



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**SELECCIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN BASE A  
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE RESIDUOS DE  
*EUCALYPTUS GLOBULUS* Y *POPULUS CANADENSIS* PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,  
MENCION QUÍMICA Y AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**RICARDO JOSÉ HARRIS CORREA**

**PROFESORA GUÍA:**

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

**PROFESORA CO-GUÍA:**

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**

FRANCISCO GRACIA CAROCA

RENÉ CARMONA CERDA

ÁLVARO URZÚA MOLL

SANTIAGO DE CHILE

JUNIO 2012

# Resumen

---

El creciente consumo de energía a nivel mundial y la escasez de combustibles fósiles han dado espacio a nuevas fuentes de energía de carácter renovable y con un impacto ambiental menor. Entre estas fuentes de energía aparece el material lignocelulósico, que puede ser utilizado para producir bioetanol de segunda generación, el cual es un sustituyente o complemento de la gasolina utilizada para el transporte terrestre.

La producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico consta principalmente de tres etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. En el presente trabajo se realizó una comparación entre tres pretratamientos: explosión a vapor, organosolv y líquidos iónicos (utilizándose emimCl en este caso) y dos residuos de distintos tamaños: eucalipto: 1 – 2 mm; álamo: 1 – 30 mm. Estas técnicas se compararon por medio de una caracterización física y química, con lo que se estableció el principal efecto que tienen sobre el material y la propiedad más relevante para comprender la conversión de glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática.

En cuanto al análisis químico se obtuvo que el organosolv generó el material con mayor contenido porcentual de glucosa (eucalipto: 90,12%; álamo: 77,82%), removiendo casi la totalidad de la lignina y parte de la hemicelulosa. La explosión a vapor fue el método que más hemicelulosa removió, pasando de un 17,5% a solo un 4,5% para el eucalipto y de un 17,2% a un 7,2% para el álamo. El material pretratado con emimCl no presentó cambios significativos en su composición química.

Por otro lado, la caracterización física del material consistió en medir su área superficial, cristalinidad, grado de polimerización, longitud de fibra y accesibilidad enzimática. En todas ellas, el organosolv presentó condiciones más favorables para la hidrólisis enzimática que los otros pretratamientos. En la hidrólisis que contenía 2% de sólidos, para el material pretratado por organosolv, se obtuvo una conversión de 82,3% para el eucalipto y 70,8% para el álamo, mientras que para la explosión a vapor fueron de 71,9% para el eucalipto y 60,9% para el álamo. Para el material pretratado con emimCl todas las conversiones fueron inferiores al 10%, por lo que se concluyó que el tratamiento no resultó efectivo en las condiciones utilizadas de 60 min a 150°C.

Para las hidrólisis de alta consistencia (10% sólidos y 10% glucosa), las conversiones obtenidas fueron inferiores (32 – 48,3%) debido a limitación en la transferencia de masa convectiva. Sin embargo, las conversiones fueron siempre mayores para el eucalipto debido al menor tamaño de chip inicial.

Todas las propiedades físicas fueron afectadas de acuerdo a la teoría, a excepción de la longitud de fibra para el eucalipto, donde el resultado fue afectado por la severidad del pretratamiento. El grado de polimerización post pretratamiento, inferido a partir de la viscosidad, resultó ser el mejor indicador para evaluar la conversión de celulosa a glucosa en la hidrólisis, por

lo que se ajustó un polinomio de segundo grado que relaciona esta conversión en función de la viscosidad y el tamaño inicial de chip utilizado.

En conclusión, el organosolv resultó ser el pretratamiento que genera las mejores condiciones tanto físicas como químicas para la hidrólisis enzimática en ambas biomásas y el grado de polimerización es el mejor indicador para predecir esto.

# Agradecimientos

---

Como todas las etapas de la vida, esta es una más que se completa y es una de las más grandes y potentes. De seguro me ha marcado y me ha formado y no hubiera sido posible sin todas las personas que estuvieron junto a mí en el proceso. Por esto, no me queda más que agradecer con gran cariño:

A mis padres, por ese apoyo incansable e incondicional y ese ejemplo de perseverancia que me impulsó a través de estos años a seguir adelante a pesar de las dificultades. Gracias por el esfuerzo que hicieron para permitirme vivir y estudiar en Santiago y luchar siempre por darme las mejores condiciones para ser cada día mejor. También a mis hermanas, que me acompañaron en el día a día, apoyándome con pequeños detalles y dándole calidez a nuestro hogar.

A mis amigos, por hacer de la universidad y de Santiago un lugar alegre y entretenido. Tantas veces fueron la razón para ir a una clase o estudiar un poco más. Juntos nos enfrentamos a tantos desafíos y crecimos como personas. En especial a aquellos con los que comenzamos hace 7 años y hoy estamos juntos cerrando la misma etapa. A mi Ina, por haber sido el apoyo más potente para el desarrollo de este trabajo, acompañándome desde el principio y dándome el empuje para continuar cada vez que lo necesité.

A los profesores que conocí a lo largo de este paso por Beauchef. Grandes maestros y fuentes de inspiración. En especial a María Elena, quien con gran paciencia y sabiduría me guió a través de este trabajo y me permitió expresarme y desarrollar mi curiosidad científica. Agradezco también enormemente a Nancy, la profesora Oriana y los profesores Francisco y Alejandro por la cercanía y buena disposición.

Al proyecto Apoyo a la Formación de Redes Internacionales entre Centros de Investigación, Concurso 2010 – Biocomsa, por darme la oportunidad de ser parte de este gran equipo de investigación. Agradezco los recursos brindados para poder desarrollar el trabajo y darme la posibilidad de viajar a Canadá.

Al grupo de investigación de Jack Saddler en la facultad de forestal en la Universidad de British Columbia, en especial a Richard Chandra y Pablo Chung, por acogerme y guiarme en mi pasantía en sus laboratorios.

A la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile por estos 7 años llenos de alegrías y satisfacciones.

Ricardo José Harris Correa, Marzo 2012.

# Índice de contenido

---

Índice de Figura .....	vii
Índice de Imágenes.....	viii
Índice de Gráficos.....	ix
Índice de Tablas.....	xi
Nomenclatura y abreviaciones .....	xiii

## **CAPÍTULO I:** Motivación, Marco Teórico, Antecedentes Bibliográficos y Objetivos

<b>1.- Motivación.....</b>	<b>1</b>
1.1.- <i>Visión energética y medioambiental del uso de combustibles.....</i>	<i>1</i>
1.2.- <i>Bioetanol como alternativa .....</i>	<i>2</i>
<b>2.- Marco Teórico.....</b>	<b>3</b>
2.1.- <i>Material lignocelulósico .....</i>	<i>3</i>
2.2.- <i>Pretratamientos del material lignocelulósico.....</i>	<i>5</i>
2.2.1.- <i>Tipos de pretratamientos .....</i>	<i>5</i>
2.3.- <i>Hidrólisis enzimática y fermentación .....</i>	<i>6</i>
2.3.1.- <i>Hidrólisis enzimática.....</i>	<i>6</i>
2.3.2.- <i>Fermentación.....</i>	<i>7</i>
<b>3.- Antecedentes Bibliográficos.....</b>	<b>8</b>
3.1.- <i>Pretratamientos .....</i>	<i>8</i>
3.1.1.- <i>Explosión a vapor.....</i>	<i>8</i>
3.1.2.- <i>Organosolv.....</i>	<i>9</i>
3.1.3.- <i>Líquidos iónicos - emimCl .....</i>	<i>9</i>
3.2.- <i>Hidrólisis enzimática.....</i>	<i>10</i>
3.3.- <i>Producción de bioetanol en el mundo .....</i>	<i>11</i>
<b>4.- Objetivos.....</b>	<b>12</b>
4.1.- <i>Objetivos generales .....</i>	<i>12</i>
4.2.- <i>Objetivos específicos .....</i>	<i>12</i>

## **CAPÍTULO II: Materiales y Procedimientos**

<b>5.- Materiales.....</b>	<b>13</b>
5.1.- <i>Materiales</i> .....	13
5.1.1.- Material lignocelulósico.....	13
5.1.2.- Enzimas.....	14
5.1.3.- Líquido iónico .....	14
<b>6.- Procedimientos .....</b>	<b>15</b>
6.1.- <i>Pretratamientos</i> .....	15
6.1.1.- Explosión a vapor (SE).....	15
6.1.2.- Organosolv (OS).....	15
6.1.3.- Pretratamiento con emimCl (IL) .....	16
6.2.- <i>Análisis</i> .....	17
6.2.1.- Composición química (fracción sólida) – Klason.....	17
6.2.2.- Composición química (fracción líquida) – Oligómeros y monómeros.....	19
6.2.3.- Área superficial: Water Retention Value .....	21
6.2.4.- Índice de cristalinidad: FT-IR.....	21
6.2.5.- Grado de polimerización (DP): Viscosidad .....	22
6.2.6.- Longitud de fibra: FQA.....	23
6.2.7.- Accesibilidad enzimática: Simons' Stain .....	23
6.3.- <i>Hidrólisis enzimática</i> .....	25
6.3.1.- Consistencia al 2% de sólidos .....	25
6.3.2.- Consistencia al 10% de sólidos .....	25
6.3.1.- Consistencia al 10% de glucosa .....	25

## **CAPÍTULO III: Resultados y Discusión**

<b>7.- Resultados y Discusión.....</b>	<b>26</b>
7.1.- <i>Composición química de la biomasa</i> .....	26
7.1.1.- Fracción sólida .....	26
7.1.2.- Fracción líquida.....	30
7.2.- <i>Propiedades físicas y conversión de glucosa</i> .....	32
7.2.1.- Área superficial.....	33
7.2.2.- Índice de cristalinidad.....	36
7.2.3.- Grado de polimerización (Viscosidad) .....	38
7.2.4.- Longitud de fibra .....	42
7.2.5.- Accesibilidad enzimática.....	44
7.3.- <i>Resumen del efecto de las propiedades físicas sobre la conversión</i> .....	47

## **CAPÍTULO IV: Conclusiones y Recomendaciones**

<b>8.- Conclusiones .....</b>	<b>49</b>
<b>9.- Recomendaciones .....</b>	<b>52</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo A: Composición química de la fracción sólida .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo B: Composición química de la fracción líquida .....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo C: Resultados del área superficial .....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo D: Resultados del índice de cristalinidad.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo E: Resultados del grado de polimerización.....</b>	<b>63</b>
<i>Efecto del uso de filtro en la medición de viscosidad.....</i>	<i>63</i>
<i>Resultados del análisis.....</i>	<i>65</i>
<i>Conversión de glucosa en función de la viscosidad y el tamaño del material inicial.....</i>	<i>66</i>
<b>Anexo F: Resultados de la accesibilidad enzimática .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo G: Estimación de costos de caracterización física.....</b>	<b>69</b>

## *Índice de Figura*

Figura 1: Utilización de energías a nivel mundial proyectadas al año 2100 .....	2
Figura 2: Estructura del material lignocelulósico .....	3
Figura 3: Estructura de la celulosa .....	4
Figura 4: Esquema de la estructura de la lignina .....	4
Figura 5: Esquema del efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico .....	5
Figura 6: Esquema de la medición con viscosímetro de de capilar .....	22



## *Índice de Imágenes*

Imagen 1: Chips de eucaliptus y de álamo sin pretratar.....	13
Imagen 2: Pulpa de álamo pretratado por explosión a vapor. ....	15
Imagen 3: Pulpa de álamo pretratado por organosolv.....	16
Imagen 4: Chips de eucalipto pretratado con emimCl .....	16
Imagen 5: Material inicial sin pretratar. Eucalipto tamizado de 1 - 2 mm. Álamo sin tamizar de 1 - 30 mm .....	58
Imagen 6: Fracción sólida obtenida luego del pretratamiento por SE, OS e IL.....	58

## *Índice de Gráficos*

Gráfico 1: Composición química del eucalipto pretratado por SE, OS, IL y sin pretratar (S/P) .....	28
Gráfico 2: Composición química del álamo pretratado por SE, OS y sin pretratar (S/P) .....	30
Gráfico 3: Presencia de azúcares en la fracción líquida del eucalipto pretratado por SE y OS. ....	31
Gráfico 4: Presencia de azúcares en la fracción líquida del álamo pretratado por SE y OS. ....	31
Gráfico 5: Water retention value (WRV) para eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	33
Gráfico 6: Water retention value (WRV) para eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	34
Gráfico 7: Water retention value (WRV) para álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	35
Gráfico 8: Comparación del WRV para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos). ....	35
Gráfico 9: Índice de cristalinidad para eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	36
Gráfico 10: Índice de cristalinidad para eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	37
Gráfico 11: Índice de cristalinidad para álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	37
Gráfico 12: Comparación del CrI para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos). ....	38
Gráfico 13: Viscosidad de la celulosa de eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	39
Gráfico 14: Viscosidad de la celulosa de eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	40
Gráfico 15: Viscosidad de la celulosa de álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	40
Gráfico 16: Comparación de DP para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos) y ecuación de ajuste de conversión en función del tamaño de chip y la viscosidad. ....	41
Gráfico 17: Largo de las fibras de eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	42

Gráfico 18: Largo de las fibras de álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	43
Gráfico 19: Comparación del largo de fibra para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos). ....	44
Gráfico 20: Razón de adsorción de tinturas para eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	45
Gráfico 21: Razón de adsorción de tinturas para eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	46
Gráfico 22: Razón de adsorción de tinturas para álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis. ....	46
Gráfico 23: Comparación del SS para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos). ....	47

## Índice de Tablas

Tabla 1: Principal efecto de algunos pretratamientos físico-químicos sobre el material lignocelulósico.....	8
Tabla 2: Plantas productoras de etanol a escala piloto e industrial .....	11
Tabla 3: Preparación de estándares para Klason.....	18
Tabla 4: Preparación de estándares para oligómeros .....	20
Tabla 5: Preparación de estándares para monómeros.....	20
Tabla 6: Preparación de los tubos para SS para cada material.....	23
Tabla 7: Dilución de muestras para medición de absorbancia .....	24
Tabla 8: Pesos de material agregados a cada hidrólisis y volumen de reacción total. ....	25
Tabla 9: Comparación de estudios de composición química para <i>Eucalyptus globulus</i> sin pretratar. ....	27
Tabla 10: Comparación de estudios de la composición química de material pretratado por SE y OS. ....	27
Tabla 11: Composición de lignina, hemicelulosa y celulosa del eucalipto pretratado por SE, OS e IL. ....	27
Tabla 12: Comparación de estudios de composición química para <i>Populus canadensis</i> sin pretratar. ....	29
Tabla 13: Composición de lignina, hemicelulosa y celulosa del álamo pretratado por SE y OS.....	29
Tabla 14: Conversiones de glucosa obtenidas para cada hidrólisis para los distintos residuos pretratados por SE, OS e IL. ....	32
Tabla 15: Máxima adsorción de tintura DO y DB en eucalipto y álamo pretratados por SE, OS e IL.. ....	44
Tabla 16: Resumen de las principales propiedades físicas de los residuos lignocelulósicos pretratados y su efecto sobre la conversión a glucosa.....	47
Tabla 17: Composición química de la fracción sólida del eucalipto y el álamo. ....	59
Tabla 18: Oligómeros presentes en la fracción líquida.....	60
Tabla 19: Monómeros presentes en la fracción líquida.....	60
Tabla 20: Determinación del WRV para residuos pretratado por SE, OS e IL.....	61
Tabla 21: Determinación del índice de cristalinidad (CrI) para residuos pretratados por SE, OS e IL. ....	62

Tabla 22: Comparación de los tiempos de paso a través del capilar para muestras con y sin filtrar. .....	64
Tabla 23: Determinación de la viscosidad para residuos de eucalipto y álamo pretratado por SE, OS e IL.....	65
Tabla 24: Conversión de glucosa, viscosidad y tamaño utilizados para ajustar la ecuación. ....	66
Tabla 25: Absorbancia medida a las distintas muestras de eucalipto y álamo incubado con DB y DO. .....	68
Tabla 26: Estimación de costo por muestra para cada propiedad física. ....	69

## *Nomenclatura y abreviaciones*

AFEX	"Ammonia Fiber Explosion" (explosión de fibras con amonio)
AIL	Lignina insoluble en ácido
ARP	"Ammonia Recycle Percolation" (percolación con reciclo de amonio)
ASL	Lignina soluble en ácido
$c$	Concentración molar
$C$	Conversión de glucosa (ajuste de ecuación de viscosidad y tamaño)
$C_B$	Concentración de tintura azul
$C_O$	Concentración de tintura naranja
CBU	Unidades de celobiosa
CED	Cuprietilendiamina
CrI	Índice de cristalinidad
CV	Coeficiente de variación
DB	Direct Blue 1
DE	Desviación estándar
DO	Direct Orange 15
DP	Grado de polimerización
emimCl	Cloruro de 1-etil-3-metil imidazol
FPU	Unidades de papel filtro
FQA	Fiber Quality Analyser
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
HPLC	Cromatografía líquida a alta presión
$I_0$	Intensidad de luz incidente
$I$	Intensidad de luz transmitida
IL	Líquidos iónicos - emimCl
$l$	Largo del paso de luz
LHW	"Liquid Hot Water" (agua caliente líquida)
OS	Organosolv
PBS	Solución buffer fosfato
rpm	Revoluciones por minuto
S/P	Sin pretratar
SE	Explosión a vapor
SHF	Sacarificación y fermentación separadas
SS	Simons' Stain
SSF	Sacarificación y fermentación simultáneas
$SS_{O/B}$	Razón de tintura naranja y azul adsorbida por el material
$T$	Tamaño de chip inicial (ajuste de ecuación de viscosidad y tamaño)
UBC	University of British Columbia
WRV	"Water Retention Value" (valor de retención de agua)

$[A]$	Cantidad de tinte adsorbida por el material
$[A]_{m\acute{a}x}$	Máximo de tinte adsorbido por el material
$[C]$	Concentración de tinte libre
$\varepsilon$	Coefficiente de extinción
$\mu$	Viscosidad dinámica

# Capítulo I

---

## Motivación, Marco Teórico, Antecedentes Bibliográficos y Objetivos

---

### **1.- Motivación**

Estudios sobre energías renovables y alternativas están siendo desarrollados como reemplazo de los combustibles fósiles. En particular, la biomasa lignocelulósica proveniente de residuos forestales y agrícolas, restos de la industria papelera y cultivos con fines energéticos está siendo fuertemente estudiada debido a su potencial como materia prima para producción de biocombustibles y otros bioproductos como bioplásticos y bioquímicos <sup>(1)</sup>.

#### **1.1.- Visión energética y medioambiental del uso de combustibles**

Las fuentes energéticas fósiles van en disminución principalmente por no ser renovables, mientras que el consumo de energía a nivel mundial crece cada día, estimándose un aumento de la demanda mundial de un 1,8% anual para los próximos 20 años <sup>(2)</sup>. Esto ha generado un gran interés por encontrar alternativas para sustituir el uso de combustibles fósiles por fuentes renovables y menos contaminantes.

Entre las alternativas que se estudian para la sustitución de combustibles fósiles se encuentra la utilización de biomasa de origen agrícola, forestal, animal, agroindustrial, sólidos urbanos y cultivos genéricos <sup>(3)</sup>, con la ventaja que ninguna de estas fuentes amenaza directamente la producción de alimentos.

En la Figura 1 se puede apreciar el registro del consumo energético desde 1850 proyectado hasta el año 2100. En esta imagen se puede ver la evolución del consumo, siendo principalmente carbón la única fuente al comienzo, surgiendo posteriormente el petróleo y el gas, los cuales tienen gran protagonismo en la actualidad. Sin embargo, se proyecta y se espera que nuevas energías tomen el protagonismo, como es la energía solar y la biomasa, principalmente.

Por otro lado, desde un punto de vista medioambiental, es importante tener en mente que los combustibles generan emisión de gases de efecto invernadero, en particular, dióxido de carbono. Sin embargo, en el caso de los combustibles a partir de biomasa, al ser estos renovables, durante su etapa de cultivo están constantemente captando CO<sub>2</sub> a través del proceso de



fotosíntesis. Hay estudios que indican que en un bosque en crecimiento pueden capturarse de 300 a 600 toneladas por hectárea, según la densidad de éste <sup>(4)</sup>.

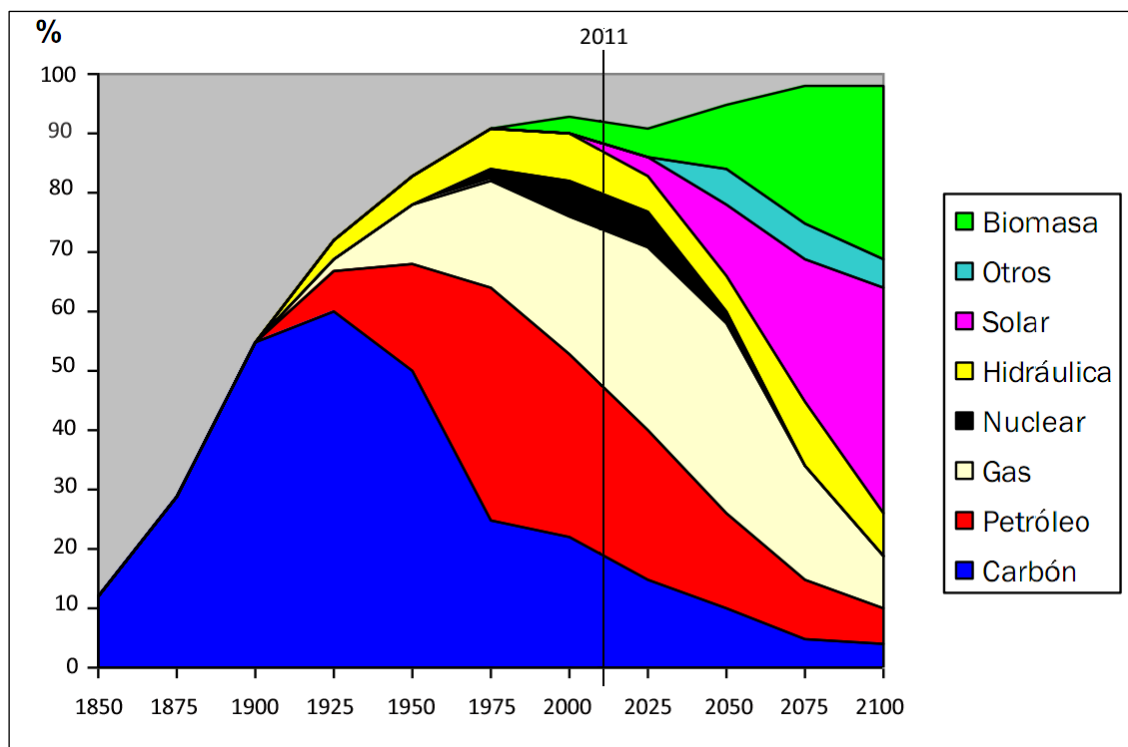


Figura 1: Utilización de energías a nivel mundial proyectadas al año 2100 <sup>(3)</sup>

## 1.2.- Bioetanol como alternativa

El bioetanol es el etanol producido a partir de biomasa por medio de la fermentación. Tiene las mismas características que su equivalente químico, por lo que puede ser utilizado con los mismos fines. Uno de estos usos es como aditivo a las gasolinas para mejorar su octanaje y oxigenación, pudiendo agregarse hasta un 10 – 15% p/p sin realizar ninguna modificación al motor de combustión <sup>(5)</sup>. Para mayores concentraciones de etanol en los combustibles, se requieren ciertas modificaciones mecánicas menores que ya se han implementado en algunos países como Brasil y Estados Unidos <sup>(6)</sup>.

Este bioetanol de primera generación es producido comercialmente a partir de la fermentación de azúcares de origen vegetal, en Estados Unidos, Brasil, China y Europa, principalmente. En el 2011 se produjeron 88,7 millones de m<sup>3</sup> a nivel mundial, reemplazando así la necesidad de más de 1 millón de barriles de petróleo crudo al día en el mundo <sup>(7)</sup>. Sin embargo, el cultivo masivo de vegetales para la producción de etanol ha desplazado los cultivos con fines alimenticios, generando un impacto en la economía de éstos <sup>(8)</sup>. Es por esta razón que, a pesar de ser un proceso más complejo, el producir bioetanol de segunda generación, es decir, a partir de desechos lignocelulósicos no comestibles, es aun más interesante.

## 2.- Marco Teórico

El bioetanol de segunda generación es el producto de la fermentación alcohólica de azúcares contenidas en el material lignocelulósico. Generalmente, estos azúcares están en forma de polímeros, principalmente en forma de celulosa. Por lo tanto, para obtenerlas se requiere descomponer estas macromoléculas hidrolizándolas. Sin embargo, la eficiencia de esta hidrólisis depende de qué tan soluble y accesible sea esta celulosa, por lo que el material requiere de un tratamiento previo. En resumen, la obtención del bioetanol a partir de material lignocelulósico consta de tres etapas: pretratamiento, hidrólisis y fermentación. Luego, el bioetanol es purificado por destilación y deshidratación.

