

Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*)

Evaluation of chemical pretreatments for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues cassava (*Manihot esculenta Crantz*)

*Lilibeth Niño López**, *Alejandro Acosta Cárdenas*, *Ricardo Gelves Zambrano*

Grupo de Biotransformación, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Calle 67 Número 53 – 108. CP. 050010. Medellín, Colombia.

(Recibido el 02 de febrero de 2013. Aceptado el 11 de octubre de 2013)

Resumen

El efecto de diferentes pretratamientos químicos con ácido sulfúrico (H_2SO_4), hidróxido de sodio (NaOH) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), fueron evaluados mediante la cuantificación de azúcares reductores totales producidos durante la etapa de hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) y el porcentaje (%) de remoción de lignina después del pretratamiento. La cantidad de residuos utilizados (1 y 5%) (w/v) a diferentes tamaños de partícula (1,18 y 0,6mm) fueron pretratados por separado (hojas y tallos) con H_2SO_4 , NaOH y H_2O_2 a diferentes concentraciones (1 y 5%) (w/v). Los residuos vegetales fueron hidrolizados con la enzima accellerase 1500 a 50°C, pH 5 y 140 rpm. El pretratamiento con NaOH permite la mayor liberación de azúcares reductores totales durante la hidrólisis enzimática (3,7g/L) en hojas seguido del pretratamiento con H_2SO_4 (2,11g/L) y H_2O_2 (1,54g/L). En tallos las concentraciones de azúcares son menores.

Palabras clave: Pretratamiento, hidrólisis, etanol, residuos lignocelulósicos, celulosa, hemicelulosa, lignina

Abstract

The effect of different chemical pretreatment with sulfuric acid (H_2SO_4), sodium hydroxide (NaOH) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were evaluated by quantifying total reducing sugars produced during enzymatic hydrolysis step

* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 4 + 5792001, correo electrónico: lilibethniolopez@hotmail.com (L. Niño)

of lignocellulosic residues cassava (*Manihot esculenta Crantz*) and lignin removal percentage after pretreatment. The amount of waste used (1 to 5%) (w/v) in different particle sizes (1.18 and 0.6 mm) were pretreated separately (leaves and stems) with H_2SO_4 , NaOH and H_2O_2 at varying concentrations (1 and 5%) (w/v). Plant residues were hydrolyzed with enzyme Accellerase 1500 with 50 ° C, pH 5 and 140 rpm. NaOH pretreatment enables higher total reducing sugars released during enzymatic hydrolysis (3.7 g/L) followed by leave pretreatments using H_2SO_4 (2.11 g/L) and H_2O_2 (1.54 g/L). Sugar concentrations were lower in stem pretreatments.

Keywords: Pretreatment, hydrolysis, ethanol, lignocellulosic waste, cellulose, hemicellulose, lignin

Introducción

Frente a la preocupación mundial por el calentamiento global, la dependencia a los combustibles fósiles no renovables con precios sobre los 100 USD/barril y en aumento, urge la búsqueda de nuevas alternativas energéticas basadas en recursos renovables, como los desechos agrícolas, forestales, domésticos e industriales. Esta biomasa es la fuente primaria de energía renovable que puede proporcionar los combustibles alternativos de transporte como bioetanol o biodiesel a corto plazo [1].

La producción actual de bioetanol se basa en etanol a partir de almidón y azúcares, pero ha habido un debate considerable acerca de su sostenibilidad. En este contexto el bioetanol producido a partir de biomasa lignocelulósica es una interesante alternativa ya que los materiales lignocelulósicos no atentan contra la seguridad alimentaria y están disponibles como desechos siendo el recurso renovable más abundante, se estima una producción anual de 1×10^{10} toneladas en todo el mundo [2], por lo tanto el costo de la materia prima es muy bajo.

Una tecnología prometedora es la de convertir esta abundante biomasa lignocelulósica en etanol a través de un proceso a base de enzimas [3]. La conversión de biomasa lignocelulósica en etanol, sin embargo es difícil debido a la compleja estructura de la pared celular de las plantas. Se requiere tratamiento previo para modificar la composición química y estructural de los

residuos lignocelulósicos con el fin de facilitar la hidrólisis de los hidratos de carbono en azúcares fermentables [4].

