



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

**ESTUDIO DEL PROCESO PRODUCTIVO DE BIOETANOL A
PARTIR DE RESIDUOS DE EUCALIPTUS PRE-TRATADOS
CON DISTINTOS LÍQUIDOS IÓNICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA**

LORETO ALEJANDRA MARTÍNEZ BOCAZ

**PROFESORA GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
BARBARA A. ANDREWS
FRANCISCO GRACIA CAROCA**

SANTIAGO DE CHILE
Julio 2012

RESUMEN

Los combustibles fósiles son cada vez más escasos y la contaminación ambiental sigue en aumento, por lo que es imprescindible la búsqueda de nuevas fuentes de energía. Una alternativa es la producción de bioetanol, la cual se puede realizar a partir de residuos de biomasa forestal, lo que es bastante conveniente para la situación chilena, ya que la industria forestal es una de las más importantes en este país.

Este trabajo de memoria consistió en estudiar distintas condiciones del proceso productivo del bioetanol, a partir de residuos de *Eucalyptus globulus Labill* (eucalipto) como material lignocelulósico. La primera parte de este estudio consistió en utilizar líquidos iónicos protonados (PIs) en la etapa de pre-tratamiento, con condiciones de operación de 30 o 60 minutos a 60, 70, 80 y 90°C. En este caso, se obtuvo pequeños aumentos en el rendimiento de la sacarificación al utilizar acetato de 2-hidroxydietilamonio (2-HDEAA) y lactato de 2-hidroxyetilamonio (2-HEAL) en el pre-tratamiento. El mejor resultado se obtuvo con 2-HEAL a 70°C, durante 30 minutos, aunque este rendimiento no supera el 4%.

En la segunda parte de este estudio, se analizaron distintas condiciones de operación en la etapa de pre-tratamiento, de secado y de lavado del proceso productivo del bioetanol. En la etapa del pre-tratamiento, se utilizaron dos líquidos iónicos aprotonados (AIs): [EMIM][Cl] y [EMIM][Ac]. En los estudios en los que se utilizó [EMIM][Cl] no se obtuvieron buenos resultados, ya que los rendimientos no superaron el 6%, lo que se debe a las impurezas que presentó el LI utilizado. En el caso del [EMIM][Ac] se obtuvieron muy buenos resultados, ya que los rendimientos fueron de hasta un 63%, lo que equivale a obtener 351 mg de glucosa / gr de material pre-tratado. Si se compara este resultado con resultados anteriores (con [EMIM][Cl]), en los cuales el mejor rendimiento corresponde de 185 mg de glucosa / gr de material pre-tratado, se obtiene un aumento del 90% en el rendimiento.

La última etapa de este estudio correspondió a la sacarificación y fermentación simultáneas, en las cuales se analizaron distintas cargas de biomasa, LI en el pre-tratamiento y distintos métodos de obtención del inóculo de levaduras. Los mejores rendimientos se obtuvieron con una carga de biomasa del 5%, con el material pre-tratado con [EMIM][Ac] y con el inóculo obtenido sin propagación, equivalentes a un rendimiento de 412 litros de etanol por tonelada de material pre-tratado. Al comparar estos resultados con los mejores obtenidos en estudios previos, se observó un aumento de un 182% en el rendimiento.

Finalmente, con el rendimiento de 412 litros de etanol por tonelada de material pre-tratado, y buscando reemplazar el 2% o un 5% del requerimiento de gasolina para el año 2012, se logra cubrir un 1,2% o un 0,5% de la demanda de este combustible respectivamente. Para obtener mejores porcentajes de cobertura se debe optimizar este proceso productivo, o se podría aumentar la cantidad de material disponible, para esto se propone el uso de cultivos dendroenergéticos de eucalipto.

Como conclusión al trabajo realizado, se estima conveniente continuar este estudio, con el fin de aumentar el rendimiento del proceso productivo del bioetanol. Para esto se recomienda realizar más estudios con 2-HDEAA, 2-HEAL y con [EMIM][Ac], ya que estos presentaron los mejores resultados. Por otro lado, se recomienda estudiar el reciclaje de líquidos iónicos, ya que se deben reducir los costos de este proceso productivo.