### 2.1.- Material lignocelulósico

Se le llama material lignocelulósico a la biomasa compuesta por lignina, hemicelulosa y celulosa. Este material corresponde aproximadamente al 50% de la biomasa del planeta<sup>(5)</sup>. En la Figura 2 se puede apreciar en detalle la estructura de la pared celular de las plantas a nivel tanto macro como microscópico, donde se notan los polímeros de celulosa rodeada de hemicelulosa y lignina. Esta estructura tiene una alta resistencia mecánica y es lo que permite a las plantas y árboles mantenerse en pie<sup>(9)</sup>.

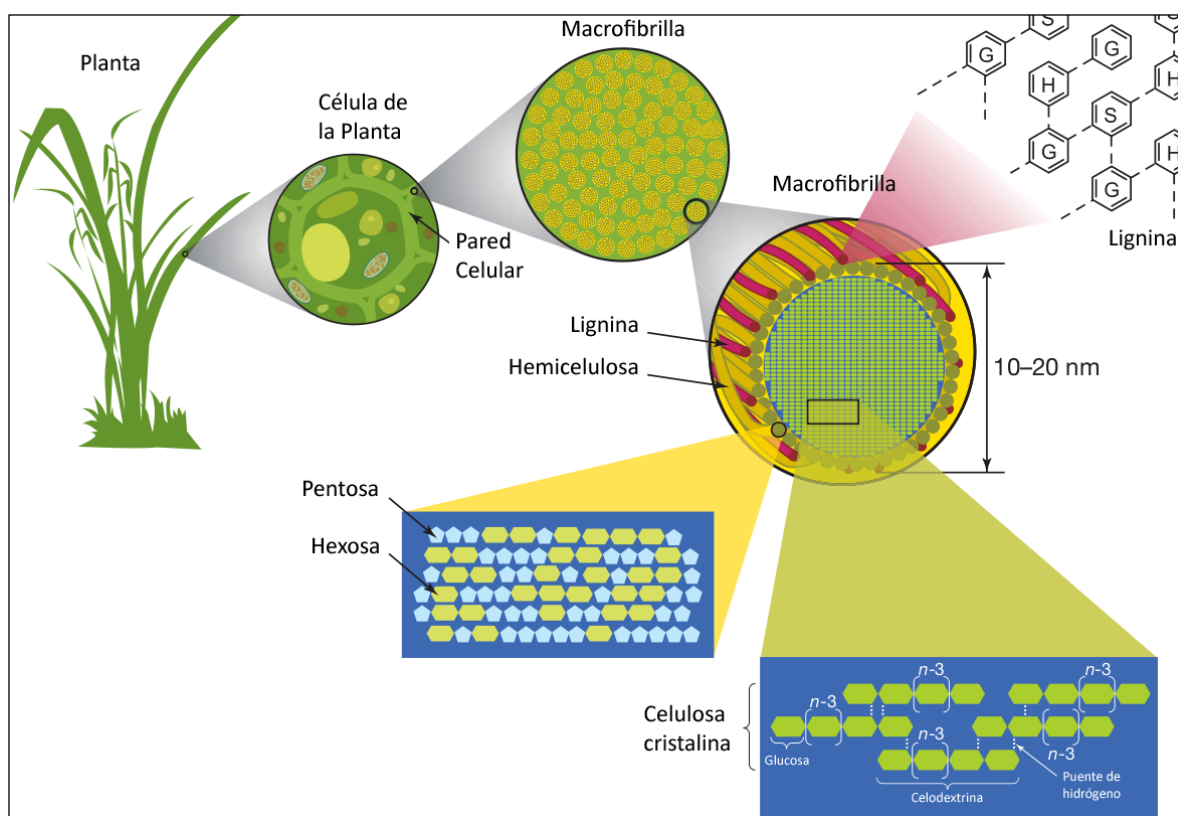


Figura 2: Estructura del material lignocelulósico<sup>(10)</sup>

La celulosa está compuesta por cadenas lineales de glucosas conectadas por enlaces beta 1-4 (Figura 3). Estas cadenas interactúan entre sí por puentes de hidrógeno, dando origen a unas zonas amorfas y a otras zonas muy ordenadas, generando una estructura cristalina, lo que le da características de insolubilidad en agua, rigidez y resistencia al ataque enzimático<sup>(11)</sup>.

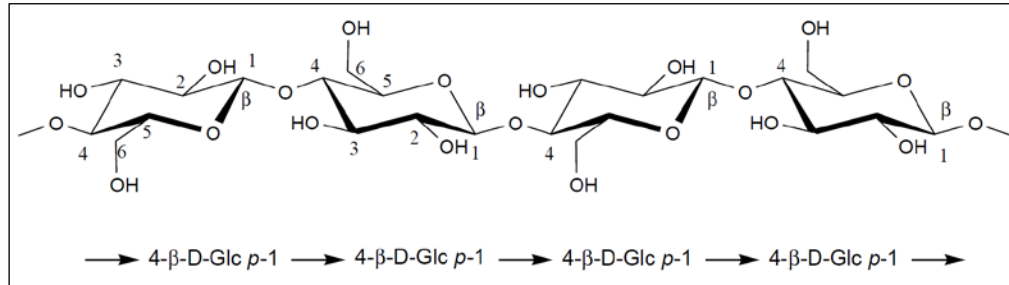


Figura 3: Estructura de la celulosa<sup>(9)</sup>

Por otro lado, la estructura de la hemicelulosa está constituida por pentosas y hexosas y varía dependiendo si se trata de madera proveniente de coníferas (llamadas maderas blandas) o de latifoliadas (llamadas maderas duras). En el caso de las primeras, está principalmente formada por combinaciones de galactosa, manosa y glucosa, mientras que las segundas, principalmente por xilosa y glucosa. Sin embargo, ambas tienen otros azúcares en menor cantidad, formando estructuras más amorfas (menos cristalinas) que la celulosa<sup>(9)</sup>.

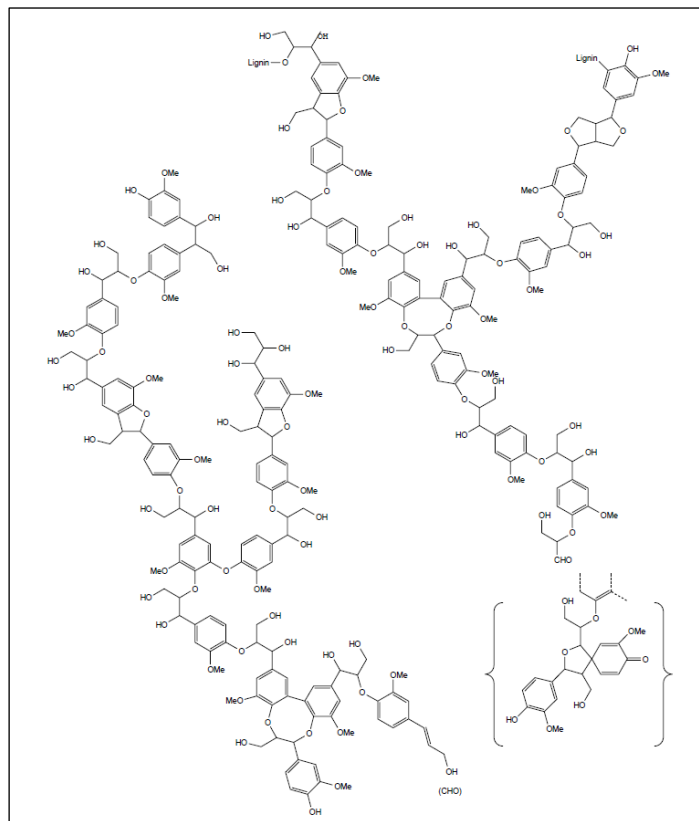


Figura 4: Esquema de la estructura de la lignina<sup>(9)</sup>

La lignina es una macromolécula constituida por unidades de fenilpropano que son polimerizados en el proceso de biosíntesis de lignina. Típicamente, los enlaces entre subunidades corresponden a éter-carbono y carbono-carbono<sup>(9)</sup> (Figura 4).

En general, los materiales lignocelulósicos tienen una composición de un 40-45% de celulosa, 19-30% de hemicelulosa y 22-32% de lignina<sup>(12)</sup>.

## 2.2.- Pretratamientos del material lignocelulósico

Dado que lo que se busca es obtener los azúcares contenidos en el material lignocelulósico, en particular, la glucosa por ser más abundante, es necesario llegar a la celulosa. Sin embargo, la envoltura molecular compuesta por lignina y hemicelulosa, junto con la cristalinidad de la celulosa, dificultan enormemente la descomposición en glucosa (hidrólisis), por lo que es necesario un tratamiento previo que permita romper parcial o totalmente esta estructura y dejar expuesta la celulosa (Figura 5).

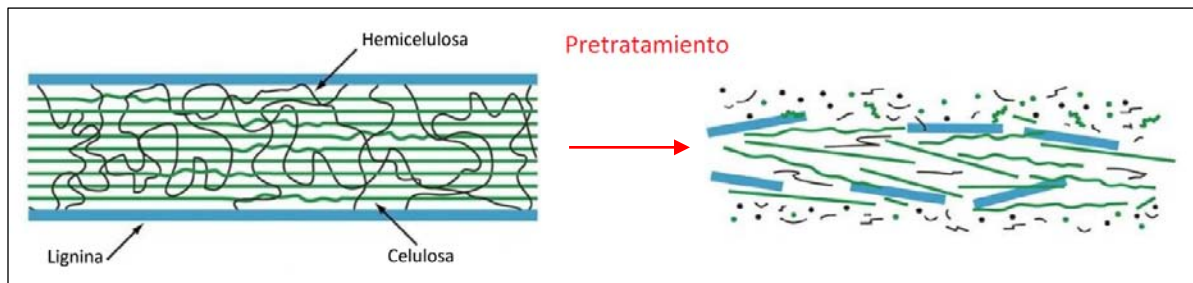


Figura 5: Esquema del efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico<sup>(13)</sup>

Para lograr esto existen distintos métodos que se clasifican según su principio de acción en físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. Todos estos tienen el mismo fin: romper la estructura lignocelulósica y exponer la celulosa. Sin embargo, estos métodos generan distintos inhibidores para las etapas posteriores y tienen distintos requerimientos energéticos y distintos tiempos de operación.

### 2.2.1.- Tipos de pretratamientos

#### 2.2.1.1.- Físicos

Corresponde al rompimiento del material lignocelulósico por molienda, afectando así el área superficial, lo que aumenta la transferencia de masa y reduce la cristalinidad, mejorando la accesibilidad. El costo energético de este método está asociado al tamaño de partícula que se desee producir<sup>(14)</sup>.

#### 2.2.1.2.- Físico-químicos

En esta categoría existen diversos métodos: Steam Explosion (SE), Liquid Hot Water (LHW), Ammonia Fiber Explosion (AFEX), Ammonia Recycle Percolation (ARP) y Supercritical Fluid (SCF). Todos estos métodos se basan en la ruptura de la estructura lignocelulósica principalmente por

cambios de presión y temperatura. Esto significa que requiere un importante consumo energético<sup>(14)</sup>.

#### 2.2.1.3.- Químicos

Los pretratamientos químicos también son variados: ácidos, alcalinos, oxidación húmeda, ozonólisis, organosolv y líquidos iónicos. Todos estos métodos se basan en reacciones químicas entre los componentes del medio y el material lignocelulósico que atacan los enlaces, principalmente, de la lignina y la hemicelulosa. Con esto se genera la ruptura de la estructura, logrando la exposición de la celulosa. Sin embargo, estos procesos generan moléculas inhibitorias que afectan la hidrólisis y la fermentación<sup>(14)</sup>.

#### 2.2.1.4.- Biológicos

En la naturaleza existen hongos capaces de degradar el material lignocelulósico, en particular, la lignina. Estos son los hongos de pudrición blanca (WRF), que requieren de muy baja energía y condiciones ambientales simples. El principal problema con estos pretratamientos es que toman del orden de semanas<sup>(15)</sup>.

### 2.3.- Hidrólisis enzimática y fermentación

Luego de realizar el pretratamiento del material lignocelulósico, éste está listo para la hidrólisis enzimática y fermentación. Esto puede realizarse en dos etapas independientes y consecutivas o puede combinarse en una sola, teniendo cada una de estas estrategias sus ventajas y desventajas.

#### 2.3.1.- Hidrólisis enzimática

Esta etapa busca descomponer las moléculas de celulosa en glucosa mediante la acción de enzimas celulasas, que se clasifican en tres grupos según su actividad: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas<sup>(16)</sup>.

- Endoglucanasas: Actúan en las regiones amorfas de la celulosa sobre el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico entre moléculas de glucosa, generando cadenas de glucosa de menor longitud para la acción de las otras enzimas<sup>(16)</sup>.
- Exoglucanasas: Actúa en los extremos reductores y no reductores de la celulosa sobre el enlace  $\beta$ -1,4-D-glucano, generando moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa) y monómeros de glucosa<sup>(16)</sup>.
- Celobiasas: Actúa directamente sobre las moléculas de celobiosa, separando los dímeros en monómeros de glucosa<sup>(16)</sup>.

Típicamente, esta hidrólisis se lleva a cabo entre 45 – 55 °C, con un pH 4 – 5 y con cargas enzimáticas de 10 – 30 FPU por gramo de material lignocelulósico. La incubación se realiza con agitación (~250 rpm) y por unas 48 – 72 horas<sup>(17; 18)</sup>. Sin embargo, los resultados de esto son variables debido a que existe inhibición por sustrato, por producto y por moléculas presentes en el material, generadas en el pretratamiento. Estos inhibidores, propios de cada tipo de

pretratamiento, causan un decaimiento de la actividad enzimática formando uniones irreversibles con el sitio activo<sup>(18)</sup>.

### 2.3.2.- Fermentación

La fermentación es un proceso biológico de oxidación incompleta mediante el cual un microorganismo obtiene energía para su desarrollo a partir de una fuente de carbono. En el caso de la fermentación alcohólica, los azúcares son asimilados en ausencia de oxígeno y transformados en etanol, dióxido de carbono y bioenergía<sup>(19)</sup>.

Luego, los azúcares obtenidos en la hidrólisis enzimática son fermentados por microorganismos de fermentación alcohólica para la producción del bioetanol. Los microorganismos más conocidos para la fermentación de hexosas (en este caso glucosa) son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Zymomonas mobilis*. Teóricamente, por cada gramo de glucosa se puede obtener 0,51 gramos de etanol, sin embargo, existen inhibidores que impiden alcanzar el máximo teórico<sup>(18)</sup>.

Con el fin de mejorar los rendimientos de la hidrólisis enzimática y la fermentación, se utilizan distintas estrategias: (1) Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF); (2) Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF); (3) Sacarificación y Co-fermentación Simultáneas (SSCF); (4) Bioprocesos Consolidados (CBP). De estas cuatro estrategias, las más interesantes han resultado ser las dos primeras<sup>(19)</sup>.

- SHF: Se realiza la hidrólisis enzimática independiente de la fermentación, lo que tiene como ventaja permitir utilizar las condiciones de operación óptimas para cada etapa, las cuales han sido bien estudiadas. Sin embargo, existe inhibición por producto en ambos procesos<sup>(19)</sup>.
- SSF: La hidrólisis enzimática y la fermentación se llevan a cabo al mismo tiempo en el mismo reactor. Esto implica que las condiciones de operaciones deben ser compatibles con ambos procesos, lo que lleva a buscar temperaturas y medios que se alejan del óptimo. Pero, al mismo tiempo, genera un desplazamiento del equilibrio de la reacción enzimática, evitando la inhibición por producto en la hidrólisis. Además, la presencia de un microorganismo podría degradar compuestos tóxicos que provienen del pretratamiento, ayudando a mantener la actividad enzimática. Finalmente, presenta también la ventaja de reducir los costos en equipo, pues se requiere de un reactor en lugar de dos<sup>(19)</sup>.

### 3.- Antecedentes Bibliográficos

Debido a los requerimientos energéticos antes mencionados, se ha despertado el interés en la comunidad científica por desarrollar nuevas opciones. Entre todas ellas existe en particular la utilización de la celulosa contenida en la biomasa para la producción de bioetanol, donde se han estudiado diversas técnicas. Aquí se presentan las más relevantes para comprender el contexto en el que se lleva a cabo este proyecto.

#### 3.1.- Pretratamientos

Diferentes pretratamientos han sido mencionados, sin embargo, los relevantes para este estudio son tres: explosión a vapor, organosolv y líquidos iónicos.

##### 3.1.1.- Explosión a vapor

Corresponde a un método físico-químico, pues se basa en la ruptura de la estructura lignocelulósica por acción de la temperatura y presión, en conjunto con catalizadores químicos, como el  $H_2SO_4$  o el  $SO_2$ , que actúan a nivel de la pared celular, homogenizando la ruptura de la estructura lignocelulósica<sup>(14; 20)</sup>.

La explosión a vapor consiste en someter al material a alta presión y temperatura por un corto tiempo, despresurizando bruscamente, lo que lleva a la ruptura de las fibras. Esta ruptura aumenta la accesibilidad de las enzimas a la celulosa en la hidrólisis. El tamaño de las partículas es uno de los factores que más afecta a la eficiencia de este proceso, sin embargo, se puede compensar con la severidad<sup>1</sup>. Se utilizan tiempos de 1 – 10 minutos y temperaturas de 170 – 270 °C y será la combinación de estos lo que determinará el rendimiento en la recuperación de azúcares fermentables<sup>(14)</sup>. En la Tabla 1 se presenta el principal efecto de algunos pretratamientos físico-químicos comparables a la explosión a vapor.

Tabla 1: Principal efecto de algunos pretratamientos físico-químicos sobre el material lignocelulósico.<sup>(21)</sup>

Pretratamiento	Efecto	pH
Percolación con reciclo de amonio (ARP)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Remueve principalmente lignina.</li><li>• Los carbohidratos permanecen como sólidos.</li></ul>	↑
Explosión de fibras con amonio (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"><li>• No produce remoción.</li></ul>	
Agua caliente líquida (LHW)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Remueve pequeñas cantidades de hemicelulosa y lignina.</li><li>• La xilosa es hidrolizada en forma de oligómeros a la fracción líquida.</li></ul>	
Explosión a vapor (SE)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Remueve principalmente hemicelulosa y algo de lignina.</li><li>• La xilosa es hidrolizada en forma de monómeros a la fracción líquida.</li></ul>	

<sup>1</sup> La severidad corresponde a la intensidad del pretratamiento, es decir, cuando se tiene altas temperaturas y grandes tiempos de residencia, se habla de un tratamiento severo. Mientras que, cuando las condiciones son más suaves (menor temperatura y tiempo), el tratamiento es de menor severidad.

Existe un fuerte compromiso dado por la severidad del pretratamiento entre la accesibilidad enzimática y la pérdida de azúcares fermentables. Cuando se utilizan condiciones muy suaves (poco tiempo y bajas temperaturas), se conserva la mayor parte de los azúcares fermentables presentes en el material, pero la accesibilidad enzimática se ve limitada, generando bajos rendimientos en la hidrólisis. Mientras que, al utilizar condiciones más severas (mayor tiempo y temperatura), el material obtenido tiene muy buena accesibilidad enzimática, lográndose un alto rendimiento en la hidrólisis, pero se pierden azúcares fermentables. Esto se debe a que las azúcares derivadas de la hemicelulosa pasan a formar moléculas más pequeñas y no fermentables que son solubles en la fracción líquida<sup>(20)</sup>.

En general, este es un método costo-efectivo que transforma la lignina y solubiliza la hemicelulosa, pero tiene como desventaja que causa una degradación parcial de la hemicelulosa, requiere de catalizadores ácidos y genera compuestos tóxicos para las etapas siguientes, como ácido acético y derivados de éste<sup>(14; 22)</sup>.

### **3.1.2.- Organosolv**

El organosolv corresponde a un tratamiento químico que proviene de la industria del papel. Se basa en la disolución de la lignina por un solvente orgánico, típicamente un alcohol, el cual actúa despolimerizando la lignina. Este proceso se lleva a cabo en un reactor donde se mezcla el licor de cocción (solvente) y el material lignocelulósico para ser calentado a temperaturas entre 180 – 210 °C por 30 – 90 minutos. El licor de cocción corresponde a una mezcla de 50 – 75% alcohol en agua, utilizándose en la mayoría de los casos metanol o etanol<sup>(23)</sup>. También se agrega un catalizador ácido en pequeña proporción (~1% p/p) para acelerar la reacción y bajar un poco la temperatura<sup>(24)</sup>.

En general, es un método que da altos rendimientos, pudiendo alcanzar una deslignificación casi total del material lignocelulósico, dejando altamente expuesta a la celulosa para el ataque enzimático, sin embargo, es un método costoso, pues requiere de largos tiempos de incubación y recuperación del solvente<sup>(24)</sup>. Si el material no es bien lavado, el solvente orgánico remanente puede actuar como inhibidor en etapas posteriores<sup>(22)</sup>.

### **3.1.3.- Líquidos iónicos - emimCl**

Por definición los líquidos iónicos son sales formadas por un catión orgánico y un anión que puede ser orgánico o inorgánico; funden a menos de 100°C y presentan gran estabilidad térmica, alta conducción eléctrica y una presión de vapor despreciable, lo que lo hacen un solvente amigable con el medio ambiente<sup>(22)</sup>. Más aún, los IL han demostrado ser reciclables y reutilizables sin pérdida importante de su capacidad solvente<sup>(25)</sup>.

En general, el pretratamiento con IL consiste en una incubación por un tiempo del orden de 0,5 – 24 horas a una temperatura que puede ir desde 50 a 170°C, que busca principalmente solubilizar la estructura cristalina de la celulosa rompiendo los puentes de hidrógeno. Los rangos son muy amplios debido a que existe una gran cantidad de líquidos iónicos con diferentes propiedades, sin que aun se haya determinado un proceso óptimo. Sin embargo, entre los que han



sido más estudiados está el 1 cloruro etil-3 metil imidazol (emimCl), para el cual las condiciones de operación están en torno a 30 – 90 minutos y 120 – 170 °C, en general<sup>(22)</sup>.

Seleccionando las mejores condiciones se ha logrado alcanzar rendimientos<sup>2</sup> superiores al 90%<sup>(26; 27)</sup>, sin embargo, los líquidos iónicos son solventes costosos, lo que obliga a recuperarlos e incluso reciclarlos. Además, el material pretratado debe ser muy bien lavado, pues restos de estos solventes pueden inhibir las etapas posteriores<sup>(14; 22; 25)</sup>.

### 3.2.- Hidrólisis enzimática

Como fue descrito anteriormente, la hidrólisis enzimática busca descomponer la celulosa en glucosa mediante el uso de enzimas específicas llamadas celulasas<sup>(16)</sup>. Estas enzimas tienen su óptimo entre 45 – 55 °C a pH 4 – 5<sup>(17)</sup>. Otros factores que afectan la hidrólisis son la carga enzimática, la consistencia (concentración de biomasa) y la composición de la biomasa<sup>(28)</sup>.

Para la carga enzimática se divide las enzimas en dos grupos: celulasas (endo/exoglucanasas - medidas en FPU) y celobiasas (medidas en CBU). Estas son cargadas por separado y típicamente se carga entre 10 – 30 FPU por gramo en base seca de material pretratado y se usa una razón FPU:CBU menor a uno, es decir, se utiliza una carga mayor de celobiasas para evitar la inhibición por producto de las celulasas<sup>(29)</sup>.

Por otro lado, la consistencia más usada en esta hidrólisis es 2% p/v, por ejemplo, 2 gramos de material por cada 100 mL de medio hidrolizante. Esta consistencia tiene buenos resultados y no presenta problemas de transferencia de masa<sup>(29; 30)</sup>. Sin embargo, se utilizan también consistencias de hasta un 10% p/v, las cuales pueden presentar problemas de difusión y adsorción permanente de las enzimas al material, disminuyendo el rendimiento<sup>(29)</sup>.

Debido a que las enzimas son costosas, hay un gran interés por aumentar la eficiencia de éstas y disminuir la cantidad utilizada. Para esto, se está intentando realizar hidrólisis con una alta consistencia (8 – 10% p/v) y utilizando la menor carga posible<sup>(28)</sup>.

La composición de la biomasa también afecta el rendimiento de la hidrólisis. En especial el contenido de lignina y hemicelulosa. La lignina actúa como un obstáculo, disminuyendo la accesibilidad enzimática. Además, las celulasas se adsorben en ciertas regiones de la lignina, formando uniones infructuosas, lo que causa una disminución de la actividad enzimática observada. Por otro lado, si la hemicelulosa no es removida por el pretratamiento, la celulosa permanece menos accesible y muy cristalina, pues al remover la hemicelulosa se generan más áreas amorfas que facilitan la hidrólisis. Sin embargo, la presencia de hemicelulosa permite el potencial aprovechamiento de los azúcares que la componen, lo que genera un compromiso donde el óptimo dependerá de cada material<sup>(28)</sup>.

---

<sup>2</sup> Estos rendimientos solo se han logrado a escala de laboratorio con materiales molidos finamente y altas cargas enzimáticas.

### 3.3.- Producción de bioetanol en el mundo

En el mundo existen diversos proyectos de producción de bioetanol de segunda generación a nivel de planta piloto y planta industrial. En la Tabla 2 se presentan algunas de estas plantas y la materia prima que utilizan, donde los residuos agrícolas son los más comunes, pues al ser cultivos anuales permiten un abastecimiento más regular. En general, es difícil encontrar detalles sobre el proceso que utilizan estas plantas, pues es el secreto de mayor valor que poseen.