Una variedad de técnicas de pretratamiento físicos (trititación, hidrotermólisis), químicos (ácido, alcalino, solventes y ozono), fisicoquímicos (explosión de vapor, explosión fibra de amonio) y biológicos, han sido desarrollados para mejorar la accesibilidad de las enzimas en las fibras de celulósicas [5].

El pretratamiento alcalino se refiere a la aplicación de soluciones alcalinas para remover la lignina y varias sustituciones de ácidos urónicos que reducen la accesibilidad de la enzima a la celulosa [4]. El tratamiento con NaOH diluido produce un hinchamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos y una rotura de la estructura de la lignina. El mecanismo de la hidrólisis alcalina de la biomasa parece estar basada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina, u otros componentes de la hemicelulosa [1]. La efectividad de este pretratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar. Así, por ejemplo, se ha conseguido aumentar la digestibilidad de sustratos como paja con un contenido de lignina del 18% [6] y de maderas duras, pero no de maderas blandas con un contenido de lignina superior al 26% [7].

El pretratamiento ácido involucra el uso de ácido sulfúrico, nítrico y clorhídrico para remover la hemicelulosa y exponer la celulosa para la digestión enzimática [3]. La principal reacción que se produce durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de hemicelulosa, sin embargo la hemicelulosa solubilizada (oligómeros) puede ser objeto de reacciones hidrolíticas y producir monómeros, furfural e Hidroximetil furfural (HMF) [8, 9]. Durante el pretratamiento ácido se solubiliza la lignina rápidamente en entornos ácidos [10,11].

El pretratamiento oxidativo utiliza la delignificación oxidativa para romper y solubilizar la lignina mejorando así la digestibilidad de la enzima [12]. El pretratamiento oxidativo consiste en la adición de un oxidante compuesto, como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético, a la biomasa, suspendida en agua. El objetivo es eliminar la hemicelulosa y lignina para aumentar la accesibilidad de la celulosa. Durante el pretratamiento oxidativo pueden darse varias reacciones, como la sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, división de alquil éter del arilo o la ruptura oxidativa de núcleos aromáticos [13]. En muchos casos, el oxidante utilizado no es selectivo y por lo tanto pueden existir pérdidas de hemicelulosa y celulosa y formación de inhibidores, debido a que la lignina se oxida y se solubiliza formando compuestos aromáticos.

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) es uno de los cultivos más importantes en Colombia la producción ascendió a 2,05 millones de toneladas métricas (t), que corresponden al puesto 16 en el mundo; el rendimiento medio es de 11,26 t/ha, según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural del país [14]. Con una tonelada (1000 kg) de yuca fresca se pueden obtener 280 kg de harina, 230 kg de almidón o 350 kg de residuos vegetales secos, debido a la alta densidad de siembra (30000 a 120000 plantas por hectárea) [15]. El aumento de la siembra de yuca es muy beneficioso para el desarrollo económico, pero también genera preocupación acerca de la eliminación de los residuos vegetales

que se generan como hojas y tallos. Estos residuos contienen lignocelulosa y presentan una alternativa de ser usados como materia prima de bajo costo para aumentar la producción de etanol a través de un pretratamiento, hidrólisis y fermentación adecuada.

Para utilizar estos residuos como materia prima para la producción de etanol, es necesario realizar un pretratamiento previo. Este estudio se inició por: 1. investigar el efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno en hojas y tallos de yuca por separado, debido a su variabilidad en la composición de celulosa, hemicelulosa y lignina. 2. Evaluar diferentes condiciones de pretratamiento como tamaño de partícula, concentración de material vegetal y químico, que influyen notablemente en la degradación de la celulosa por la acción enzimática y por ende en la producción de azúcares reductores totales después de la hidrólisis y 3. Evaluar el % de remoción de lignina en cada caso.

Materiales y métodos

Biomasa

Se utilizaron residuos de hojas y tallos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*), fueron secados, molidos y tamizados, estos residuos vegetales fueron traídos de la planta de producción de harina de yuca en Mutatá-Antioquia. El material se trituro hasta un tamaño de partícula de 1,8mm y 0,6mm. La materia prima fue traída de la planta piloto de procesamiento de yuca de Mutatá, Urabá Antioqueño y se almacenó en bolsas plásticas a temperatura ambiente hasta su uso.

