

Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"
Facultad de Ingenierías
Departamento de Química e Ingeniería Química.



Trabajo de Diploma

*Pretratamiento ácido en dos etapas de tallos
de yuca (Manihot dulcis) para la hidrólisis
enzimática de la celulosa*

Autora: Yailén Evelyn Martínez Peña

Tutora: MSc. Ena Hernández López

Matanzas, Julio, 2011

DECLARACION DE AUTORIDAD

Declaro ser la única autora de este trabajo de diploma que lleva como título: **"Pretratamiento ácido en dos etapas de tallos de yuca para la hidrólisis enzimática de la celulosa"**, y autorizo a la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos a hacer uso del mismo con la finalidad que estime conveniente.

FIRMA

NOTA DE ACEPTACION

NOMBRE Y APELLIDOS

FIRMA

NOMBRE Y APELLIDOS

FIRMA

NOMBRE Y APELLIDOS

FIRMA

PENSAMIENTO

"Por este mundo pasaré solamente una vez, si hay una buena obra que pueda hacer, si hay una buena palabra que pueda decir; haré esa buena obra y diré esa buena palabra, pues ya nunca volveré a pasar por aquí"

Edmundo D' Amicis

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelo.

A mi mamá y a mi papá por educarme y haber logrado en mí el espíritu de superación que inculcaron con su ejemplo, por ser las razones por las cuales hoy estoy en la cima de mi sueño que a la vez, es su sueño.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas, a todas las cuales quisiera expresarle mi más sincera gratitud.

A Ena Hernández López por haber aceptado tutorear este trabajo y por haberlo hecho con tanta pasión y entrega, y Carlos Martín Medina por su ejemplo de dedicación a la investigación y por haberme indicado el camino para realizar este trabajo.

A mi mamá Ramona Peña Leyva por su dedicación, desvelo y apoyo para mi educación, por estar siempre presente cuando más la necesitaba, por su aliento incondicional, por ser mi máxima inspiración y saber que sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A mi papá José Martínez Almenares que aunque lejos se encuentre estuvo siempre preocupado y al tanto de cada paso mío, igual por ser mi máxima inspiración que sepa también que sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A mi hermano Rainer por incitarme a ir a cuanta fiesta hubiera con el pretexto de despejar, por confiar siempre en mí y apoyarme.

A mi tía Anett y a mi prima Kathy por confiar en mí, apoyarme cada vez que lo necesité y por tratar siempre de buscarle solución a mis problemas.

A Yosmel por estar todos estos años a mi lado, por su amor y sacrificio, por su apoyo EN TODO y por haberme soportado en los momentos en que yo me volvía insoportable.

A mi familia toda, por estar siempre pendiente y preocupada de cada paso que di.

A Michael por haber aceptado cotutorear este trabajo y por tenderme su mano incondicionalmente cada vez que prescindí de su ayuda.

A mi grupo Q-51 por ayudarme y apoyarme en todos los momentos, en especial a Yeisel, Yadira, Malvis, Annalien, Alietys, Roberto, Duniesky, Yasmany, Dayli.

A Anisley Herrera porque a pesar de sus problemas, estuvo presente en los momentos en que necesité que me escuchara y por ayudarme siempre.

A Yunior por estar dispuesto siempre a prestarme la computadora cuando la necesité e igual incitarme a salir a divertirme para liberar tensiones.

A Tania y Carmen por prestarme cristalería cada vez que lo necesité, por hacerme más ameno el tiempo en el laboratorio y por el té de cada tarde.

A Jose Luis por aceptar que hiciéramos nuestros experimentos en el Laboratorio.

A Ariel y Rapado por aclararme dudas acerca de resultados de experimentos cada vez que lo necesité.

A todos los profesores que de una forma u otra tuvieron que ver con mi formación durante todos estos años.

A TODOS GRACIAS.

RESUMEN

Con vistas a evitar las pérdidas de carbohidratos detectadas en experimentos previos, se investigó la hidrólisis ácida en dos etapas como método de pretratamiento para la hidrólisis enzimática de la celulosa contenida en los tallos de yuca. La primera etapa de hidrólisis se realizó a 130°C y 30 minutos y la segunda a 170°C y 10 minutos, en ambas se utilizó ácido sulfúrico. El material sólido se sometió a deslignificación con NaOH al 2% a 100°C. La pulpa obtenida, al igual que el material pretratado en una y en dos etapas de hidrólisis, se hidrolizó con enzimas celulolíticas. El rendimiento de cada etapa y el análisis de la composición de las corrientes obtenidas permitieron realizar el balance de materiales y cuantificar la recuperación y las pérdidas de los componentes de interés. La mayor conversión en la hidrólisis enzimática de la celulosa se alcanzó en el pretratamiento por hidrólisis ácida en dos etapas (1,5% de ácido sulfúrico en la primera y 0,5% en la segunda) seguido de deslignificación alcalina. Se demostró que el pretratamiento ácido en una sola etapa (con ácido sulfúrico al 0,5%) seguido de deslignificación alcalina, por su relativamente alta convertibilidad enzimática, su sencillez de implementación, y sus bajas pérdidas de celulosa, es una alternativa prometedora para el procesamiento de los tallos de yuca.

ABSTRACT

In order to avoid losses of carbohydrates detected in previous experiments, was investigated the two-stage acid hydrolysis as a pretreatment method for enzymatic hydrolysis of cellulose in the cassava stems. The first stage of hydrolysis was performed at 130°C and 30 minutes to 170°C and 10 minutes and the second, and both used sulfuric acid. The solid material was subjected to delignification with NaOH at 2% at 100°C. The pulp obtained, like the pretreated material in one and two stages of hydrolysis was hydrolysed with cellulolytic enzymes. The performance of each stage and the analysis of the composition of the currents obtained allowed for the material balance and quantify the recovery and losses of the components of interest. The best conversion in enzymatic hydrolysis of cellulose was greater in the two-stage acid hydrolysis as a pretreatment (1,5% of sulfuric acid in the first stage and 0,5% of sulfuric acid in the second) with alkalyne delignification. The experimental results revealed that acid pretreatment in one stage with sulfuric acid at 0,5% with alkalyne delignification, for relatively high enzymatic convertibility, and low losses of the cellulose, is a promising alternative for the fractionation of cassava stems.

INDICE

Introducción	1
Capítulo I: Análisis Bibliográfico	4
1.1. Biocombustibles	4
1.2. La biomasa lignocelulósica como fuente de energía renovable y materia prima	5
1.3. Composición de los materiales lignocelulósicos	7
1.4. Características de la yuca (<i>Manihot dulcis</i> y <i>manihot sculenta</i>)	8
1.5. Producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos	9
1.5.1 Hidrólisis ácida	10
1.5.2 Hidrólisis enzimática	11
1.5.3 Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos	12
1.6. Biorrefinerías	14
1.6.1. Diseño de sistemas de biorrefinerías	14
1.7. Conclusiones Parciales	17
Capítulo II: Materiales y Métodos.	17
2.1. Muestreo, preparación y conservación de la materia prima	17
2.2. Caracterización de la materia prima	17
2.3. Pretratamiento por hidrólisis ácida diluida a los tallos de yuca	20
2.3.1. Prehidrólisis ácida a tallos de yuca en autoclave	49
2.3.2. Prehidrólisis ácida a tallos de yuca en reactor Regmed	22
2.4. Deslignificación alcalina	25
2.4.1. Precipitación de la lignina en los licores negros	25
Capítulo III: Análisis de resultados	27
3.1. Composición de la materia prima	27
3.2. Pretratamiento ácido en autoclave	29
3.3. Pretratamiento ácido en reactor	32
3.3.1. Pretratamiento ácido en una etapa	33
3.3.2. Pretratamiento ácido en dos etapas	35
3.4. Deslignificación alcalina	38
3.5. Convertibilidad enzimática	39
3.6. Conclusiones Parciales	43

4. Conclusiones	44
5. Recomendaciones	45
6. Referencias	46
7. Anexos	54

INTRODUCCIÓN

La situación energética global en la actualidad está marcada por el incremento de los precios de los combustibles en el mercado internacional, lo que está asociado a la disminución de las reservas y la inminencia de agotamiento de los recursos fósiles (González, 2007). En aras de garantizar la soberanía energética para cualquier país es preciso emplear recursos locales de manera sostenible. Eso, unido a la creciente preocupación por los efectos negativos del abuso de los hidrocarburos sobre el medio ambiente y el clima en la Tierra, ha incrementado el interés por los portadores energéticos renovables (González, 2007).

En el año 2004 el 13,2% de la energía consumida en el mundo procedía de fuentes renovables, de las cuales el 79,4% corresponde a la biomasa lignocelulósica (IEA, 2007), constituyendo una de las fuentes de energía más extendidas en el mundo y en la que descansan las mayores expectativas de desarrollo en las próximas décadas (Carrasco, 2002).

Para un uso sustentable de los biocombustibles se requiere que sean producidos de materias primas que no compitan con la producción de alimentos.

En Cuba, la agricultura y la agroindustria generan cantidades significativas de residuos lignocelulósicos, los cuales no son usados económicamente y su acumulación constituye un problema para el medio ambiente. Entre los desechos agrícolas de interés se encuentran los tallos de yuca.

La producción anual de yuca en Cuba asciende a 140 000 toneladas. Por cada tonelada de yuca se generan 170 kg de tallos, de los cuales solamente una pequeña parte recibe utilización, en la propagación del cultivo y en la elaboración de alimento animal. El resto de los tallos de yuca es fundamentalmente abandonado en el campo o quemado.

Una vía para aumentar la eficiencia económica de la utilización de los materiales lignocelulósicos es la conversión integral de la materia prima siguiendo una filosofía de biorrefinerías, lo que implica la obtención de distintos productos a partir de los diversos componentes de la biomasa (Huang *et al.*, 2008).

Hasta ahora se ha investigado poco sobre el fraccionamiento de los tallos de yuca que serían mucho mejor aprovechados si se procesase en biorrefinerías lignocelulósicas para la producción de etanol celulósico u otros productos de alto valor económico y social. Para ello, es necesario separar la celulosa, las hemicelulosas y la lignina contenidos en la materia prima, y procesar cada uno de esos componentes para la obtención de derivados específicos.

La caracterización química de los tallos de yuca, realizada por investigadores de la Universidad de Matanzas (Martín *et al.*, 2006), reveló que estos están constituidos en un 46% por carbohidratos, de los cuales los más importantes son los glucanos (33%) y xilanos (12%). Se ha estimado que la conversión de la fracción de glucanos de los tallos de yuca a etanol combustible podría generar unos 140 litros por tonelada de ese material (Martín *et al.*, 2006).

Para poder convertir los tallos de yuca a etanol es necesario hidrolizar los polisacáridos, lo que requiere de catálisis química o enzimática. Sin embargo, debido a la baja reactividad de la celulosa es necesario pretratar las materias primas para facilitar el acceso de las enzimas al sustrato (Martín, 2007). Existen diversos tipos de pretratamiento basados en criterios físicos, químicos, físico-químicos o biológicos (Martín, 2008). Los únicos métodos de pretratamiento que han sido reportados para este material son la oxidación húmeda (Martín y Thomsen, 2007) y la prehidrólisis ácida (Martín *et al.*, 2007). Con este último se obtienen mejores resultados, no obstante en las condiciones de prehidrólisis ácida a 140°C y 1,5% de ácido sulfúrico se logró una solubilización considerable de los glucanos, y una parte importante de la glucosa formada se degradó a 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Hernández y Martín, en preparación). Los trabajos antes mencionados revelaron que los tallos de yuca contienen una fracción de glucanos que se hidroliza a condiciones relativamente poco enérgicas y que se degrada durante el pretratamiento conduciendo a una baja conversión de los polisacáridos en azúcares fermentables. Por otra parte, la convertibilidad enzimática de los tallos de yuca pretratados por prehidrólisis ácida resultó baja, lo que podría estar relacionado con la presencia de lignina, la cual es un inhibidor de la acción de las celulasas.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores se formula el siguiente **problema científico**:

La conversión hidrolítica de los polisacáridos en las condiciones previamente ensayadas para la prehidrólisis ácida de los tallos de yuca es baja debido a la degradación de la fracción fácilmente hidrolizable de los glucanos y a la inhibición de las enzimas celulolíticas por la presencia de lignina.

Como vía para solucionar este problema se puede formular la siguiente **hipótesis**:

El pretratamiento ácido en dos etapas de los tallos de yuca seguido de la deslignificación alcalina podría permitir una mayor conversión hidrolítica de los glucanos y un mejor aprovechamiento de la celulosa contenida en la materia prima para la producción de etanol u otros productos de interés.

Objetivo general:

Evaluar el efecto del pretratamiento ácido en dos etapas y la deslignificación alcalina sobre la convertibilidad enzimática de la celulosa de los tallos de yuca.

Objetivos específicos:

- Determinar la composición química de los tallos de yuca.
- Definir la concentración de ácido sulfúrico y el tiempo de pretratamiento más apropiados para la prehidrólisis ácida en dos etapas de tallos de yuca.
- Evaluar el efecto de la hidrólisis ácida en dos etapas sobre la convertibilidad enzimática de la celulosa de los tallos de yuca.
- Evaluar el efecto de la deslignificación posterior a la hidrólisis ácida sobre la convertibilidad enzimática de la celulosa de los tallos de yuca.

Capítulo I. Análisis Bibliográfico

1.1 Biocombustibles.

La situación energética actual, tanto nacional como internacional, relacionada en primer término con el incremento del costo de los combustibles en el mercado Internacional, y esto asociado a la escasez de los recursos fósiles y su agotamiento en el futuro no lejano, ha obligado a países en vías de desarrollo a realizar acciones concretas encaminadas al empleo de recursos locales de manera sostenible para el suministro energético, tanto para la producción de energía eléctrica o calor para diferentes procesos.

Los recursos energéticos renovables brindan una oportunidad de mantener e incrementar el ritmo de crecimiento de un país, y en este sentido la humanidad debe apostar todo el intelecto que posee.

Los biocombustibles, combustibles derivados de la biomasa (conjunto de materiales de origen biológico que son susceptibles de ser utilizados para otros fines distintos a los alimentarios) pueden ser considerados como alternativas a los carburantes de origen fósil. Los biocombustibles de primera generación, como el etanol de maíz o de jugo y melazas de caña de azúcar, así como el biodiesel de aceites de colza y de soya, ya se comercializan exitosamente en numerosos países (Agarwal, 2007). Para un uso sustentable de los biocombustibles se requiere que sean producidos de materias primas que no compiten con la producción de alimentos. Sin embargo, la producción de combustibles a partir de fuentes de alimentos y la explotación de tierras cultivables con fines energéticos presenta inconvenientes desde el punto de vista ético en un mundo donde el hambre continúa afectando a millones de personas (Martín y Martín, 2008). Un desafío para la ciencia actual es usar los materiales lignocelulósicos (MLC) para la producción de etanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Wyman, 2007), y producir el biodiesel a partir de semillas oleaginosas no comestibles (Azam *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2010).

En la actualidad la biomasa lignocelulósica constituye una de las fuentes de energía más extendidas en el mundo y es la fuente de energía renovable en la que descansan las mayores expectativas de desarrollo en las próximas décadas (Carrasco, 2002).