AGRADECIMIENTOS

Luego de terminar esta importante etapa de mi vida quisiera agradecer a todas esas personas que estuvieron conmigo de una u otra manera y que me apoyaron constantemente en mis altos y bajos:

Primero quiero agradecer a mi familia, a mis padres Carmen y Rodrigo, y a mi hermano Rodrigo, de quienes he recibido un apoyo incondicional desde el comienzo. Siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado y me han hecho ver diferentes salidas a mis problemas. Realmente agradezco tener una familia como la que tengo, llena de valores y de un gran apoyo familiar.

También quiero agradecer a mi profesora guía María Elena Lienqueo, por su gran disposición y comprensión, a la profesora Oriana Salazar y a Nancy Carrasco, ya que sin su ayuda no hubiera terminado nunca, muchas gracias por las respuestas a las infinitas preguntas que tenía. A Ricardo Harris, por ayudarme en todo, sin tu ayuda todavía estaría empezando, y a Christian Wilken. Muchas gracias a la Gina, a la señora Erika y a todos los profesores del Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología.

A mis amigos del departamento: Camilo, Chico, Nico, Cami's, Javier, Pancito, Diego, Pablo, Maripa, Charry, Curotto y Domingo (materiales también cuenta). Gracias por alegrarme los días durante estos últimos años, por esas infinitas veces que nos reímos y por las tantas otras que pasamos mal juntos. No hay nada como burlarse de uno mismo y de las malas situaciones.

También a mis amigos de primer año, a Felipe, Shaggy, Kari, Sele, Cami, Trini, Xala, Pablito, Nubian y en especial Jarrito... a quien nunca voy a olvidar, si todos quedamos hablando como tú!! Esa buena onda y ganas de pasarlo bien siempre quedará conmigo. A todos ustedes muchas gracias por todas esas tardes de risa y esos buenos momentos.

Finalmente agradezco el apoyo financiero proporcionado por el Programa de Investigación Domeyko Energía de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, al Instituto Milenio y al Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB). A la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS por la donación de las levaduras y a Miguel Iglesias por la donación de los líquidos iónicos protonados.

Loreto Alejandra Martínez Bocaz, Mayo 2012

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I: Introducción y Motivación, Marco Teórico, Antecedentes y Objetivos	1
1. Introducción y Motivación	1
1.1. Crisis energética y medioambiental.....	1
1.2. Crisis energética y medioambiental en Chile.....	2
1.3. Biocombustibles como alternativa	3
1.4. Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.....	5
1.5. Proyección para la producción de bioetanol en Chile, a partir de material lignocelulósico	6
1.6. Motivación y Justificación	7
2. Marco teórico.....	8
2.1. Biomasa	8
2.1.1 Biomasa lignocelulósica.....	8
2.2. Reducción de tamaño y tamizado.....	11
2.3. Pre-tratamiento.....	11
2.3.1 Pre-tratamiento con líquidos iónicos.....	12
2.4. Sacarificación o hidrólisis enzimática	13
2.5. Fermentación.....	14
3. Antecedentes del trabajo a desarrollar.....	16
3.1. Pre-tratamiento con PILs	16
3.2. Pre-tratamiento con AILs.....	17
3.3. Sacarificación y fermentación simultáneas.....	19
4. Objetivos.....	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO II: Materiales, Procedimientos y Metodologías.....	21
5. Materiales	21
5.1. Madera	21
5.2. Líquidos iónicos	21
5.3. Enzimas.....	22
5.4. Microorganismo fermentador.....	22
6. Procedimientos.....	22
1.- Pre-tratamiento y sacarificación con PILs:.....	23
2.- Pre-tratamiento y sacarificación con AILs:	24
3.- Sacarificación y fermentación simultánea:	24
6.1. Molienda y tamizado	24
6.2. Pre-tratamiento del material con Líquidos Iónicos.....	25
6.3. Lavado del material pre-tratado	26
6.4. Secado de la celulosa pre-tratada	26
6.5. Sacarificación y Fermentación	26