Pretratamiento químico de hojas y tallos de yuca

Durante el pretratamiento químico se escogieron tres tipos de pretratamiento con NaOH, H₂SO₄ y H₂O₂, a diferentes concentraciones de químico y sustrato, también se evaluaron diferentes tamaños de partícula 0,6 y 1,18 mm, durante 15 minutos

a 90°C en baño María. Se evaluó el efecto del pretratamiento, mediante la concentración de azúcares obtenidos bajo cada condición estudiada, durante la hidrólisis enzimática de material vegetal, la enzima utilizada fue acellerase 1500 de Genencor, con una carga enzimática de 160 FPU/g y 1,5% de material vegetal pretratado, también se evaluó el efecto del pretratamiento en cuanto al porcentaje (%) de remoción de lignina.

Se realizaron diseños factoriales completos, para estudiar simultáneamente todos los factores que son importantes durante el proceso de pretratamiento, y los tratamientos se realizaron por la combinación de los diferentes niveles de cada uno de los factores estudiados.

Hidrólisis enzimática

Los sólidos cargados durante la hidrólisis enzimática fueron de 1,5% (w/v). La etapa de hidrólisis enzimática fue realizada en un Shaker orbital a 50°C y 140 rpm, durante 24 horas en frascos donde se adicionó la enzima accellerase 1500 (complejo de celulasas) de Genencor con una actividad enzimática de 284 FPU/ml (unidades de papel filtro) y 50mM de citrato buffer (pH 5,0). Se tomaron muestras de 1ml a las 24 horas.

Determinación de contenido de fibra

La cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina fue determinada por el método de Van Soest [16], laboratorio de biotecnología ruminal de la Universidad Nacional, sometiendo cada muestra a reflujo durante 1 hora sobre un crisol filtrante de vidrio sinterizado en un extractor de fibra usando 100 mL de solución de detergente neutro y posteriormente 100 mL de solución de detergente ácido; el residuo se trató con 25 mL de ácido sulfúrico al 72% p/p durante 3 horas. En cada una de estas etapas se calculo la diferencia de peso de la muestra, para determinar en su orden los porcentajes de fibra detergente neutra, fibra detergente ácido y fibra detergente lignina; a partir de estos porcentajes se calcularon las fracciones de componentes de la fibra usando las ecuaciones (1-3).

$$\% \text{Hemicelulosa} = \% \text{FDN} - \% \text{FDA} \quad (1)$$

$$\% \text{Celulosa} = \% \text{FDA} - \% \text{FDL} \quad (2)$$

$$\% \text{Lignina} = \% \text{FDL} \quad (3)$$

En donde:

%FDN: porcentaje fibra detergente neutra

%FDA: porcentaje fibra detergente ácido

%FDL: porcentaje fibra detergente lignina

Determinación del % remoción de lignina

El método fue adaptado por McIntosh y Vancov [17], a partir del procedimiento descrito por Lin [18]. Los hidrolizados pretratados con NaOH fueron separados, y centrifugados hasta formar pellet; el hidrolizado fue calentado hasta 60°C y el pH fue ajustado hasta 2 con H₂SO₂ mediante agitación continua. Después de 5 minutos de agitación las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente, y el precipitado fue sedimentado por centrifugación. El precipitado ácido insoluble lignina, fue lavado con agua (pH 2), posteriormente el precipitado recolectado fue secado y pesado. El % de remoción de lignina fue calculado en base a la cantidad de material seco inicial, con respecto a la cantidad de lignina ácido insoluble obtenida.

Medición de azúcares reductores

Se prepararon diluciones de la muestra, de acuerdo al valor esperado de azúcares reductores presentes, se tomo 4mL de muestra diluida, fue agitada en un vortex y se centrifugo a 4000 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante se tomó 1 mL de muestra y se procedió a medir la concentración de azúcares reductores usando el método de DNS (ácido dinitrosalicílico) [19] descrito por NREL [20].