1.2 La biomasa lignocelulósica como fuente de energía renovable y materia prima.

La biomasa lignocelulósica es considerada como una fuente renovable de energía muy interesante y prometedora. La biomasa está a menudo disponible localmente en grandes cantidades y a precios razonablemente bajos y la factibilidad de su conversión en portadores energéticos secundarios es indudable.

Los productos derivados de la biomasa tienen carácter renovable, ya que constituyen una fase del ciclo biológico de los elementos carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno (Carrasco, 1990). La energía que puede ser obtenida de la biomasa es una forma de la energía solar que ha sido captada por las plantas y transformada en energía química (Carrasco, 1990). Por cada mole de CO₂ atmosférico fijado por las plantas, 114 kcal de energía solar se transforman en energía química de los productos de la fotosíntesis.

La biomasa lignocelulósica pueden tener los siguientes orígenes (Carrasco, 1990):

- a) Natural: Es la biomasa que se produce en los bosques y otros ecosistemas naturales. Su explotación no es interesante por razones de mantenimiento del equilibrio ecológico.
- b) Residual: Es la biomasa resultante de la actividad humana. Incluye residuos forestales, agrícolas, ganaderos, agroindustriales y de las industrias de la madera, así como residuos sólidos urbanos.
- c) Cultivos energéticos. Son aquellos cultivos dedicados a la producción de biomasa con fines no alimentarios. Suelen ser especies caracterizadas por su robustez a fin de abaratar los costos de cultivo y, por tanto, el precio de la biomasa final. Son plantas perennes con un crecimiento rápido y una elevada eficiencia en la fotosíntesis y en la asimilación de nutrientes y presentan alta resistencia a las plagas y a la sequía. Son consideradas de interés agroenergético especies agrícolas o forestales de alta producción, que son utilizadas simultáneamente para usos agrícolas y energéticos, así como especies nuevas seleccionadas exclusivamente para su uso energético.

El principal beneficio medioambiental del uso energético de la biomasa lignocelulósica es que el CO₂ liberado a la atmósfera durante la combustión forma parte del ciclo natural del carbono por lo que no supone un aporte neto de este y no contribuye a incrementar el efecto invernadero. Además, el uso de combustibles derivados de la biomasa contribuye a la autosuficiencia energética de países sin grandes reservas de combustibles convencionales (Carrasco, 1990). Por otra parte, el proceso de producción de la biomasa permite la formación de oxígeno en la fotosíntesis, regula la evaporación de agua y evita la erosión del suelo.

Como desventajas del empleo de los materiales lignocelulósicos se destacan su bajo valor calórico comparado con el de los combustibles fósiles, su falta de uniformidad y su baja densidad, por lo que debe producirse cerca de su lugar de utilización (Carrasco, 2002).

La producción global de los procesos fotosintéticos es de 10-50 x 10¹² toneladas de biomasa seca anualmente, lo que corresponde al 50% de toda la biomasa en el mundo y, expresado en términos energéticos, equivale a 10 veces el consumo global de energía. Sin embargo, solamente entre el 3 y el 4% de esos materiales son utilizados económicamente en el mundo occidental, fundamentalmente como alimentos, en la producción de pulpa y papel y en la generación de energía. Estas cifras ilustran la abundancia de los materiales lignocelulósicos y sus ilimitadas potencialidades con vistas a ser utilizados en la producción de etanol sin afectar la alimentación humana (IEA, 2007).

En el mundo existe gran variedad de biomasa lignocelulósica, como por ejemplo los tallos y tucas de maíz, el bagazo y la paja de caña de azúcar, la paja de trigo, entre otros. En Cuba, la agroindustria azucarera aporta alrededor de 5 toneladas de bagazo y residuos agrícolas por cada tonelada de azúcar producida (Reyes *et. al.*, 2002), y la biomasa forestal tiene un potencial estimado en 3,5 millones de metros cúbicos al año sin peligro a romper el equilibrio ecológico, constituyen importantes recursos biomásicos a emplear con fines energéticos. Otros tipos de residuos, como los tallos de yuca, han sido poco investigados a pesar de que tienen potencial para usos energéticos.

1.3. Composición de los materiales lignocelulósicos.

Los MLC en general están formados por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina (Tabla 1.2), los cuales son componentes de las paredes celulares. El conjunto de los polisacáridos celulosa y hemicelulosas se conoce como holocelulosa (Chum *et al.*, 1985).

Tabla 1.3 Composición de materiales lignocelulósicos (%). (Irmene y Adela, 2008)

Fuente	Celulosa (%)	Hemicelulosas (%)	Lignina (%)
Olote de maíz	36.0	23.0	17.0
Fibra de maíz	14.3	16.8	8.4
Bagazo de caña	50	20.0	30.0
Paja de trigo	33-38	21-25	23.0
Paja de arroz	34	25.0	23.0
Madera de pino	46.4	8.8	29.4
Pasto	31	20-24	17-18
Papel de oficina	68.6	12.4	11.3

La celulosa, el principal componente de las paredes celulares de las plantas superiores, está contenida en 36-51% de la masa seca en los materiales lignocelulósicos. El contenido de Hemicelulosas varía entre 15 y 30%, mientras que la lignina representa de un 20 a un 25% de la masa seca. El contenido de extractivos no suele ser superior de 3-4%, mientras que las cenizas solo en pocas especies alcanzan el 2%. Los compuestos extractivos son una amplia variedad de compuestos que incluyen ácidos resínicos, compuestos fenólicos, aceites esenciales, grasas, ceras, taninos, colorantes y carbohidratos, entre otros (Martín, 2002).

Uno de los problemas inherentes en la utilización de la biomasa es la estructura compleja del MLC. Este material consiste en elementos estructurales (tipo de fibra). La mayoría de la sustancia en la biomasa está presente en las fibras que, debido a su

función, tienden a tener las paredes celulares más espesas, sobre todo hacia el fin de un anillo de crecimiento cuando se trata de MLC de árboles (Chum *et al.*, 1985).

La gravedad específica de los MLC es bastante constante, por consiguiente, la gravedad específica de biomasa realmente es una medida indirecta de la cantidad de volumen nulo en el material. La densidad es importante en la utilización de la biomasa porque determina la capacidad de digestión y la proporción de licor. La densidad varía considerablemente entre los MLC y ella determina los parámetros de la reacción (Chum *et al.*, 1985).

1.4. Características de la yuca (*Manihot dulcis* y *Manihot sculenta*).

La yuca (*Manihot dulcis* y *Manihot sculenta*) es un alimento de gran importancia en Cuba y otros países tropicales. Es una planta de origen americano que pertenece a la familia *euphorbiaceae*. Se ha extendido en una amplia área de los trópicos americanos desde Venezuela y Colombia hasta el Noroeste de Brasil, con predominio de los tipos de yuca dulce en el norte y en la zona de Brasil los amargos. Las especies silvestres del género *Manihot* tienen dos centros de origen: uno en México y América Central y el otro en el noroeste de Brasil (<http://www.infoagro.com/hortalizas/yuca.htm>). Es un arbusto que presenta tamaño variable, depende de la variedad y el ambiente, la altura varía de 1,50 m a más de 2,5 m. El tallo por lo general es cilíndrico, con tendencia a ser prismático y con un diámetro que varía de 2 a 6 cm. Por su posición pueden ser: erectos, decumbentes o postrados. El color puede ser rojo, marrón, verde, amarillo. Los nudos son prominencias con característica propia de la variedad y se compone de: base de la hoja, yema axilar, y dos estípulas laterales. El tamaño, forma del nudo y distancia entre los nudos es una característica varietal, aunque es afectada por condiciones ambientales (www.apades.org/cultivos/yuca.htm)

Las raíces reservantes son morfológica y anatómicamente idénticas a las raíces fibrosas, sólo se diferencian en que las raíces reservantes tienen mayor desarrollo radical y alta cantidad de almidón. Las hojas son alternas, simples y caedizas, de vida corta. Su longitud varía de 12 a 18 cm. El fruto es una cápsula ovoide verde de 1 a 1,5 cm de largo con 6 aristas longitudinales prominentes, onduladas y a menudo de color

diferente al resto del fruto. Contiene tres celdas normalmente con una semilla en cada una.

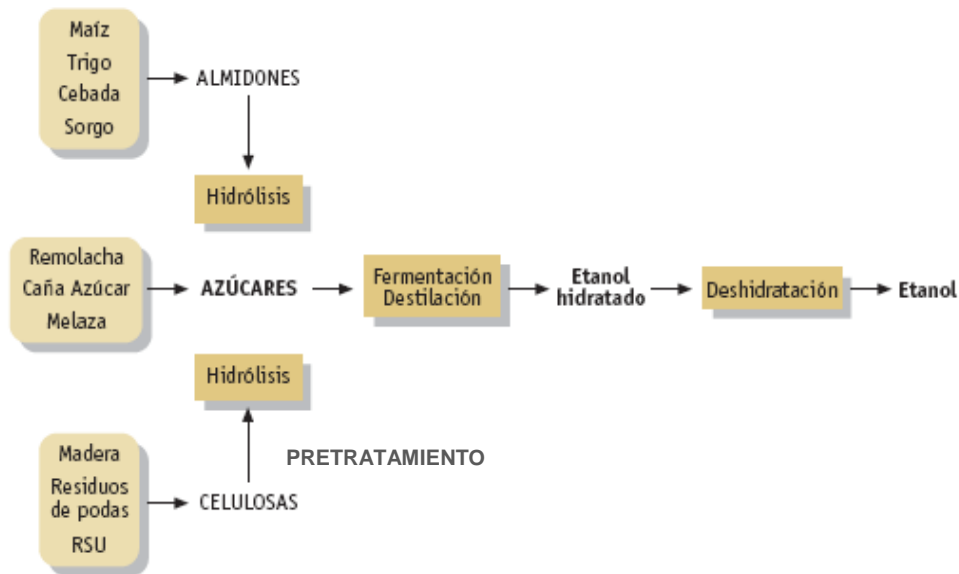
El principal uso que reciben los tallos de yuca es en la siembra de nuevas plantaciones (Oseih y Taah, 2009). No obstante, no todos los tallos de yuca son utilizados en la replantación, y la mayor parte constituye un excedente que no recibe ningún uso de relevancia y generalmente se quema o abandona en los campos. Entre los usos que se han propuesto para los tallos de yuca se encuentran la conformación de raciones para la alimentación animal (Nommanha, 1962), así como la producción de tableros de partículas (Patron, 2008), y como material de construcción para fines decorativos (Acosta, 1993).

1.5 Producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos.

En los últimos años, el aumento del uso del etanol combustible en el mundo y la preocupación por desvincular su producción de materias primas que compitan con la alimentación humana han elevado el interés en el uso de los MLC en lugar de las materias primas azucaradas y amiláceas usadas tradicionalmente muchas de las cuales a su vez pueden ser fermentados a etanol por las levaduras. Sin embargo, producir azúcares con altos rendimientos y bajo costo a partir de la biomasa lignocelulósica es más difícil que producir azúcares a partir de materiales azucarados o amiláceos. Por eso, a pesar de que el costo de la biomasa lignocelulósica es mucho más bajo que el costo de otras materias primas, el costo de obtener azúcares a partir de lignocelulosa ha sido históricamente demasiado alto como para atraer el interés para su uso industrial (Martín, 2002).

Esto ha llevado a la propuesta de diversos procesos tecnológicos, tanto basadas en la hidrólisis ácida como en la enzimática (Bueno, 2008).

Un proceso de obtención de etanol a partir de lignocelulosa debe contemplar como una etapa fundamental la hidrólisis de la celulosa con el objetivo de obtener una disolución de glucosa que pueda ser sometida a fermentación. La hidrólisis de la celulosa puede ser catalizada por ácidos y por enzimas.



En la hidrólisis de la celulosa, los hidrolizados obtenidos pueden ser fermentados con *Saccharomyces cerevisiae* produciendo etanol y dióxido de carbono. La solución alcohólica obtenida posee de 5-7% (v/v) en etanol, el cual es concentrado mediante destilación fraccionada hasta la obtención de una mezcla azeotrópica con una concentración de 96% (v/v) en etanol. El producto obtenido puede ser utilizado directamente como combustible o ser deshidratado con obtención de etanol anhidro, el cual se mezcla con gasolina para ser usado como combustible automotor. La deshidratación puede realizarse por destilación azeotrópica, con usos de tamices moleculares y por otros métodos.

1.4.1 Hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida es conocida desde 1819. Consiste en hidrolizar, en presencia de ácidos minerales fuertes, los enlaces glicosídicos de los polisacáridos con formación de monosacáridos. Para lograr la hidrólisis completa de la celulosa se deben emplear ácidos concentrados que permitan el hinchamiento necesario y la destrucción parcial de las regiones ordenadas (Martín, 2002). El ácido más usado es el sulfúrico, pero también pueden ser utilizados el clorhídrico, el nítrico, el fosfórico y el acético (Lavarack *et al.*, 2002; Rodríguez-Chong *et al.*, 2004; Gámez *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2011).

El principal inconveniente de la hidrólisis ácida es el requerimiento de materiales anticorrosivos costosos para la fabricación de reactores y tuberías (Wyman, 1999).

Otros inconvenientes son la formación de sustancias inhibitorias de la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica, sobre todo cuando se trabaja a altas temperaturas (Bashir y Lee, 1994), y el requerimiento de neutralización.

Entre los inhibidores formados durante la hidrólisis ácida se encuentran los aldehídos furánicos furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), los ácidos acético, fórmico y levulínico, así como varios compuestos fenólicos liberados de la degradación parcial de la lignina (Mes-Hartree y Saddler, 1983, Palmqvist *et al.*, 1996).

Se ha trabajado mucho en el desarrollo de procesos de hidrólisis con ácidos diluidos. La hidrólisis percolativa es un proceso, en el cual soluciones acuosas de H_2SO_4 o de HCl son pasadas a través de un lecho de astillas de madera o aserrín en un digestor a temperaturas elevadas (120 - 180°C) con remoción continua del hidrolizado para evitar la degradación de los azúcares liberados. A continuación, el hidrolizado, que contiene generalmente 4-6% de azúcares, es neutralizado y concentrado por evaporación. En la hidrólisis con ácidos diluidos, una parte de la celulosa permanece sin hidrolizarse, mientras que las hemicelulosas son hidrolizadas completamente a sus monosacáridos componentes.

El residuo sólido que queda luego de la hidrólisis está compuesto fundamentalmente por lignina, la cual está más o menos condensada en dependencia de las condiciones durante la hidrólisis. La lignina puede ser usada como combustible o como materia prima para obtener distintos productos.

1.4.2 Hidrólisis enzimática.

Debido a los inconvenientes de la hidrólisis ácida, durante los últimos años se le ha dedicado especial atención a la hidrólisis enzimática (Martín, 2002), la cual consiste en el uso de enzimas celulolíticas en lugar de ácidos para catalizar la hidrólisis de los polisacáridos contenidos en los MLC. Las enzimas celulolíticas utilizadas son obtenidas de hongos del género *Trichoderma* (Taherzadeh y Karimi, 2007).