Tabla 2: Plantas productoras de etanol a escala piloto e industrial<sup>(31)</sup>

Compañía	Localización	Materia Prima	Producción Anual [m <sup>3</sup> ]	Año de Inicio
POET Cellulosic Ethanol Pilot Plant	Scotland, S.D.	Residuos agrícolas	80	2008
ETEK	Suecia	Residuos de maderas blandas	183	2015
Abengoa Bioenergía	Salamanca, España.	Residuos agrícolas	5.000	2006
Inbicon	Kalundborg, Denmark.	Paja de trigo	5.400	2009
Arkenol-Sacto	Sacramento, California, USA.	Paja de arroz	15.000	2001
Ethanol Partners Masada	Middletown, Nueva York, USA.	Residuos urbanos	25.000	2001
Sealaska	South East Region, Arkansas, USA.	Residuos de maderas blandas	30.000	2003
Ethanol Partners Masada	Birmingham, Alabama, USA.	Residuos urbanos	51.000	2002
BCI4	Dedham, Massachusetts, USA.	Bagazo	75.600	2002
BC International	Jenning, Louisiana, USA.	Bagazo y arroz	80.000	2002
BCI Collins Pine	Chester, California, USA.	Residuos de madera	80.000	2002
BCI Gridley	Oroville, California, USA.	Paja de arroz	80.000	2002
Coskata	Denver, Boligee, USA.	Residuos agrícolas	207.000	2011
Iogen	Ottawa, Canadá.	Residuos agrícolas	378.000	2004
Iogen Corp-Shell-VW2	Alemania	Paja de trigo	-	2008/2010
PureVision Technology	Ft. Lupton, Colorado, USA.	Madera	Piloto	2002

## **4.- Objetivos**

### **4.1.- Objetivos generales**

Seleccionar pretratamientos de residuos de *Eucalyptus globulus* y *Populus canadensis* en función de sus características físico-químicas para la producción de bioetanol.

### **4.2.- Objetivos específicos**

- Comparar la composición química del material lignocelulósico resultante de los distintos pretratamientos.
- Comparar las características físicas principales del material lignocelulósico resultante de los distintos pretratamientos.
- Comparar la conversión de azúcares en la hidrólisis enzimática para diferentes concentraciones de sustrato pretratado.
- Relacionar el efecto de las características físicas y químicas sobre los resultados de la hidrólisis para cada material lignocelulósico resultante de los distintos pretratamientos.
- Comparar los métodos de caracterización física del material como predictores de la conversión de azúcares.

# Capítulo II

## Materiales y Procedimientos

### 5.- Materiales

#### 5.1.- Materiales

##### 5.1.1.- Material lignocelulósico

El material lignocelulósico utilizado corresponde a residuos de madera de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Populus canadensis* (álamo). El primero, proveniente de bosques comerciales de 10 años de la VII Región, fue donado en calidad de astillas el Sr. R. Harris F., las que fueron molidas y tamizadas hasta un tamaño de chip de 1 – 2 mm en el Departamento de Ingeniería de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile. Se mantuvo almacenado en bolsas plásticas selladas con un contenido de humedad de un 24,5% hasta el momento de su uso. El segundo material fue proveído por la Facultad de Forestal de la Universidad de British Columbia en chips de 1 – 30 mm, siendo utilizados directamente, registrándose un contenido de humedad de un 7,5%. En la Imagen 1 se presentan fotos de este material.



Imagen 1: (a) Chips de eucalipto. (b) Chips de álamo sin pretreatar.

### **5.1.2.- Enzimas**

Las enzimas fueron provistas por la Facultad de Forestal de la Universidad de British Columbia. La celulasa utilizada corresponde a la enzima comercial *Spezyme*<sup>®</sup> CP de Genencor International – Danisco US, Inc. La celobiasa utilizada corresponde a *Novozyme*<sup>®</sup> 188, proveniente del hongo *Aspergillus niger*, producida comercialmente por el laboratorio Sigma – Aldrich<sup>®</sup> (C6105).

### **5.1.3.- Líquido iónico**

El líquido iónico (IL) utilizado corresponde a cloruro de 1 etil-3 metil imidazol (emimCl), el cual fue adquirido de la empresa Sigma – Aldrich<sup>®</sup> (30764-1KG-F), con un 95% de pureza, sin detalles de los posibles contaminantes. Se asume que estos son mayormente agua.

## 6.- *Procedimientos*

Los procedimientos realizados pueden dividirse en tres etapas. La primera etapa consiste en llevar a cabo los distintos pretratamientos: explosión a vapor (SE), organosolv (OS) y líquidos iónicos (IL). Luego, en una segunda etapa se busca analizar y caracterizar física y químicamente el material con y sin pretratamiento según los métodos descritos, para finalmente, como tercera etapa, realizar la hidrólisis del material pretratado.

### 6.1.- *Pretratamientos*

#### 6.1.1.- *Explosión a vapor (SE)*

Previo al pretratamiento, se impregnan 100 g en base seca de material con  $\text{SO}_2$  al 3% p/p, como catalizador, durante toda la noche. Posteriormente, se carga la cámara inyectora de 2 L StakeTech III y se le inyecta vapor a  $200^\circ\text{C}$  (16,4 atm) por 5 minutos. La pulpa obtenida es filtrada y lavada con 500 mL de agua y se almacena la fracción sólida y líquida por separado a  $4^\circ\text{C}$  para su posterior análisis. El procedimiento es idéntico para ambos materiales lignocelulósicos (eucalipto y álamo). En la Imagen 2 se presenta una foto del material pretratado por SE.



Imagen 2: Pulpa de álamo pretratado por explosión a vapor.

#### 6.1.2.- *Organosolv (OS)*

Antes de realizar el pretratamiento se debe preparar el licor de cocción y el licor de lavado. Para 100 g en base seca de material lignocelulósico, el licor de cocción está compuesto por 455 mL de etanol, 1 g de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 245 mL de agua destilada (proporción 13:7, considerando el agua contenida en el material según su contenido de humedad). Por otro lado, el licor de lavado es una mezcla de 682,5 mL de etanol y 367,5 mL de agua destilada (proporción 13:7). Posteriormente, se carga el digestor rotatorio de 2 L (Aurora Products Ltd.) con los 100 g de material lignocelulósico y el licor de cocción. Se incuba por 60 minutos a  $180^\circ\text{C}$ . Al cabo del tiempo, se enfría el reactor y la pulpa es filtrada al vacío y lavada con el licor de lavado. Las fracciones sólida y líquida se

almacenan por separado a 4°C para su posterior análisis. El procedimiento es idéntico para ambos materiales lignocelulósicos. En la Imagen 3 se presenta una foto del material pretratado por OS.

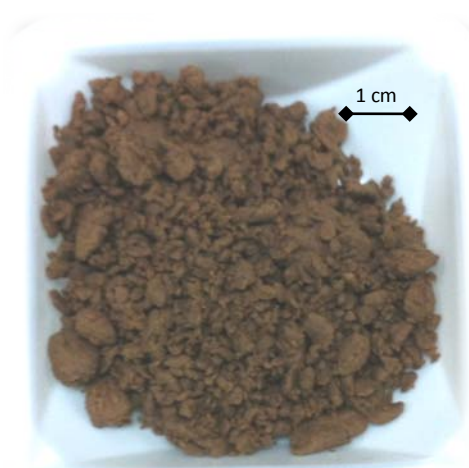


Imagen 3: Pulpa de álamo pretratado por organosolv.

#### **6.1.3.- Pretratamiento con emimCl (IL)**

Este pretratamiento se llevó a cabo según las mejores condiciones obtenidas previamente <sup>(17)</sup>. En un vaso precipitado de 1 L se dispone de 40 g de material lignocelulósico y el IL en una proporción 1:3 p/p. Se incuba por 60 minutos en un baño de silicona termorregulado a 150°C en un equipo Merck Heidolph Mr Hei-Standard. Al cabo del tiempo de incubación, el material es retirado del baño y lavado 3 veces por centrifugación. Este lavado consiste en agregar 260 mL de agua destilada y agitar por 1 minuto, luego, se centrifuga a 8.000 rpm (10.700 g) por 10 minutos en centrífuga Sorvall RC 6 Plus. Este pretratamiento fue realizado solo para el eucalipto. En la Imagen 4 se presenta una foto del material pretratado con IL.



Imagen 4: Chips de eucalipto pretratado con emimCl

## 6.2.- Análisis

### 6.2.1.- Composición química (fracción sólida) - Klason

Este método entrega la composición química (azúcares, lignina y cenizas) del material lignocelulósico tanto pretratado como sin pretratar mediante una hidrólisis ácida. Para esto, se pesa cada componente por separado y se realiza un balance de masa.

#### 6.2.1.1.- Preparación de las muestras

- Todas las muestras deben ser capaces de pasar por una malla # 40 (470  $\mu$ m).
- Material sin pretratar:
  - Secar en horno (105°C) ~20 g de material antes de moler.
  - Moler en molino de cuchillos grande para que pase malla de 2 mm.
  - Moler en molino de cuchillos pequeño para que pase malla número 20 y luego repetir para malla # 40.
  - Almacenar la muestra en contenedor sellado.
- Material pretratado:
  - Secar en horno (105°C) ~5 g de material.
  - Moler en molino de cuchillos pequeño hasta que pase por malla número 40.

#### 6.2.1.2.- Preparación del ácido

- Ácido sulfúrico al 72% p/p.
  - Agregar lentamente 665 mL de ácido sulfúrico concentrado a 300 mL de agua destilada.
  - Dejar enfriar y llenar hasta completar 1 L con agua destilada.
- Ácido sulfúrico al 4% p/p.
  - Agregar 5,55 mL de ácido al 72% a 94,44 mL de agua destilada.

#### 6.2.1.3.- Hidrólisis ácida

- Secar en horno (105°C) ~1 g del material molido.
- Pesar cuidadosamente 0,2 g de material seco en copas Klason enumeradas y registrar el peso real. Realizar esto en duplicado o triplicado.
- Agregar a todas las copas 3 mL de ácido al 72%.
- La reacción debe transcurrir por 2 horas, donde debe agitarse cada 10 minutos con los bastones de vidrio.
- Paralelamente, preparar las botellas para el autoclavado. Por cada copa Klason debe prepararse una botella con septa con 112 mL de agua destilada.
- Al cabo de las 2 horas, vaciar las copas en las botellas con septa utilizando esta misma agua para enjuagar hasta que la copa esté limpia.
- Finalmente, sellar las botellas con septa y llevar a autoclave por 60 minutos a 121°C.

#### 6.2.1.4.- Preparación de stock de azúcares

- Pesar las siguientes azúcares en un tubo Falcon de 50 mL y registrar los pesos reales:  
Arabinosa      10 mg



Galactosa	10 mg
Glucosa	200 mg
Xilosa	60 mg
Manosa	60 mg

- Pesar 50 mL de agua nano-pure y registrar peso exacto.
- Agitar y mezclar.

#### 6.2.1.5.- Preparación de estándares

- Para construir las curvas de calibración, es necesario tener distintos estándares:

Tabla 3: Preparación de estándares para Klason

Nombre	Vol stock de azúcar [mL]	Vol ácido al 72% [mL]	Vol agua [mL]
H	30	3	82
M	10	3	102
L	5	3	107
VL	2,5	3	109,5
VVL	1	3	111
VVVL	0,5	3	111,5
VVVVL	0,25	3	111,25

- Mezclar en botellas con septa, sellar y autoclavar junto con las otras muestras.

#### 6.2.1.6.- Filtración

- Después de autoclavar, dejar enfriar las botellas y filtrar el contenido para separar la lignina insoluble en ácido del resto de los componentes (los estándares no necesitan ser filtrados).
- Los filtros a utilizar deben ser de vidrio (30 mL) y porosidad media.
  - Deben limpiarse previamente en baño ácido overnight.
  - Luego, lavar con agua y secar en horno (105°C).
  - Registrar peso seco de cada filtro ya enumerado (se necesitan tantos filtros como muestras hayan).
- Poner el filtro sobre un matraz al vacío y verter el contenido de la botella. Hacer esto para cada pareja botella-filtro.
- Tomar 10 mL de muestra del filtrado en tubo Falcon de 15 mL para posterior análisis.
- Retirar el filtro y dejar secar en horno overnight (105°C).
- Pesar filtros y calcular peso de la lignina insoluble en ácido.

#### 6.2.1.7.- Análisis de lignina soluble en ácido (ASL)

- Medir absorbancia del filtrado a 205 nm. El valor debe estar entre 0,1 y 1. Si es necesario, diluir con ácido al 4%.
- Utilizar ácido al 4% como cero del espectrofotómetro.
- La concentración de lignina soluble en ácido (ASL) queda determinada por la ecuación 6.1.

$$[ASL] = A_{205} * DF * 0,00909 \left[ \frac{g}{L} \right] \quad (6.1)$$

#### 6.2.1.8.- Análisis de azúcares

- Preparar las muestras para análisis en HPLC.
  - Preparar 1 mL para análisis según las indicaciones posteriores para estándares o muestras.
- Usar fucosa como estándar interno.
  - Pesar ~75 mg de fucosa y ~15 mL de agua (registrar pesos exactos).
- Estándares:
  - Mezclar 950 µL de cada estándar con 50 µL de la solución de fucosa.
  - Pasar por filtro de 0,45 µm a viales para HPLC enumerados.
- Muestras:
  - Mezclar 400 µL de muestra con 50 µL de la solución de fucosa y 550 µL de agua nano-pure.
  - Pasar por filtro de 0,45 µm a viales para HPLC enumerados.
- Correr el programa de análisis de azúcares en equipo HPLC Dionex DX 2500 con columna CarboPac PA-1 y detector electroquímico.

#### 6.2.1.9.- Análisis de cenizas

- Pesar un pocillo de cerámica por cada muestra y enumerarlo.
- Pesar ~1,5 g de material seco y molido (malla número 40).
- Llevar a horno por 6 horas a 400°C, enfriar a 105°C y luego a temperatura ambiente en disecador.
- Pesar y calcular el peso de las cenizas.

#### 6.2.2.- Composición química (fracción líquida) – Oligómeros y monómeros

Este método de análisis entrega la cantidad y tipo de azúcar presente en la fracción líquida de la etapa de pretratamiento por medio de una hidrólisis ácida.

##### 6.2.2.1.- Preparación de stock de azúcares

- Pesar las siguientes azúcares en un tubo Falcon de 50 mL y registrar los pesos reales:

Arabinosa	20 mg
Galactosa	40 mg
Glucosa	125 mg
Xilosa	80 mg
Manosa	80 mg
- Pesar 50 mL de agua nano-pure y registrar peso exacto.
- Agitar y mezclar.

##### 6.2.2.2.- Determinación de azúcares totales: Muestras

- El volumen de reacción es de 20 mL en botellas con septa y se realiza en duplicado.
- Agregar a cada botella:

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 72%	0,697 mL
Muestra	5-15 mL (depende de la concentración de azúcares)

Agua destilada 19,303 mL – volumen de muestra

- Sellar cada botella y autoclavar por 60 minutos a 121°C.

#### 6.2.2.3.- Determinación de azúcares totales: Estándares

- Para construir las curvas de calibración, es necesario tener distintos estándares:

Tabla 4: Preparación de estándares para oligómeros

Nombre	Vol stock de azúcar [mL]	Vol ácido al 72% [mL]	Vol agua [mL]
H-O	4	0,697	15,303
M-O	2	0,697	17,303
L-O	1	0,697	18,303
VL-O	0,4	0,697	18,903
VVL-O	0,1	0,697	19,203

- Mezclar en botellas con septa, sellar y autoclavar junto con las otras muestras.

#### 6.2.2.4.- Determinación de azúcares totales: Análisis

- Dejar enfriar las botellas autoclavadas.
- Usar fucosa como estándar interno.
  - Pesar ~100 mg de fucosa y ~25 mL de agua (registrar pesos exactos)
- Estándares:
  - Mezclar 950 µL de cada estándar autoclavado con 50 µL de la solución de fucosa.
  - Pasar por filtro de 0,45 µm a viales para HPLC enumerados.
- Muestras:
  - Mezclar 25 - 300 µL de muestra con 50 µL de la solución de fucosa y agregar agua nano-pure hasta completar 1000 µL.
  - Pasar por filtro de 0,45 µm a viales para HPLC enumerados.
- Correr el programa de análisis de azúcares en equipo HPLC Dionex DX 2500 con columna CarboPac PA-1 y detector electroquímico.

#### 6.2.2.5.- Determinación de monómeros

- Usar fucosa como estándar interno.
  - Pesar ~100 mg de fucosa y ~25 mL de agua (registrar pesos exactos).
- Estándares:

Tabla 5: Preparación de estándares para monómeros

Nombre	Vol stock de azúcar [µL]	Vol ácido al 72% [µL]	Vol agua [µL]
H-M	300	50	650
M-M	100	50	850
L-M	50	50	900
VL-M	20	50	930
VVL-M	10	50	940

- Mezclar en tubos eppendorf.
- Pasar por filtro de 0,45 µm a viales para HPLC enumerados.

- Muestras
  - Mezclar 50 - 300  $\mu\text{L}$  de muestra con 50  $\mu\text{L}$  de la solución de fucosa y agregar agua nano-pure hasta completar 1000  $\mu\text{L}$ .
  - Pasar por filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  a viales para HPLC enumerados.
- Correr el programa de análisis de azúcares en equipo HPLC Dionex DX 2500 con columna CarboPac PA-1 y detector electroquímico.

#### 6.2.2.6.- Determinación de oligómeros

- Restar los monómeros a las azúcares totales.

#### 6.2.3.- Área superficial: Water Retention Value

Este análisis entrega un índice del área superficial del material pretratado basándose en la capacidad de retener agua.

- Pesar  $\sim 0,5$  g en base seca de material pretratado en tubo Falcon de 50 mL. Realizar en duplicados.
- Llenar con 50 mL de agua destilada y dejar overnight a 4°C.
- Filtrar material al vacío en tubo con filtro de malla de 125  $\mu\text{m}$  de poro con doble fondo.
- Centrifugar tubo con filtro de doble fondo a 3.200 rpm (1.300 g) por 30 minutos.
- Pesar platos (aptos para secado en horno) limpios y enumerados. Tantos como muestras se tengan.
- Poner torta húmeda del filtro centrifugado en plato y pesar material.
- Llevar a horno a 105°C y dejar secar overnight.
- Pesar plato con torta seca y calcular el “Water Retention Value” (WRV) según la ecuación 6.2.

$$WRV = \frac{Torta\ húmeda\ [g] - Torta\ seca\ [g]}{Torta\ seca\ [g]} \quad (6.2)$$

#### 6.2.4.- Índice de cristalinidad: FT-IR

Este análisis entrega un índice del grado de cristalinidad (CrI) del material pretratado basándose en la razón entre las estructuras cristalinas y amorfas de la celulosa.

- Pesar  $\sim 0,5$  g en base seca de material pretratado en un vaso con 300 mL de agua.
- Agitar con batidora por 5 minutos para homogenizar.
- Filtrar esta suspensión en filtro de poro 20-25  $\mu\text{m}$  al vacío y dejar torta secar a temperatura ambiente.
- Medir altura de peaks a 1427  $\text{cm}^{-1}$  (cristalino) y a 895  $\text{cm}^{-1}$  (amorfo) en espectrómetro infrarrojo Spectrum One Fourier-transform (FT-IR).
- El índice está dado por la ecuación 6.3.

$$CrI = \frac{Altura_{1427}}{Altura_{895}} \quad (6.3)$$

### 6.2.5.- Grado de polimerización (DP): Viscosidad

Este análisis entrega un índice del grado de polimerización de la celulosa contenida en el material pretratado. Consiste en un blanqueado (designificación) del material, seguido de una disolución de la celulosa y medición de la viscosidad de la solución resultante.

#### 6.2.5.1.- Blanqueado del material pretratado

- Pesarse ~3 g en base seca de material pretratado.
- Preparar solución blanqueadora (para cada muestra).
  - 29,7 mL de agua.
  - 0,3 mL de ácido acético.
  - 1,5 g de NaClO<sub>2</sub>.
- Mezclar ligeramente el material pretratado con la solución blanqueadora.
- Dejar incubar en completa oscuridad por 24 horas a temperatura ambiente.
- Agregar 200 mL de agua.
- Filtrar al vacío utilizando papel filtro.
- Resuspender torta en 500 mL de agua agitando por 10 minutos.
- Repetir filtrado y resuspensión dos veces.
- Almacenar torta de material blanqueado a 4°C para próxima etapa.

#### 6.2.5.2.- Disolución de material blanqueado

- Pesarse 0,25 g en base seca de material blanqueado en botella con septa.
- Agregar 25 mL de cuprietilendiamina 1 M (CED).
- Agitar en "shaker" por 45 – 90 minutos a temperatura ambiente hasta ver que el material está homogéneamente disuelto. Si a los 90 minutos existen fibras visibles, filtrar al vacío con filtro de fibra de vidrio.

#### 6.2.5.3.- Medición de viscosidad

- En un baño termorregulado a 25°C se carga el viscosímetro de capilar de vidrio con 6 mL de la solución de material blanqueado y CED.

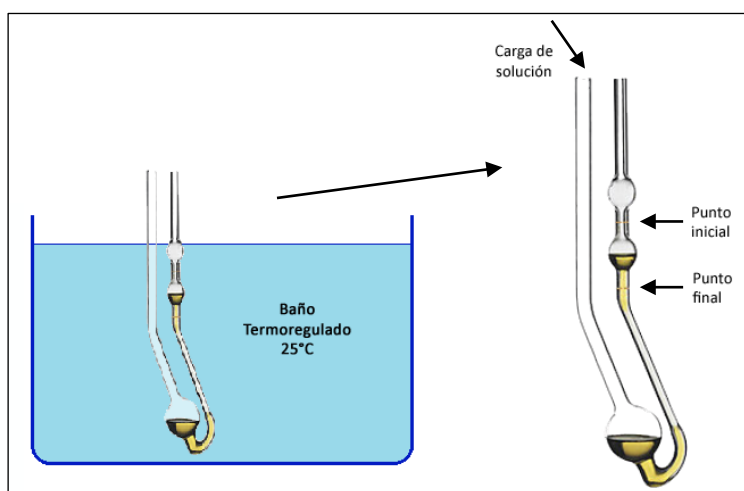


Figura 6: Esquema de la medición con viscosímetro de capilar

- Se toma el tiempo que tarda en pasar el líquido entre el punto inicial y final 5 veces (Figura 6), se promedian ( $t$ ) y se calcula la viscosidad  $\mu$  según la ecuación 6.4.

$$\mu[\text{cp}] = 0,0978 * t[\text{s}] * 1,052 \quad (6.4)$$

#### 6.2.6.- Longitud de fibra: FQA

Este análisis entrega un promedio estadístico del largo y ancho de las fibras lignocelulósicas del material pretratado basado en un muestreo de 8.000 a 10.000 fibras.

- Poner ~0,5 g de material pretratado en 500 mL de agua.
- Agitar con batidora para homogenizar por unos 10 minutos.
- Correr suspensión en equipo High Resolution Fiber Quality Analyser LDA02 de OpTest Equipment, Inc., que entrega directamente el promedio estadístico del largo y ancho de las fibras en micrones.

#### 6.2.7.- Accesibilidad enzimática: Simons' Stain

El análisis de Simons' Stain (SS) entrega un valor de adsorción de tinturas de distintos tamaños (azul: pequeña; naranja: tamaño de la celulasa, mayor afinidad a la celulosa que la azul) al material pretratado, lo que indica la accesibilidad enzimática que tiene este material.

##### 6.2.7.1.- Preparación de las muestras

- Pesar 0,01 g en base seca de cada material pretratado en 6 tubos de 1,5 mL.
- Agregar agua destilada, PBS (solución buffer fosfato: pH 6, 0,3M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,4mM NaCl), tinturas: "Direct Blue 1" (DB) y "Direct Orange 15" (DO) a cada tubo según la Tabla 5.

Tabla 6: Preparación de los tubos para SS para cada material

	1	2	3	4	5	6
Agua [mL]	0,85	0,8	0,75	0,7	0,6	0,5
PBS [mL]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DO (10 mg/mL) [mL]	0,025	0,05	0,075	0,1	0,15	0,2
DB (10 mg/mL) [mL]	0,025	0,05	0,075	0,1	0,15	0,2

- Incubar tubos a 70°C y 200 rpm overnight.
- Centrifugar tubos a 13.000 rpm (13.200 g) por 10 minutos.
- Guardar sobrenadante en tubos de 1 mL.

##### 6.2.7.2.- Medición de muestras y coeficiente de extinción

- Preparar diluciones con el sobrenadante según Tabla 6 para medición de absorbancia.
- Cargar cubetas con 1 mL de las diluciones preparadas y medir absorbancia en espectrofotómetro a 450 nm y a 625 nm.