6.5.1	Sacarificación sin fermentación.....	26
6.5.2	Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)	27
7.	Metodologías	28
7.1.	Secado del material.....	28
7.2.	Reciclaje de Líquidos iónicos	28
7.3.	Aislamiento de colonias de levadura y obtención del inóculo	29
7.4.	Medición de glucosa	29
7.5.	Medición de etanol	29
CAPÍTULO III: Resultados y Discusión		30
8.	Resultados y Discusiones	30
8.1.	Pre-tratamientos con PILs.....	30
8.2.	Pre-tratamientos con AILs	32
8.2.1	Pre-tratamientos con [EMIM][Cl]	32
	Efecto del secado, forma de lavado y origen de la materia prima.....	33
8.2.2	Pre-tratamientos con [EMIM][Ac]	37
8.3.	Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF).....	43
8.4.	Cobertura Potencial de Bioetanol.....	47
CAPÍTULO IV: Conclusiones y Recomendaciones		50
9.	Conclusiones.....	50
10.	Recomendaciones.....	52
Referencias.....		53
ANEXOS		A1
Anexo A.- Introducción y Motivación.....		A1
A.1	Proyección del aumento del precio del petróleo	A1
A.2	Emissiones de dióxido de Carbono en el mundo	A1
A.3	Participación del bioetanol en el sector transporte	A2
	Políticas de uso de biocombustibles.....	A3
Anexo B.- Marco teórico.....		B1
B.1	Reducción de tamaño y tamizado	B1
B.2	Pre-tratamiento	B1
B.3	Lavado del material pre-tratado.....	B4
B.4	Secado del material.....	B5
B.5	Sacarificación y fermentación simultáneas	B6
Anexo C.- Materiales		C1
Anexo D.- Metodologías.....		D1
Anexo E.- Resultados y Discusiones		E1
E.1	Cálculo de la disponibilidad de glucosa.....	E1
E.2	Cálculo del rendimiento de la sacarificación.....	E1
E.3	Cálculo de los rendimientos de la SSF.....	E2

E.3.1 Rendimiento [%]	E2
E.3.2 Rendimiento [gr de etanol/kg de material pre-tratado]	E3
E.3.3 Rendimiento [lt de etanol/ton de material pre-tratado]	E3
Anexo F.- Especificaciones del [EMIM][Cl] de Merck.....	F1

Índice de Tablas

Tabla 1-1: Balance energético de Chile, año 2008.....	2
Tabla 1-2: Producción mundial de bioetanol, año 2008.....	4
Tabla 1-3: Requerimientos de bioetanol año 2012 en Chile.....	6
Tabla 2-1: Composición de distintas biomásas lignocelulósicas.....	9
Tabla 2-2: Composición química del residuo de eucalipto.....	9
Tabla 2-3: Características y diferencias entre los Líquidos Iónicos Aprotónicos (AIL) y Protonados (PIL).....	13
Tabla 2-4: Rangos óptimos de operación para la sacarificación.....	14
Tabla 3-1: Cationes y aniones utilizados para la síntesis de PILs en el estudio de Pinkert et al.	16
Tabla 3-2: Porcentajes de liberación de glucosa (rendimiento), luego de 10 o 24 horas de hidrólisis enzimática (H.E.), con un pre-tratamiento con [EMIM][Ac], con distintas condiciones de operación (temperatura y tiempo), con álamo y rastrojos de maíz como material lignocelulósico, según el estudio de Varanasi et al.....	17
Tabla 3-3: Rendimiento en la hidrólisis de celulosa en glucosa, post-pre-tratamiento con [EMIM][Ac] con distintas cargas de álamo (biomasa), según el estudio de Varanasi et al.....	18
Tabla 3-4: Rendimiento de la hidrólisis enzimática de eucalipto por 72 horas, post-pre-tratamiento con [EMIM][Cl].....	19
Tabla 3-5: Parámetros en estudio y rangos/alternativas de trabajo del estudio de Niklitschek.....	19
Tabla 8-1: Parámetros en estudio y rangos de trabajo para el pretratamiento con 2-HDEAA, 2-HEAA o 2-HEAL.....	32
Tabla 8-2: Parámetros en estudio de la centrifugación en la etapa de lavado.....	38
Tabla 8-3: Efecto del tiempo de lavado en la eficiencia de las etapas de lavado durante 5 o 10 minutos, a 8.000 rpm (8.228xg).....	43
Tabla 8-4: Parámetros en estudio en la sacarificación y fermentación simultáneas.....	45
Tabla 8-5: Rendimientos de las distintas configuraciones de la SSF.....	47
Tabla 8-6: Residuos de eucalipto aprovechables energéticamente, según tipo de aserradero.....	49
Tabla 8-7: Producción potencial de bioetanol, según la cantidad de RAEs de eucalipto.....	49
Tabla 8-8: Destino de los RAEs, según porcentaje.....	50
Tabla 8-9: Porcentajes de cobertura de bioetanol, según el porcentaje de reemplazo de gasolina.....	50
Tabla 8-10: Cantidad de hectáreas de eucalipto para tener un 100% de cobertura, según el porcentaje de reemplazo de gasolina.....	51
Tabla B-1: Ventajas y desventajas de los distintos tipos de pretratamientos.....	B1