La hidrólisis enzimática presenta una serie de ventajas sobre la hidrólisis ácida. Es un método selectivo, con un mayor rendimiento, sin el inconveniente de la formación de productos colaterales, y brinda la posibilidad de simultanearse con la fermentación

alcohólica en procesos conocidos como SSF (del inglés *Simultaneous saccharification and fermentation*) (Taherzadeh y Karimi, 2007).

Las principales limitaciones de la hidrólisis enzimática son el alto costo de las enzimas y el requerimiento de grandes reactores debido a la lentitud de la reacción (Martín, 2002). Otro inconveniente importante es que la estructura cristalina de la celulosa y su estrecha interrelación con las hemicelulosas y la lignina restringen la accesibilidad de las enzimas. Por esa razón es necesario someter la materia prima a un proceso de pretratamiento antes de la hidrólisis enzimática.

1.4.3 Pretratamiento de los MLC.

Existen diferentes métodos físicos, químicos, biológicos y combinados de pretratamientos (Mosier *et al.*, 2005). Los métodos físicos son costosos y poco efectivos. Los métodos biológicos son muy lentos, mientras que los métodos químicos y físico-químicos poseen menor costo y son más eficientes.

La explosión con vapor es un método físico-químico que da buenos rendimientos en un corto tiempo y minimiza el uso de reactivos químicos (Gregg y Saddler, 1996). Consiste en un calentamiento del material con vapor saturado seguido de una descompresión explosiva. Durante el calentamiento, los grupos acetilo de las hemicelulosas se hidrolizan y el ácido acético formado cataliza la hidrólisis de las hemicelulosas.

Otro método es la utilización de agua caliente en estado líquido (LHW, del inglés *Liquid Hot Water*). En este método, el cual no requiere del uso de reactivos, las hemicelulosas se solubilizan en forma de oligosacáridos, y la fracción celulósica es fácilmente hidrolizable (Zeng *et al.*, 2007).

La explosión con amoníaco, AFEX (del inglés *Ammonia Fiber Explosion*), es un pretratamiento físico-químico en el cual el material es expuesto al amoníaco líquido a 90-100°C durante unos 30 minutos y luego la presión es reducida bruscamente. La AFEX mejora la hidrólisis enzimática y minimiza la formación de inhibidores de la fermentación, pero es poco efectivo en materiales con alto contenido de lignina y se requiere de la recirculación del amoníaco (Eggeman y Elander, 2005).

Los pretratamientos organosolv permiten adecuar la celulosa a la acción de las enzimas mediante el uso de disolventes orgánicos que solvolizan y solubilizan la lignina y parte de las hemicelulosas. Estos métodos consisten en el calentamiento de la lignocelulosa con sistemas acuosos de disolventes orgánicos a temperaturas entre 150-200⁰C. Los disolventes usados deben ser reciclados para reducir el costo operacional (Sun y Cheng, 2002).

La oxidación húmeda es el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos con agua y aire u oxígeno a temperaturas por encima de 120⁰C. La oxidación húmeda está entre los procesos más simples en términos de equipamiento, energía y reactivos químicos requeridos, y es un método apropiado para materiales con bajo contenido de lignina (Martín *et al.*, 2007).

Pretratamiento ácido diluido.

El pretratamiento ácido diluido, consiste en el uso de ácidos diluidos para despolimerizar y solubilizar las hemicelulosas y activar la celulosa para la hidrólisis enzimática (Grohmann *et al.*, 1995). Su principio de acción es similar a la hidrólisis ácida descrita anteriormente. La prehidrólisis con H₂SO₄ diluido es un método muy efectivo, entre cuyas ventajas se encuentran la recuperación de las hemicelulosas en forma de monosacáridos y la posibilidad de recuperar la lignina pura después de la hidrólisis. Su principal inconveniente es el alto costo de los materiales anticorrosivos requeridos para la construcción de los reactores (Mosier *et al.*, 2005).

Deslignificación alcalina.

En la deslignificación alcalina se utilizan bases como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio o amoníaco para solubilizar la lignina, con lo que se logra mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. El tratamiento alcalino es más efectivo que los pretratamientos ácidos y oxidativos en el rompimiento de los enlaces éster entre la lignina y los carbohidratos. Es más efectivo en el pretratamiento de residuos agrícolas que en maderas. Puede combinarse con tratamientos con peróxido de hidrógeno (Taherzadeh y Karimi, 2008) y con oxidación húmeda (Bjerre *et al.*, 1996), lo que mejora considerablemente la hidrólisis enzimática de la celulosa.

1.5 Biorrefinerías

Las biorrefinerías se definen como los “medios de producción que integran procesos de conversión de biomasa y equipos para producir combustible, energía y productos químicos a partir de la misma”. Una biorrefinería es una planta procesadora donde la biomasa es convertida en múltiples productos valiosos de manera similar a una refinería petroquímica. En contraste con una refinería de petróleo, una biorrefinería usa recursos renovables y produce combustibles y reactivos químicos que contribuyen menos a la contaminación ambiental (Fernando *et al.*, 2006).

Las biorrefinerías lignocelulósicas pueden producir, además de etanol y papel como productos principales, múltiples co-productos como ácido acético, furfural, acetona, butanol, ácido succínico y otros compuestos. Para la utilización eficiente de las materias primas, en las biorrefinerías lignocelulósicas se requiere hidrolizar lo más completamente posible los polisacáridos, convertir todos los azúcares en etanol y co-productos, y encontrar aplicaciones de alto valor agregado para la lignina, cuyo uso actual se limita a la generación de vapor y electricidad. A corto plazo los co-productos son generalmente deseados en aplicaciones energéticas, mientras que a largo plazo la alcoquímica sentará las bases para la producción sustentable de reactivos químicos y materiales (Fernando *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008).

1.5.1 Diseño de sistemas de biorrefinerías.

El diseño de las biorrefinerías se refiere a proveer tecnología básica con líneas de productos similares a los obtenidos por la industria petroquímica. A partir de trabajos dedicados al desarrollo de sistemas de biorrefinerías siguiendo la lógica de la base de productos petroquímicos, se crea el “árbol de familia de productos químicos” obtenidos a partir de la biomasa (Ver Fig. 1.6.1) (Cappa, M; Díaz A, 2007).

Existen cuatro sistemas complejos de biorrefinerías clasificadas de acuerdo a la biomasa considerada:

- Biorrefinerías de “naturaleza seca”, las cuales utilizan biomasa lignocelulósica;

- Biorrefinerías de “granos”, las cuales utilizan como materia prima cereales o maíz;
- Biorrefinerías de “naturaleza húmeda”, las cuales utilizan plantas herbáceas y cereales no maduros.
- Biorrefinerías que incluyen la plataforma de los azúcares, basada en la conversión química y bioquímica de los azúcares extraídos de la biomasa por distintos métodos.

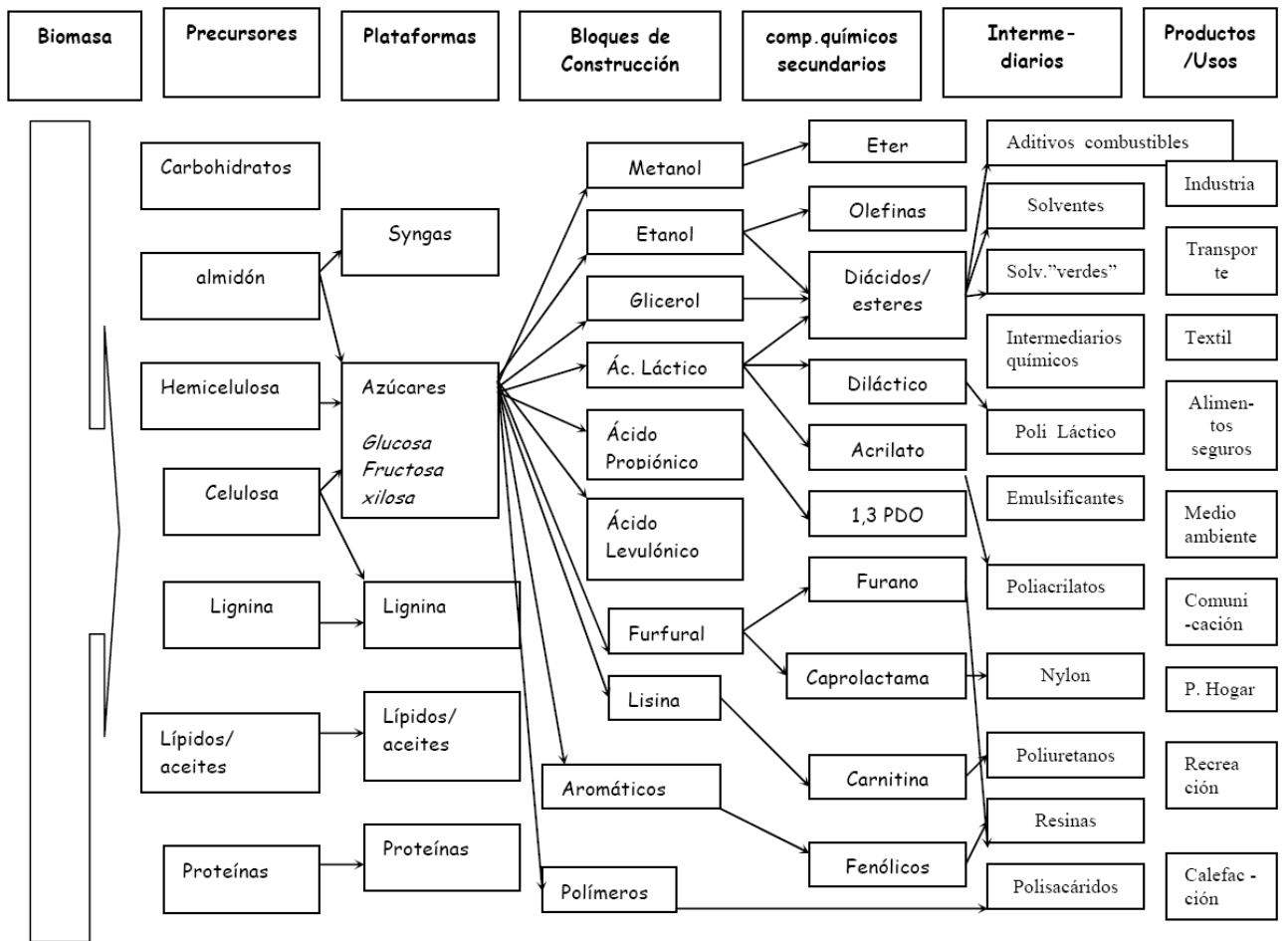


Fig.1.5.1 Diagrama de flujo de productos a partir de biomasa y sus posibles usos.

1.6 Conclusiones Parciales

1. Los materiales lignocelulósicos son la fuente renovable de energía y materias primas más abundante en la Tierra, pero su utilización actual es inferior a su potencial real.
2. Los tallos de yuca constituyen una materia prima de interés para la producción de etanol y otros bioproductos.
3. Entre los distintos métodos de pretratamiento para la hidrólisis enzimática, la prehidrólisis ácida y la deslignificación alcalina es un método adecuado a las particularidades de los tallos de yuca.

Capítulo II. Materiales y Métodos

En el presente capítulo se describen los procedimientos aplicados y equipos fundamentales utilizados en la investigación. El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio del Grupo de Tecnología de Biorrecursos del Departamento de Química e Ingeniería Química de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”.

El trabajo experimental consta de las siguientes etapas:

- Recolección y preparación de la materia prima;
- Caracterización de la materia prima;
- Prehidrólisis ácida en autoclave;
- Hidrólisis ácida en dos etapas en reactor Regmed a escala de banco;
- Deslignificación del material pretratado por hidrólisis ácida en una y dos etapas;
- Hidrólisis enzimática de la celulosa contenida en el material pretratado y deslignificado.

2.1. Muestreo, preparación y conservación de la materia prima.

Los tallos de yuca (*Manihot dulcis*) se colectaron en áreas del Instituto Politécnico Agropecuario “César Escalante” (Jagüey Grande, Matanzas). Los tallos frescos se cortaron en trozos de 5 cm de longitud y se secaron al sol y al aire durante 2 semanas, y a continuación se trituraron en un molino artesanal hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 2 mm. El material molido se sometió a un secado adicional a 40 °C en una estufa (Aiset® YLD-6000, R.P. China) durante 24 h. Posteriormente, el material seco se tamizó para obtener una fracción con un tamaño de partícula de 1 mm, que se utilizaría posteriormente para la caracterización química de la materia prima. Las dos fracciones fueron conservadas en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

2.2. Caracterización de la materia prima.

La determinación del contenido de humedad, componentes minerales, sustancias extractivas, carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosas) y lignina de la materia prima se realizó siguiendo procedimientos analíticos de la Academia Forestal

de San Petersburgo, Rusia (Obolenskaja, 1986), actualizados a partir de protocolos del *National Renewable Energy Laboratory* de los EE.UU. (Sluiter *et al.*, 2008).

- **Humedad:** El material se secó a 105 °C en una estufa (AISET® YLD-6000, R.P. China) durante 24 h, y el contenido de humedad se determinó gravimétricamente utilizando una balanza analítica digital (Sartorius BS 124S, China).
- **Cenizas:** Se determinó después de la incineración de una alícuota del material a 550°C en horno mufla analógico con control térmico (AISET YLD-6000, Alemania).
- **Extractivos en agua:** Se suspendieron 10 g de la materia prima con 100 mililitros de agua destilada y se calentaron a temperatura de ebullición con reflujo durante tres horas en un baño de María (Midingen / Sitz Freital, Alemania). El agua se separó por filtración a vacío (ILMVAC 400171, China), y los sólidos se lavaron con abundante agua hasta alcanzar la neutralidad, se secaron al aire durante dos días y luego en estufa a 40°C por 48 horas. El contenido de extractivos en agua se cuantificó gravimétricamente. En el filtrado se determinó el pH y la concentración de azúcares reductores totales.
- **pH:** Se realizó por el método potenciométrico directo con pH metro MV 88 con electrodo de vidrio combinado.
-
- **Azúcares reductores totales (ART):** Se realizó colorimétricamente por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959) como desarrollador de color, y se leyó la absorbancia a 546 nm en un espectrofotómetro UV (Zuzi UV-4200, España).
- **Extractivos en etanol:** Aproximadamente 5 g de materia prima se colocaron en un aparato Soxhlet de 75 ml, y se realizó la extracción con 160 mL de etanol al 95% durante 24 h utilizando un baño de María como fuente de calentamiento. Al final de la extracción, el dedal con los sólidos residuales se lavó con etanol y se secó al aire por dos días y luego a 40°C por 24 h. El etanol fue separado del

extracto por rotoevaporación (IKA RV 05 Basic, Alemania). El balón con el extracto se secó a 40°C por 24 h, y posteriormente se cuantificó gravimétricamente.