Tabla 7: Dilución de muestras para medición de absorbancia

	1	2	3	4	5	6
Factor dilución	5	10	20	50	100	100
Agua [ $\mu\text{L}$ ]	800	900	950	980	990	990
Sobrenadante [ $\mu\text{L}$ ]	200	100	50	20	10	10

- Determinar el coeficiente de extinción  $\varepsilon$  para cada tintura según la ecuación 6.5, donde  $I_0$  corresponde a la intensidad de la luz incidente,  $I$  es la intensidad de luz transmitida,  $l$  es el largo del paso de luz y  $c$  es la concentración molar (Ley de Lambert-Beer)<sup>(32)</sup>.

$$\frac{I}{I_0} = 10^{\varepsilon lc} \quad (6.5)$$

### 6.2.7.3.- Cálculo de adsorción

- Resolviendo las ecuaciones 6.6 y 6.7 simultáneamente (donde  $A$  es la absorbancia y  $\varepsilon \left[ \frac{\text{mL}}{\text{g cm}} \right]$  es el coeficiente de extinción a cada longitud de onda y  $L$  (1 cm en este caso, es el largo del paso del haz de luz) se obtienen la concentración de tintura azul ( $C_B$ ) y naranja ( $C_O$ ) en la cubeta<sup>(32)</sup> en gramos por mL de muestra diluida.

$$A_{450} = \varepsilon_{O_{450}} LC_O + \varepsilon_{B_{450}} LC_B \quad (6.6)$$

$$A_{625} = \varepsilon_{O_{625}} LC_O + \varepsilon_{B_{625}} LC_B \quad (6.7)$$

- Multiplicar  $C_B \left[ \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right]$  y  $C_O \left[ \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right]$  por el factor de dilución de la Tabla 6. Esto corresponde a la concentración de tintura en el sobrenadante en gramos por mL. Como la cantidad de solución preparada en la Tabla 5 es 1 mL, se obtienen también los gramos de tintura totales en el sobrenadante.
- Calcular los gramos de tintura agregado inicialmente a partir de la concentración nominal de éstos y el volumen agregado.
- Calcular los gramos adsorbidos de tintura en el material balanceando los gramos iniciales con los gramos en el sobrenadante.
- Calcular máxima adsorción según la ecuación 6.8, donde  $[C]$  (mg/mL) es la concentración de tintura libre (en el sobrenadante) en el equilibrio,  $[A]$  (mg tintura/mg sustrato) es la cantidad de tintura adsorbida por el material y  $K_{Ads}$  una constante.  $[A]_{m\acute{a}x}$  corresponde al máximo de tintura adsorbido y puede calcularse para azul o naranja por separado<sup>(32)</sup>.

$$\frac{[C]}{[A]} = \frac{1}{K_{Ads}[A]_{m\acute{a}x}} + \frac{[C]}{[A]_{m\acute{a}x}} \quad (6.8)$$

- Calcular la razón entre tinte naranja y azul adsorbida en el material para comparar porosidad y accesibilidad enzimática entre distintos materiales según ecuación 6.9.

$$SS_{O/B} = \frac{[A]_{m\acute{a}x_{DO}}}{[A]_{m\acute{a}x_{DB}}} \quad (6.9)$$

### 6.3.- Hidrólisis enzimática

Todas las hidrólisis fueron llevadas a cabo en buffer acetato 50 mM a pH 4,8, en un shaker a 150 rpm y 50°C por 72 horas. Se muestrearon 250 µL, se inactivó a 100°C por 20 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm (13.200 g) por 10 minutos. Se tomaron 100 µL del sobrenadante, se agregaron 50 µL de solución de fucosa (5 mg fucosa/mL agua destilada) como estándar interno y 850 µL de agua destilada. Se filtro por 0,45 µm y se prepararon los viales para HPLC. Estos se almacenaron a -20°C hasta ser analizados.

#### 6.3.1.- Consistencia al 2% de sólidos

Esta hidrólisis contiene un 2% de sólidos, es decir, 0,6 g en base seca de material pretratado para un volumen total de reacción de 30 mL. La concentración de enzimas es de 10 FPU y 20 CBU por gramo de celulosa.

#### 6.3.2.- Consistencia al 10% de sólidos

Esta hidrólisis contiene un 10% de sólidos, es decir, 3,0 g en base seca de material pretratado para un volumen total de reacción de 30 mL. La concentración de enzimas es de 10 FPU y 20 CBU por gramo de celulosa.

#### 6.3.1.- Consistencia al 10% de glucosa

Esta hidrólisis contiene un 10% de glucosa, calculados a partir de 3,0 g en base seca de eucalipto pretratado por organosolv (material con mayor contenido de glucosa: 90,2%), es decir, todas las hidrólisis contienen 2,71 g en base seca de glucosa. El volumen de reacción está calculado a partir del peso en base seca de material pretratado para que este sea al 10% de consistencia (Tabla 7). La concentración de enzimas es de 10 FPU y 20 CBU por gramo de celulosa.

**Tabla 8: Pesos de material agregados a cada hidrólisis y volumen de reacción total.**

Material		Glucosa (%)	Peso seco glucosa (g)	Peso seco material (g)	Volumen de reacción (mL)
Eucalipto	SE	57,0	2,71	4,76	47,6
	OS	90,2	2,71	3,00	30,0
	IL	42,4	2,71	6,39	63,9
Álamo	SE	58,1	2,71	4,67	46,7
	OS	77,8	2,71	3,48	34,8



# Capítulo III

---

## Resultados y Discusión

---

### 7.- *Resultados y Discusión*

Los primeros resultados que se presentan corresponden al análisis de composición química del material con y sin pretratamiento para tener una mejor comprensión del comportamiento de éstos en la hidrólisis.

Posteriormente, se presentan los resultados como una relación entre cada propiedad física del material pretratado y la conversión de glucosa alcanzada en cada hidrólisis enzimática. Esto, con el fin de correlacionarlos.

#### 7.1.- **Composición química de la biomasa**

La biomasa (fracción sólida) se analizó utilizando el método de Klason descrito en la sección 6.2.1. En el caso del eucalipto, se realizó para biomasa pretratada por explosión a vapor (SE), organosolv (OS), emimCl (IL) y sin pretratar (S/P). En el caso del álamo, se realizó para biomasa pretratada por explosión a vapor (SE), organosolv (OS) y sin pretratar (S/P).

Además, se analizó la presencia de monómeros y oligómeros en la fracción líquida obtenida del pretratamiento para eucalipto y álamo por explosión a vapor y organosolv según el método descrito en la sección 6.2.2.

##### 7.1.1.- *Fracción sólida*

###### 7.1.1.1.- *Eucalipto*

En la Tabla 8 se presenta una comparación con datos de la literatura a modo de validación del método y, por lo tanto, de los resultados obtenidos de la medición de azúcares y lignina por Klason. Esta validación es necesaria para identificar resultados que presenten un comportamiento que se desvíe de lo esperado y entender el motivo. La lignina ahí presentada corresponde a la suma de AIL y ASL, la hemicelulosa es la suma de los azúcares, excepto por la glucosa que corresponde a la celulosa. A pesar de que la hemicelulosa contiene glucosa, no se considera en la suma debido a que la celulosa está constituida solo por glucosa, por lo tanto, por simplicidad se le asigna el valor completo. De esta tabla se concluye que los valores obtenidos son similares a los de otros estudios, por lo que la composición del eucalipto será considerada válida.

En la Tabla 9 se presentan a modo de validación del efecto de los pretratamiento SE y OS los valores de la composición química del *Eucaliptus globulus* obtenidos por el método de Klason y

se compara con un estudio de la composición química del *Pinus contorta* (pino), ambos pretratados bajo condiciones similares por SE y OS. Se puede ver que, tanto para el eucalipto como para el pino pretratado por OS, se tiene el máximo de recuperación de celulosa y el mínimo de lignina, mientras que para el SE se tiene el mínimo de hemicelulosa. Esto indica que los pretratamientos actuaron de acuerdo a lo esperado.

Además, en la Tabla 9 se puede ver que el eucalipto pretratado por OS presenta el máximo contenido de glucosa (90,12%), esto debido a que este pretratamiento busca disolver principalmente la lignina (4,38%)<sup>3</sup> y en segundo lugar, la hemicelulosa<sup>(23)</sup> (6,21%)<sup>4</sup>. Más aun, si se compara con lo obtenido por SE, se puede ver que efectivamente el OS es el que extrae más lignina. Mientras que, en el caso del eucalipto pretratado por SE, se espera que la hemicelulosa sea removida<sup>(14; 28)</sup>, teniéndose en este caso valores incluso menor a la hemicelulosa presente en el OS (4,46%)<sup>5</sup>, lo que es consistente con la teoría. En la Tabla 10 se puede ver un resumen de la composición de lignina, hemicelulosa y celulosa.

**Tabla 9: Comparación de estudios de composición química para *Eucalyptus globulus* sin pretratar.**

Componente	Klason <sup>6</sup>	Stackpole et al <sup>(33)</sup>	Rencoret et al <sup>(34)</sup>	Area et al <sup>(35)</sup>
Lignina	25,1%	20,5%	24,5%	23,9%
Hemicelulosa	17,5%	25,3%	20,4%	24,2%
Celulosa	43,4%	43,4%	46,1%	42,5%

**Tabla 10: Comparación de estudios de la composición química de material pretratado por SE y OS.**

Componente	Explosión a vapor (SE)		Organosolv (OS)	
	Klason <sup>7</sup>	Chandra et al <sup>(36)</sup>	Klason	Chandra et al <sup>(36)</sup>
	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Pinus contorta</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Pinus contorta</i>
Lignina	32%	47%	4%	21%
Hemicelulosa	5%	1%	6%	4%
Celulosa	57%	54%	90%	78%

**Tabla 11: Composición de lignina, hemicelulosa y celulosa del eucalipto pretratado por SE, OS e IL.**

Componente	SE	OS	IL	S/P
Lignina (%)	31,7 ± 0,7	4,4 ± 0,9	29,4 ± 1,2	25,1 ± 1,4
Hemicelulosa (%)	4,5 ± 0,4	6,2 ± 2,8	16,3 ± 0,6	17,5 ± 0,5
Celulosa (%)	56,9 ± 1,7	90,1 ± 6,5	42,4 ± 1,7	43,4 ± 1,3

<sup>3</sup> Correspondiente a la suma de AIL y ASL presente en el material luego de ser pretratado por OS.

<sup>4</sup> Correspondiente a la suma de arabinosa, galactosa, xilosa y manosa presente en el material luego de ser pretratado por OS.

<sup>5</sup> Correspondiente a la suma de arabinosa, galactosa, xilosa y manosa presente en el material luego de ser pretratado por SE.

<sup>6</sup> Resultados obtenidos por el método de Klason en el presente trabajo para eucalipto S/P (sin pretratar).

<sup>7</sup> Resultados obtenidos por el método de Klason en el presente trabajo para eucalipto pretratado por SE y OS.

En el Gráfico 1 se puede apreciar la composición química resultante del análisis por el método Klason para eucalipto (Anexo A). Los azúcares que ahí se muestran corresponden a los principales presentes en la biomasa, donde la arabinosa, galactosa, xilosa y manosa provienen de la hemicelulosa y la glucosa principalmente de la celulosa<sup>(9)</sup>. También está el contenido de lignina insoluble en ácido (AIL) y lignina soluble en ácido (ASL).

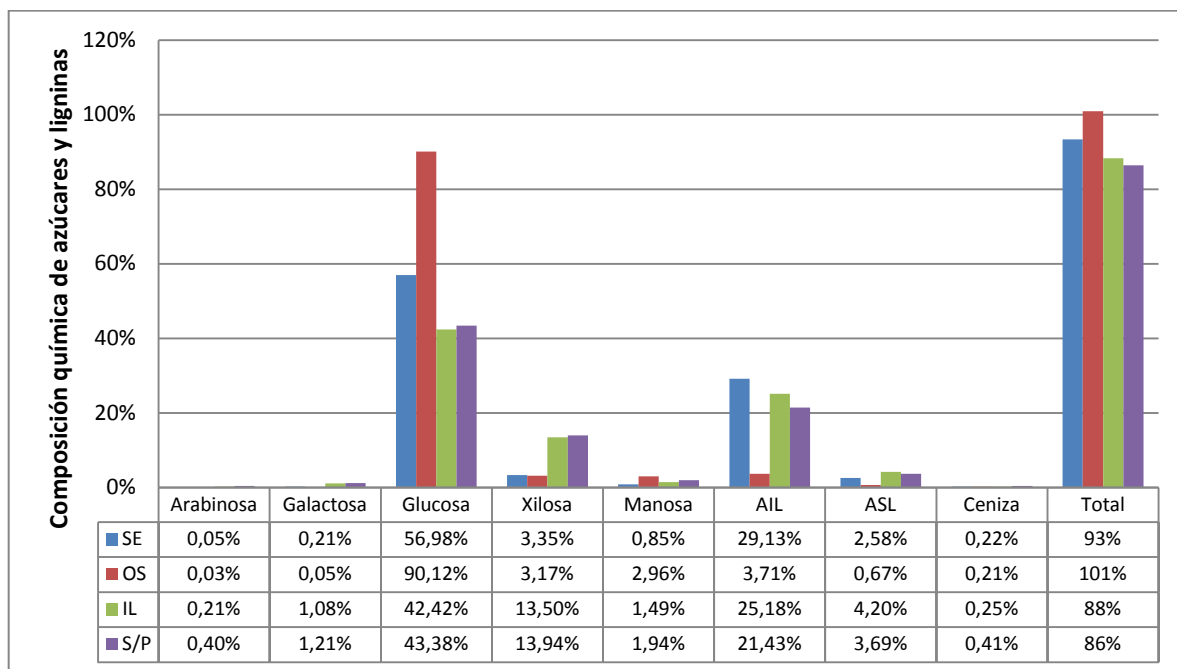


Gráfico 1: Composición química del eucalipto pretratado por SE, OS, IL y sin pretratar (S/P)

Por otro lado, al material pretratado por IL se espera que se afecte su estructura cristalina y no necesariamente su composición química<sup>(22)</sup>. En este caso, se puede ver en el Gráfico 1 que la composición química del IL y S/P son prácticamente iguales. Esto indica que el material no ha sufrido cambios de composición química. Los cambios en su estructura cristalina se estudiarán más adelante.

Para el caso del eucalipto, el balance de masa se presenta en las columnas “Total” del Gráfico 1. En el caso de SE y OS resulta ser razonable para el método (>90%), sin embargo, para IL y S/P se tiene un balance menor a 90% (88% y 86%, respectivamente). Esto podría deberse a algún componente del eucalipto que no esté siendo captado por el método y que no esté presente en la fracción sólida del material pretratado por SE y OS. Debido a que la medición de extraíbles resultó menor al 1%, estos se consideran despreciables. Un componente que podría cumplir con estas condiciones y completar el balance es el ácido urónico, el cual corresponde aproximadamente al 6% de la composición del *Eucalyptus globulus*<sup>(34)</sup>. Además, forma parte de la hemicelulosa y se auto-hidroliza a temperaturas superiores a los 150°C<sup>(37)</sup>, por lo que pasaría a la fracción líquida en SE y OS. En consecuencia, el ácido urónico podría ser una posible explicación para ajustar el balance.

### 7.1.1.2.- Álamo

En la Tabla 11 se presentan valores de composición química que se encuentran en la literatura. Se puede ver que la composición obtenida por Klason resulta similar a las que se han obtenido en estudios previos<sup>(38; 39; 40)</sup>, donde la lignina corresponde a la suma de AIL y ASL, la celulosa corresponde a la glucosa y la hemicelulosa es la suma de las otras azúcares, lo que permite validar estos resultados.

**Tabla 12: Comparación de estudios de composición química para *Populus canadensis* sin pretratar.**

Componente	Klason <sup>8</sup>	Reiniati <sup>(38)</sup>	Huang et al <sup>(39)</sup>	Weil et al <sup>(40)</sup>
Lignina	24,4%	17-25%	27,2%	22,7%
Hemicelulosa	17,2%	15-35%	19,6%	17,2%
Celulosa	47,6%	40-45%	43,7%	38,3%

En la Tabla 12 es interesante observar que nuevamente, al igual que en el caso del eucalipto, es el OS el que obtiene el mayor contenido de glucosa (77,82%) y el menor de lignina (8,39%)<sup>9</sup>. Mientras que, para el SE, se obtiene el menor valor de hemicelulosa (SE: 7,21%; OS: 8,52%)<sup>10</sup>. Estos valores permiten suponer que los pretratamientos fueron efectivos ya que para el SE se espera que tenga una extracción principalmente de hemicelulosa<sup>(14; 28)</sup>, mientras que para el OS, se espera una mayor remoción de lignina<sup>(23)</sup>.

**Tabla 13: Composición de lignina, hemicelulosa y celulosa del álamo pretratado por SE y OS.**

Componente	SE	OS	S/P <sup>11</sup>
Lignina (%)	30,6 ± 1,2	8,4 ± 1,4	24,4
Hemicelulosa (%)	7,2 ± 0,5	8,5 ± 0,7	17,2
Celulosa (%)	58,1 ± 0,6	77,8 ± 0,5	47,6

En el Gráfico 2 se presenta el detalle de la composición química para el álamo resultante del análisis por el método Klason (Anexo A). Al igual que para el eucalipto, se midieron las principales azúcares y la lignina tanto soluble como insoluble en ácido.

La columna "Total" presente en el Gráfico 2 corresponde al balance de masa para el álamo y para este método, debiese ser mayor a un 90%. El caso del álamo sin pretratar (S/P) queda muy ajustado, sin embargo, como se discutió para el eucalipto, también existe ácido urónico en el álamo que corresponde aproximadamente a un 4% de la composición<sup>(41)</sup>, lo que permitiría alcanzar un balance más completo, pues en este caso, los extraíbles también resultaron menores al 1%.

<sup>8</sup> Resultados obtenidos por el método de Klason en el presente trabajo para álamo S/P (sin pretratar).

<sup>9</sup> Correspondiente a la suma de AIL y ASL presente en el material luego de ser pretratado por OS.

<sup>10</sup> Correspondiente a la suma de arabinosa, galactosa, xilosa y manosa presente en el material luego de ser pretratado por SE y OS respectivamente.

<sup>11</sup> El error de la medición de la composición del álamo sin pretratar es desconocido.

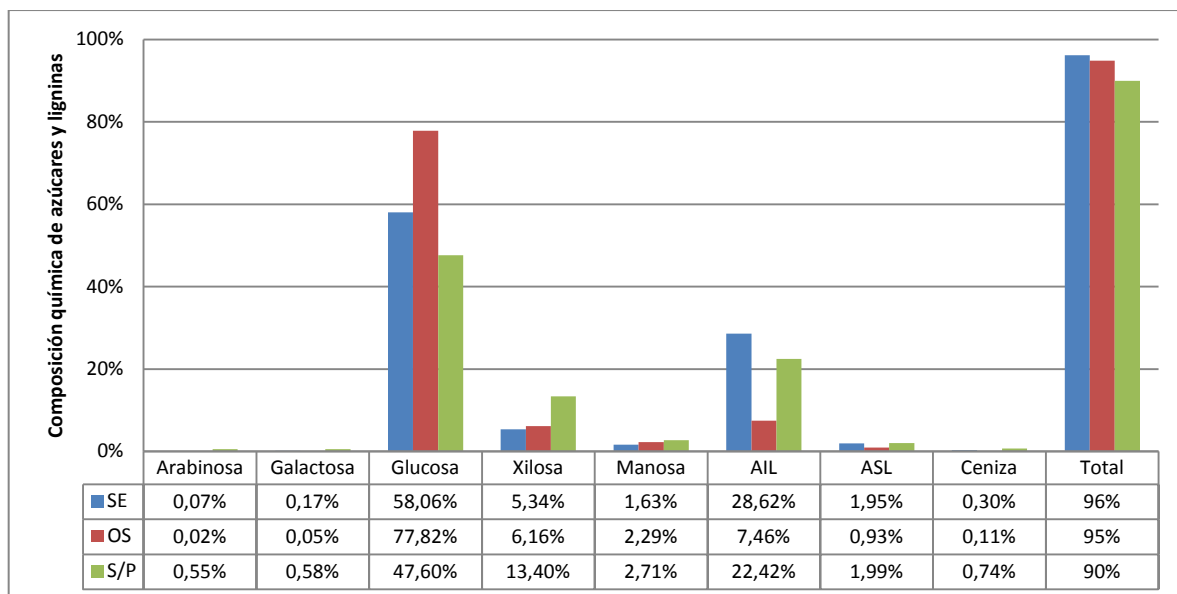


Gráfico 2: Composición química del álamo pretratado por SE, OS y sin pretratar (S/P)

### 7.1.2.- Fracción líquida

El análisis de la composición química de la fracción líquida consiste en cuantificar la presencia de azúcares que fue analizada por el método de oligómeros y monómeros según la descripción en la sección 6.2.2. para ambos materiales pretratados por SE y OS. Esta composición se presenta como la concentración en gramos de azúcar por cada gramo de líquido obtenido, pues una composición porcentual no entrega mayor información. Cabe destacar que esta fracción líquida es generada en el pretratamiento de 100 gramos en base seca de biomasa, por lo que se puede aproximar a gramos de azúcares por cada 100 gramos de biomasa. Sin embargo, hay que tener en mente el rendimiento<sup>12</sup> del pretratamiento, que para este estudio, en el caso del SE es del orden del 60% y en el OS del orden del 40% para ambos tipos de residuos, lo que indica que el OS remueve más componentes del material y para saber cuáles es necesario un análisis químico.

En el Gráfico 3 se puede observar la concentración de monómeros (3A) y oligómeros (3B) presentes en la fracción líquida del eucalipto pretratado. En el caso de los monómeros, se ve que la glucosa y la xilosa son los de mayor presencia, lo que es de esperar, puesto que son los dos monómeros más abundantes en la biomasa. Sin embargo, se ve que hay cantidades de arabinosa y galactosa en porcentajes no despreciables, pues son fácilmente hidrolizables. Esto explica por qué son tan bajos los valores de estas azúcares en la fracción sólida (Gráfico 1).

En relación a los oligómeros, las concentraciones son bastante bajas, a excepción de la xilosa, la cual se destaca por sobre las otras, en especial para SE. Esto se debe a que oligómeros que contienen xilosa son el principal componente de la hemicelulosa<sup>(9)</sup> y el SE busca extraer la

<sup>12</sup> El rendimiento se mide como el porcentaje de peso de material pretratado obtenido (fracción sólida) por cada gramo de biomasa inicial. Que sea bajo su valor no necesariamente significa que sea malo, más bien, significa que el pretratamiento está removiendo y solubilizando lignina, hemicelulosa o celulosa.

hemicelulosa<sup>(22)</sup>. Esto provoca una inversión de tendencia entre monómeros, donde los máximos corresponden al OS y oligómeros, donde los máximos corresponden a SE.

Para el caso del álamo (Gráfico 4, izquierda), se tiene un comportamiento similar al caso del eucalipto en cuanto a los tipos de azúcares presentes. Sin embargo, se invierte la tendencia, es decir, para cada monómero es mayor su valor para SE que para OS. Esto tiene directa relación con el tamaño de los chips de cada material. Al ser los chips de eucalipto más pequeños y uniformes (1 – 2 mm) el OS es capaz de solubilizar más azúcares que el SE, mientras que con chips más grandes (1 – 30 mm), el SE solubiliza más azúcares, ya que el OS es altamente sensible al tamaño de la biomasa<sup>(23)</sup>.

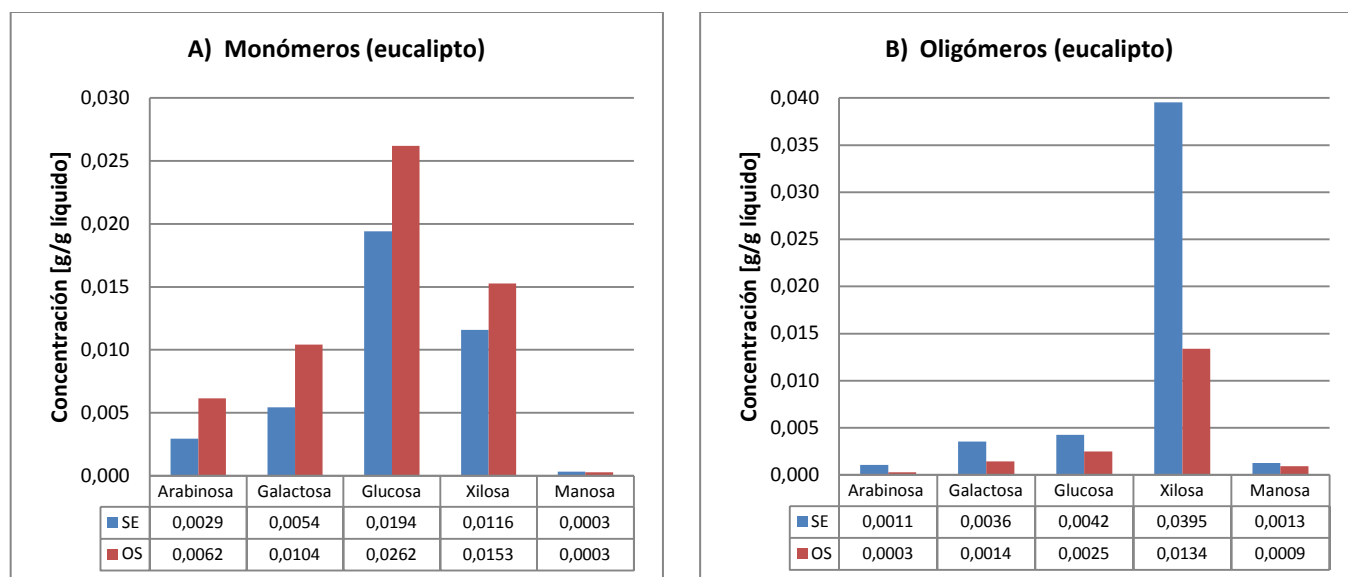


Gráfico 3: Presencia de azúcares en la fracción líquida del eucalipto pretratado por SE y OS.