Análisis de datos

Se utilizo el modelo lineal general (ANOVA) implementado en el software Statgrafics, para analizar cada una de las variables estudiadas,

la variable dependiente fue la concentración de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática del material pretratado a diferentes condiciones y % de remoción de lignina después del pretratamiento.

Se realizó análisis estadístico con el software Statgrafics, con el fin de encontrar las mejores condiciones que favorecen el proceso de pretratamiento de residuos lignocelulósicos (hojas y tallos) de yuca (*Manihot esculenta Crantz*).

Resultados y discusión

Caracterización de hojas y tallos de yuca

La composición química de las hojas y tallos de yuca es presentada en la tabla 1.

Tabla 1 Composición de hojas y tallos de yuca

| Análisis de fibra por el método de Van Soest | Porcentaje (%)^a | |
|---|-----------------------------------|---------------|
| | Hojas | Tallos |
| Fibra detergente acida (FDA) | 47,96 | 52,95 |
| Acido detergente lignina (ADL) | 7,06 | 13,12 |
| Fibra detergente neutra (FDN) | 63,59 | 65,95 |
| Celulosa | 40,9 | 39,83 |
| Hemicelulosa | 15,63 | 13 |

^a Porcentajes de composición en base seca

La fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente acida (FDA) y acido detergente lignina (ADL) fue determinada a partir del material sin pretratar hojas y tallos de yuca por el método de Van Soest [16]. La celulosa es el componente mayoritario (40,9% en hojas y 39,83% en tallos), seguido de la hemicelulosa (15,63% en hojas y 13% en tallos) (tabla 1), lo cual indica una alta formación de hidratos de carbono debido a que esta planta tiene una alta capacidad fotosintética, intermedia entre plantas C3 y C4 sin la típica anatomía C4; sin embargo cuenta con características fisiológicas y morfológicas que favorecen su supervivencia en ambientes adversos, como tolerancia a la sequia, siendo un cultivo altamente productivo [21, 22]. En la tabla 1 se observa que el contenido de lignina es de 7,06%

en hojas y 13,12% en tallos, en comparación con otros materiales lignocelulósicos la cantidad de lignina es similar a especies herbáceas y residuos de la agricultura (10-20%) [23] y en cuanto al contenido de celulosa y hemicelulosa es similar a maderas duras 40-55 % de celulosa y 24-40% de hemicelulosa [1]. La composición química de este tipo de residuos lignocelulósicos es similar a la fibra de madera, coníferas y otros residuos lignocelulósicos que han sido utilizados como sustrato en la producción de etanol de segunda generación.

Efecto del pretratamiento del material vegetal hojas y tallos de yuca

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el pretratamiento químico del material vegetal con NaOH, H₂SO₄ y H₂O₂ y los porcentajes de remoción de lignina.

El pretratamiento e hidrólisis de material lignocelulósico de la planta de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) respecto a sus hojas y tallos se presenta en la figura 1, en las cuales se aprecia el efecto de diferentes pretratamientos: con álcali (A), ácido (B) y peróxido de hidrogeno (C), respectivamente, con una concentración entre 1 y 5 % para el reactivo, 1 y 5% para la concentración del material lignocelulósico, 0,6 y 1,18 mm de tamaño de partícula y 15 minutos de pretratamiento. Se aprecia que para este tipo de material el pretratamiento alcalino (figura 1A) presenta los mejores resultados en cuanto a la concentración de azúcares totales (3,7g/l) liberados durante la hidrólisis enzimática, seguido del pretratamiento con ácido

Sulfúrico (2,11g/l) y peróxido de hidrogeno (1,54g/l). Según el análisis estadístico ANOVA existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,000$) entre los tres pretratamientos evaluados, siendo mejor el pretratamiento con álcali, ya que aumenta la digestibilidad de la celulosa, es más efectivo en la remoción de la lignina y muestra menor solubilización en la hemicelulosa y celulosa en comparación con el pretratamiento ácido o hidrotérmico [24].