Índice de Figuras

Figura 1-1: Demanda Energética versus PIB.....	1
Figura 1-2: Producción mundial de bioetanol.....	4
Figura 1-3: Comparación del diagrama de flujos de la producción e bioetanol, a partir de distintas biomásas.....	6
Figura 2-1: Diagrama de bloques simplificado del proceso productivo del bioetanol.....	8
Figura 2-2: Esquema de la estructura de la biomasa lignocelulósica.....	10
Figura 2-3: Enlaces intra- y extra-moleculares en la celulosa.....	10
Figura 2-4: Esquema de la matriz de biomasa lignocelulósica con y sin pre-tratamiento.....	12
Figura 6-1: Diagrama de bloques del proceso productivo del bioetanol a partir de material lignocelulósico.....	24
Figura 8-1: Rendimientos de la hidrólisis enzimática, post-pre-tratamientos con PILs a 60 y 70°C, durante 30 y 60 minutos. Barras de error indican la desviación estándar.....	33
Figura 8-2: Perfiles cinéticos de la sacarificación, post-pre-tratamiento con [EMIM][Cl] durante (A) 30 minutos y (B) 60 minutos, con una posterior etapa de secado a 30°C, 40°C, 50°C y a temperatura ambiente.....	35
Figura 8-3: Efecto del tipo de lavado y de la edad de la biomasa en la sacarificación, (A) con distintos tipos de lavado, (B) con un pre-tratamiento con biomásas de distintas edades, ambos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p, con [EMIM][Cl] y con una posterior etapa de secado a 40°C.....	37
Figura 8-4: Efecto en la hidrólisis enzimática, de las condiciones de lavado post-pre-tratamiento. (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Eficiencias de cada configuración, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p, con [EMIM][Cl] y con una posterior etapa de secado a 40°C.....	39
Figura 8-5: Resultados del pre-tratamiento con distintos AIL's, (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 60 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C.....	40
Figura 8-6: Resultados del pre-tratamiento con [EMIM][Ac], (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 30 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C.....	41
Figura 8-7: Comparación de la sacarificación de eucalipto pre-tratado con [EMIM][Ac] puro o reciclado, (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 30 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 y 10 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C.....	42
Figura 8-8: Efecto del secado antes y después del pre-tratamiento con [EMIM][Ac], (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 30 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C.....	44
Figura 8-9: Perfiles cinéticos de la sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto, pre-tratado con [EMIM][Ac] o con [EMIM][Cl], (A) gramos de etanol por kilogramo de material pre-tratado, (B) litros de etanol por tonelada de material pre-tratado. Las condiciones de sacarificación/fermentación se detallan en la Tabla 8-4.....	45
Figura 8-10: Rendimientos de la SSF a las 96 horas, (A) En gramo de etanol por kilogramo de material pre-tratado, (B) en litros de etanol por tonelada de material pre-tratado.....	47
Figura A-1: Proyección del precio del petróleo.....	A1
Figura A-2: Emisiones de CO ₂ por combustión de combustibles fósiles.....	A1
Figura A-3: Emisiones de gases del efecto invernadero, por sector.....	A2
Figura A-4: Participación del bioetanol en el sector transporte en carretera.....	A2
Figura B-1: Estructuras de los cationes (arriba) y aniones (abajo) más comunes en los AILs involucrados en la disolución de la celulosa.....	B1