- **Polisacáridos fácilmente hidrolizables (PFH):**

La determinación de los polisacáridos fácilmente hidrolizables se realiza mediante análisis gravimétrico del residuo sólido remanente después de la hidrólisis de las hemicelulosas. En un balón de destilación se mezclaron 2 g de muestras libres de extractivos con 20 mL de ácido clorhídrico al 5 % en masa. La mezcla se mantuvo a ebullición durante 3 h en un equipo de reflujo colocado en un baño de agua. Al finalizar, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se filtró a vacío. Los residuos sólidos de la filtración fueron secados a 105°C durante 24 h, enfriados y pesados.

$$\text{PFH} = \frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2.1})$$

Donde:

m_0 , masa inicial de la muestra, g.

m_1 , masa del residuo, g.

El contenido de PFH también fue determinado a partir de los azúcares reductores totales en el filtrado.

- **Polisacáridos difícilmente hidrolizables (PDH):**

Los residuos de la determinación de los PFH fueron pesados e introducidos en vasos de precipitado de 100 mL. A cada vaso se adicionó 15 mL de ácido sulfúrico al 72% en masa, y la mezcla se mantuvo durante 2 h a temperatura ambiente con agitación periódica. Posteriormente, la mezcla fue transferida a un balón de destilación de 500 mL, se le adicionó 135 mL de agua destilada y se reflujo durante 2 h en un baño de agua. Finalmente, la mezcla se enfrió y se filtró a vacío. El residuo de la filtración se secó a 105°C durante 24 h, se enfrió y pesó. El contenido de PDH se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{PDH} = \frac{(m_2 - m_3)}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2.2})$$

Donde:

m_0 , masa inicial de la muestra, g.

m_2 , masa inicial del residuo de la determinación de PFH, g.

m_3 , masa final del residuo de este proceso, g.

El contenido de PDH también fue determinado a partir de los azúcares reductores totales en el filtrado.

- **Lignina:** Se determinó mediante la cuantificación gravimétrica del residuo obtenido en la determinación de PDH. El contenido de lignina se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{m_3}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2.3})$$

Donde:

m_0 , masa inicial de la muestra, g.

m_3 , masa final del residuo de la determinación de PDH, g.

2.3. Pretratamiento por hidrólisis ácida diluida a los tallos de yuca.

Se realizó como método de pretratamiento a la materia prima, la prehidrólisis ácida diluida, con el objetivo de solubilizar gran parte de las hemicelulosas y obtener un material enriquecido en celulosa. Se realizó a escala de laboratorio en un autoclave (Advantage AL02-03-100, China) y a escala de banco en un reactor especialmente diseñado para el procesamiento de materiales lignocelulósicos (Regmed, Brasil). **2.3.1**

Prehidrólisis ácida a tallos de yuca en autoclave.

Como primer paso a la investigación sobre pretratamiento de tallos de yuca, la materia prima se trató con ácido sulfúrico en un autoclave siguiendo un diseño de experimento 2^2 , en el que las variables independientes fueron el tiempo de reacción y la concentración de ácido sulfúrico (Tabla 2.3.1). La temperatura de trabajo (130°C) se

escogió teniendo en cuenta el valor máximo permitido para la operación segura de la autoclave.

Tabla 2.3.1 Condiciones experimentales para el pretratamiento ácido en autoclave.

No.	c(H ₂ SO ₄), %	Tiempo, min	Temperatura, °C	Relación líquido-sólido
1	0,5	30	130	9:1
2	0,5	60	130	9:1
3	1,5	30	130	9:1
4	1,5	60	130	9:1

Muestras de 5 g de tallos de yuca se mezclaron en un frasco de 0.5 L con una solución de ácido sulfúrico a la concentración de trabajo hasta alcanzar 50 gramos de mezcla en una relación líquido-sólido de 9:1. Las suspensiones obtenidas se trataron a 130°C en un autoclave (Advantage AL02-03-100, China) durante el tiempo de pretratamiento previamente seleccionado. Al concluir el pretratamiento, se dejó enfriar el autoclave hasta 70°C, se retiraron los frascos, y su contenido fue filtrado a vacío. El residuo sólido fue lavado primero con abundante agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. El filtrado se conservó a 4°C luego de tomar muestras para análisis de pH y de azúcares reductores totales. Los sólidos lavados fueron secados a temperatura ambiente durante cuatro días. Luego se pesaron los sólidos y se determinó su contenido de humedad para poder cuantificar el rendimiento de sólidos pretratados (celulignina) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \left[\frac{\text{Peso}_{\text{final}} \cdot (1 - H_2)}{\text{Peso}_{\text{inicial}} \cdot (1 - H_1)} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2.3.1})$$

Donde:

H₂, humedad del sólido pretratado, %.

H₁, humedad del sólido antes de tratar, %.

Posteriormente, se realizó la determinación del contenido de celulosa, hemicelulosas y lignina en los sólidos pretratados. Las hemicelulosas y la celulosa fueron determinadas a través de los polisacáridos fácilmente y difícilmente hidrolizables, respectivamente, utilizando los métodos descritos previamente.

A partir de la composición química se calculó la recuperación de la celulosa, las hemicelulosas y la lignina, así como la solubilización de las hemicelulosas. La recuperación de las hemicelulosas se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$R_{PFH} = m(PFH)_{final} / m(PFH)_{MP} * 100 \quad (\text{Ec. 2.3.2})$$

Donde:

$m(PFH)_{final}$, masa de hemicelulosas en la celulignina, g.

$m(PFH)_{MP}$, masa de hemicelulosas en la materia prima, g.

R, recuperación de hemicelulosas en la celulignina, %.

El cálculo de la recuperación de la celulosa y la lignina se hizo de manera similar al de la recuperación de las hemicelulosas. Para calcular la solubilización de las hemicelulosas (S_{PFH}) se utilizó la siguiente expresión:

$$S_{PFH} = 100 - R_{PFH} \quad (\text{Ec. 2.3.3})$$

Se realizaron dos réplicas de todos los pretratamientos y tres réplicas de todos los análisis. Los resultados experimentales se procesaron estadísticamente mediante el paquete estadístico *Statgraphics Plus versión 5.0 for Windows*.

2.3.2 Prehidrólisis ácida de tallos de yuca en el reactor Regmed.

Las condiciones de experimentación para ambas etapas en el reactor Regmed se muestran en la tabla (2.3.2). Las condiciones de reacción en la primera etapa se seleccionaron a partir de los resultados de la experimentación en el autoclave. Las condiciones de la segunda etapa se basaron en reportes de la literatura especializada (Taherzadeh y Karimi, 2007). El diagrama mostrado en la Fig. 2.3.1 facilita la comprensión de la secuencia experimental seguida.

Tabla 2.3.2 Condiciones experimentales para el pretratamiento ácido en autoclave.

Etapas	c(H ₂ SO ₄), %	Tiempo, min	Temperatura, °C	Relación líquido-sólido
1	0,5	30	130	9:1
1	1,5	30	130	9:1
2	0,5	10	170	15:1

Primera etapa

Para la primera etapa de pretratamiento, se pesaron 600 gramos de tallos de yuca, se mezclaron en el reactor con 30 gramos de ácido sulfúrico concentrado (para el experimento con concentración al 0,5 %) y se le añadió agua destilada hasta completar 6 kg de mezcla. La mezcla se calentó a 130°C durante treinta minutos, y luego se dejó que el reactor se enfriase espontáneamente, lo que tomó unos 180 minutos. Para la separación de las fracciones y su posterior caracterización se siguió el mismo procedimiento descrito previamente para los experimentos en el autoclave. Para el pretratamiento con concentración de ácido al 1,5 % se repitió el mismo protocolo, pero con la salvedad de que la masa de ácido sulfúrico concentrado usada fue 90 g. La mayor parte de la celulignina obtenida en este pretratamiento ácido se sometió a una segunda hidrólisis ácida para completar el pretratamiento. Otra parte de la celulignina fue deslignificada por tratamiento alcalino, y una pequeña cantidad fue sometida a hidrólisis con celulasas para evaluar la convertibilidad enzimática de la celulosa.

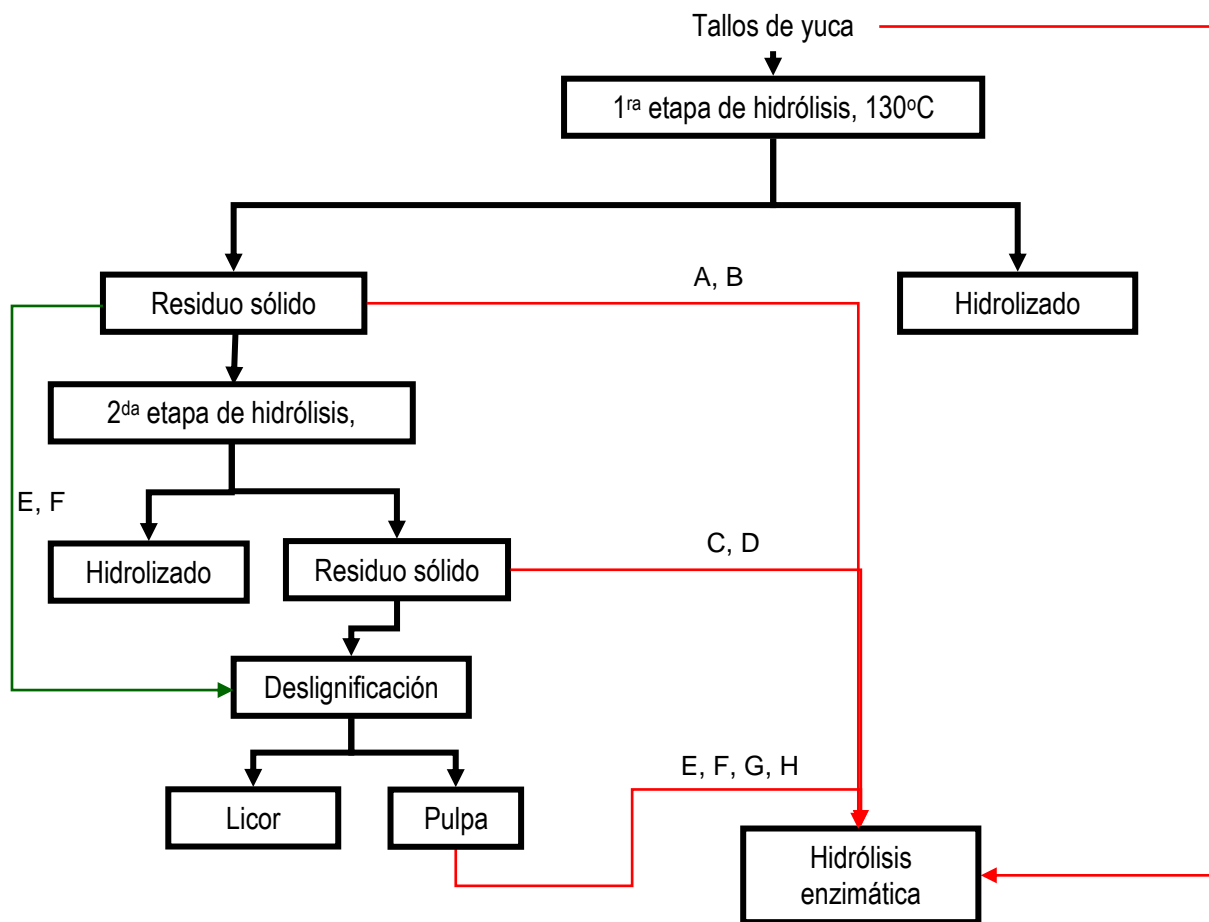


Figura 2.3.1. Secuencia experimental seguida para la hidrólisis y deslignificación de los tallos de yuca.

Segunda etapa

En esta etapa se utilizó una temperatura de 170°C, un tiempo de 10 minutos y una relación líquido-sólido de 15:1. Se tomaron 350 gramos de la celulignina obtenida en la primera etapa, y se mezclaron con ácido sulfúrico diluido totalizando una masa de 6 kg. El resto del procedimiento fue similar al descrito para la primera etapa. La celulignina obtenida se sometió a deslignificación alcalina, excepto una pequeña cantidad que se utilizó para la evaluación de su convertibilidad enzimática.

2.4. Deslignificación alcalina.

Las celuligninas obtenidas en ambas etapas de pretratamiento ácido fueron sometidas a deslignificación alcalina. Para ello, 10 g de muestra se mezclaron con 190 mL de hidróxido de sodio al 2% en un balón de 500 mL. Posteriormente, la mezcla se calentó a

100°C y se reflujo durante 1 hora. Al concluir ese periodo, la fracción líquida (licor negro) se separó de la fracción sólida (pulpa celulósica) por filtración a vacío. La pulpa se lavó con abundante agua, hasta alcanzar pH neutro, se secó al ambiente durante tres días y se pesó para determinar el rendimiento. A la pulpa se le determinó su composición química y su convertibilidad enzimática. El licor negro se conservó a 4°C para la precipitación de la lignina.

2.4.1. Precipitación de la lignina en los licores negros.

Para lograr la precipitación de la lignina, los licores negros fueron acidificados con HCL 6 M hasta alcanzar un pH de 2. La lignina precipitada se separó de las aguas madres mediante centrifugación (Heal Force Neofuge 15R, China), se lavó con agua destilada hasta lograr un pH neutro, se secó durante siete días al aire y se pesó para poder cuantificar su rendimiento con respecto a la biomasa inicial y a la recuperación de la lignina contenida en la biomasa.

$$\text{Rendimiento} = (m_{\text{Lignina precipitada}} / m_{\text{MP}}) \times 100\% \quad (\text{Ecuación 2.4.1})$$

$$\text{Recuperación} = (m_{\text{Lignina precipitada}} / m_{\text{MP}} \times \text{Lign}_{\text{MP}}) \times 100\% \quad (\text{Ecuación 2.4.2})$$

Donde:

m_{MP} , masa de la materia prima;

Lign_{MP} , contenido de lignina en la materia prima.

2.5. Hidrólisis enzimática.

Este proceso se realiza para determinar la convertibilidad enzimática de la celulosa contenida en las celuligninas de ambas etapas de pretratamiento ácido, a las pulpas celulósicas y a la materia prima. A la muestra sin tratar que va a ser utilizada como patrón de comparación, utilizando:

Muestras de 0.0200 g de biomasa se suspendieron en tubos 940 µL de tampón de citrato (0.1 M, pH 4.8) en tubos de Eppendorf de 1.5 mL cada uno. Posteriormente, a las mezclas se añadieron preparaciones comerciales de celulasas (Celluclast 1.5 L, Novozymes, Dinamarca) y de β-glucosidasa (Novozym 188, Novozymes, Dinamarca).

La carga enzimática final fue de 30 FPU/g para las celulasas, mientras que la β -glucosidasa se añadió en exceso. La mezcla se incubó a 50°C y 150 rpm durante 72 h en una incubadora con agitación (Vortemp 56, EE.UU.). Al concluir el tiempo de reacción, se sacaron los tubos de la incubadora, se dejaron reposar durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente se tomaron muestras para determinar la concentración de azúcares reductores totales.