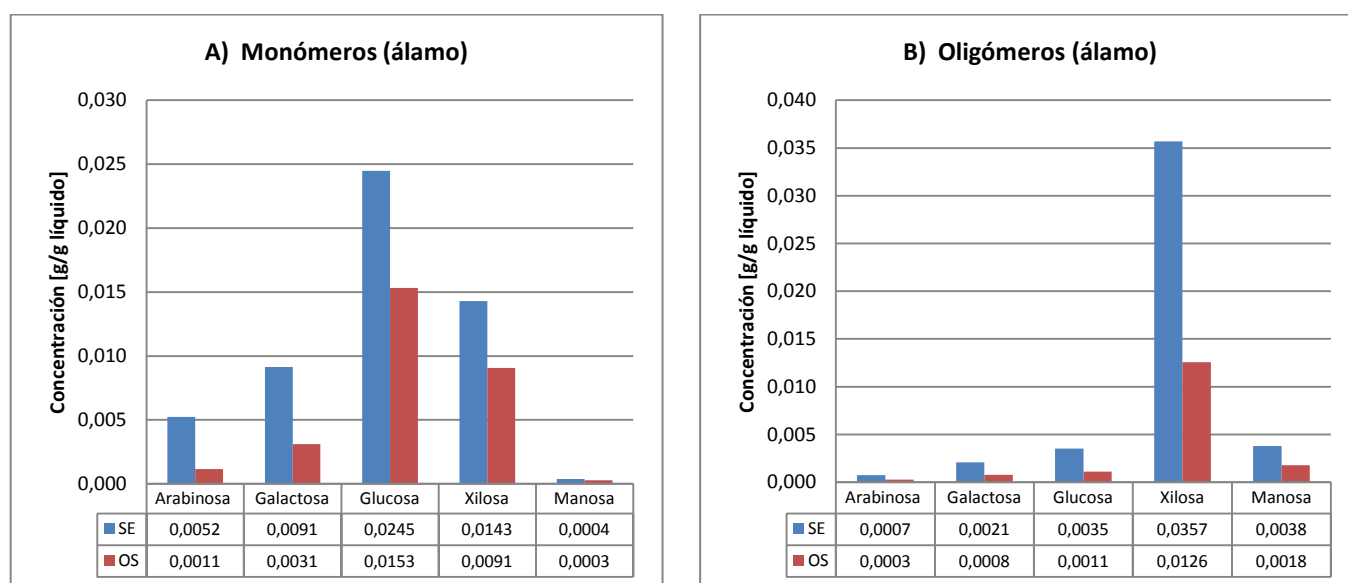


Gráfico 4: Presencia de azúcares en la fracción líquida del álamo pretratado por SE y OS.

En el caso de los oligómeros (Gráfico 4, derecha) se ve una tendencia muy similar a la obtenida en el caso del eucalipto, donde claramente se observa que el principal componente es la xilosa, especialmente para SE. Además, al contrario de lo observado en el Gráfico 3, SE tiene valores mayores que OS tanto en monómeros como en oligómeros.

En general, en todos los casos se tiene que la concentración de azúcares es menor a 0,03 g/g líquido, lo que significa que los métodos solubilizan alrededor de un 50% de las azúcares totales, donde la mayor parte corresponde a azúcares derivadas de la hemicelulosa, manteniendo la mayor parte de la celulosa, por lo que tienen una baja pérdida de sustrato (Anexo B).

## 7.2.- Propiedades físicas y conversión de glucosa

La conversión de glucosa presentada en los siguientes resultados de esta sección corresponde a la glucosa liberada al medio por la hidrólisis enzimática a partir del contenido de glucosa en la fracción sólida del material pretratado en forma de polímero según la ecuación 7.1. Esta conversión se presenta para las tres condiciones de hidrólisis en la Tabla 13. La hidrólisis al 2% sólidos busca medir la calidad del material pretratado en condiciones favorables a la transferencia de masa, la hidrólisis al 10% sólido busca medir la productividad en un medio saturado de sustrato y la hidrólisis al 10% glucosa busca medir si hay algún efecto favorable por parte de los restos de lignina y hemicelulosa cuando se tiene igual cantidad de sustrato disponible.

$$\text{Conversión (\%)} = \frac{\text{gramos liberados al medio}}{\text{gramos disponibles en material pretratado}} * 100\% \quad (7.1)$$

Si se compara la composición química inicial del eucalipto y del álamo (Tabla 10 y Tabla 12) se esperarían resultados similares luego del pretratamiento y, en consecuencia, valores de conversión parecidos. Sin embargo, debido a que el contenido de glucosa del material pretratado resulta diferente en todos ellos, la glucosa inicial en la hidrólisis dependerá del pretratamiento (Tabla 13). En particular, si se compara por pretratamiento, para SE se tiene prácticamente la misma composición de glucosa para eucalipto y álamo, pero para OS se tiene una diferencia de un 12%. Esta diferencia se debe principalmente al tamaño de chip utilizado<sup>13</sup>, lo que significa que el OS es más sensible que el SE a esta variable<sup>(28)</sup>.

Tabla 14: Conversiones de glucosa obtenidas para cada hidrólisis<sup>14</sup> para los distintos residuos pretratados por SE, OS e IL.

Residuo	Pretratamiento	Glucosa inicial <sup>15</sup> [g/g mat]	Conversión de glucosa a las 72 horas (liberación al medio)		
			2% sólidos	10% sólidos	10% glucosa
Eucalipto	SE	0,57	71,9%	47,7%	47,8%
	OS	0,90	82,3%	46,4%	48,3%
	IL	0,42	5,2%	9,8%	5,7%
Álamo	SE	0,58	60,9	34,5%	32,7%

<sup>13</sup> Chips de eucalipto: 1 – 2 mm; Chips de álamo: 1 – 30 mm.

<sup>14</sup> Las hidrólisis al 2% y 10% sólidos corresponde al porcentaje de material pretratado en base seca presente en el medio. La hidrólisis al 10% glucosa corresponde al porcentaje de glucosa disponible en el medio.

<sup>15</sup> Glucosa contenida por el material en estado de polímeros y oligómeros.

Debido a que los valores obtenidos para IL fueron muy bajos (Tabla 13), probablemente por condiciones de pretratamiento subóptimas<sup>16</sup>, se presentan dos gráficos para cada propiedad física medida en eucalipto: el primero presenta los valores para SE, OS e IL; el segundo presenta el comportamiento para SE y OS, excluyendo los valores de IL. Para el caso del álamo no hubo pretratamiento con IL, por lo que se presenta en un solo gráfico lo obtenido por SE y OS.

### 7.2.1.- Área superficial

El área superficial fue estimado a partir del “water retention value” (WRV). En teoría, el área superficial influye en la cantidad de sitios iniciales de reacción para las celulasas<sup>(28; 36)</sup>. Por lo que a mayor área superficial, se debería esperar una mayor tasa de hidrólisis.

Como se mencionó anteriormente, el IL no presenta información relevante debido a las condiciones utilizadas (Gráfico 5). Por esta razón, en el Gráfico 6 se presenta la conversión en función del área superficial para materiales pretratados con SE y OS.

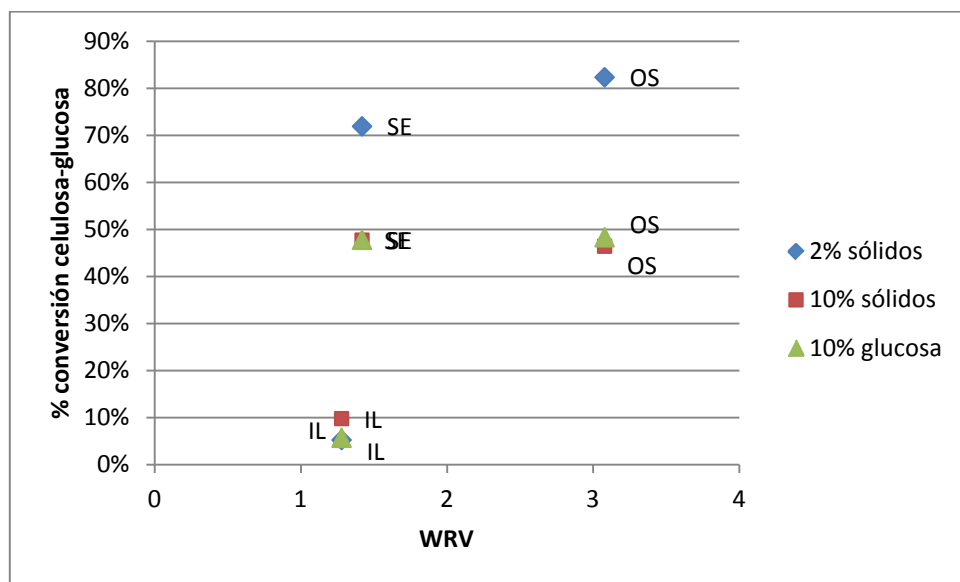


Gráfico 5: Water retention value (WRV) para eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

En el Gráfico 6 y Gráfico 7 se puede observar para la hidrólisis al 2% sólidos que existe un claro efecto entre el WRV y su conversión. A mayor WRV, mayor conversión obtenida. Sin embargo, no se aprecia lo mismo para el caso de 10% sólidos y 10% glucosa.

<sup>16</sup> El líquido iónico utilizado presentaba un grado de pureza inferior al utilizado anteriormente en estudio de Juri<sup>(17)</sup>, de donde se obtuvo las condiciones óptimas para el pretratamiento a pequeña escala. Estas condiciones fueron adaptadas para realizarse a una escala mayor, generándose problemas de escalamientos, principalmente por falta de agitación.



Según lo observado en el laboratorio al momento de realizar la hidrólisis, el material presentaba un aspecto esponjoso, con una gran capacidad para absorber agua, lo que en alta concentración (10% sólidos/glucosa) dejaba a la hidrólisis enzimática sin medio para transportar a las enzimas. Este efecto no se aprecia a baja concentración (2% sólidos) pues hay suficiente líquido para empapar el material y actuar como medio de transporte de enzimas. Se ha estudiado <sup>(29; 30)</sup> que consistencias de hasta un 5% no presentan problemas de transferencia de masa, sin embargo, cuando se supera el 8%, ésta comienza a afectar, haciendo la hidrólisis más lenta y con menor conversión final <sup>(29; 30)</sup>. Más aún, se espera que la agitación a altas consistencias, en conjunto con la acción enzimática, sea suficiente para licuar la pulpa al cabo de un tiempo (2 – 28 horas) y así mejorar la transferencia <sup>(30)</sup>, lo que no fue observado en las 72 horas de hidrólisis. Por lo tanto, la disminución de conversión en las hidrólisis al 10%, respecto a las al 2%, se debe a una limitación en la transferencia de masa por convección, debido a que no hay un medio líquido suficiente que sea capaz de transportar las enzimas. Este efecto ha sido observado también en otros estudios <sup>(29; 30)</sup>.

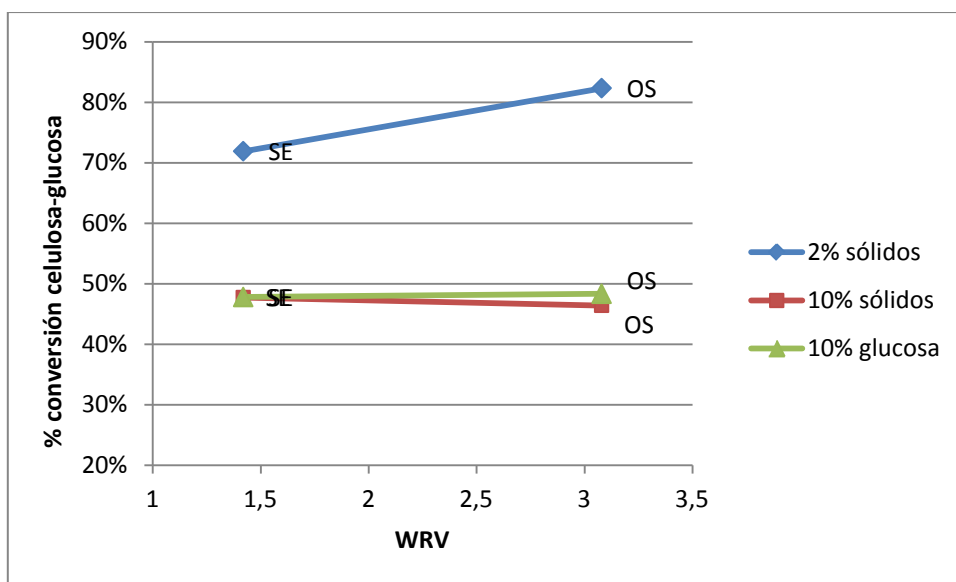


Gráfico 6: Water retention value (WRV) para eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

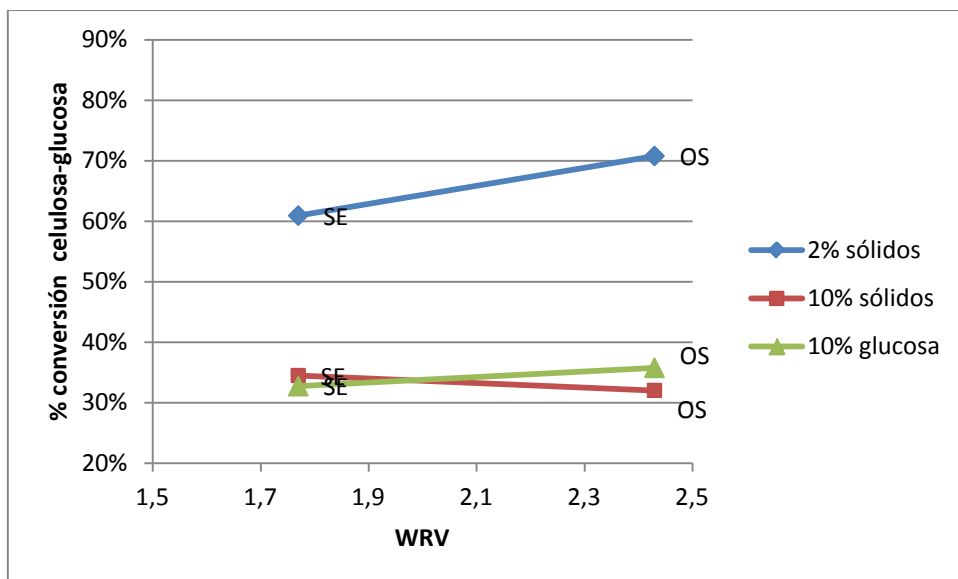


Gráfico 7: Water retention value (WRV) para álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

En general, se puede decir que el material pretratado por OS presenta mayor área superficial que SE e IL, logrando una conversión de glucosa ~10% mayor cuando se trabaja con una consistencia al 2% sólidos (Anexo C). Este comportamiento es el mismo para ambos residuos, sin embargo, es importante notar que a pesar de que el eucalipto pretratado por SE y el álamo pretratado por OS tienen conversiones muy similares, su WRV es distinto (Gráfico 8). Esto indica que la conversión alcanzada no depende únicamente de esta propiedad, sino más bien presenta una baja sensibilidad al WRV, como se ha visto en algunos estudios realizados para *Pseudotsuga menziesii* <sup>(28)</sup> y *Pinus contorta* <sup>(36)</sup>. Más aun, la diferencia de tamaños del chip utilizado es la explicación más probable de la diferencia de WRV, y por tanto, de área superficial.

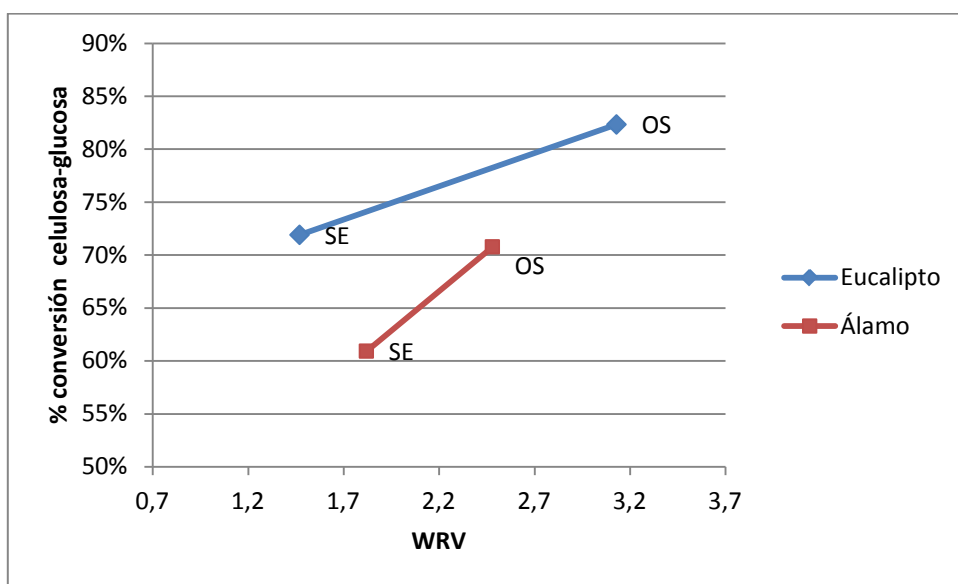


Gráfico 8: Comparación del WRV para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos).

### 7.2.2.- Índice de cristalinidad

El índice de cristalinidad (CrI) se determina según el método descrito en la sección 6.2.4. e indica el grado de cristalinidad que tiene la estructura de la celulosa, siendo más cristalina para valores mayores. Si  $CrI = 1$ , implica que la celulosa tiene igual cantidad de zonas amorfas y cristalinas en su estructura. Teóricamente se entiende que mientras más amorfa sea la estructura, es decir, mientras menor sea el valor del CrI, se puede alcanzar una mayor hidrólisis. Sin embargo, existe un gran debate en si esto es cierto o no, pues los estudios que se han realizado hasta ahora para determinar esto afectan también el área superficial o el grado de polimerización<sup>(28; 42)</sup>.

En el Gráfico 9 nuevamente se aprecia que el material pretratado por IL presenta valores que no resultan interesantes en cuanto a conversión. Además, su valor de CrI es mayor a uno, lo que también indica que el pretratamiento IL, en las condiciones que se realizó, no es efectivo, reafirmando los bajos niveles de conversión de glucosa (<10%).

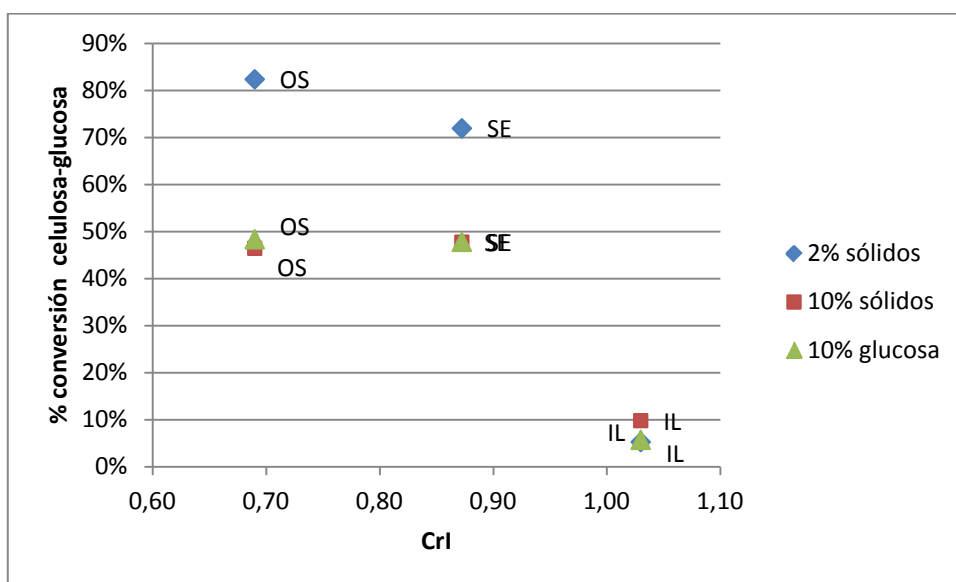


Gráfico 9: Índice de cristalinidad para eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

Si se centra la atención en el material pretratado por SE y OS (Gráfico 10 y Gráfico 11) se puede observar que existe una relación entre CrI y el porcentaje de conversión apreciable para 2% sólidos. En el caso de las hidrólisis al 10% sólidos y 10% glucosa se tiene nuevamente un comportamiento similar, donde no se distingue diferencia para los distintos CrI. Esto se debe al problema de transferencia de masa discutido en la sección anterior (7.2.1).

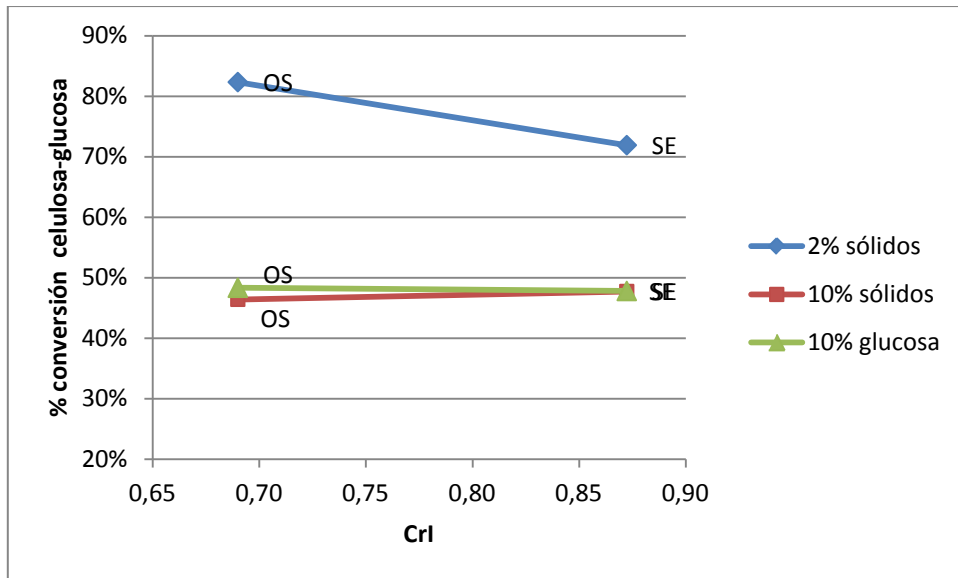


Gráfico 10: Índice de cristalinidad para eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

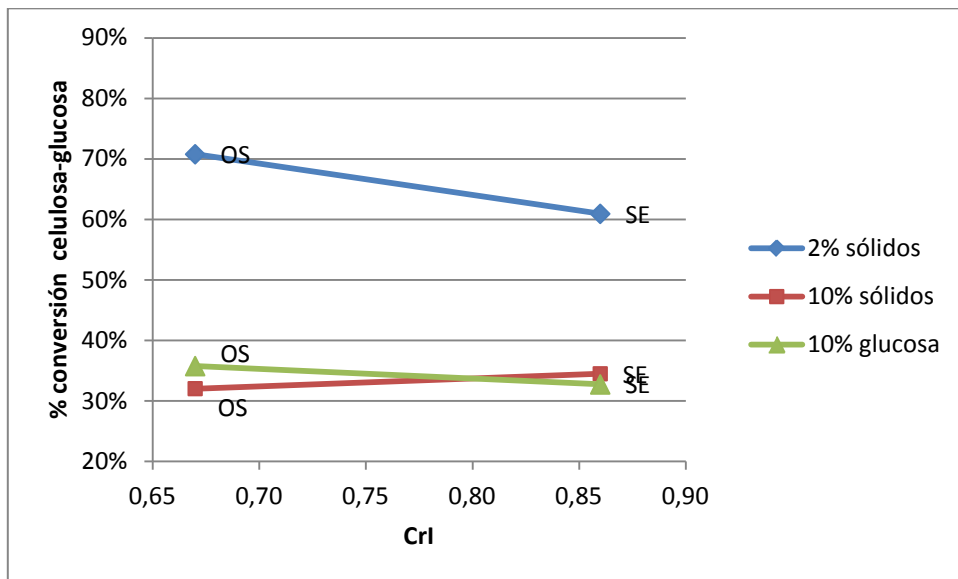


Gráfico 11: Índice de cristalinidad para álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

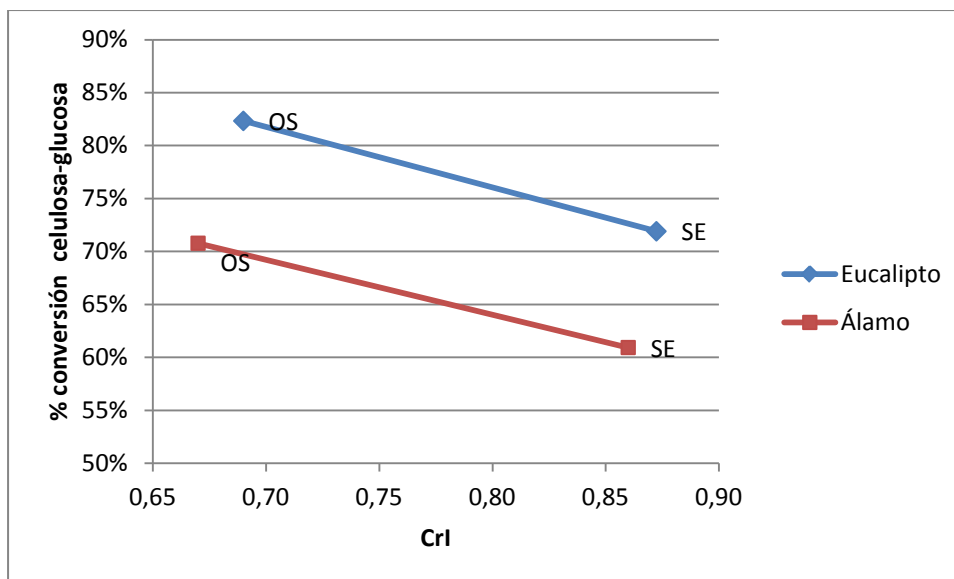


Gráfico 12: Comparación del Crl para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos).