El NaOH causa un aumento de la superficie interna de la celulosa y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad, lo que provoca el rompimiento de la estructura de la lignina [25], además remueve sustituciones de acetil y ácidos urónicos, que bajan la accesibilidad de la enzima a la superficie de la hemicelulosa y celulosa [4]. El hidróxido de sodio, amoníaco

y la cal han recibido la mayor atención como agentes de pretratamiento, debido a su bajo costo siendo un proceso económico, tanto en químicos como en el reciclado del agua [26], y en parte por la disminución en la dosificación de enzimas que son generalmente necesarias para convertir la celulosa en glucosa [27].

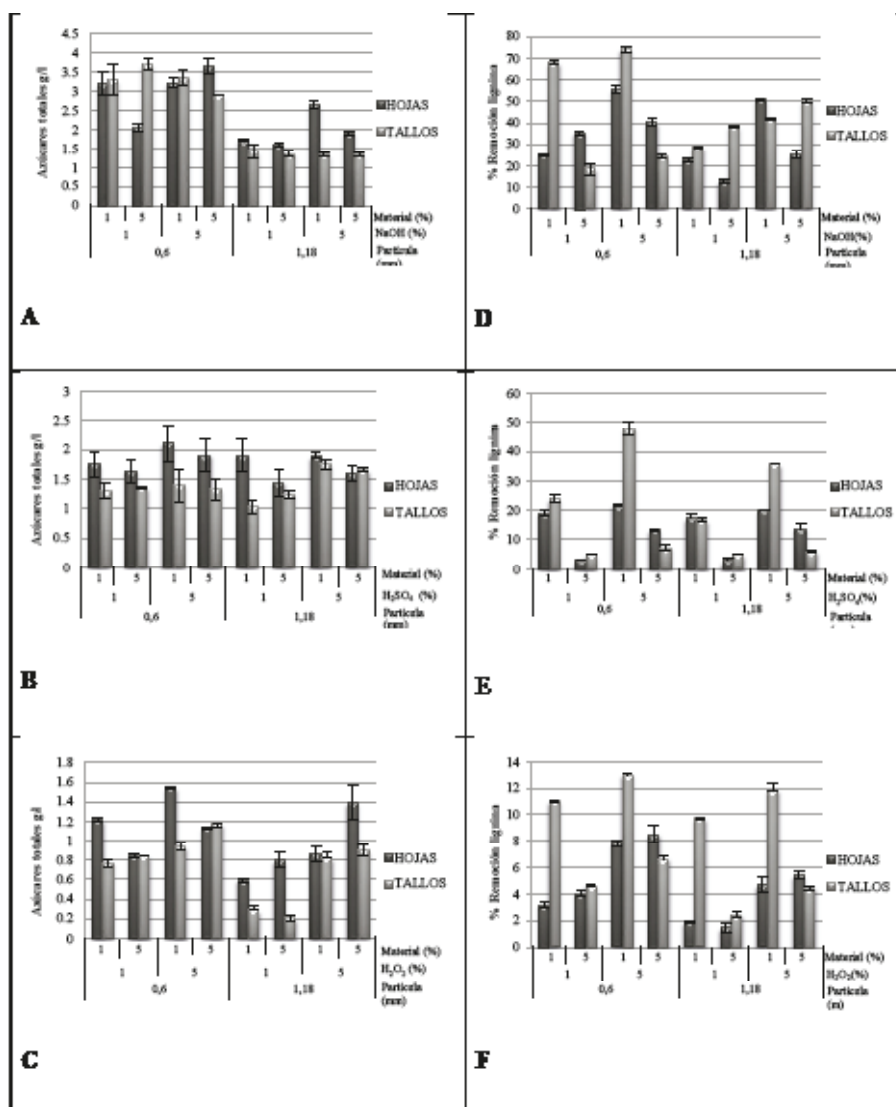


Figura 1 Efecto del pretratamiento con NaOH (A), H₂SO₄ (B) y H₂O₂(C), durante la hidrólisis enzimática de hojas y tallos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*), % Remoción de lignina en muestras de hojas y tallos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) pretratadas con NaOH (D), H₂SO₄ (E) y H₂O₂(F)

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,000$) al utilizar tamaños de partículas entre 0,6mm y 1,18 mm, obteniéndose mayor liberación de azúcares durante la hidrólisis al utilizar 0,6mm como tamaño de partícula, esto se debe a que el proceso de molienda del material vegetal permite incrementar la accesibilidad de la celulosa al sustrato, por el aumento del área de superficie disponible para la enzima, por lo tanto al disminuir el tamaño de las partículas aumenta el área de superficie específica y aumenta la liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática, siendo este uno de los factores más importantes que determinan la facilidad de la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico [28-30].