Con la concentración de ART se calculó la convertibilidad enzimática (CE) mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Celulosa hidrolizada} = c(\text{ART}) \times 0.9 \quad (\text{Ec. 2.5.1})$$

Donde:

$c(\text{ART})$, concentración de ART, g/L.

$$\text{CE} = \text{Celulosa hidrolizada} / \text{PDH en biomasa} \times 100\% \quad (\text{Ec. 2.5.2})$$

Capítulo III. Análisis de resultados

3.1. Composición de la materia prima

Con el fin de determinar la composición química de los tallos de yuca, se llevó a cabo una rigurosa secuencia analítica, que incluyó la determinación consecutiva de las sustancias extractivas, polisacáridos y lignina, así como el análisis en paralelo del contenido de componentes minerales. Se siguió la metodología clásica para el análisis químico de maderas y residuos agrícolas según protocolos de la Academia Forestal de San Petersburgo, Rusia (Obolenskaja, 1986). Algunas especificidades de la metodología empleada difieren de otros protocolos de amplio uso en la actualidad, como los del vTI-Instituto de Tecnología y Biología de la Madera de Hamburgo, Alemania (Puls, 1993), o los del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de los EE.UU. (Sluiter *et al.*, 2008). No obstante, la marcha analítica seguida se basa en los mismos principios, y los resultados experimentales, aunque son algo menos precisos debido al no uso de técnicas cromatográficas, brindan una panorámica general bastante atinada, por lo que pueden ser considerados adecuados para el tipo de estudio realizado en el presente trabajo. Los resultados del análisis revelaron que los tallos de yuca, por su composición química, son un material apropiado para distintos aprovechamientos siguiendo un esquema de biorrefinería lignocelulósica.

Los principales componentes de los tallos de yuca son los carbohidratos estructurales, los cuales constituyen dos terceras partes de la masa seca de la materia prima (Ver anexo 1). La celulosa, determinada como la fracción de polisacáridos difícilmente hidrolizables, representa el 37,3% del material, mientras que las hemicelulosas, determinadas como polisacáridos fácilmente hidrolizables, constituyen el 31,4 % (Tabla 3.1.1). El alto contenido de celulosa es una indicación del potencial de los tallos de yuca para la obtención no sólo de etanol celulósico, sino también de otros productos, como ácido láctico, sorbitol, ácido levulínico y otros. A partir del contenido de celulosa en los tallos de yuca, y teniendo en cuenta el rendimiento agrícola de la yuca (35-40 t/ha) y el rendimiento de tallos (170 kg por tonelada de raíz de yuca) (Koopmans y Koppejan, 1997), se puede elucidar un rendimiento de etanol celulósico ascendente a 1 774 litros de etanol al 95% por hectárea de plantación.

Tabla 3.1.1. Composición química de los tallos de yuca. La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Componentes	Contenido (% en masa)
Celulosa	37,3 (0.21)
Hemicelulosas	31,4 (0.16)
Lignina	17,8 (0.03)
Extractos en agua	7,5 (0.02)
Extractos en etanol	6,0 (0.2)
Cenizas	1,9 (0.07)

Las hemicelulosas también permiten diversas aplicaciones para los tallos de yuca, pero la elucidación real de su potencial no es posible en el marco actual debido a limitaciones del método de análisis empleado. Se conoce que las hemicelulosas son un polisacárido muy heterogéneo, formado por diversos azúcares que incluyen pentosas, hexosas, metilpentosas y ácidos urónicos en distintas proporciones (Fengel y Wegener, 1989). Para poder revelar el potencial de aplicación de las hemicelulosas de los tallos de yuca se precisa emplear métodos de análisis que permitan cuantificar sus componentes individuales.

El análisis de la materia prima también reveló que la lignina es el tercer componente en importancia de los tallos de yuca (Tabla 3.1.1). El contenido de lignina en los tallos de yuca (17,8 %) es comparable al contenido de este componente en otros desechos agrícolas, e inferior al de las maderas duras y blandas (Fengel y Wegener, 1989; Hayn *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2006b). El relativamente bajo contenido de lignina es favorable para la conversión de los tallos de yuca, ya que puede permitir tratamientos químicos poco severos para hidrolizar los polisacáridos, y minimiza la inhibición de la hidrólisis enzimática de la celulosa (Palonen *et al.*, 2004).

En caracterizaciones de tallos de yuca reportadas previamente, la determinación de los extractos se limitó a la extracción con etanol, mientras que se ignoró la cuantificación de

extractos hidrosolubles (Martín *et al.*, 2006b; 2007a). En el presente trabajo, con el fin de lograr una mejor resolución de las sustancias extractivas, se realizó la extracción sucesiva con agua y con etanol (Obolenskaja, 1986). El procedimiento resultó acertado, ya que se logró elucidar la presencia de un contenido de extractos solubles en agua caliente ascendente a 7,5% de la masa de la materia prima (Tabla 3.1.1). Ese contenido es superior a los valores reportados para otros materiales (Sjöström, 1993). El contenido de extractos solubles en etanol detectado en este trabajo (6,0%) fue ligeramente inferior al reportado previamente (7,2%) (Martín *et al.*, 2006b), lo que es una consecuencia de la mejor resolución lograda en este trabajo. En el reporte previo (Martín *et al.*, 2006b), al no realizarse extracción agua, una parte de los extractos hidrosolubles fue extraída con etanol aumentando el contenido aparente de extractos solubles en etanol.

Un resultado de interés es que entre los extractos hidrosolubles se detectó 1,2 g/L de azúcares reductores, los cuales pueden ser de interés para procesos fermentativos. Es importante señalar, que el contenido real de carbohidratos en la fracción de extractos hidrosolubles puede ser aún mayor, ya que el método analítico empleado no permitió cuantificar los oligo- y polisacáridos. Para estudios futuros es recomendable hidrolizar los carbohidratos oligoméricos de modo que los productos de la hidrólisis puedan ser cuantificados posteriormente como azúcares reductores totales. También sería de interés aplicar análisis cromatográficos para identificar cada uno de los azúcares presentes en esa fracción.

El contenido de componentes minerales coincide con lo reportado previamente para tallos de yuca (Martín *et al.*, 2006b), y es comparable con los valores encontrados en otros materiales (Sjöström, 1993).

3.2. Pretratamiento ácido en autoclave.

Como resultado del pretratamiento se alcanzaron rendimientos de sólidos de aproximadamente 78-82% (Fig. 3.2.1). La disminución del rendimiento de sólidos se debe a la solubilización de algunos componentes, fundamentalmente las hemicelulosas. La solubilización de las hemicelulosas resulta en un material cuyos principales componentes son celulosa y lignina, por lo que recibe el nombre de celulignina. El

rendimiento de celulignina fue ligeramente inferior en los pretratamientos que usaron ácido sulfúrico al 1,5% (experimentos 3 y 4), lo que es resultado de una mayor acción hidrolítica sobre las hemicelulosas a mayor concentración de H₂SO₄. Por otra parte, a igual concentración de ácido el rendimiento de sólidos fue inferior en los pretratamientos cuya duración fue 60 minutos (experimentos 2 y 4), lo que es una consecuencia lógica de la mayor severidad de las condiciones experimentales.

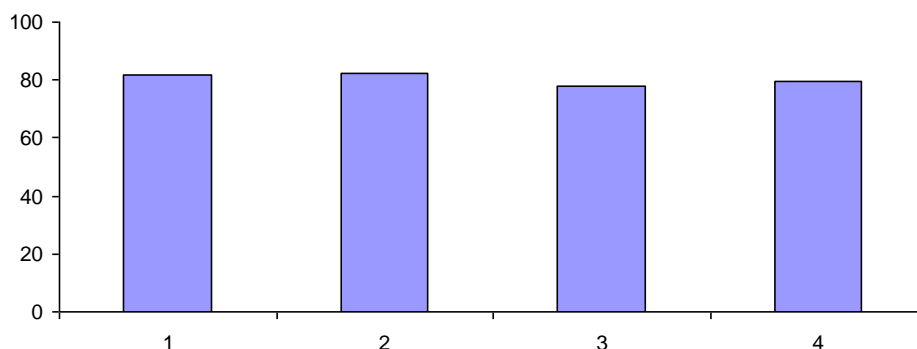


Figura 3.2.1. Rendimiento de sólidos en el pretratamiento ácido en autoclave (%)

La composición química de las celuligninas obtenidas en las distintas condiciones se muestra en la Tabla 3.2.1 (Ver anexo 2). Se puede observar que el contenido de hemicelulosas descendió, como consecuencia de su hidrólisis ácida, de 31,4% en la materia prima (Tabla 3.1.1) a 10,6-12,5% en los sólidos pretratados. Otro resultado de la solubilización de las hemicelulosas es el incremento del contenido de celulosa y de lignina. El contenido de celulosa fue más notable en los experimentos realizados con la mayor concentración de ácido sulfúrico, donde pasó de 37,3% en la materia prima a alrededor del 59% en la celulignina.

Tabla 3.2.1 Composición química de las celuligninas obtenidas en el pretratamiento ácido en autoclave. Las desviaciones estándares se muestran entre paréntesis.

No.	Hemicelulosas, %	Celulosa, %	Lignina, %
1	12,53 (0,1)	49,3 (0,2)	38,2 (0,3)
2	10,57 (0,2)	47,5 (0,1)	40,6 (0,1)
3	11,67 (0,3)	59,2 (0,1)	30,8 (0,1)
4	10,70 (0,2)	58,9 (0,2)	30,5 (0,2)

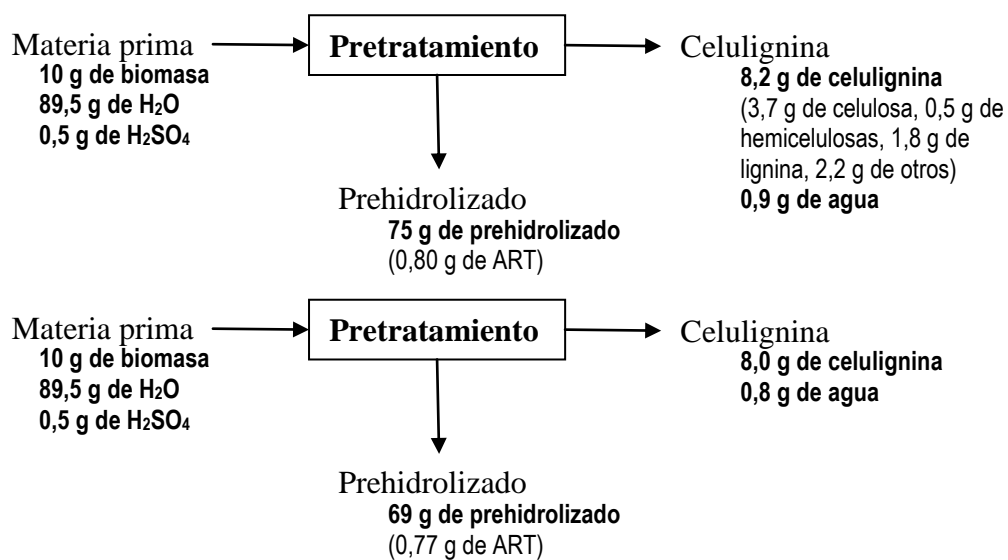


Figura 3.2.2. Balance de masas del pretratamiento ácido de los tallos de yuca en los experimentos 1 (diagrama superior) y 4 (diagrama inferior).

El balance de masas del pretratamiento ácido revela que la totalidad de la celulosa y de la lignina contenidas en los tallos de yuca fueron recuperadas en la celulignina (Fig. 3.2.2). Los resultados del balance también permitieron cuantificar el grado de solubilización de las hemicelulosas, el cual osciló entre 67,4 y 72,9% del contenido inicial de ese componente (Tabla 3.2.2). Las mayores solubilizaciones tuvieron lugar en los experimentos 2 y 4, correspondientes al mayor tiempo de pretratamiento. Por otra parte, el contenido de azúcares reductores totales en los prehidrolizados resultó inferior al valor que debería esperarse a partir de la solubilización ocurrida de las hemicelulosas. Esto indica que ocurrió la degradación de una parte de los azúcares hemicelulósicos. La degradación, que es consecuencia de la reactividad de los monosacáridos en presencia de un medio ácido a elevada temperatura (Fengel y Wegener, 1989), fue mayor en el experimento 4 (Fig. 3.2.2), que fue el realizado a mayor concentración de ácido sulfúrico y durante un tiempo de reacción más largo.

Tabla 3.2.2. Solubilización de las hemicelulosas (%) y concentración de azúcares reductores totales (g/L) en los prehidrolizados.

No.	Solubilización de hemicelulosas, %	Concentración de ART, %
1	67,41	10,45
2	72,26	9,00

3	70,91	11,25
4	72,92	11,3

El procesamiento estadístico de los resultados de la experimentación en autoclave revela que el tiempo ejerce una influencia significativa sobre el rendimiento de sólidos (Figura 3.2.3). El análisis de varianza muestra que el valor de *p-value* es menor que 0.05 con un nivel de confianza de 95%, es por ello que se decide trabajar en el reactor con el menor tiempo (30 minutos). La concentración de ácido sulfúrico no ejerce influencias significativas y tampoco la interacción de ambos factores. (Ver anexo 3)

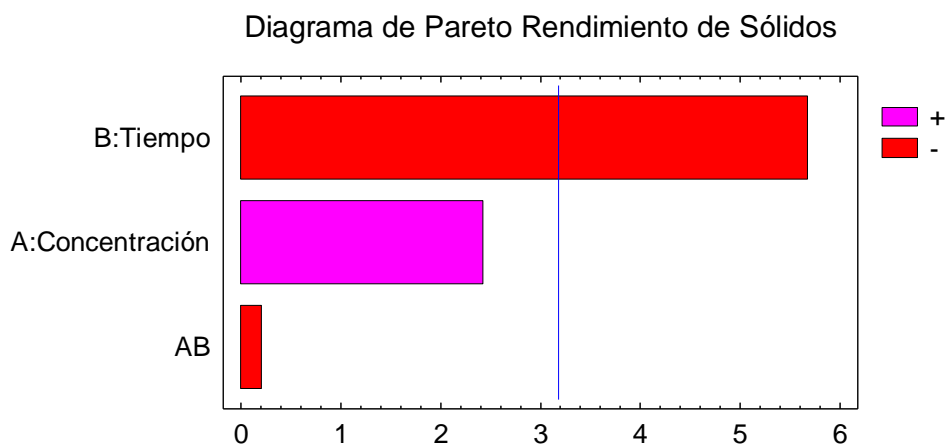


Figura 3.2.3. Diagrama de Pareto para el rendimiento de sólidos.

3.3 Pretratamiento ácido en el reactor:

3.3.1. Pretratamiento ácido en una etapa.

A partir de los resultados obtenidos en el autoclave, y teniendo en cuenta la necesidad de aplicar condiciones experimentales más cercanas a la escala de una planta, se investigó el pretratamiento ácido en una y en dos etapas en un reactor a escala de banco. El reactor empleado fue diseñado y construido especialmente para diferentes tipos de tratamientos a materiales lignocelulósicos, y permite el trabajo en un rango amplio de temperaturas y presiones, así como el uso de diferentes reactivos químicos. Además, está equipado con un sistema de rotación de la cámara de reacción, que permite el mezclado de los reactantes durante el proceso (Rocha *et al.*, 2011).