Debido a la falta de estudios previos acerca del efecto de la cristalinidad sobre la hidrólisis enzimática, no se puede establecer una regla general. Sin embargo, si se ve que para valores menores de Crl, la conversión es mayor para 2% sólidos en ambos residuos, observándose en el Gráfico 10 y Gráfico 11 que para una disminución de 0,19 en el índice de cristalinidad, la conversión de glucosa aumenta en un 10%, aproximadamente (Anexo D), lo que causa pendientes similares (Eucalipto: -0,518; Álamo: -0,571), como se observa en el Gráfico 12. A pesar de que ambos residuos presenten este comportamiento, es importante notar que el eucalipto y el álamo tienen prácticamente el mismo Crl para cada pretratamiento y la conversión alcanzada es diferente (Gráfico 12). Esto lleva a suponer que no es la propiedad física más relevante, sino más bien, que la diferencia en la conversión está influenciada por alguna otra propiedad física, que podría ser el grado de polimerización, longitud de fibra, accesibilidad enzimática o tamaño de chip inicial del material.

### 7.2.3.- Grado de polimerización (Viscosidad)

La viscosidad de la celulosa solubilizada en CED y medida según el método descrito en la sección 6.2.5. se relaciona con el grado de polimerización (DP) que tiene la celulosa del material pretratado<sup>(28)</sup>. Se estima que a menor grado de polimerización, las cadenas de celulosa son más cortas, es decir, hay mayor cantidad de extremos libres para la acción de las exoglucanasas, lo que generaría una hidrólisis más rápida<sup>(43)</sup>. Sin embargo, similar al problema que existe con la medición del efecto de la cristalinidad, la medición del DP es compleja y los estudios que existen varían el DP junto con el área superficial o índice de cristalinidad. Se ha demostrado que para materiales con Crl similar, los que presentan menor DP se hidrolizan con mayor facilidad<sup>(28; 44)</sup>.

Debido a que este es un método por disolución diseñado para pulpas de celulosa, se aplicó a los chips pretratados por IL, pero la disolución no fue completa y fue necesario filtrar previo a cargar el viscosímetro. Se realizaron diversas medidas para establecer si filtrar generaba algún

cambio en la medición de viscosidad y se concluyó que no tenía un efecto relevante (Anexo E). Sin embargo, los resultados obtenidos nuevamente son bajos (Gráfico 13), reafirmando que también se obtendrían bajos niveles de conversión. Por lo tanto, no se considerará IL en este análisis.

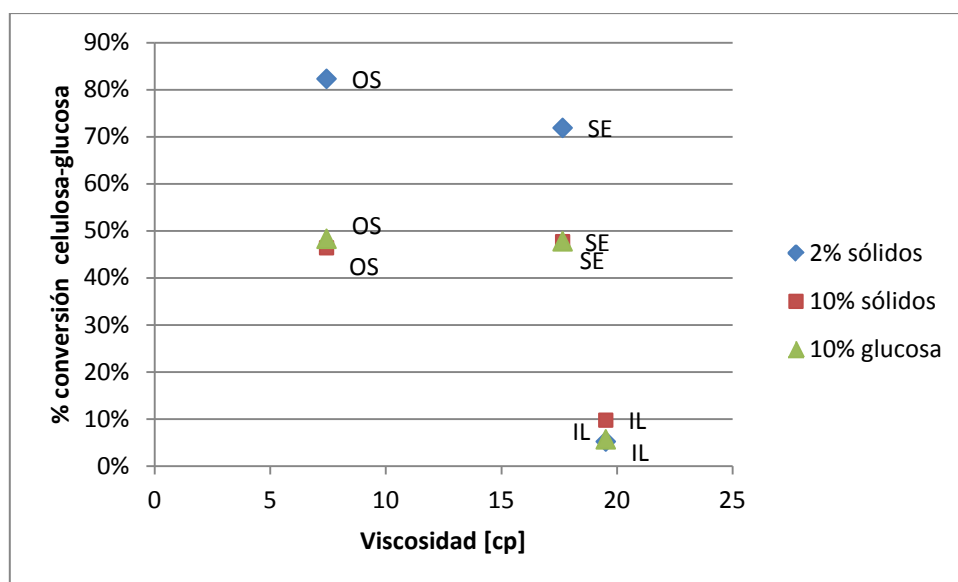


Gráfico 13: Viscosidad de la celulosa de eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

En lo que respecta al Gráfico 14 y Gráfico 15, se puede ver nuevamente un comportamiento similar a lo que se obtuvo para el área superficial y para la cristalinidad. Una vez más las dos hidrólisis de alta consistencia (10%) presentan problemas de transferencia de masa y la hidrólisis al 2% sólidos se comporta según la teoría. Debido a que las hidrólisis fueron medidas solo al inicio y al final (72 horas), no se puede ver la evolución de la sacarificación, por lo que el efecto del DP sobre la velocidad inicial de hidrólisis no se puede conocer. Sin embargo, es claro para el 2% de consistencia que a menor viscosidad, mayor conversión.

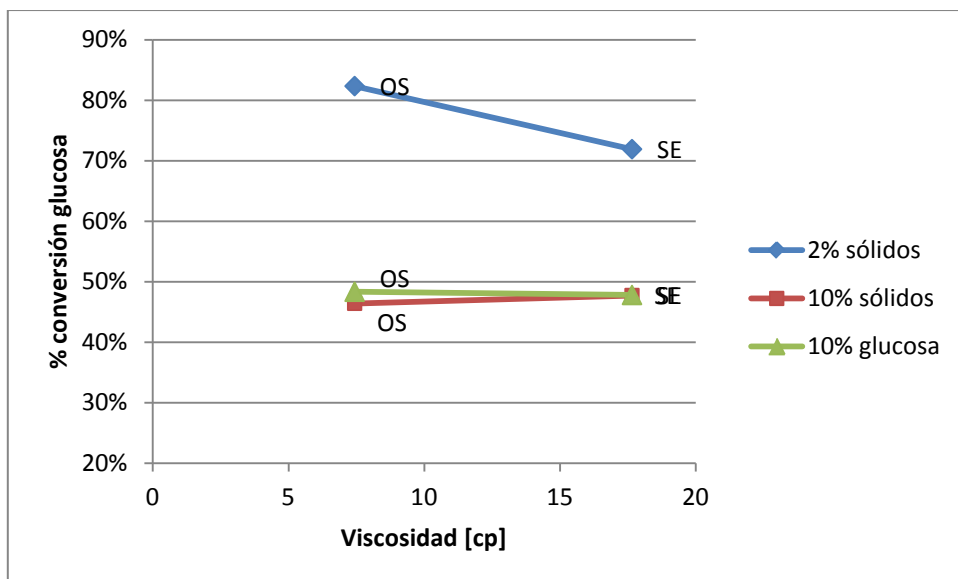


Gráfico 14: Viscosidad de la celulosa de eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

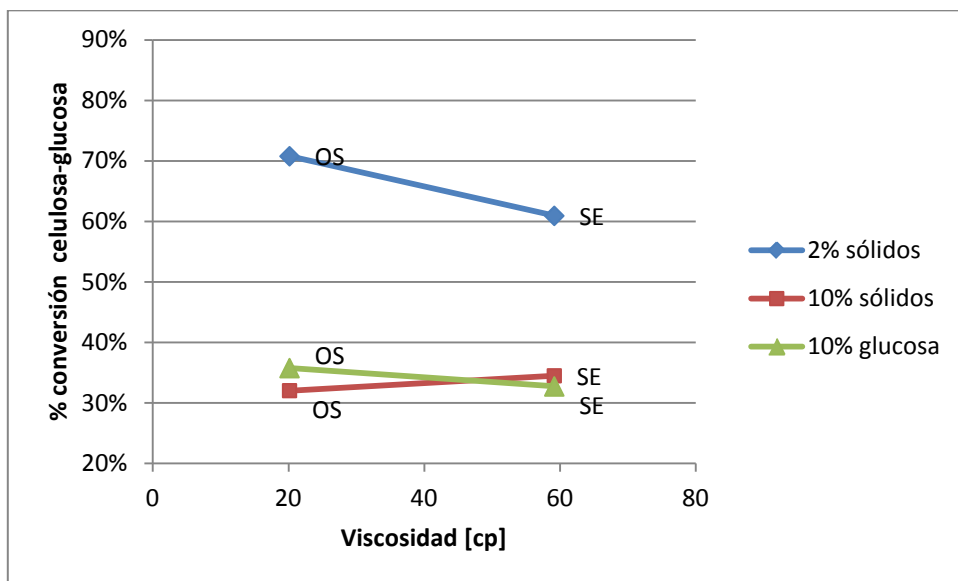


Gráfico 15: Viscosidad de la celulosa de álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

Se puede observar en ambos gráficos (Gráfico 14 y Gráfico 15) que el efecto del DP es el mismo, lográndose menor grado de polimerización y mayor conversión con OS en ambos materiales. Esto se debe principalmente a que la despolimerización de la celulosa se ve aumentada por la generación de ácidos provenientes de la extracción de lignina y azúcares <sup>(45)</sup>, teniendo un efecto más fuerte en el OS, pues el tiempo de residencia es mayor (60 min) que para el SE (5 min).

Además, resulta interesante comparar el DP entre eucalipto y álamo para la hidrólisis al 2%, pues, como se puede ver en el Gráfico 16, existe una relación consistente entre la viscosidad y la conversión (Anexo E). Resulta ser que el eucalipto tiene un DP menor que el álamo tanto para SE como para OS, por lo que al graficarlos juntos forman una tendencia que coincide con la teoría y por primera vez queda expuesta una razón capaz de explicar la diferencia de conversión. No necesariamente significa que sea la única propiedad física que afecta la conversión alcanzada, pero si la más relevante para este trabajo.

La diferencia entre los valores de DP obtenidos para eucalipto y álamo están directamente relacionados con el tamaño de chips utilizado inicialmente<sup>17</sup>, siendo más severo el SE y el OS para el eucalipto. Es por esta razón que en el Gráfico 16 se presenta una curva llamada “Ajuste” que corresponde a la ecuación 7.2. Ésta permite obtener la conversión ( $C$ ) en fracción como una función del tamaño de chip inicial ( $T$ ) en milímetros<sup>18</sup> y la viscosidad medida ( $\mu$ ) en centipoise. Esta ecuación fue ajustada a partir exclusivamente de los valores obtenidos en este trabajo. El detalle de esta metodología está disponible en el Anexo E.

$$C = 0,91485 - 0,01106 \mu - 0,01041 T + 0,00057 \mu T \quad (7.2)$$

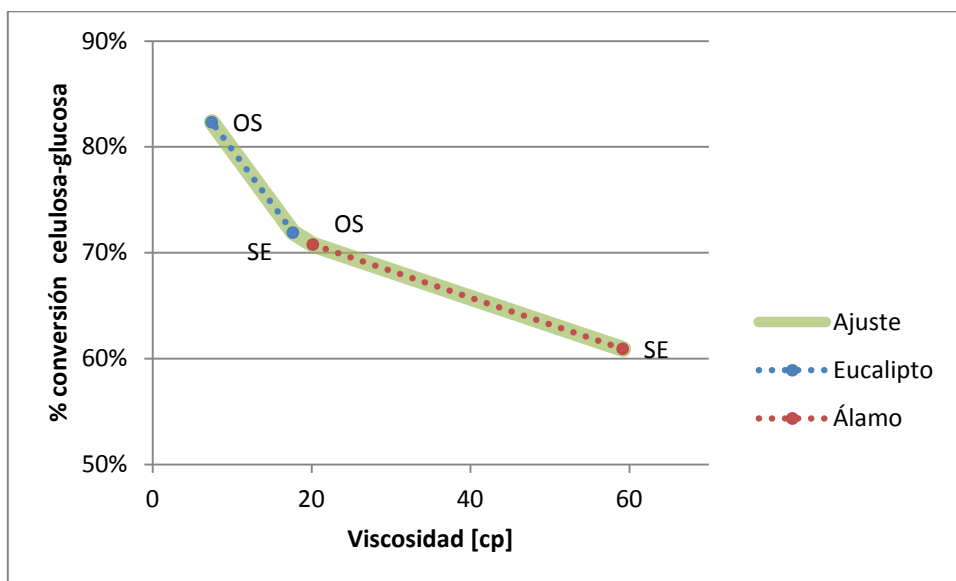


Gráfico 16: Comparación de DP para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos) y ecuación de ajuste de conversión en función del tamaño de chip y la viscosidad.

Esta ecuación ajustada permite obtener una primera aproximación de la conversión que se obtendría para una combinación de viscosidad y tamaño de chip. Sin embargo, se basa solo en los valores obtenidos en este trabajo y se necesitan más datos para poder validarla o corregirla. Por lo tanto, esto podría considerarse como la primera etapa del desarrollo de un modelo que permita,

<sup>17</sup> Chips de eucalipto: 1 – 2 mm; Chips de álamo: 1 – 30 mm.

<sup>18</sup> Debido a que los tamaños son un rango, se tomó  $T$  como el tamaño promedio, es decir, 1,5 mm para eucalipto y 15 mm para el álamo.



sin necesidad de llevar a cabo la hidrólisis, estimar cuál sería la conversión de glucosa solo conociendo su tamaño de chip inicial y la viscosidad de la celulosa disuelta en CED.

#### 7.2.4.- Longitud de fibra

Se sabe que la longitud de las fibras afecta principalmente la velocidad de hidrólisis, siendo más rápida para fibras más cortas <sup>(46)</sup>. Esto necesariamente estará relacionado con el área superficial, CrI y DP, pues tener fibras más cortas mejorará estas otras propiedades físicas, siendo el área superficial la más afectada y relevante <sup>(46)</sup>.

Debido a que la longitud de fibra se mide en un equipo diseñado para pulpas de celulosa, no fue posible realizar esta medición para el material pretratado con IL.

En el Gráfico 17 y Gráfico 18 se observa el efecto que tiene el largo de las fibras sobre la conversión de glucosa. Una vez más se tiene que la hidrólisis en alta consistencia (10%) presenta limitaciones en la transferencia de masa, mientras que la hidrólisis al 2% sólidos muestra distintas conversiones para cada largo. En el caso del eucalipto (Gráfico 17), se tiene que a mayor longitud de fibra se obtendrá mayor conversión. Esto es contrario a lo que indica la teoría, Sin embargo la diferencia de longitud, de aproximadamente 2%, se considera poco significativa.

Por otro lado, en el caso del álamo la diferencia de longitud es de un 30%, aproximadamente (Gráfico 18) y es consistente con la teoría, pues se cumple que a menor longitud de fibra, mayor conversión.

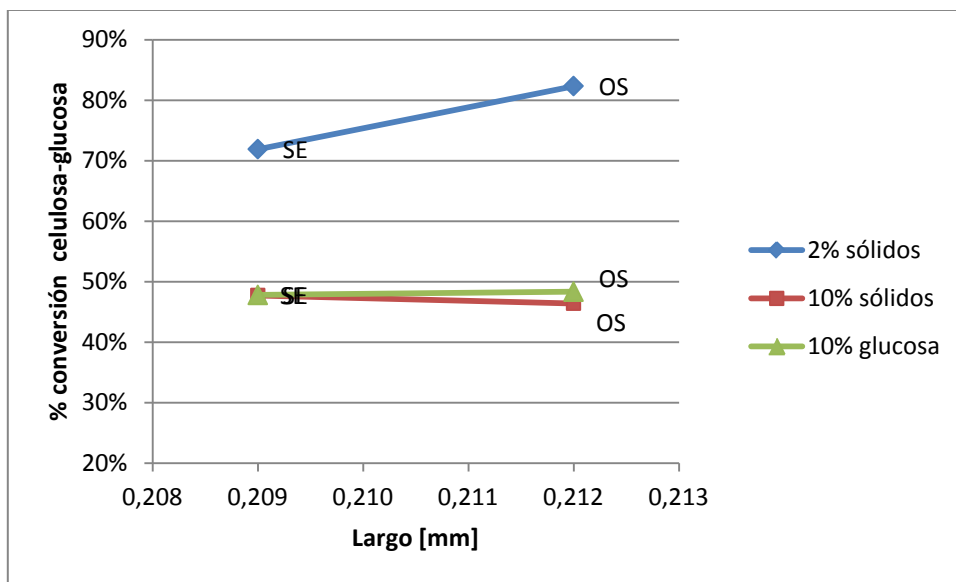


Gráfico 17: Largo de las fibras de eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

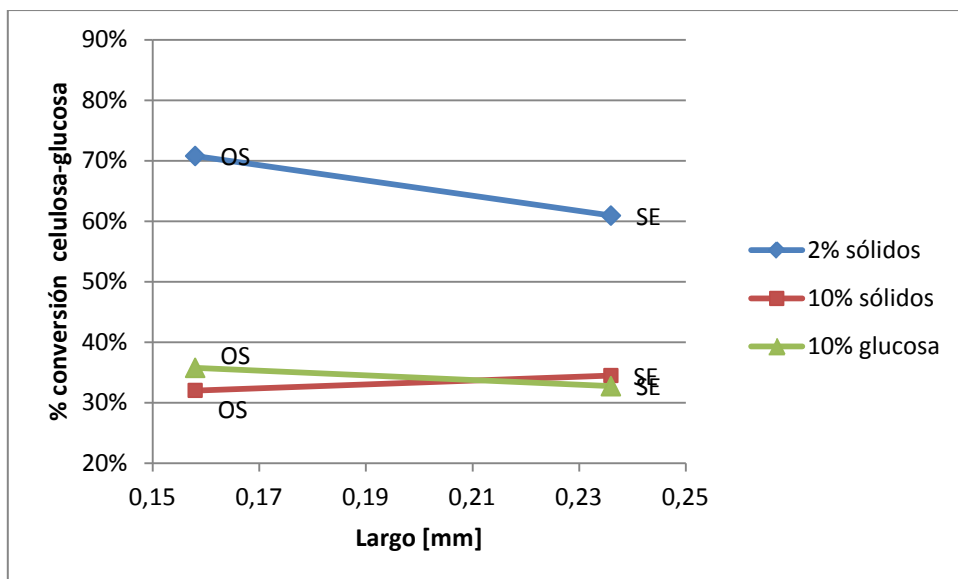


Gráfico 18: Largo de las fibras de álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

Una vez más los resultados se ven fuertemente afectados por su tamaño de chip inicial<sup>19</sup>, pues al ser el eucalipto más pequeño, se alcanza el mismo tamaño de fibra con ambos pretratamiento, mientras que en el álamo alcanza a notarse el efecto del tamaño entre SE y OS.

Probablemente las diferencias de conversión de glucosa estén más influenciadas por las otras propiedades físicas más que por la longitud de fibra misma, como se ha visto en otros estudios<sup>(36)</sup>. Esto se puede apreciar en el Gráfico 19, donde se ve que la diferencia de longitud para el eucalipto es insignificante (<0,005 mm), mientras que para el álamo es de 0,08 mm y ambos residuos tienen una diferencia de aproximadamente 10% en la conversión de glucosa alcanzada. Esto indica que, efectivamente, la longitud de fibra no es el parámetro relevante para este caso, sin embargo, no niega el efecto que esta propiedad puede tener en la velocidad de hidrólisis inicial, la que puede no apreciarse debido a que solo se tomó el punto final a las 72 horas.

<sup>19</sup> Chips de eucalipto: 1 – 2 mm; Chips de álamo: 1 – 30 mm.

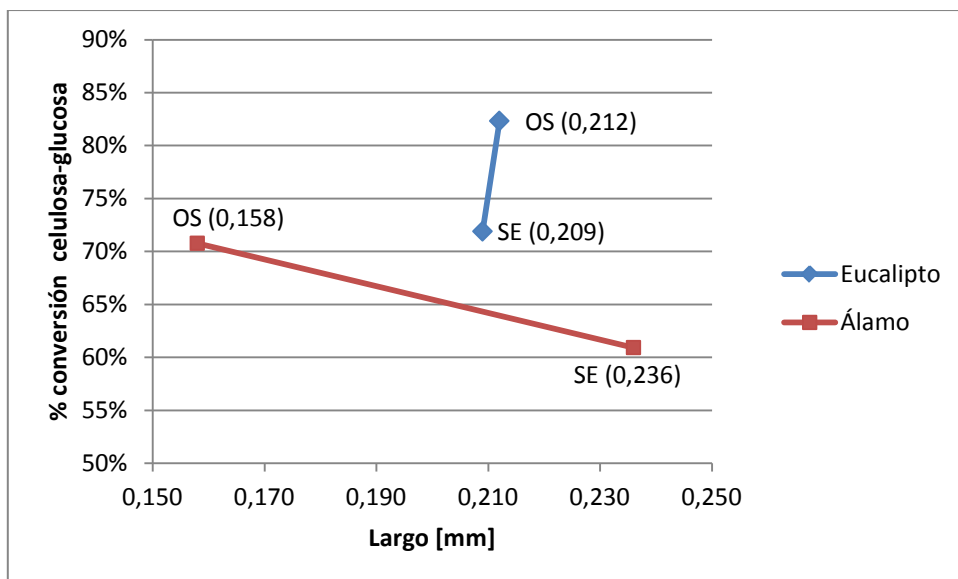


Gráfico 19: Comparación del largo de fibra para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos). Entre paréntesis se presenta el largo exacto de cada material.

### 7.2.5.- Accesibilidad de las enzimas

La accesibilidad de las enzimas puede estimarse a partir de la capacidad para adsorber tinturas de distintos tamaños. Este es el principio del método de Simons' Stain (SS) descrito en la sección 6.2.7. Esta técnica utiliza una tintura naranja (DO) del tamaño de la enzima (>25 kDa<sup>(47)</sup>)<sup>20</sup> y tiene gran afinidad por la celulosa, y otra azul (DB), de menor tamaño (992,8 Da<sup>(47)</sup>) y menor afinidad por la celulosa. Al realizarse la adsorción simultáneamente para ambas tinturas, la DO desplaza a la DB en los lugares donde puede penetrar debido a su mayor afinidad por el sustrato. Por lo tanto, la adsorción de DB indica la porosidad donde no puede acceder una enzima, y la de DO, indica la porosidad de tamaño suficiente para permitir el acceso a una enzima. Además, se determina la razón de adsorción de estas dos tinturas ( $SS_{O/B}$ ) para entender mejor la porosidad que presenta el material (ecuación 6.9).

Tabla 15: Máxima adsorción de tintura DO y DB en eucalipto y álamo pretratados por SE, OS e IL. Los valores se presentan como mg de tintura adsorbida por gramo de material pretratado.

Residuo	Muestra	DO [mg/g]	DB [mg/g]	Total (DO+DB) [mg/g]	$SS_{O/B}$ (DO/DB)
Eucalipto	SE	32	28	60	1,14
	OS	81	32	113	2,53
	IL	24	4	28	6,00
Álamo	SE	61	28	89	2,18
	OS	76	31	107	2,45

<sup>20</sup> Esta tintura es producto de una condensación, por lo que tiene una amplia distribución de tamaños, donde el 20% aproximadamente es mayor a 25 kDa. Esta fracción es separada por cromatografía y utilizada para este análisis.<sup>(47)</sup>

En la Tabla 14 se presenta los máximos valores de adsorción para cada tintura. Estos valores de adsorción fueron calculados según el método descrito en la sección 6.2.7. a partir de los valores de absorbancia obtenidos experimentalmente (Anexo F). Se espera que mientras más alta sea la adsorción de DO, mayor accesibilidad enzimática presentará el material, causando así una hidrólisis más rápida y completa <sup>(32)</sup>. Para el IL se tiene un valor de  $SS_{O/B}$  más alto que el resto (6,0), sin embargo, en cada uno de sus componentes, la adsorción es inferior, presentando un total adsorbido muy bajo ( $28 \text{ mg/g}^{21}$ ). Esto nos indica que el IL produjo un material poco poroso, pero con poros suficientemente grandes como para permitir el acceso de las enzimas. A pesar de esto, la conversión alcanzada en IL es baja (Gráfico 20) y el pretratamiento resulta poco efectivo, por lo que no se analizará con mayor profundidad.