La concentración de sustrato utilizada (1 y 5%) no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3356$), por lo tanto se hace necesario estudiar concentraciones de sustrato más altas, con el fin de pretratar mayor cantidad de material lignocelulósico, reduciendo de esta manera los costos del pretratamiento químico. Se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de químico utilizada (1 y 5%) ($p=0,0076$) obteniéndose los mejores resultados al 5% de NaOH. En cuanto al tipo de material (hojas y tallos) existen diferencias estadísticamente significativa ($p=0,013$) obteniéndose mayores concentraciones de azúcares en hojas, debido a que la concentración de la celulosa es más alta y la lignina es menor (Tabla 1). La mayor concentración de azúcares obtenida en hojas fue al utilizar 5% de sustrato, 5% de NaOH y 0,6mm de tamaño de partícula; en tallos, la mayor concentración de azúcares obtenida fue al utilizar 5% de sustrato, 1% de NaOH y 0,6mm de tamaño de partícula (figura 1).

El grado de delignificación refleja claramente la eficacia del pretratamiento, este parámetro es muy importante para mejorar la degradación enzimática de la lignocelulosa y es influenciado por la severidad del pretratamiento. El efecto del pretratamiento mediante la delignificación

se cuantificó mediante la determinación de la reducción de lignina insoluble en ácido, en sólidos pretratados en función de cada variable estudiada (Pretratamiento con NaOH, H_2SO_4 y H_2O_2 ; porcentaje de material, tamaño de partícula, concentración de químico), y es expresado como un porcentaje de reducción comparado con el material sin pretratar. Con respecto al % de remoción de lignina (figura 1D), el porcentaje más alto de remoción de lignina (74,077%) se presentó al pretratar los tallos al 1% de material, 5% de hidróxido y 0,6mm de tamaño de partícula y en hojas (55,53%) bajo las mismas condiciones, sin embargo existen diferencias estadísticamente significativas entre los pretratamientos utilizados ($p=0,000$), obteniéndose % de remoción mayores al pretratar el material lignocelulósico con NaOH, indicando una mayor solubilización de la lignina y por lo tanto una mayor concentración de azúcares durante la hidrólisis enzimática (figura 1D), en cuanto a la concentración de material (1 y 5%) existen diferencias significativas ($p=0,000$) obteniéndose mayor remoción de lignina al 1% debido a que el químico está en mayor contacto con el material a bajas concentraciones y por lo tanto es posible un aumento en la remoción de la lignina. La concentración de NaOH utilizada permite una mayor remoción de la lignina al 5% presentándose diferencias estadísticamente significativas entre el 1 y 5% ($p=0,000$). Existen diferencias significativas en cuanto al tamaño de partícula y tipo de material ($p=0,0131$ y $0,0002$) siendo mayor la remoción de lignina a un tamaño de partícula de 0,6mm, en cuanto al tipo de material vegetal en tallos fue mayor el porcentaje de remoción de lignina.

En la figura 1B se muestra el efecto del pretratamiento con H_2SO_4 , la concentración de azúcares fue más baja que con NaOH, debido a que el pretratamiento con ácido diluido afecta predominantemente la hemicelulosa, con bajo impacto en la degradación de la lignina, lo cual indica que una gran proporción de lignina permanece intacta en la fase sólida después del

pretratamiento con ácido diluido [10]. Por lo tanto la lignina queda entrelazada entre la hemicelulosa y celulosa actuando como una barrera física, la cual restringe el acceso de las celulasas a la celulosa [31]. Cabe resaltar que el objetivo del pretratamiento con ácido es solubilizar la hemicelulosa, y hacer más accesible la celulosa, sin embargo la hemicelulosa solubilizada puede ser objeto de reacciones hidrolíticas y producir monómeros, furfural e HMF [3], siendo estos compuestos inhibidores, durante la fermentación de los hidrolizados.