Al igual que en los experimentos realizados en el autoclave, en los pretratamientos en una etapa en el reactor se utilizaron dos concentraciones de ácido sulfúrico: 0,5% (pretratamiento A) y 1,5% (pretratamiento B). Por otra parte, la temperatura se fijó a 130°C, el tiempo de reacción a 30 min y la relación líquido-sólido 9:1.

Los rendimientos de celulignina (56,3-68,1%) resultaron inferiores a los obtenidos en los experimentos en el autoclave (78-82%) (Ver anexo 4), indicando que en el reactor ocurrió una mayor solubilización de la materia prima. Este fenómeno puede ser atribuido a que el calentamiento y el enfriamiento en el reactor requirieron de tiempos más largos, lo que favoreció la solubilización de los componentes de los tallos de yuca (Tabla 3.3.1). La mayor solubilización ocurrió en el pretratamiento B, lo que es un resultado lógico, pues el efecto catalítico del ácido sulfúrico sobre la hidrólisis de los polisacáridos aumenta con el aumento de su concentración (Taherzadeh y Karimi, 2007).

Tabla 3.3.1. Rendimiento y composición de las celuligninas obtenidas en la primera etapa de pretratamiento en el reactor, y concentración de azúcares en el prehidrolizado. La desviación estándar se muestra entre paréntesis. (Ver anexo 5)

Proceso	Rendimiento de celulignina, %	Hemicelulosas, %	Celulosa, %	Lignina, %	c(ART), g/L
A	68,1	26.22 (0,1)	50.52 (0,2)	23.28 (0,1)	26,7
B	56,3	18.33 (0,3)	52.62 (0,1)	30.22 (0,2)	44,5

Como resultado del pretratamiento, aumentó el contenido de celulosa en el material y disminuyó el de hemicelulosas (Tabla 3.3.1). El pretratamiento con la mayor concentración de ácido sulfúrico condujo a una mayor solubilización de las hemicelulosas, llevando a un contenido final de 18,3%, mientras que en el otro el contenido final fue de 26,2%. Estos resultados están en concordancia con la concentración de azúcares reductores totales, la cual fue mayor en el prehidrolizado procedente del pretratamiento B.

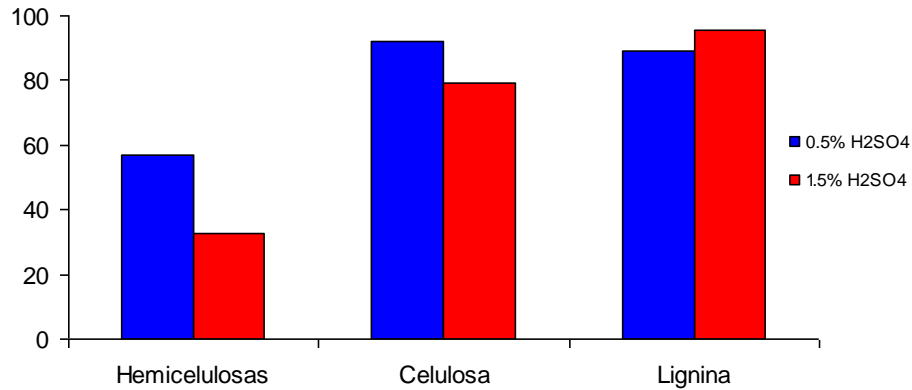


Figura 3.3.1 Recuperación de los principales componentes en la celulignina obtenida por pretratamiento de los tallos de yuca con H₂SO₄ al 0,5 y al 1,5%.

El balance de masas del pretratamiento permitió cuantificar la recuperación de los principales componentes de los tallos de yuca en la celulignina, la cual se presenta en la Figura 3.3.1. La menor recuperación de las hemicelulosas en el pretratamiento B es un resultado de su solubilización. Por su parte, el pretratamiento A, a pesar de alcanzar una menor solubilización de las hemicelulosas, presentó una mayor recuperación de la celulosa (92,2%) que la alcanzada en el B (79,4%). O sea, la cantidad de celulosa disponible para la hidrólisis enzimática es mayor en la celulignina procedente del pretratamiento que empleó menor concentración de ácido sulfúrico.

Como las hemicelulosas fueron el componente que más afectado resultó en esta primera etapa del pretratamiento, se realizó un balance de masas más detallado. Se muestra el balance de las hemicelulosas en el proceso B (Figura 3.3.2). Se puede observar, que de 412 g de hemicelulosas que entraron al proceso, sólo se logró recuperar 256,3 g (195,8 g en el prehidrolizado y 60,5 g en la celulignina), lo que indica que ocurrieron pérdidas del 37,9% de ese componente como resultado de su degradación por la acción del ácido (Fengel y Wegener, 1989). En el pretratamiento A también ocurrió degradación de las hemicelulosas.

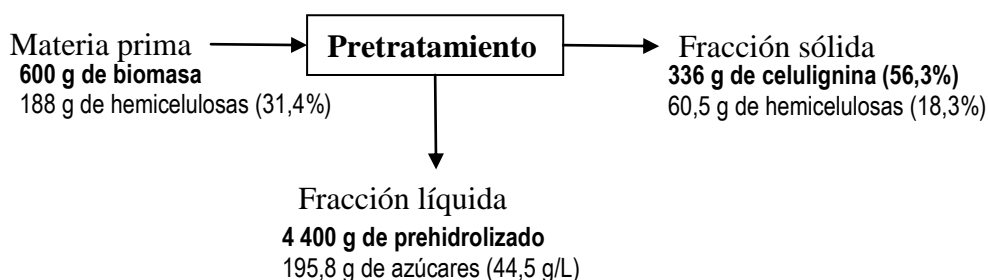


Figura 3.3.2 Balance de las hemicelulosas en el pretratamiento de los tallos de yuca con H_2SO_4 al 1,5% en el reactor.

3.3.2. Pretratamiento ácido en dos etapas.

Para completar este pretratamiento, las celuligninas obtenidas en el experimento anterior se sometieron a un nuevo tratamiento ácido, pero a una temperatura más elevada ($170^{\circ}C$) y por un tiempo más corto (10 min), de acuerdo a lo expresado en la literatura especializada (Taherzadeh y Karimi, 2007). El pretratamiento de la celulignina procedente del proceso A se denominó pretratamiento C, mientras el procedente de la B se designó pretratamiento D. En ambos casos la concentración de ácido sulfúrico fue 0,5%.

Tabla 3.3.3. Rendimiento y composición de las celuligninas obtenidas en la segunda etapa de pretratamiento en el reactor, y concentración de azúcares en el prehidrolizado. La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Proceso	Rendimiento de celulignina, %	Hemicelulosas, %	Celulosa, %	Lignina, %	c(ART), g/L
C	71,0	13,3 (0.01)	53,1 (0.02)	35,5 (0.01)	9,1
D	85,0	12,5 (0.02)	52,6 (0.01)	34,9 (0.01)	4,7

Los rendimientos de celulignina (71,0-85,0%) (Tabla 3.3.3) fueron superiores a los obtenidos en la primera etapa (56,3-68,1%) (Tabla 3.3.1), indicando que la segunda etapa de pretratamiento la solubilización del material fue inferior a la ocurrida en la primera etapa. Esto es una consecuencia de que en la primera etapa ya se habían solubilizado la mayor parte de los componentes potencialmente solubilizables en

condiciones de pretratamiento ácido. Al mismo tiempo, la solubilización fue superior para la celulignina procedente del proceso A, lo que en cierto modo compensa la menor solubilización que había ocurrido en la primera etapa en el proceso con menor concentración de ácido. Los valores de concentración de azúcares en los prehidrolizados (9,1 g/L para el proceso C y 4,7 g/L para el proceso D) concuerdan con el perfil de solubilización de los polisacáridos en esos dos pretratamientos. (Ver anexo 6)

Tabla 3.3.4. Recuperación de los polisacáridos en la segunda etapa y recuperación global en todo el pretratamiento en dos etapas.

Proceso	Hemicelulosas, %		Celulosa, %	
	Segunda etapa	Global	Segunda etapa	Global
C	36,0	20,4	74,6	68,8
D	58,0	19,1	85,0	67,5

A diferencia de lo ocurrido en la primera etapa del pretratamiento, en la que la recuperación de polisacáridos fue mayor para el proceso A que en el B (Fig, 3.3.1) durante la segunda etapa la recuperación tanto de hemicelulosas como de celulosa fue menor en el proceso C que en el proceso D (Tabla 3.3.4) (Ver anexo 7). Eso es consecuencia de que en la celulignina procedente del proceso A quedaban más polisacáridos que no habían sido solubilizados en la primera etapa. Sin embargo, resulta interesante que la recuperación global de hemicelulosas (19,1-20,4%) y de celulosa (67,5-68,8%) fue comparable para ambos procesos, y resultó apenas ligeramente superior para el proceso, en el que la concentración de ácido sulfúrico en la primera etapa fue 0,5%.

3.4 Deslignificación alcalina:

Para reducir el efecto inhibitorio de la lignina sobre la hidrólisis enzimática, se realizó la deslignificación de todas las celuligninas, incluyendo tanto las obtenidas por el pretratamiento ácido en una etapa, como las producidas en dos etapas.

Tabla 3.4.1 Resultados de la deslignificación.

Origen de la celulignina	Rendimiento de pulpa, %	Solubilización de lignina, %	Recuperación de celulosa en pulpa, %	Recuperación global de celulosa, %
1era etapa 0.5%	73,37	10,6	77,87	53,0
1era etapa 1.5%	74,42	31,0	80,79	45,2
2da etapa (1-0.5%)	75,49	24,1	71,40	34,5
2da etapa (1-1.5%)	72,6	49,9	80,40	38,3

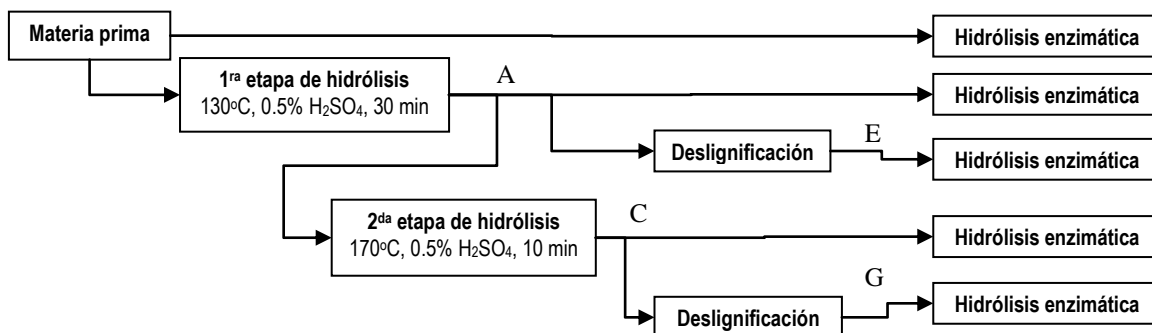
Como se puede observar en la Tabla 3.4.1, el rendimiento de pulpa osciló entre 72,6 y 75,5%, lo que indica que apenas se alcanzó la solubilización de la cuarta parte del material. Las mejores deslignificaciones se obtuvieron para el material pretratado en dos etapas y para los procesos con mayor concentración de ácido. El tratamiento alcalino de la celulignina obtenida por una sola etapa de hidrólisis con 0.5% de ácido sulfúrico conllevó a la solubilización de apenas el 10,6% de la lignina. La segunda etapa de pretratamiento a esa celulignina permitió una mejoría en la deslignificación hasta 24,1%. Por otra parte, la celulignina procedente de los procesos con uso de 1.5% de ácido sulfúrico presentó una mejor deslignificación, 31,0 y 49,9%, respectivamente para los pretratamientos en una y en dos etapas. El mayor grado de deslignificación se alcanzó en el proceso que utilizó la celulignina procedente del pretratamiento en dos etapas con 1,5% ácido sulfúrico en la primera etapa.

Los valores de recuperación de celulosa en la pulpa indican que una parte de ese componente se solubilizó en la deslignificación. Esto fue más evidente en el material procedente del pretratamiento en dos etapas con 0,5% ácido sulfúrico en la primera etapa, en el cual se recuperó en la pulpa apenas el 71,4% de celulosa contenida en la celulignina, indicando que el restante 28,6% se solubilizó en la deslignificación (Tabla 3.4.1). La solubilización de la celulosa durante la etapa de deslignificación está relacionada con las llamadas reacciones de *peeling*, las cuales son la primera causa de

las pérdidas de polisacáridos en condiciones alcalinas a elevadas temperaturas (Fengel y Wegener, 1989). La última columna de la Tabla 3.4.1 muestra la recuperación global de celulosa, la cual se calculó teniendo en cuenta las pérdidas que ocurren no sólo en la deslignificación, sino también en las etapas previas. Este parámetro permite cuantificar el porcentaje de la celulosa en la materia prima que se recupera en la pulpa. Como era lógico esperar, la recuperación global de celulosa fue mayor para los procesos que incluyeron el pretratamiento en una sola etapa. La mayor recuperación (53%) se alcanzó en el proceso que incluyó el uso de ácido sulfúrico al 0,5% en el pretratamiento.

3.5 Convertibilidad enzimática:

Para poder estudiar el efecto de los distintos tratamientos sobre la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática, se incubaron con celulasas muestras de los sólidos obtenidos en las distintas etapas. Como referencia, también se ensayó la hidrólisis enzimática de la materia prima sin tratar. La Fig. 3.5.1 ilustra la secuencia seguida y ayuda a comprender la nomenclatura utilizada. Las fracciones identificadas como A y B son las celuligninas resultantes de la prehidrólisis con H_2SO_4 al 0,5 y al 1,5%, respectivamente, mientras que las fracciones C y D corresponden a las celuligninas provenientes de los pretratamientos ácidos en dos etapas. Por otra parte, las demás fracciones son las pulpas celulósicas, las cuales fueron obtenidas al deslignificar las celuligninas obtenidas en los pretratamientos en una (E y F) o en dos etapas (G y H).



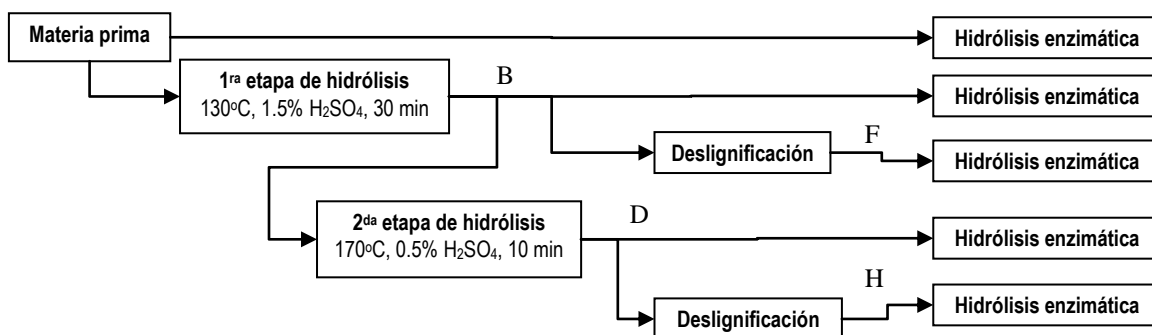


Figura 3.5.1. Secuencia seguida para la hidrólisis enzimática de los tallos de yuca pretratados con H₂SO₄ al 0,5% (diagrama superior) y al 1,5% (diagrama inferior) en la primera etapa.

