condiciones anaeróbicas, en las primeras etapas de la fermentación alcohólica que es anaeróbica, crecen utilizando el aire que queda en el biorreactor. Por lo tanto, la disminución de los azúcares no representa necesariamente una conversión total a etanol.

Esto puede explicar los resultados de la Figura 5, en la cual se puede observar que el máximo rendimiento de bioetanol producido por la levadura es de 82.36% a una concentración de 3.5 g/L de azúcares provenientes de peladilla de espárrago, mientras que con la concentración de 7 g/L de azúcares suministrados solo se llega a 71.78% de rendimiento. Esto significa que *Candida utilis* var. *major* utiliza gran parte del sustrato para multiplicarse y generar de esta forma biomasa lo cual fue comprobado con los resultados obtenidos y

que son mostrados en la Tabla 1, la misma que indica que a esa misma concentración de sustrato se obtuvo 1.02 g/L de biomasa, valor cercano al 1.8 g/L obtenido con la melaza a la misma concentración.

Por otro lado, el pretratamiento es un proceso indispensable cuando se trabaja con material lignocelulósico y permite solubilizar los azúcares fermentescibles presentes en este. Sin embargo, puede originar compuestos que interfieren en el proceso de fermentación. Del pretratamiento del material lignocelulósico se obtienen 2 fases una sólida y otra líquida en las cuales no sólo están presentes los azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de celulosa y hemicelulosa sino que, debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas en las que se desarrollan estos pretratamientos, se originan una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación<sup>22</sup>. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de materia prima (maderas duras, blandas o herbáceas), del pretratamiento utilizado, de las condiciones del proceso (temperatura y tiempo) y

de la utilización o no de catalizadores ácidos<sup>20</sup>.

Se han descrito algunos efectos como: reducción de la tasa específica de crecimiento<sup>20</sup> disminución de la productividad volumétrica de etanol<sup>7</sup>; descenso de la productividad específica de etanol<sup>17,20</sup> y disminución de la producción de biomasa<sup>22</sup>, encontraron que existen compuestos tóxicos como el furfural que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos o bien producir daños sobre la membrana plasmática. Asimismo, afirman que pueden producir la inhibición de enzimas glicolíticas y fermentativas<sup>7</sup>.

La influencia de estos factores podría ayudar a explicar los resultados observados en la Figura 2, la cual muestra que con 7 g/L de azúcares presentes en la fracción líquida proveniente del tratamiento de la peladilla de espárrago se produjo 1.02 g/L de proteína unicelular y 2.4 % de etanol; mientras que cuando se le suministró melaza a la misma concentración de azúcares reductores se logró obtener 1.8 g/L de proteína unicelular y 3.47% de etanol.

## CONCLUSIÓN

- La producción de bioetanol aumenta a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores totales "ART" de "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago".
- El rendimiento de *Candida utilis*. var. *major* CECT 1430 es óptimo (91.66%) a la concentración de 1.75 g/L de azúcares reductores totales de "peladilla" de *Asparagus officinalis*; disminuyendo conforme se aumenta la concentración de dichos azúcares.
- El valor más alto en la producción de bioetanol (2.04%) se encuentra a una concentración de 7 g/L de azúcares reductores totales de "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago", con un rendimiento del 71.78% de *Candida utilis*. var. *major* CECT 1430.
- La producción de proteína unicelular se incrementa conforme se incrementa la concentración de azúcares reductores totales de "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago". El valor más alto en la producción de proteína unicelular (1.02 g/L) se encuentra a una concentración de 7 g/L de azúcares reductores totales de "peladilla" de *Asparagus officinalis*, con un rendimiento del 36.02% de *Candida utilis*. var. *major* CECT 1430.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palacio, H. 1996. Fabricación de alcohol. Editorial Salvat S.A. Madrid. España.
2. Olgún, E. y P. Téllez. 2000. Evaluación de alternativas biotecnológicas para la diversificación de la industria azucarera. Revista ATAM N° 1, 2000.
3. Israelidis, C. y M. Coduonis. 1982. Utilization of Agricultural Wastes for Animal Feed and Energy. Agricultural Research. Atenas. Grecia.
4. Bjerre A. B., Olesen A.B., y Fernqvist T. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis results in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol Bioeng.* 49: 568-577.
5. Valdez, I. 1997. Obtención de cepas resistentes a alcohol y termotolerantes por métodos de selección en cultivo continuo. Primer Taller Internacional de Producción de Alcoholes. TIPAL. Cuba.
6. Gera R., Dhamija S.S., Gera T., & Singt D. 1997. Intergeneric ethanol producing hybrids.
7. Ballesteros, M. 2001. Biocombustibles para el transporte. En: *Tecnologías Energéticas e Impacto Ambiental*. JEN-CIEMAT 1951-2001 pp. 357-369. McGraw-Hill.
8. Instituto Peruano del Espárrago. 2004. Primer censo nacional de productores y plantas de procesamiento de espárrago. Lima. Perú.
9. León, C. 2005. Influencia de la concentración de melaza de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar" en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. *major*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
10. Barrena, M. 1999. Optimización del enriquecimiento proteico de "peladilla" de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) con cultivo mixto de *Trichoderma reesei* con *Candida utilis* y *Chaetomium cellulolyticum* con *C. utilis*. Tesis para optar el gado de Maestro en Ciencias. Mención en Microbiología Industrial y Biotecnología. Universidad Nacional de Trujillo.



11. Bardales, C., J. Mostacero., C. León, J. Arellano., M. Salazar., C. Nomberto y O. Pretell. 2009. Extracción de azúcares reductores totales "ART" de "peladilla" de *Asparagus officinalis* "espárrago" por métodos físicos, químicos y físico químicos. Revista ARNALDOA. Vol 16(1). Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo. Perú
12. Estévez, R. 1998. Influencia de la concentración de azúcares sobre la producción de levadura torula. Rev. ICIDCA. 7 (3) 61 – 63.
13. Bailón, S. 2001. Influencia del sulfato de amonio, nitrato de potasio y urea en la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* var. major. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Microbiología Industrial y Biotecnología. Universidad Nacional de Trujillo.
14. Difco Manual. 1985. Dehydrated cultivo médium and reagent for microbiology. 10<sup>th</sup> edition. Edit. Difco Laboratories. Detroit. USA.
15. Gómez, J. 1999. Variación de la concentración de aminoácidos obtenidos a partir de la fermentación de suero láctico con *Kluyveromyces fragilis*. Tesis para optar el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
16. Caballero, J. 2000. Optimización de la concentración de sales y azúcar en extracto de pasas para la producción continua de etanol usando *Zymomonas mobilis* inmovilizadas en alúmina. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Microbiología Industrial y Biotecnología. Universidad Nacional de Trujillo.
17. Torres, B.C. 1997. Metodología de la investigación científica. 5ª ed. Edit. "San Marcos". Lima – Perú.
18. Herbert, D. 1999. Some principles of continous culture. Recent progress in Microbiology. Edit. G. Tunerall. Canadá.
19. Freese, F. 1988. Métodos estadísticos elementales para técnicas forestales. Edit. Departamento de Agricultura de U.S.A. U.S.A
20. Sun & Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review. Bioresource Technology. 83: 1-11.
21. Liberman, B. 1999. The use of selected yeast strains for ethanol production. Memorias. TIPAL 99. Matanzas. Cuba.
22. Sánchez, O. 1996. Procedimiento para la producción de alcohol en destilerías cubanas. Revista de la Sociedad de Biotecnología y Boingeniería de México. 2, 35-39.

**Recibido: 10 julio 2011 | Aceptado: 18 octubre 2011**