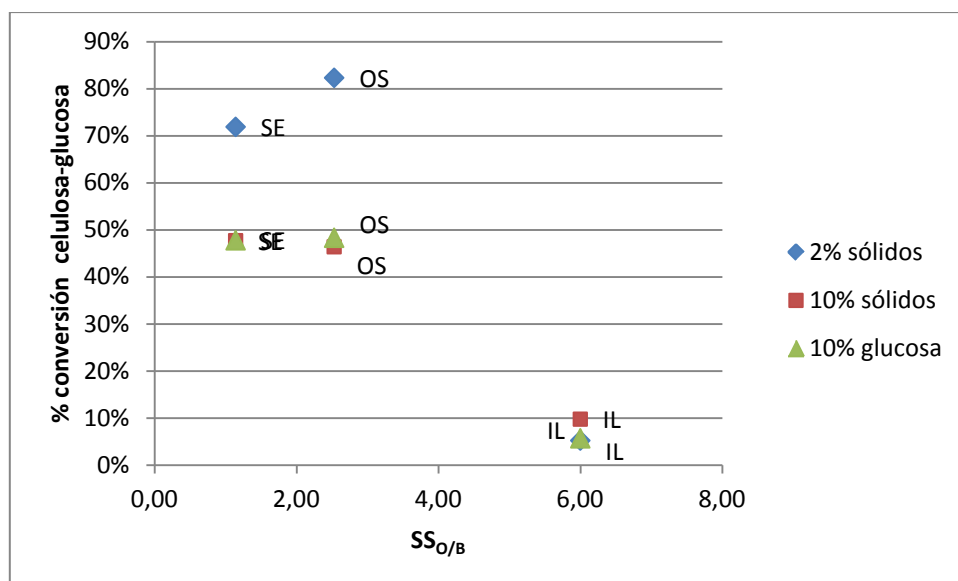


Gráfico 20: Resultados de Simons' Stain para eucalipto pretratado por SE, OS e IL. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

Si se centra la atención en los pretratamientos SE y OS (Gráfico 21 y Gráfico 22), se puede ver que para las hidrólisis con un 10% de consistencia se vuelve a repetir la baja conversión alcanzada debido a la limitación por transferencia de masa. Sin embargo, para la hidrólisis al 2% sólidos, se puede ver que para mayores valores de  $SS_{O/B}$ , se logra una mayor conversión de glucosa. Esto coincide con lo esperado, pues altos valores de  $SS_{O/B}$  indican que hay más poros grandes, es decir, que hay una mayor accesibilidad enzimática. Esto se logra para ambos residuos con el OS, siendo en ambos casos  $SS_{O/B}$  muy cercano a 2,5.

<sup>21</sup> Este valor corresponde a 28 miligramos de tintura adsorbida en un gramo de material pretratado por IL.

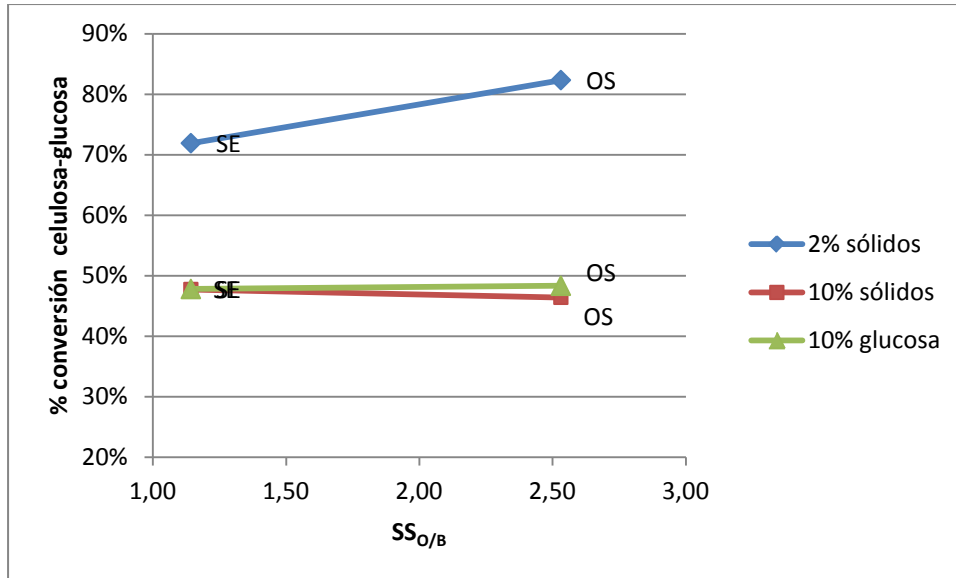


Gráfico 21: Resultados de Simons' Stain para eucalipto pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

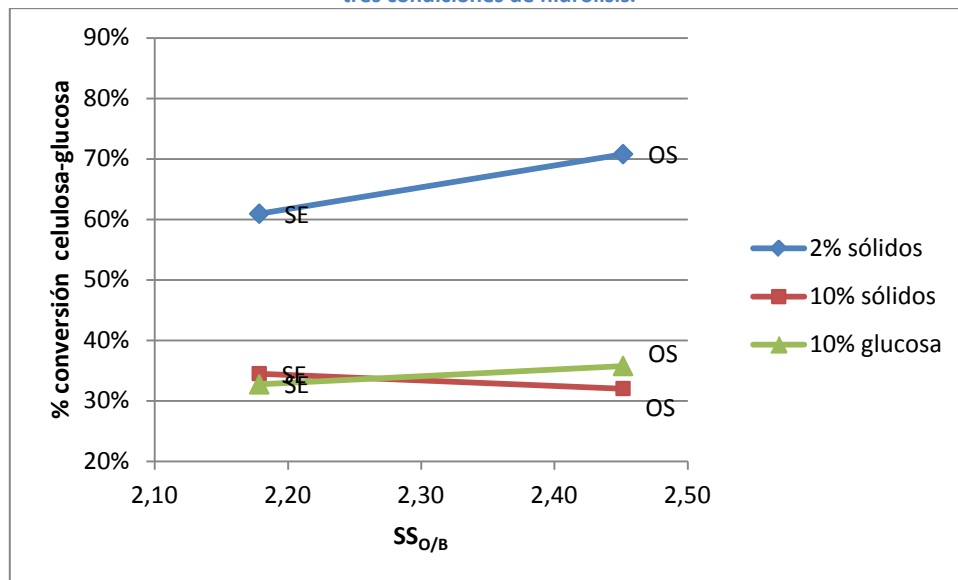


Gráfico 22: Resultados de Simons' Stain para álamo pretratado por SE y OS. Se presentan las conversiones para las tres condiciones de hidrólisis.

La razón de por qué el OS tiene un mayor  $SS_{O/B}$  se debe a que este pretratamiento genera en ambos residuos una composición rica en celulosa (eucalipto: 90%; álamo: 78%), por lo que se tiene mayor adsorbente de tinturas por gramo de material pretratado<sup>(32)</sup>. Esto no representa una desigualdad en la medición, pues la composición del material será la misma para las enzimas. Más aún, la composición rica en celulosa y escasa en lignina es una explicación de por qué se tiene mayor conversión para el material pretratado por OS que por SE, pues permite el acceso enzimático sin obstrucción por parte de la lignina ni la hemicelulosa.

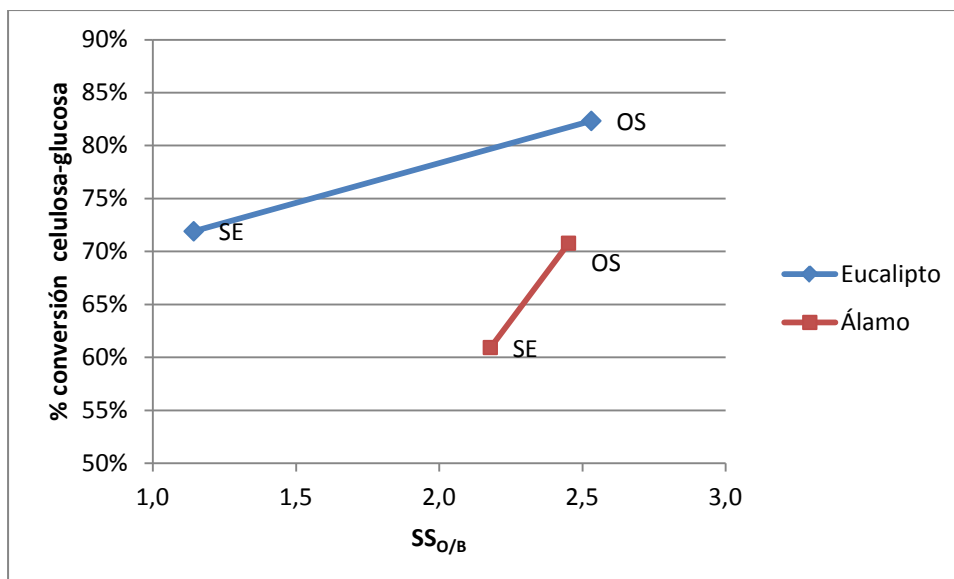


Gráfico 23: Comparación del SS para álamo y eucalipto pretratados por SE y OS (hidrólisis al 2% sólidos).

Sin embargo, es importante destacar que a pesar de tener valores de  $SS_{O/B}$  tan similares para el OS, la conversión alcanzada difiere en más de un 20% (Gráfico 23). Luego, se podría suponer que esta no es una propiedad decisiva en cuanto a la conversión de glucosa. A pesar de que pueda influir, la conversión está afectada necesariamente por otras propiedades físicas.

### 7.3.- Resumen del efecto de las propiedades físicas sobre la conversión

Luego de haber analizado las principales propiedades físicas que podrían tener influencia sobre la conversión de celulosa a glucosa alcanzada en la hidrólisis, se presenta un resumen de éstas considerando las ventajas y desventajas que tienen los métodos de medición utilizados (Tabla 15). Estas ventajas están pensadas desde el punto de vista de su aplicación como método que permita inferir los resultados de una hidrólisis, por lo tanto, el tiempo y el costo son los principales parámetros.

Tabla 16: Resumen de las principales propiedades físicas de los residuos lignocelulósicos pretratados y su efecto sobre la conversión a glucosa.

Propiedad física	Método de medición	Relevancia sobre la conversión <sup>22</sup>	Ventajas	Desventajas	Tiempo total aprox.	Costo por muestra <sup>23</sup> [CLP]
Área superficial	Water Retention Value	Baja	Acepta pulpa y chips <sup>24</sup> .	Requiere incubación "overnight" <sup>25</sup> . Requiere secado	48 horas	1000

<sup>22</sup> Esta relevancia se basa exclusivamente en los resultados obtenidos en este estudio.

<sup>23</sup> Considera costos energéticos de refrigeración, secado en horno, agitación y reactivos utilizados para el tamaño de muestra descrito en la metodología.

<sup>24</sup> Los pretratamientos SE y OS producen pulpa, mientras que el IL produce chips.

<sup>25</sup> "Overnight" se refiere a una espera de aproximadamente 12 horas, por lo que usualmente se deja toda la noche.

				"overnight".		
Índice de cristalinidad	Espectrometría infrarroja (FT-IR)	Baja	Se puede medir en un día.	Requiere de espectrómetro infrarrojo. Difícil medir chips.	8 horas	30
Grado de polimerización	Medición de viscosidad	Alta	Acepta pulpa y chips.	Requiere etapa de deslignificación (24 horas). Puede necesitar etapa de filtración.	30 horas	800
Longitud de fibra	Fiber Quality Analyser	Muy Baja	Rápido y económico.	Requiere de FQA. Solo mide pulpas.	1 hora	1
Accesibilidad enzimática	Simons' Stain	Baja	Acepta pulpa y chips.	Requiere incubación agitada "overnight". Compuesto de múltiples etapas. Cálculos complejos.	24 horas	500

Es importante destacar en algunos costos presentados están fuertemente influenciados por consumo energético, lo que muchas veces corresponde a equipos que funcionan de manera continua en un laboratorio y podría considerarse costo despreciable (Anexo G).

# Capítulo IV

---

## Conclusiones y Recomendaciones

---

### 8.- Conclusiones

Debido a que los requerimientos energéticos a nivel mundial se están incrementando, al mismo tiempo que algunas fuentes se están agotando, como los combustibles fósiles, se está optando por fuentes de energía renovables. En Chile, debido a la desarrollada industria forestal, el uso de biocombustibles de origen lignocelulósico tiene gran potencial, en particular, la producción de bioetanol de segunda generación. Sin embargo, las tecnologías para producir bioetanol aun no han sido optimizadas, lo que crea la necesidad de comparar los resultados obtenidos por distintos métodos y generar formas de caracterizar y comprender el comportamiento del material en cada una de las etapas del proceso, en particular, en el pretratamiento, como se llevó a cabo en este estudio.

De la caracterización química realizada al material pretratado por explosión a vapor, organosolv y emimCl, se desprenden las siguientes conclusiones:

- El pretratamiento por SE remueve la mayor parte de la hemicelulosa y parcialmente la lignina, tanto para eucalipto como para el álamo. En el caso del OS se remueve gran parte de la lignina, obteniéndose un material rico en celulosa (eucalipto: 90,12%; álamo: 77,82%). Para el IL no se generan cambios importantes en la composición química, aunque es necesario considerar que el pretratamiento es poco efectivo en las condiciones en que se llevó a cabo en este estudio, como se deduce en la baja eficiencia de conversión de celulosa a glucosa en la hidrólisis enzimática, en parte por las impurezas (principalmente agua) del emimCl utilizado.
- Los pretratamientos por SE y OS permiten la solubilización de una fracción de la hemicelulosa a monómeros y oligómeros, los que son liberados a la fracción líquida post-pretratamiento, especialmente arabinosa, galactosa y xilosa. Es importante considerar esta pérdida al momento de realizar los balances de masa.
- Los pretratamientos por SE y OS son sensibles al tamaño de chip inicial, siendo OS más sensible en las condiciones utilizadas.



Del análisis de las cinco propiedades físicas estudiadas (área superficial, cristalinidad, grado de polimerización, largo de fibra y accesibilidad enzimática) en eucalipto y álamo pretratado por SE, OS e IL se concluye que:

- El grado de polimerización es la propiedad más relevante para entender y predecir la diferencia de conversión de celulosa a glucosa, siendo esta conversión mayor cuando el grado de polimerización es menor.
- Para el área superficial, cada material, a mayor valor de esta, mayor conversión. Pero no se mantiene esta relación al comparar entre materiales. Lo mismo sucede con la porosidad o accesibilidad enzimática.
- El índice de cristalinidad, se obtiene en ambos material es prácticamente el mismo valor para cada pretratamiento (SE: 0,86 – 0,87; OS: 0,67 – 0,69; eucalipto-álamo), manteniendo la diferencia de conversiones de celulosa a glucosa, por lo que no hay una tendencia directa
- La longitud de fibra no presenta valores concluyentes, ya que la diferencia para el eucalipto es despreciable (SE: 0,212 mm; OS: 0,209 mm) y mantiene un 10% de diferencia en la conversión, mientras que para el álamo se obtiene mayor conversión para menor valor de longitud.
- El área superficial, cristalinidad, longitud de fibra y accesibilidad enzimática de los materiales no justifican la diferencia en la conversión de celulosa a glucosa y la variación en estas propiedades se debe principalmente al efecto dado por el tamaño inicial de chip utilizado.
- El material pretratado por OS presenta un menor grado de polimerización y mayor conversión de celulosa a glucosa que los otros pretratamientos tanto para álamo como para eucalipto.

De las distintas consistencias de hidrólisis utilizadas se concluye que:

- En las hidrólisis de alta consistencia (10% sólidos y 10% glucosa) los resultados de conversión fueron inferiores (32 – 48,3%) que en la hidrólisis al 2% sólidos, debido a que, por la característica absorbente del material, se produjo una limitación por transferencia de masa convectiva, impidiendo que las enzimas fueran transportadas fluidamente.
- En la hidrólisis de baja consistencia (2% sólidos) se obtuvo mayor conversión de celulosa a glucosa para los materiales pretratados por OS, siendo para el caso del eucalipto un 10,4% mayor (SE: 71,9%; OS: 82,3%) y un 9,9% mayor para el álamo (SE: 60,9%; OS: 70,8%).

Si bien, ninguna propiedad es suficiente por si sola para explicar la conversión obtenida, pues todas afectan en distinto grado los valores, es claro para los resultados de este trabajo que la propiedad más representativa resulta ser el grado de polimerización. A pesar de que la medición de esta propiedad no es compleja, tiene largos tiempos de espera y un alto costo comparado con las otras propiedades.

Finalmente, se concluye que el organosolv resulta ser el pretratamiento que genera las mejores condiciones físicas y químicas para la hidrólisis enzimática, a pesar de presentar una alta sensibilidad al tamaño de chip inicial. Además, el grado de polimerización resulta ser la propiedad más representativa del comportamiento del material en la hidrólisis enzimática.

## 9.- *Recomendaciones*

A partir de las conclusiones expuestas, se realizan las siguientes recomendaciones con el fin de darle continuidad al trabajo desarrollado:

- Profundizar el estudio de por qué resulta ser el grado de polimerización la propiedad más representativa de los resultados de la hidrólisis enzimática y analizar los pretratamientos a partir de este punto de vista, es decir, de cómo el pretratamiento actúa sobre el material para generar un menor grado de polimerización.
- Generar más datos de conversión en función de la viscosidad y tamaño de chips para validar o mejorar la ecuación ajustada, relacionarla con una ecuación de severidad y diseñar un modelo predictivo.
- Trabajar con consistencias intermedias para la hidrólisis enzimática (5 – 8%) y estudiar si el aumento de ésta compensa la disminución de conversión.
- Analizar económicamente la utilidad de la caracterización física y química como predictores de la hidrólisis enzimática.
- Realizar la caracterización física y química para material pretratado exitosamente con emimCl para conocer el verdadero efecto que está teniendo sobre el material.
- Caracterizar físicamente más muestras de material pretratado por OS o SE y generar resultados suficientes para realizar un estudio estadístico.

# Referencias

---

1. **Fu, Dongbao, Mazza, Giuseppe and Tamaki, Yukihiro.** *Lignin Extraction from Straw by Ionic Liquids and Enzymatic Hydrolysis of the Cellulosic Residues.* Summerland : Agricultural and Food Chemistry, 2010, Vol. 58.
2. **European Commission - Research & Innovation.** *Perspectivas de la evolución mundial hasta el 2030 en ámbitos de energía, la tecnología y la política climática.* 2009.
3. **Avella, Oscar.** *Etanol Celulósico a Partir de Residuos Agrícolas.* Lima, Perú : s.n., 2009.
4. **Sicirec.** Forest and carbon capture. [Online] [Cited: diciembre 21, 2011.] <http://www.sicirec.org/definiciones/carbon-capture>.
5. **Sánchez, Oscar and Cardona, Carlos Ariel.** *Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.* 11, Caracas : INCI, Noviembre 2005, Vol. 30. ISSN 0378-1844.
6. **Gobierno Federal - Estados Unidos Mexicanos.** *Recomendaciones de especificaciones técnicas para el etanol y sus mezclas, y la infraestructura para su manejo en México.* México D.F. : s.n., 2010.
7. **Renewable Fuels Association.** Global Ethanol Production to Reach 88,7 Billion Litres in 2011. [Online] 2011. [Cited: Diciembre 22, 2011.] <http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-88.7-billion-litres-in-2011/>.
8. **Reuters.** Analysis: In food vs fuel debate, U.S. resolute on ethanol. [Online] Febrero 14, 2011. [Cited: Diciembre 22, 2011.] <http://www.reuters.com/article/2011/02/14/us-usa-ethanol-support-idUSTRE71D0UR20110214>.
9. **Laine, Christina.** *Structures of Hemicelluloses and Pectins in Wood and Pulp.* Espoo : Helsinki University of Technology, 2005. ISSN 1457-6252.
10. **Degenstein, John.** Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. [Online] [Cited: Diciembre 29, 2011.] <http://undbiomass.blogspot.com/>.
11. **Mejía, Teresa, et al.** *Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología.* s.l. : Avance y Perspectiva, 2002, Vol. 21.
12. **Georgia Tech - Institute of Paper Science and Technology.** *Chemical Overview of Wood.*
13. **University College London.** UCL Department of Chemical Engineering. [Online] 2008. [Cited: Diciembre 29, 2011.] <http://www.ucl.ac.uk/chemeng/people/academic-researchers/ramirez>.

14. **Brodeur, Gary, et al.** *Chemical and physico-chemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review.* 2009.
15. **Ma, Fuying, et al.** *Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth.* s.l. : Elsevier, 2010, Vol. 101.
16. **Pezoa, Ricardo.** *Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación.* Santiago : Universidad de Chile, 2010.
17. **Juri, Sebastian.** *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca.* 2011.
18. **Talebnia, Farid, Karakashev, Dimitar and Angelidaki, Irini.** *Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.* Lyngby : Bioresource Technology, 2010, Vol. 101.
19. **Niklitschek, Tomás.** *Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol.* Santiago : Universidad de Chile, 2010.
20. **Booussaid, Abdel-Latif, et al.** *Steam Pretreatment of douglas-fir wood chips: Can conditions for optimum hemicellulose recovery still provide adequate access for efficient enzymatic hydrolysis?* Vancouver : Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, Vols. 84-86.
21. **Chung, Pablo.** *Effect of Pretreatment Technologies.* Santiago : University of British Columbia, 2011.
22. **Mora-Pale, Mauricio, et al.** *Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass.* 6, s.l. : Biotechnology and Bioengineering, 2011, Vol. 108.
23. **Muurinen, Esa.** *Organosolv pulping: A review and distillation study related to peroxyacid pulping.* Linnanmaa : University of Oulu, 2000.
24. **Díaz, Diego.** *Estudio técnico y económico de alternativas de producción de bioetanol y coproductos de biorefinería a partir de residuos forestales en Chile.* Santiago : Universidad de Chile, 2011.
25. **Shill, Kierston, et al.** *Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle.* 3, Berkeley : Biotechnology and Bioengineering, 2011, Vol. 108.
26. **Lee, Sang Hyun, et al.** *Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis.* 5, Nueva York : Biotechnology and Bioengineering, 2009, Vol. 102.

27. **Li, Chenlin, et al.** *Comparison of diluted acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification.* 4900-4906, Emeryville, CA : Bioresource Technology, 2010, Vol. 101.
28. **Chandra, Richard P., et al.** *Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?* Vancouver : Biochemical Engineering and Biotechnology, 2007, Vol. 108.
29. **Lu, Yanpin, et al.** *Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues.* Vancouver : Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, Vols. 98-100.
30. **Qin, Wenjuan.** *High consistency enzymatic hydrolysis of lignocellulose.* Vancouver : University of British Columbia, 2010.
31. **Camodonico, Miguel Angel.** *Procesos de separación de etanol para la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica.* Santiago : s.n., 2011.
32. **Chandra, Richard, et al.** *The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, Part 1: A modified Simons' Staining technique.* Vancouver : American Institute of Chemical Engineers, 2008.
33. **Stackpole, Desmond J., et al.** *Genetic variation in the chemical components of Eucalyptus globulus wood.* Tasmania : Genes Genomes Genetics, 2011, Vol. 1.
34. **Rencoret, Jorge, et al.** *Lignin composition and structure in young versus adult Eucalyptus globulus plants.* Sevilla : Plant Physiology, 2011, Vol. 155.
35. **Area, María C., et al.** *Estudio comparativo de especies de Eucalyptus y su respuesta al pulpado NSSC.* Misiones : UNAM, 2004.
36. **Chandra, Richard P., et al.** *Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates.* 1217-1222, Vancouver : Biotechnology Letters, 2009, Vol. 31.
37. **Leschinsky, Moritz, Sixta, Herbert and Patt, Rudolf.** *Detailed mass balance of the autohydrolysis of Eucalyptus globulus at 170°C.* s.l. : BioResources, 2009, Vol. 4.
38. **Reiniati, Isabela.** *Chemical, physical and viscoelastic properties of hotpressed hybrid poplar.* s.l. : Washington State University, 2009.
39. **Huannng, Hua-Jiang, et al.** *Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: A comparative process and economic analysis.* Saint Paul : Biomass and Bioenergy, 2009, Vol. 33.
40. **Weil, Joe, et al.** *Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water.* 199, West Lafayette : Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, Vol. 68.