La evaluación de la concentración del material lignocelulósico (1 y 5%) no presenta diferencias significativas ($p=0,3356$), mientras que la concentración de ácido utilizada durante el proceso del pretratamiento (1 y 5%), presenta diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0076$) siendo mayor la concentración de azúcares al 5%.

El mayor porcentaje de remoción de lignina fue de 47,75% al pretratar los tallos al 1%, 5% de H_2SO_4 y a un tamaño de partícula de 0,6 mm, en hojas el mayor porcentaje de remoción fue de 21,74% bajo las mismas condiciones (figura 1E).

El pretratamiento con H_2O_2 (figura 1C) dio como resultado la concentración de azúcares reductores totales más bajas en este tipo de material lignocelulósico, debido a que el principal efecto del pretratamiento oxidativo es la delignificación oxidativa para romper y solubilizar la lignina mejorando así la digestibilidad de la enzima [32]. El pretratamiento oxidativo consiste en la adición de un compuesto oxidante, como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético, a la biomasa, suspendida en agua. El objetivo es eliminar la hemicelulosa y lignina para aumentar la accesibilidad de la celulosa. Durante el pretratamiento oxidativo pueden darse varias reacciones, como la sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, división de alquil éter del arilo o la ruptura oxidativa de núcleos aromáticos [13]. En muchos casos,

el oxidante utilizado no es selectivo y por lo tanto pueden existir pérdidas de hemicelulosa, celulosa y formación de inhibidores, debido a que la lignina se oxida y se solubiliza formando compuestos aromáticos.

Para este pretratamiento las condiciones que favorecen la liberación de azúcares durante la hidrólisis es 5% de H_2O_2 y 0,6 mm de tamaño de partícula en hojas y tallos de yuca.

El mayor porcentaje de remoción de lignina fue de 13,02% al pretratar los tallos al 1%, 5% de H_2O_2 y a un tamaño de partícula de 0,6 mm, en hojas el mayor porcentaje de remoción fue de 8,52% al 5% de material, 5% de H_2O_2 y 0,6mm de tamaño de partícula (figura 1F).

Conclusiones

En esta investigación, se evaluó el efecto de diferentes pretratamientos químicos como etapa previa para el proceso de hidrólisis enzimática. El pretratamiento con hidróxido de sodio produce la mayor liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática del material vegetal, obteniéndose mejores resultados al utilizar hojas y un tamaño de partícula de 0,6mm, en cuanto a la concentración de material y reactivo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los pretratamientos con ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno no mostraron buenos resultados para este tipo de material vegetal.

Se hace necesario continuar estudiando el pretratamiento con hidróxido de sodio bajo otras condiciones con el fin de aumentar la liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática. Es importante resaltar que por la abundancia, el potencial de azúcar, derivado de la composición química, la alta capacidad fotosintética y resistencia de la planta de yuca, se puede considerar como una excelente materia prima para la producción de etanol celulósico.