En tratamiento de los tallos de yuca sin tratar con enzimas celulolíticas resultó en la hidrólisis del 34,2% de la celulosa contenida en la materia prima (Fig. 3.5.2). Ese es un valor relativamente alto en comparación con lo alcanzado en otras materias primas, como por ejemplo el bagazo de caña de azúcar (Martín *et al.*, 2007b). Aunque no se dispone de suficientes resultados como para una confirmación contundente, esa relativamente alta convertibilidad enzimática debe relacionarse con la presencia de β-glucanos fácilmente hidrolizables en las hemicelulosas de los tallos de yuca. Sin embargo, esa convertibilidad no es suficiente como para justificar un proceso industrial de hidrólisis enzimática de los tallos de yuca sin pretratamiento. (Ver anexo 8)

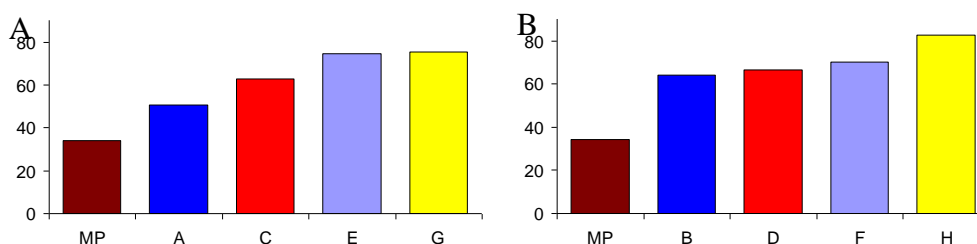


Figura 3.5.2. Convertibilidad enzimática (%) de los tallos de yuca pretratados con H₂SO₄ al 0,5% (A) y al 1,5% (B) en la primera etapa.

La convertibilidad enzimática alcanzada en la celulignina obtenida por pretratamiento de los tallos de yuca con ácido sulfúrico al 0,5% resultó un 50,6% de la celulosa contenida en la materia prima, lo que representa un incremento de un 47,8% con relación a los

tallos sin tratar (Fig. 3.5.2-A). Por otra parte, cuando en el pretratamiento se utilizó ácido sulfúrico al 1,5%, la hidrolizabilidad enzimática se incrementó hasta un 64,1% (Fig. 3.5.2-B), lo que equivale a un aumento de un 87%. A simple vista, podría parecer que la mayor concentración de ácido sulfúrico es mucho más conveniente para el pretratamiento. Sin embargo, si se tiene en cuenta que el uso de una mayor concentración de ácido conllevó a una menor recuperación de la celulosa (Fig. 3.3.3), entonces la efectividad de ambos métodos es comparable. Así, la convertibilidad enzimática global de la celulignina A, en la que se había recuperado el 92% de la celulosa en el pretratamiento sería sólo ligeramente inferior a la de la celulignina B, en la que la recuperación de celulosa fue de 79%.

Las celuligninas obtenidas en la primera etapa del pretratamiento fueron sometidas a dos procesos alternativos: una segunda etapa de tratamiento ácido o una deslignificación alcalina. Aunque ambas alternativas mejoraron la convertibilidad enzimática, el efecto de cada una de ellas fue diferente para cada celulignina. La celulignina procedente de la prehidrólisis con la más baja concentración de ácido sulfúrico fue la más beneficiada, pues su convertibilidad enzimática aumentó a 62,8% con la segunda etapa ácida y a 74,6% con la deslignificación (Fig. 3.5.2-A). Esos valores representan incrementos de 24,3 y 47,4% con respecto a la convertibilidad enzimática obtenida inmediatamente después de la primera etapa. Por su parte, la celulignina producida en la prehidrólisis con ácido sulfúrico al 1,5% incrementó su convertibilidad enzimática a 66,5 y a 70,2, respectivamente con el segundo tratamiento y con la deslignificación (Fig. 3.5.2-B). Esos valores corresponden a incrementos de apenas 4 y 9,5% en comparación con el resultado de la primera etapa.

Al contrario de lo anterior, la deslignificación de la celulignina obtenida en la segunda etapa de pretratamiento ácido fue más efectiva para el material procedente de la prehidrólisis con ácido sulfúrico al 1,5%. La hidrolizabilidad enzimática de la pulpa celulósica obtenida en ese proceso fue de 82,6% (Fig. 3.5.2-B), mientras que la procedente del proceso con menor concentración de ácido fue de 75,6% (Fig. 3.5.2-A).

Se puede concluir que el pretratamiento con ácido sulfúrico al 1,5% es efectivo en producir una celulignina con una relativamente buena convertibilidad enzimática (64,1%), la cual puede aún mejorar más (hasta 82,6%) después de una segunda etapa

de tratamiento ácido y deslignificación. Por su parte, el pretratamiento con ácido sulfúrico al 0,5% produce una celulignina con una pobre convertibilidad enzimática (50,6%), pero que mejora considerablemente (hasta 74,6%) con una deslignificación directa.

A partir de estos resultados podría pensarse en dos alternativas de procesos:

- 1) Pretratamiento ácido en dos etapas (con H_2SO_4 al 1,5% en la primera etapa y al 0,5% en la segunda) seguido de deslignificación alcalina.
- 2) Pretratamiento ácido en una sola etapa (con H_2SO_4 al 0,5%) seguido de deslignificación alcalina.

Si se tienen en cuenta las pérdidas de celulosa que ocurren en cada una de las etapas, la alternativa 2 parece ser la más favorable. Como en esta variante la recuperación de celulosa en la única etapa de prehidrólisis ácida fue 92,2% (Fig. 3.3.1), y en la deslignificación fue 77,9% (Tabla 3.4.1), los cálculos revelan que el 53,6% de la celulosa inicial fue hidrolizada por las enzimas. Por otra parte, en la variante 1 hay que considerar que la recuperación de celulosa fue 79,4 en la primera etapa ácida, 85% en la segunda y 72,6% en la deslignificación, lo que llevaría a una convertibilidad global de 40,5%.

3.6 Conclusiones Parciales:

1. La caracterización de la materia prima reveló que los carbohidratos estructurales y la lignina representan, respectivamente, el 67,8 y el 17,8% del peso seco de los tallos de yuca, por lo que ese material es apropiado como materia prima para biorrefinerías lignocelulósicas.
2. En el pretratamiento ácido en autoclave el rendimiento de sólidos disminuyó con el incremento del tiempo de reacción, lo que se debió a la solubilización de las hemicelulosas.
3. La solubilización de las hemicelulosas aumentó con el incremento del tiempo de pretratamiento y con la concentración de ácido sulfúrico, pero los balances de

materiales revelaron que ocurrió la degradación de una parte de los azúcares hemicelulósicos.

4. Los balances de masas demostraron que en el pretratamiento en dos etapas la mayor recuperación de celulosa en la celulignina se alcanza con la menor concentración de ácido sulfúrico en la primera etapa.
5. Los mayores grados de deslignificación se alcanzaron en las celuligninas obtenidas en los pretratamientos en dos etapas y con mayor concentración de ácido sulfúrico, pero la mayor recuperación de celulosa en la pulpa resultante de la deslignificación se obtuvo en los materiales pretratados en una sola etapa.
6. Las mayores convertibilidades enzimáticas de celulosa se alcanzaron en las pulpas procedentes de los procesos que incluyeron pretratamiento ácido en dos etapas y deslignificación alcalina.

CONCLUSIONES

1. La mayor conversión en la hidrólisis enzimática de la celulosa se alcanzó en el pretratamiento por hidrólisis ácida en dos etapas (1,5% de ácido sulfúrico en la primera y 0,5% en la segunda) seguido de deslignificación alcalina, pero el mayor rendimiento global de celulosa se alcanzó en el material procesado en una sola etapa de pretratamiento (0,5% de ácido sulfúrico) combinada con deslignificación, lo que valida la hipótesis planteada sólo de manera parcial.
2. Los resultados de la composición química revelaron que los tallos de yuca, son un material apropiado para la producción de etanol celulósico y otros productos siguiendo un esquema de biorrefinería lignocelulósica.
3. Se demostró que el pretratamiento ácido en una sola etapa (con ácido sulfúrico al 0,5%) seguido de deslignificación alcalina, por su relativamente alta convertibilidad enzimática, su sencillez de implementación, y sus bajas pérdidas de celulosa, es una alternativa prometedora para el procesamiento de los tallos de yuca.

RECOMENDACIONES

1. En aras de minimizar la degradación de los carbohidratos se recomienda investigar el pretratamiento ácido en dos etapas utilizando tiempos de pretratamiento más cortos, así como la sustitución de la primera etapa de hidrólisis ácida por una autohidrólisis.
2. Hacer una evaluación técnico-económica exhaustiva de las variantes tecnológicas investigadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, J.R. (1993) Proceso para el laminado de madera de tallo de yuca para techo-rasos paredes, tabiques y otros usos decorativos. Patente solicitada. Solicitud 1993-001305, Venezuela.
2. Agarwal, A.K. 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*. 33:233-271.
3. ANUARIO ESTADÍSTICO DE CUBA, 2005. OFICINA NACIONAL DE ESTADÍSTICAS.
4. Balat, M., Balat, H. (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy* **86**, 2273-2282
5. Bashir, S. and Lee, S. (1994) Fuel ethanol production from agricultural, lignocellulosic feedstocks. A review. *Fuel Science Technol. Int'l.***12**,1427-1473.
6. Basso, L.C., Amorim, H. (2001) Industrial ethanol in Brazil: technological advances. *Memorias del III Taller Internacional de Producción de Alcohol*. Varadero, Cuba. ISBN 959-160095X.
7. Bazarnova, N.G. (2002). *Khimija Drevesiny y ee osnovnykh komponentov*. Utchebnoe posobije. Altaiyskii Gosudarstvennyi Universitet. Barnaul, Russia.
8. Bueno, (2008). Situación mundial sobre tecnologías de etanol celulósicos. Memoria del I Taller Nacional de Etanol celulósico. pp. 29-44 ISBN 97 8-959-7 165-22-4.
9. Cappa, M.; Díaz, A. (2007). "Hacia las biorrefinerías". Disponible en: biotec1@inti.gov.ar
10. Carrasco. J. (1990) La biomasa como fuente de energía y productos para la agricultura y la industria. Ministerio de Industria y Energía. **1-21**
11. Carrasco. J. (2002) La biomasa como fuente de energía y productos para la agricultura y la industria. Ministerio de Industria y Energía. **1-50**

12. Claassen, P.A., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., Weusthuis, R.A. (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 741-745.
13. Cheng, S., Zu, S. (2008) Use of lignocellulosic materials for a sustainable chemical industry. *BioResources* **3**, 295-296.
14. Choi, G., Han, M., Kim, Y., Kim, Y., Chung, B. (2009) Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis and Fermentation Process for Bioethanol Production from Cassava Stem. A review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **1-28**.
15. Chum, L.H; Douglas, J.L; Fernberg, A. D. 1985. "Evaluation of Pretreatments of Biomass for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose". Solar Energy Research Institute. Colorado State University. No. DE-ACO2-83CH10093. p. 77.
16. Demirbas, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* **33**, 1-18.
17. Departamento de Ingeniería Agrónoma. (2009) "La yuca, una fuente de alimentación". Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/yuca.htm>
18. Departamento de Ingeniería Agrónoma. (2009) "La yuca, una fuente de alimentación". Disponible en: <http://www.apades.org/cultivos/yuca.htm>
19. Di Pardo, J. (2000) Outlook for biomass ethanol production and demand. Bajado de Internet en Diciembre 2000. [Disponible en Internet en: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>].
20. Duarte, L., Silva-Fernandes, T., Carvalheiro, F., Gírio, F. (2009) Dilute acid hydrolysis of wheat straw oligosaccharides. *Appl Biochem Biotechnol.* **153**, 116–126.
21. Eggeman, T., Elander, R. T. (2005) Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, **96**, 2019-2025.
22. Fengel, D., Wegener, G. (1989) *Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, 274-276.

23. Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N. (2006) Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energy & Fuels*, 20, 1727-1737.
24. Galbe, M., Zacchi, G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 618-628.
25. Gámez, S., González, J.J., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2006) Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering* 74, 78-88.
26. García, J.L., Suárez, M., Domenech, F., Blanco, G., Santiesteban, C. (2000) Alcohol. En *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba. pp.197-206
27. González, Y. (2007) Utilización de la biomasa forestal de la Ciénaga de Zapata. Proyecto Territorial. CITMA Ciénaga de Zapata.
28. Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S. (1995) Fermentation of sugars in Orange peel Hydrolysates to Ethanol by Recombinant *Escherichia coli* K011. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **51**. 423-435.
29. Hayn, M.; Steiner, W.; Klinger, R.; Steinmüller, H.; Sinner, M.; Esterbauer, H. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: *Bioconversion of forest and agricultural residues*; Saddler, John N., Ed.; CAB International: Wallingford, 1993; 33-72.
30. Hernández, Monzón Aldo. 1995. "Análisis Químico Cuantitativo". Editorial Félix Várela. La Habana. Tomo I. p. 356.
31. Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W., Ramarao, B.V. (2008) A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62, 1–21.
32. Hubbe, M.A. (2008) Are lignocellulosics too valuable to be burnt? *BioResources* **3**, 295-296.
33. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2007.

34. Irmene, O. Adela. 2008. "Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles: Aspectos Técnicos y Económicos". México D.F.
35. Kamm, B., Kamm, M. (2004) Principles of biorefineries. *Appl. Microb. Biotechnol*, **64**, 137-145.
36. Khol'kin, Y. I. (1989) *Tekhnologija gidroliznikh proizvodstv*. Lesnaja Promyshlennost', Moscú.
37. Kim, S., Bruch, E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* **26**, 361 – 375.
38. Lavarack, B.P., Griffin, G.J. (2002) The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy* **23**, 367-380.
39. Leonovitch, A.A., Obolenskaja, A.V. (1988) *Khimija drevesiny i polimerov*. Lesnaja Promyshlennost', Moscú.
40. Macedo, I.D. (1998) Greenhouse gas emissions and energy balances in bio-ethanol production and utilization in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, **14**, 1, 77-81.
41. Martín, C. 2002. "Estudio de la inhibición de la fermentación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol". p. 149.
42. Martín, C., Galbe, M., Nilvebrant, N.-O., Jönsson, L.J. (2002) Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl. Biochem. Biotech.* **98/100**, 699-716.
43. Martín, C., López, Y., Plasencia, Y., Hernández, E. (2006) Characterisation of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **20**, 443-446.
44. Martín, C., López, Y., Plasencia, Y., Hernández, E. (2006b) Characterisation of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **20**, 443-446.