41. **Sannigrahi, Poulomi, Ragauskas, Arthur J. and Tuskan, Gerald A.** *Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics.* 209-226, Atlanta : Biofuels Bioproducts & Biorefining, 2009, Vol. 4.
42. **Fan, L. T., Lee, Y. H. and Beardmore, D. R.** *The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis.* Manhattan : Biotechnology and Bioengineering, 1981, Vol. 23.
43. **Pan, Xuejun, et al.** *Pretreatment of lodgepole pine killed by mountain beetle using the ethanol organosolv process: Fractionation and process optimization.* 2609-2617, Vancouver : Industrial & Engineering Chemistry Research, 2007, Vol. 46.
44. **Nahzad, MM, et al.** *Structural constraints affecting the initial enzymatic hydrolysis of recycled paper.* 17:68, Vancouver : Enzyme Microbial Technology, 1995.
45. **Pan, Xuejun, et al.** *The bioconversion of mountain pine beetle-killed lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process.* 1, Vancouver : Biotechnology and Bioengineering, 2008, Vol. 101.
46. **Mooney, Caitriona A, et al.** *The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates.* 8-9, Vancouver : Enzyme and Microbial Technology, 1999, Vol. 25.
47. **Yu, Xiaochun, Minor, James L. and Atalla, Rajai H.** *Mechanism of action of Simons' stain.* 6, Madison : Tappi Journal, 1995, Vol. 78.
48. **ISO.** *Pulps - Determination of limiting viscosity number in cupriethylenediamine (CED) solution.* 2009.
49. **Rob's Ramblings.** Power Consumption. *Fridge.* [Online] 2003. [Cited: febrero 24, 2012.] <http://users.tpg.com.au/users/robkemp/Power/fridge.htm>.
50. **Anachemia Science.** Catálogo - Centrifugas. [Online] 2009. [Cited: febrero 24, 2012.] <http://www.fireassay.ca/catalog/c1.pdf>.
51. **Rob's Ramblings.** Power Consumption Tables. [Online] mayo 2004. [Cited: febrero 24, 2012.] <http://users.tpg.com.au/users/robkemp/Power/ConsumptionTables.htm>.
52. **Anachemia Science.** Catálogo - Filtros de papel. [Online] 2009. [Cited: febrero 24, 2012.] <http://www.fireassay.ca/catalog/f1.pdf>.
53. **Alibaba.com, Inc.** Alibaba. [Online] 2012. [Cited: febrero 24, 2012.] <http://spanish.alibaba.com/>.

54. **The Lab Depot, Inc.** Products for Discovery - Lab Supplies. *Solutions: Cupriethylenediamine 1.0 M*. [Online] 2007. [Cited: febrero 24, 2012.] <http://www.labdepotinc.com/p-15830-cupriethylenediamine-10-m-solution.php?c=499>.

55. **MP Biomedicals LLC.** Pontamine sky blue 6BX : MP Biomedicals : Buy online. [Online] 2012. [Cited: febrero 24, 2012.] [http://www.mpbio.com/product\\_info.php?family\\_key=05228230](http://www.mpbio.com/product_info.php?family_key=05228230).



# Anexos

---

## *Anexo A: Composición química de la fracción sólida*

Se presentan fotografías del material aun sin pretratar (Imagen 5) y la fracción sólida obtenida luego de ser pretratada por SE, OS e IL y lavada por filtro en el caso de las dos primeras y por centrifugación en el tercer caso (Imagen 6).

Posteriormente se presentan los resultados del análisis de composición química de la fracción sólida pretratada y sin pretratar por el método de Klason (Tabla 16). En el caso del álamo sin pretratar, solo se presentan los valores de la media, pues fueron entregados directamente por la Facultad de Forestal de la UBC.



Imagen 5: Material inicial sin pretratar. Eucalipto tamizado de 1 - 2 mm (izquierda). Álamo sin tamizar de 1 - 30 mm (derecha).



Imagen 6: Fracción sólida obtenida luego del pretratamiento por SE (izquierda), OS (centro) e IL (derecha).

**Tabla 17: Composición química de la fracción sólida del eucalipto y el álamo.** El valor utilizado para los análisis corresponde a la media. DE es la desviación estándar y CV el coeficiente de variación. Los valores de DE y CV no se presentan para el álamo sin pretratar pues la media fue entregada directamente por la Facultad de Forestal de la UBC.

Residuo	Muestras	Arabinosa (%)			Galactosa (%)			Xilosa (%)			Manosa (%)			
		Media	DE	CV (%)	Media	DE	CV (%)	Media	DE	CV (%)	Media	DE	CV (%)	
Eucalipto	SE	0,05	0,03	56,27	0,21	0,01	3,59	3,35	0,44	13,13	0,85	0,12	13,71	
	OS	0,03	0,02	63,83	0,05	0,00	5,36	3,17	2,83	89,43	2,96	2,43	82,32	
	IL	0,21	0,01	6,55	1,08	0,07	6,38	13,50	0,59	4,37	1,49	0,10	6,69	
	S/P	0,40	0,05	11,47	1,21	0,10	8,59	13,94	0,51	3,65	1,94	0,05	2,56	
Álamo	SE	0,07	0,00	1,65	0,17	0,00	1,48	5,34	0,53	9,88	1,63	0,05	2,79	
	OS	0,02	0,00	0,58	0,05	0,00	0,58	6,16	0,69	11,28	2,29	0,44	19,19	
	S/P	0,55	-	-	0,58	-	-	13,40	-	-	2,71	-	-	
Residuo	Muestras	Glucosa (%)			AIL (%)			ASL (%)			Cenizas (%)			Total (%)
		Media	DE	CV (%)	Media	DE	CV (%)	Media	DE	CV (%)	Media	DE	CV (%)	
Eucalipto	SE	56,98	1,68	2,95	29,13	0,65	2,22	2,58	0,23	9,08	0,22	0,17	80,46	93,36
	OS	90,12	6,46	7,16	3,71	0,94	25,40	0,67	0,06	9,17	0,21	0,04	19,84	100,90
	IL	42,42	1,71	4,03	25,18	1,15	4,57	4,20	0,17	3,97	0,25	0,01	5,86	88,31
	S/P	43,38	1,31	3,01	21,43	1,35	6,30	3,69	0,11	2,90	0,41	0,12	29,43	86,39
Álamo	SE	58,06	0,58	1,00	28,62	1,17	4,09	1,95	0,16	8,30	0,30	0,03	10,83	96,14
	OS	77,82	0,53	0,68	7,46	1,43	19,20	0,93	0,00	0,45	0,11	0,04	33,65	94,83
	S/P	47,60	-	-	22,41	-	-	1,99	-	-	0,74	-	-	89,98

## Anexo B: Composición química de la fracción líquida

Se presentan los resultados del análisis de oligómeros y monómeros de la fracción líquida obtenida de los pretratamientos SE y OS. En la Tabla 17, los valores para la presencia de oligómeros, mientras que en la Tabla 18 están para los monómeros.

**Tabla 18: Oligómeros presentes en la fracción líquida (como gramos de oligómero por gramo de líquido) obtenida luego de pretratar por SE y OS.** DE es la desviación estándar y CV el coeficiente de variación. El hidrolizado corresponde a los gramos totales de oligómeros obtenidos en la fracción líquida a partir de 100 g de residuo.

Residuo	Muestra	Arabinosa (g/g)				Galactosa (g/g)				Glucosa (g/g)			
		Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)	Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)	Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)
Eucalipto	SE	0,0011	0,00	4,78	1,06	0,0036	0,00	1,07	3,60	0,0042	0,00	1,14	4,29
	OS	0,0003	0,00	1,01	0,37	0,0014	0,00	3,61	1,86	0,0025	0,00	2,19	3,27
Álamo	SE	0,0007	0,00	1,29	0,76	0,0021	0,00	1,69	2,12	0,0035	0,00	3,69	3,62
	OS	0,0003	0,00	6,32	0,32	0,0008	0,00	3,77	0,92	0,0011	0,00	1,42	1,34
Residuo	Muestra	Xilosa (g/g)				Manosa (g/g)							
		Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)	Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)				
Eucalipto	SE	0,0395	0,00	7,76	40,03	0,0013	0,00	21,08	1,28				
	OS	0,0134	0,00	4,09	17,46	0,0009	0,00	57,03	1,21				
Álamo	SE	0,0357	0,00	2,14	36,71	0,0038	0,00	1,05	3,90				
	OS	0,0126	0,00	4,27	15,07	0,0018	0,00	4,68	2,14				

**Tabla 19: Monómeros presentes en la fracción líquida (como gramos de monómero por gramo de líquido) obtenida luego de pretratar por SE y OS.** DE es la desviación estándar y CV el coeficiente de variación. El hidrolizado corresponde a los gramos totales de monómeros obtenidos en la fracción líquida a partir de 100 g de residuo.

Residuo	Muestra	Arabinosa (g/g)				Galactosa (g/g)				Glucosa (g/g)			
		Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)	Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)	Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)
Eucalipto	SE	0,0029	0,00	17,32	2,98	0,0054	0,00	23,81	5,51	0,0194	0,00	8,73	19,66
	OS	0,0062	0,00	47,82	8,03	0,0104	0,00	43,91	13,57	0,0262	0,01	23,14	34,20
Álamo	SE	0,0052	0,00	82,04	5,38	0,0091	0,01	71,31	9,40	0,0245	0,01	36,10	25,18
	OS	0,0011	0,00	136,54	1,38	0,0031	0,00	65,05	3,73	0,0153	0,00	18,27	18,37
Residuo	Muestra	Xilosa (g/g)				Manosa (g/g)							
		Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)	Media	DE	CV (%)	Hidrolizado (g)				
Eucalipto	SE	0,0116	0,00	8,00	11,71	0,0003	0,00	51,65	0,32				
	OS	0,0153	0,00	22,89	19,93	0,0003	0,00	9,40	0,36				
Álamo	SE	0,0143	0,00	34,30	14,69	0,0004	0,00	0,10	0,40				
	OS	0,0091	0,00	17,99	10,87	0,0003	0,00	5,88	0,35				

## Anexo C: Resultados del área superficial

En la Tabla 19 se presentan los valores obtenidos experimentalmente en cada etapa del protocolo de determinación del WRV para muestras en duplicado (A y B). También se determina el contenido de humedad de las muestras según la ecuación C.1 y el WRV según la ecuación C.2.

$$H\% = \frac{\text{pulpa centrifugada} - \text{pulpa seca}}{\text{pulpa centrifugada}} \quad (C.1)$$

$$WRV = \frac{\text{pulpa centrifugada} - \text{pulpa seca}}{\text{pulpa seca}} \quad (C.2)$$

**Tabla 20: Determinación del WRV para residuos (en duplicado) pretratado por SE, OS e IL.** <sup>A</sup> es el peso del plato donde se secó el material al horno. <sup>B</sup> es el peso del plato y la pulpa centrifugada secados al horno. <sup>C</sup> es el contenido de humedad.

Residuo	Muestras	Plato <sup>A</sup> [g]	Pulpa centrifugada [g]	Total seco <sup>B</sup> [g]	Pulpa seca [g]	H% <sup>C</sup>	Promedio H%	WRV	Promedio WRV
Eucalipto	SE-A	1,0157	1,1784	1,4830	0,4673	60,3%	58,7%	1,52	1,42
	SE-B	0,9868	1,1136	1,4657	0,4789	57,0%			
	OS-A	1,0172	1,9573	1,5099	0,4927	74,8%	75,4%	2,97	3,08
	OS-B	0,9858	1,9829	1,4603	0,4745	76,1%			
	IL-A	0,9926	0,8934	1,3781	0,3855	56,9%	56,1%	1,32	1,28
	IL-B	1,0459	1,0151	1,4982	0,4523	55,4%			
Álamo	SE-A	1,0183	1,3089	1,5416	0,5233	60,0%	63,5%	1,50	1,77
	SE-B	1,0039	1,5951	1,5304	0,5265	67,0%			
	OS-A	0,9987	1,8923	1,5507	0,5520	70,8%	70,8%	2,43	2,43
	OS-B	1,0520	1,9398	1,6173	0,5653	70,9%			

## Anexo D: Resultados del índice de cristalinidad

Se presenta la Tabla 20 con los valores de las 3 medidas realizadas a cada muestra en el espectrómetro infrarrojo, correspondiente a la altura máxima del peak a 1427 y 895  $\text{cm}^{-1}$ . Estas son promediadas y se calcula el índice de cristalinidad (CrI) como la razón entre estas dos alturas.

Tabla 21: Determinación del índice de cristalinidad (CrI) para residuos pretratados por SE, OS e IL.

Residuo	Muestra	Medida 1		Medida 2		Medición 3	
		1427 $\text{cm}^{-1}$	895 $\text{cm}^{-1}$	1427 $\text{cm}^{-1}$	895 $\text{cm}^{-1}$	1427 $\text{cm}^{-1}$	895 $\text{cm}^{-1}$
Eucalipto	SE	0,1857	0,2031	0,1823	0,2109	0,1826	0,2171
	OS	0,1040	0,1454	0,1040	0,1555	0,1023	0,1506
	IL	0,2126	0,2259	0,2291	0,2224	0,2215	0,1956
Álamo	SE	0,1582	0,1860	0,1730	0,2033	0,1516	0,1721
	OS	0,1061	0,1587	0,1054	0,1541	0,1063	0,1590
Residuo	Muestra	Promedio alturas		CrI			
		1427 $\text{cm}^{-1}$	895 $\text{cm}^{-1}$	1427/895			
Eucalipto	SE	0,1835	0,2104	0,87			
	OS	0,1034	0,1505	0,69			
	IL	0,2211	0,2146	1,03			
Álamo	SE	0,1609	0,1871	0,86			
	OS	0,1059	0,1573	0,67			

## ***Anexo E: Resultados del grado de polimerización***

Se presentan los resultados del estudio sobre el efecto del uso de filtro en la medición de viscosidad. Posteriormente, se presentan los resultados de viscosidad obtenidos para el eucalipto y álamo pretratados.

Además, se presenta el ajuste de la ecuación 7.2 que relaciona la conversión de glucosa en función del tamaño de chip inicial y la viscosidad.

### **Efecto del uso de filtro en la medición de viscosidad**

Debido a que el capilar para medir viscosidad es muy fino, la presencia de pequeñas partículas de material no disuelto genera errores en las mediciones, causando incluso la total obstrucción de éste. Por lo tanto, para evitar esto, se filtró la solución de celulosa y cuprietilendiamina (CED) a través de un filtro de fibra de vidrio.

Este experimento consistió en medir el tiempo que tarda en pasar el fluido entre los puntos iniciales y finales del capilar repetidas veces. Las mediciones se realizaron para eucalipto y álamo pretratado por SE, OS e IL. Además, a modo de control, también se midió el tiempo que tarda en pasar por el capilar el CED sin carga de celulosa para descartar que estuviera reaccionando con el filtro (Tabla 21).

Por otro lado, se tomó como variable el tiempo de “shaker” para ver si se lograba una solubilización completa de la celulosa. El protocolo dice que los tiempos deben estar entre 60 – 90 minutos, sin embargo, se llegó a utilizar 150 minutos para el caso del IL, sin lograr una solubilización completa.

En los casos en que se presenta la palabra “tapón”, significa que el capilar fue obstruido y no se pudo medir el tiempo. En algunos casos, se tiene algunas mediciones de tiempo muy distintas, sin embargo, es el menor valor el que sería más representativo, pues el fluido no puede moverse más rápido de lo que su viscosidad le permita. Cualquier aumento en el tiempo de paso se debe a la presencia de alguna partícula que genera una obstrucción parcial del capilar.

En general, se tienen diferencias de más o menos 2 segundos, lo que puede deberse simplemente a variaciones de temperatura en la solución.

Se concluye de este experimento que las diferencias de tiempos entre muestras filtradas y no filtradas no es relevante en el cálculo de la viscosidad, al menos no es relevante para un análisis comparativo.

Tabla 22: Comparación de los tiempos de paso a través del capilar para muestras con y sin filtrar. <sup>A</sup> es el tiempo de agitación para solubilizar la celulosa en el CED. <sup>B</sup> corresponde a las muestras que taparon el capilar y no se pudo medir el tiempo de paso.

Residuo	Muestra	Tiempo shaker <sup>A</sup> [min]	Sin filtrar [s]	Filtrado [s]	Diferencia de tiempo [s]
Eucalipto	SE	90	214,00	171,92	42,08
			tapón <sup>B</sup>	171,11	--
			tapón	171,35	--
			169,54	171,72	-2,18
			tapón	172,04	--
	OS	60	75,00	73,01	1,99
			75,16	72,97	2,19
			75,53	73,03	2,50
			75,55	73,18	2,37
			75,55	73,34	2,21
	OS	90	74,28	71,66	2,62
			73,91	72,22	1,69
			73,78	72,41	1,37
			74,03	72,62	1,41
			73,99	72,80	1,19
IL	150	tapón	191,74	--	
		tapón	190,29	--	
		tapón	189,95	--	
		tapón	188,97	--	
		tapón	187,92	--	
Álamo	SE	90	tapón	576,04	--
			tapón	574,41	--
			tapón	575,28	--
	OS	90	195,22	192,03	3,19
			194,66	197,78	-3,12
			194,60	196,74	-2,14
			194,45	197,41	-2,96
			194,88	196,91	-2,03
--	Control (CED)	--	16,66	16,78	-0,12
			16,37	16,60	-0,23
			16,47	16,48	-0,01
			16,42	16,44	-0,02
			16,35	16,36	-0,01

## Resultados del análisis

En la Tabla 22 se presentan las mediciones de tiempo realizadas en el viscosímetro de capilar para determinar la viscosidad y tener una idea del grado de polimerización. Todas estas muestras fueron agitadas en “shaker” por 90 minutos filtradas a través de filtros de fibra de vidrio. En general las mediciones varían muy poco, lo que le da una mayor robustez al método. El control de CED debiese dar un valor cercano a 1,6 cp<sup>(48)</sup>, lo que se cumple, validando las mediciones.

**Tabla 23: Determinación de la viscosidad para residuos de eucalipto y álamo pretratado por SE, OS e IL.** <sup>A</sup> corresponde a cuprietilendiamina sin carga de celulosa.

Residuo	Muestra	Medición	Tiempo [s]	Tiempo promedio [s]	Viscosidad [cp]
Eucalipto	SE	1	171,92	171,6	17,7
		2	171,11		
		3	171,35		
		4	171,72		
		5	172,04		
	OS	1	71,66	72,3	7,4
		2	72,22		
		3	72,41		
		4	72,62		
		5	72,80		
	IL	1	191,74	189,8	19,5
		2	190,29		
		3	189,95		
		4	188,97		
		5	187,92		
Álamo	SE	1	576,04	575,2	59,2
		2	574,41		
		3	575,28		
		4	--		
		5	--		
	OS	1	192,03	196,2	20,2
		2	197,78		
		3	196,74		
		4	197,41		
		5	196,91		
--	Control (CED) <sup>A</sup>	1	16,78	16,5	1,7
		2	16,60		
		3	16,48		
		4	16,44		
		5	16,36		



## Conversión de glucosa en función de la viscosidad y el tamaño del material inicial

Para tener una primera estimación de la conversión de glucosa basándose en el tamaño de chip inicial y la viscosidad del material pretratado, se propone el siguiente ajuste:

$$C = a + b\mu + cT + d\mu T$$

$C$ : conversión de glucosa

$\mu$ : viscosidad en [cp]

$T$ : tamaño de chip en [mm]

$a, b, c, d$ : parámetros a ajustar

Como se tienen que ajustar 4 parámetros y se conoce la viscosidad, tamaño y conversión de 4 muestras, el sistema se puede resolver.

Tabla 24: Conversión de glucosa, viscosidad y tamaño utilizados para ajustar la ecuación.

Muestra	Conversión de Glucosa [%]	Viscosidad [cp]	Tamaño [mm]
SE Eucalipto	71,9%	17,7	1,5
OS Eucalipto	82,3%	7,4	1,5
SE Álamo	60,9%	59,2	15
OS Álamo	70,8%	20,2	15

Para determinar un único tamaño de chip, debido a que en la realidad tienen una distribución granulométrica, por simplicidad se tomo el promedio. Es decir, para el eucalipto 1,5 mm y para el álamo 15 mm.

Construyendo el sistema matricialmente como:

$$M * \vec{a} = \vec{C}$$

$M$ : matriz de valores de viscosidad y tamaño

$\vec{a}$ : vector de parámetros

$\vec{C}$ : vector de conversión de glucosa

$$\begin{bmatrix} 1 & 17,7 & 1,5 & 17,7 * 1,5 \\ 1 & 7,4 & 1,5 & 7,4 * 1,5 \\ 1 & 59,2 & 15 & 59,2 * 15 \\ 1 & 20,2 & 15 & 20,2 * 15 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} a \\ b \\ c \\ d \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,719 \\ 0,823 \\ 0,609 \\ 0,708 \end{pmatrix}$$

Resolviendo el sistema se obtiene:

$$a = 0,91485 [-]$$

$$b = -0,01106 \left[ \frac{1}{cp} \right]$$

$$c = -0,01041 \left[ \frac{1}{mm} \right]$$

$$d = 0,00057 \left[ \frac{1}{cp \text{ mm}} \right]$$

Generando finalmente la ecuación ajustada para la conversión en función de la viscosidad en centipoise y el tamaño en milímetros.

$$C = 0,91485 - 0,01106 \mu - 0,01041 T + 0,00057 \mu T$$

Realizando análisis de sensibilidad a los distintos parámetros, imponiendo su valor igual a cero, se aprecia que "a" es el valor más influyente y que b, c y d tienen una importancia similar entre ellos. Sin embargo, en general, ningún valor es despreciable.

## Anexo F: Resultados de la accesibilidad enzimática

En la Tabla 24 se presentan los valores de absorbancia obtenidos según el método de Simons' Stain para muestras de eucalipto pretratadas por SE, OS e IL y muestras de álamo pretratadas por SE y OS. Los valores de coeficientes de extinción utilizados para los cálculos posteriores<sup>26</sup> fueron 42 mL/g para DO y 12 mL/g para DB.

Tabla 25: Absorbancia medida a las distintas muestras de eucalipto y álamo incubado con DB y DO.

Residuo	Muestra (6 diluciones)	Absorbancia		
		DB (450 nm)	DO (625 nm)	
Eucalipto	SE	1	0,3975	0,1725
		2	0,8306	0,3189
		3	0,7596	0,2745
		4	0,0766	0,0324
		5	0,3681	0,1352
		6	0,7563	0,2525
	OS	1	0,0666	0,0401
		2	0,2620	0,1377
		3	0,4598	0,2072
		4	0,3152	0,1405
		5	0,3037	0,1260
		6	0,5327	0,2023
	IL	1	0,8201	0,3392
		2	0,7284	0,2996
		3	0,8170	0,2944
		4	0,6217	0,2221
		5	0,5112	0,1766
		6	0,7918	0,2541
Álamo	SE	1	0,3530	0,1709
		2	0,8267	0,3031
		3	0,4855	0,1885
		4	0,2160	0,0877
		5	0,4081	0,1488
		6	0,6232	0,2093
	OS	1	0,1077	0,0657
		2	0,2570	0,1371
		3	0,4122	0,1858
		4	0,3449	0,1517
		5	0,2973	0,1252
		6	0,5534	0,2088

<sup>26</sup> Realizados por Richard Chandra, jefe del área de pretratamiento del grupo de Jack Saddler en UBC.

## Anexo G: Estimación de costos de caracterización física

Dado que la caracterización física se presenta como una forma de comprender mejor la conversión de glucosa obtenida en la hidrólisis y, además, como una posible forma de predecir estos resultados, es importante tener una estimación del costo asociado a la caracterización física del material. Para esto, se realizó una selección de las etapas más relevantes de cada método y se le asoció un costo estimado a partir de datos presentes en la literatura (Tabla 25).

**Tabla 26: Estimación de costo por muestra para cada propiedad física.** El kWh fue considerado a CLP 76,8 (Endesa, 2011). El cambio de moneda fue considerado a USD1 = CLP 480. El valor entre paréntesis es solo el valor redondeado.

Propiedad física	Etapas de costo significativo	Costo unitario de la etapa	Costo de la etapa por muestra [CLP]	Costo total por muestra [CLP]
<b>Área superficial (WRV)</b>	Refrigeración overnight (12 h)	1,5 kWh/día <sup>(49)</sup>	58	983 (~1000)
	Centrifugación (30 min)	2,4 kWh/día <sup>(50)</sup>	3,8	
	Secado en horno overnight (12 h)	24 kWh/día <sup>(51)</sup>	922	
<b>Cristalinidad (FT-IR)</b>	1 papel filtro (25 um)	0,06 US\$/unidad <sup>(52)</sup>	29	29 (~30)
<b>Viscosidad (DP)</b>	0,3 mL ácido acético	0,6 US\$/L <sup>(53)</sup>	0,1	783 (~800)
	1,5 g NaClO <sub>2</sub>	0,65 UD\$/kg <sup>(53)</sup>	0,5	
	3 papel filtro (25 um)	0,06 US\$/unidad <sup>(52)</sup>	86	
	25 mL cuprietilendiamina 1M	58 US\$/L <sup>(54)</sup>	696	
<b>Longitud de fibra (FQA)</b>	Agitación (10 min)	2,4 kWh/día <sup>(50)</sup>	1,3	1
<b>Accesibilidad enzimática (SS)</b>	0,6 mL DB	3 US\$/g <sup>(55)</sup>	173	438 (~500)
	0,6 mL DO	3 US\$/g <sup>(53)</sup>	173	
	Agitación (12 h)	2,4 kWh/día <sup>(50)</sup>	92	

Es importante notar que en el cálculo de los costos se consideró el consumo energético de hornos y refrigeradores. En general, estos equipos funcionan de manera continua en un laboratorio y es utilizado para múltiples propósitos. Por lo tanto, podrían considerarse costos hundidos, lo que afectaría fuertemente a algunos de estos, como es el caso del área superficial (WRV), donde el 94% del costo corresponde al secado en horno. El costo de adquisición de los equipos no se considera, razón por la que la medición de la longitud de fibra resulta tan económica.

Para la Tabla 15, presentada en la sección 7.3., se redondearon los valores, pues son solo una estimación para poder compararlos, utilizándose los valores entre paréntesis.