Referencias

1. Y. Sun, J. Cheng. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". *Bioresour. Technol.* Vol. 83. 2002. pp. 1-11.
2. O. Sánchez, C. Cardona. "Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas". *Interciencia.* Vol. 30. 2008. pp. 671-678.
3. D. Schell, J. Farmer, M. Newman, J. McMillan. "Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids". *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol. 105. 2003. pp. 69-85.
4. V. Chang, M. Holtzapfle. "Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity". *Appl Biochem Biotechnol.* Vol. 86. 2000. pp. 5-37.
5. N. Mosier, R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak, M. Ladisch. "Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover". *Bioresour. Technol.* Vol. 96. 2005. pp. 1986-1993.
6. A. Bjerre, A. Olesen, T. Fernqvist. "Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicelluloses". *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 49. 1996. pp. 568-577.
7. M. Millett, M. Efland, D. Caulfield. "Influence of fine grinding on the hydrolysis of cellulosic materials-acid vs. enzymatic". *Adv Chem Series.* Vol. 181. 1979. pp. 71-89.
8. D. Fengel, G. Wegener. *Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions.* Ed. Walter de Gruyter. Berlin, Germany. 1989. pp. 1-549.
9. L. Ramos, C. Breuil, J. Saddler. "Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis". *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol. 34/35. 2003. pp. 37-48.
10. T. Lloyd, C. Wyman. "Total sugar yields for pretreatment by hemicellulose hydrolysis coupled with enzymatic hydrolysis of the remaining solids". *Bioresour Technol.* Vol. 96. 2005. pp. 1967-1977.
11. S. Shevchenko, K. Chang, J. Robinson, J. Saddler. "Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicellulose component after steam explosion of softwood chips". *Bioresour Technol.* Vol. 72. 2000. pp. 207-211.
12. P. Martel, J. Gould. "Cellulose stability and delignification after alkaline hydrogen-peroxide treatment of straw". *J. Appl. Poly. Sci.* Vol. 39. 1990. pp. 707-714.
13. D. Hon, J. Shiraishi. *Wood and cellulosic Chemistry.* 2nd ed. Ed. Dekker Inc. New York, USA. 2001. pp. 275-384.
14. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). *Evaluaciones Agropecuarias URPA's, UMATA's.* Minagricultura y Desarrollo Rural - Dirección de Política Sectorial - Grupo Sistemas de Información. Bogotá, Colombia. 2005. pp. 14-18.
15. Centro Internacional de agricultura tropical (CIAT). *La yuca en el tercer milenio, sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización.* Ed. Ciat. Cali, Colombia. 1996. pp. 1-586
16. P. Van Soest. "Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 46. 1963. pp. 825-829.
17. S. McIntosh, T. Vancov. "Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment". *Bioresource Technology.* Vol. 101. 2010. pp. 6718-6727.
18. S. Lin. "*Methods in Lignin Chemistry*". Ed. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 1992. pp. 242-249.
19. G. Miller. "Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry.* Vol. 31. 1959. pp. 426-428.
20. B. Adney, J. Baker. *Measurement of Cellulase Activity.* Technical Report NREL/TP-510-42628. Cole Boulevard, Golden, Colorado, U.S. 2008. pp. 1-8.
21. M. El-Sharkawy, J. Cock. "C3-C4 intermediate photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta Crantz*). 1. Gas exchange". *Photosynthesis Research.* Vol. 12. 1987. pp. 219-235.
22. L. Cerqueira. *Energy from biomass.* Report for the IUPAP working group on energy. Assessment and Forecasting of Energy Technology in Brazil. State University of Campinas. Campinas, Brazil. 2004. pp. 1-112.
23. J. McMillan. *Pretreatment of lignocellulosic biomass.* In: *Enzymatic conversion of biomass for fuel production.* M. Himmel, J. Baker, R. Overend (editors). Ed. American Chemical Society. Washington, US. 1994. pp. 292-324.
24. F. Carvalheiro, L. Duarte, F. Girio. "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments". *J. Sci. Ind. Res.* Vol. 67. 2008. pp. 849-864.
25. M. Taherzadeh, K. Karimi. "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review". *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 9. 2008. pp. 1621-1651.

26. E. Varga, Z. Szengyel, K. Reczey. "Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility". *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol. 98/100. 2002. pp. 73-87.
27. E. Sendich, M. Laser, S. Kim, H. Alizadeh, L. Laureano, B. Dale, L. Lynd. "Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price". *Bioresour. Technol.* Vol. 99. 2008. pp. 8429-8435.
28. H. Grethlein. "The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates". *Bio. Technol.* Vol. 3. 1985. pp. 155-160.
29. A. Sinitsyn, A. Gusakov, E. Vlasen. "Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis". *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol. 30. 1991. pp. 43-59.
30. D. Thompson, H. Chen. "Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area". *Bioresour. Technol.* Vol. 39. 1992. pp. 155-163.
31. C. Mooney, S. Mansfield, R. Beatson, J. Saddler. "The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates". *Enzyme Microb Tech.* Vol. 25/64. 1999. pp. 113-119, 644-650.
32. B. Yang, A. Boussaid, S. Mansfield, D. Gregg, J. Saddler. "Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates". *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 77. 2002. pp. 678-684.