45. Martín, C., Carrillo, E., Torres, M., García, L., Marcet, M., Thomsen, A.B. (2006a) Determination of the chemical composition of tropical cellulosic materials using the detergent sequential system. *Cellulose Chemistry and Technology* **40**, 399-403.
46. Martín, C., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., Sjöde, A., Jonson, L.J. (2007) Dilute-sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **136/140**, 339-352.
47. Martín, C., Thomsen, A.B. (2007) Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82** (2), 174-181.
48. Martín, C., Marcet, M., Thomsen, A.B. (2008) Comparison of wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for bioethanol production from sugarcane bagasse. *BioResources* **3**, 670-683.
49. Martín, C., Klinke, H., Thomsen, A.B. (2007b) Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 426-432.
50. Martín, A., Martín, C. (2008) Un enfoque ético a la polémica sobre los biocombustibles. *Memorias del X Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados de la Caña- Diversificación'2008*. La Habana, Cuba. p. 176-181. ISBN 97 8-959-7 165-16-3.
51. Martín, C.; Moure, A.; Martín, G.; Carrillo, E.; Domínguez, H. & Parajó, J.C. 2010. Fractional characterisation of jatropha, neem, moringa, trisperma, castor and candlenut seeds as potential feedstocks for biodiesel production in Cuba. *Biomass and Bioenergy*. 34:533-538.
52. Mes-Hartree, M., Saddler, J. N. (1983) The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Lett.* **5**, 531-536.
53. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 420-428.

54. Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M.A., Ladisch, M.R. (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 96, 1986-1993.
55. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **96**, 673-686.
56. Nommanha, E.S. (1962) Meal of cassava stalk. *Chacaras e Quantais* **105**, 279-283.
57. Obolenskaja, A.V. (1986) Laboratornye raboty po Khimii Drevesiny. Leningradskaja Lesotekhnicheskaja Akademija. Leningrad. 72 pp.
58. Ochoa, J.R., Roncal, T., Gómez, O., Larreina, S., Cadierno, U., Hernando, S., Grisaleña, D., Calleja, I. (2007) Industria Química basada en biomasa-Implicaciones tecnológicas. Reporte. Fundación LEIA CDT. Madrid
59. Olsson, L. (1994) Ethanol production from lignocellulosic materials: Fermentation and on-line analysis. PhD. Thesis. Department of Applied Microbiology, Lund University, Sweden.
60. Oseih, M.K., Taah, K.J. (2009) A survey of cassava planting materials. *Journal of Agronomy*, 1-4.
61. Palmqvist, E., Hahn- Hägerdal, B., Galbe, M. and Zacchi, G. (1996) The effect of water- soluble inhibitors from steam- pretreated willow on the enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme Micro. Technol.* 19, 470- 479
62. Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M. (2004) Adsorption of purified *Trichoderma reesei* cellulases and their catalytic domains to steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.*, 107, 65-72.
63. Pandey ,A., Soccol, C., Nigam, O., Soccol, V. (2000) Biotechnological potential of agroindustrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **74**, 69–80.
64. Pattron, D.D. (2008) Non-food uses of Cassava. GoArticles.com. Disponible en [http:// goarticles.com/article/Non-food-uses-of-Cassava/772381/](http://goarticles.com/article/Non-food-uses-of-Cassava/772381/)

65. Pimentel, D. (2001) Ethanol fuels: Energy, economics and environmental impact. *Int. Sugar J.*, 103, 491-494.
66. Rocha, G.J.M., Martín, C., Soares, I.B., Souto-Maior, A.M., Baudel, H., Abreu, C.A.M. (2011) Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* **35**, 663-670.
67. Rodríguez-Chong, A., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2004) Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering* **61**, 143-152.
68. Sánchez, O.J., Cardona, C.A. (2007) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks. *Bioresource Technology* **99**, 5270–5295.
69. Sjöström, E. (1993) Wood Chemistry: Fundamentals and applications. 2nd edition. Academic Press, San Diego,
70. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., (1998). "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass." Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
71. Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of the lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, **83**, 1-11.
72. Taherzadeh M.J., Karimi K. (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* **2**, 707-738.
73. Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G. (2000) Reduced inhibition of enzymatic hydrolysates of steam-pretreated softwood. Submitted to *Enzyme Microb. Technol.*
74. Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M.G., Amorim, H.V. (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.*, **17**, 482-487.
75. Wyamn, C.E. (1999) Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresourse. Technol.* **50** **3-16**.

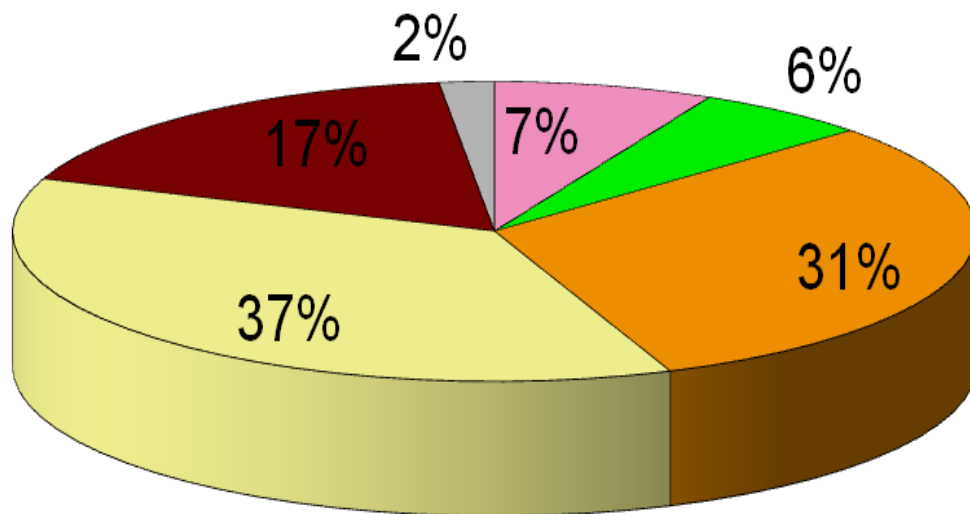
76. Wyman C.E. (2008) Cellulosic ethanol: a unique sustainable liquid transportation fuel. *MRS Bulletin* **33**, 381-383.
77. Wyman, C. (2007) What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.* **25**, 153-157.
78. Zeng, M., Mosier, N.S., Huang, C.P., Sherman, D.M., Ladisch, M.R. (2007) Microscope examination of changes of plant cell structure in corn stover do to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**, 265-278.

ANEXOS

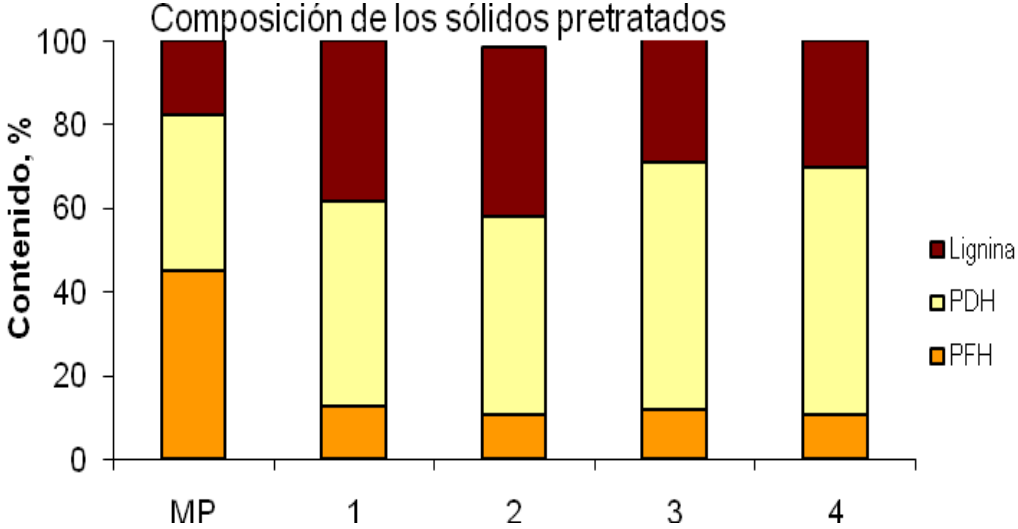
Anexo 1. Composición química de la materia prima.

Composición química de tallos de yuca

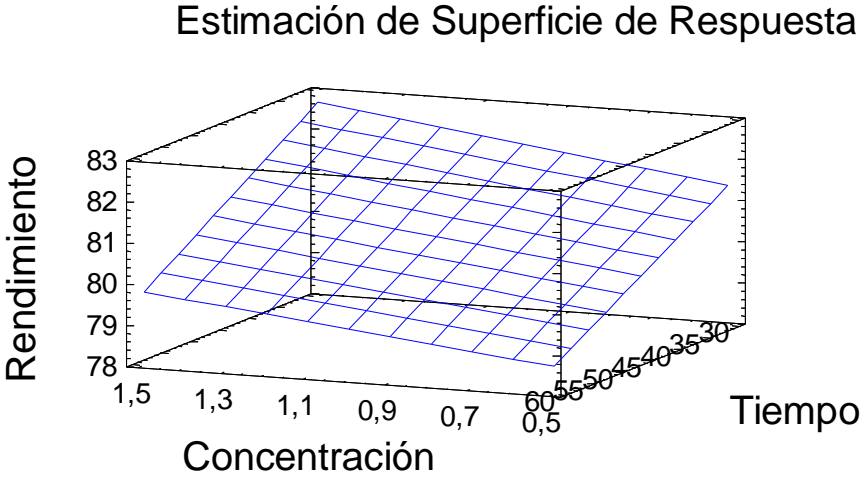
■ Extractivos en agua ■ Extractivos en etanol ■ Hemicelulosas ■ Celulosa ■ Lignina ■ Cenizas



Anexo 2. Composición química de la celulignina obtenida en autoclave.



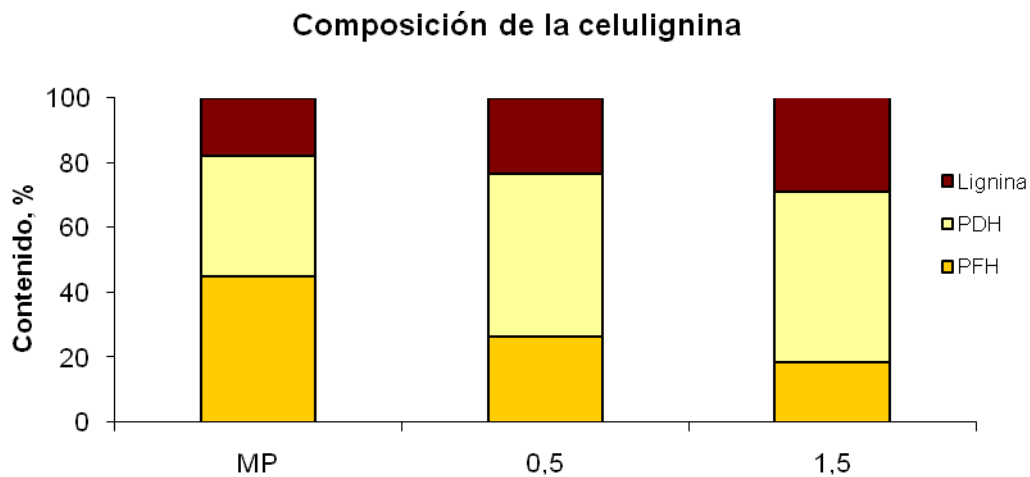
Anexo 3. Estimación de superficie de respuesta para el rendimiento de sólidos obtenido en autoclave.



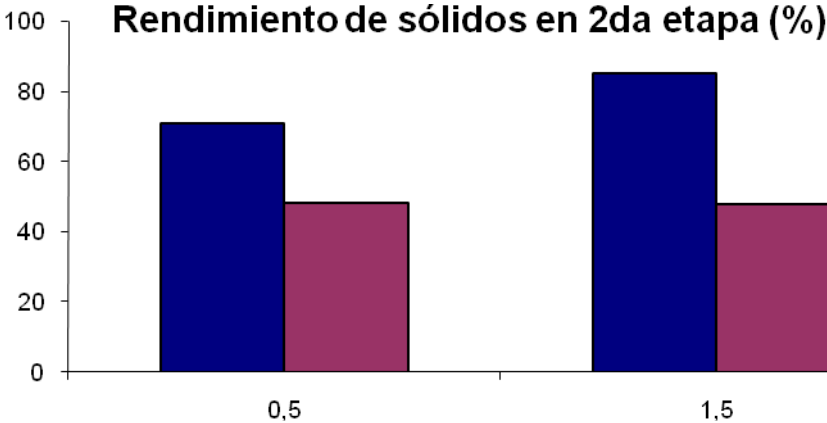
Anexo 4. Rendimiento de sólidos en la primera etapa de hidrólisis ácida.



Anexo 5. Composición química de la celulignina obtenida en la primera etapa en el reactor.

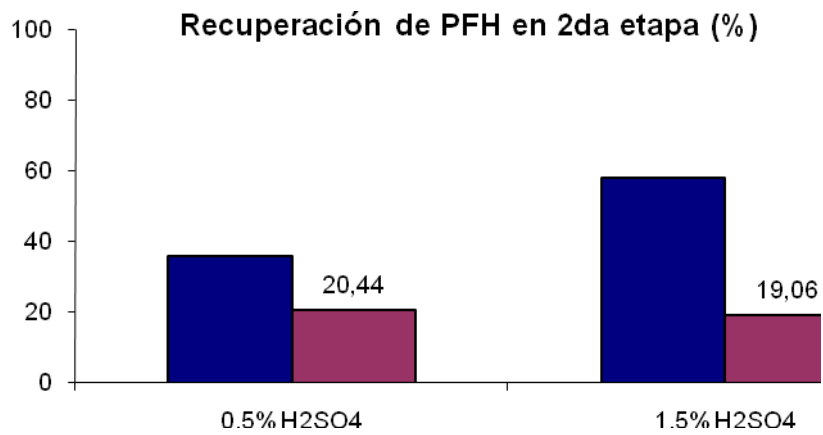


Anexo 6. Rendimiento de sólidos en la segunda etapa y global.

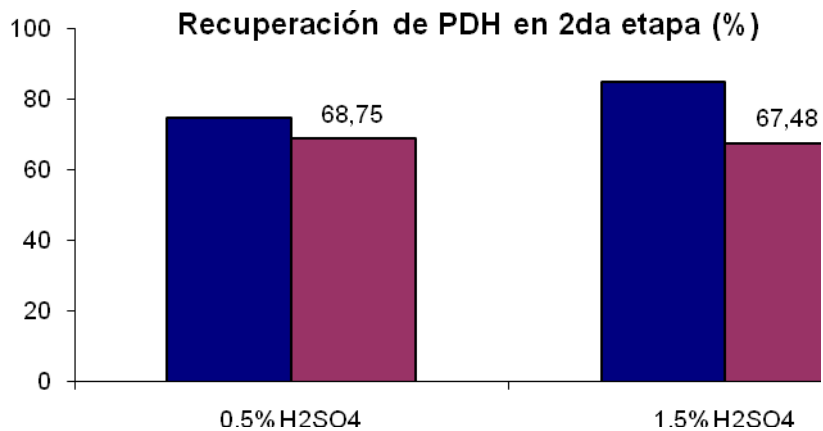


Anexo 7. Recuperación de hemicelulosas (1) y celulosa (2) en la segunda etapa del reactor.

1.



1.



Anexo 8. Resultados de la convertibilidad enzimática en cada material de tallos de yuca.