Figura B-2: Estructura de los AIL's utilizados en este estudio.....	B3
Figura B-3: Mecanismo de síntesis y estructura de un PILs (2-HEAA).....	B3
Figura D-1: Curvas de calibración de volumen de etanol versus el área entregada por la interfaz del CG. (1) Aproximación lineal de las diluciones 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1% v/v (2) Aproximación lineal de las diluciones 1, 5 y 10% v/v.....	D1

Índice de Imágenes

Imagen 6-1: a) Eucalipto tamaño pin-chip, b) acercamiento de a).....	26
Imagen 6-2: Tubo Falcon de 15 ml con el material lignocelulósico, las enzimas y el buffer.....	28
Imagen 6-3: a) Matraz Erlenmeyer modificado con el material lignocelulósico, las enzimas, el inóculo y el buffer para la SSF, b) acercamiento de a).....	29
Imagen 8-1: Material pre-tratado con [EMIM][Cl] dispuesto para la etapa de secado a distintas temperaturas.....	35
Imagen 8-2: [EMIM][Ac] a) puro, b) reciclado.....	43
Imagen 8-3: Disminución en la cantidad de material dentro del matraz debido a la pérdida de las tapas, generada por la alta presión dentro de estos (izq.), matraz normal al finalizar la SSF (der.).....	46
Imagen B-1: Molino utilizado para la reducción de tamaño del eucalipto.....	B1
Imagen B-2: Viales de vidrio con a) Líquido iónico, b) Líquido iónico y residuos de eucalipto previo al pre-tratado y c) Resultado luego del pre-tratamiento.....	B4
Imagen B-3: Baño de silicona termorregulado para realizar los pre-tratamientos.....	B4
Imagen B-4: Etapas sucesivas de lavado del material pre-tratado con [EMIM][Ac]. Imágenes luego de a) primer lavado, b) segundo lavado y c) tercer lavado.....	B5
Imagen B-5: Placas Petri con material para secar. (izquierda: Material sin pre-tratar, derecha: Material pre-tratado).....	B6
Imagen B-6: (A) Matraz Erlenmeyer, (B) Matraz Erlenmeyer modificado para la SSF (C) Matraz Erlenmeyer modificado luego de una SSF con material pre-tratado con [EMIM][Ac].....	B6
Imagen D-1: “Peak” de etanol entregado por la interfaz del cromatógrafo de gases, cuya área bajo la curva es proporcional a la concentración de etanol en la muestra.....	D1

NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES

- [EMIM][Cl]: cloruro de 1-etil-3-metilimidazol
- [EMIM][Ac]: acetato de 1-etil-3-metilimidazol
- 2-HDEAA: acetato de 2-hidroxydietilamonio
- 2-HEAA: acetato de 2-hidroxyetilamonio
- 2-HEAL: lactato de 2-hidroxyetilamonio
- AIL: líquido iónico aprotonado o “convencional”
- CG: Cromatógrafo de gases
- DO: Densidad óptica
- IEA: Agencia Internacional de Energía (*International Energy Agency* en inglés)
- LI: líquido iónico
- MO: Microorganismo
- PIL: Líquido iónico protonado o “no convencional”
- RAE: Residuo (maderero) aprovechable energéticamente
- SHF: Sacarificación y fermentación separadas
- SSF: Sacarificación y fermentación simultáneas
- TRE: Tasa de retorno energético

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y MOTIVACIÓN, MARCO TEÓRICO, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En este capítulo se señalan los motivos por los que se decidió realizar este estudio, siendo los principales la crisis medioambiental y el crítico agotamiento de los recursos petrolíferos. Además se presentan los antecedentes sobre aspectos medioambientales, combustibles fósiles y las diferentes alternativas para solucionar estos problemas, como es la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Finalmente, se señalan los objetivos principales y específicos de este estudio.

1. Introducción y Motivación

1.1. Crisis energética y medioambiental

Hoy en día unas de las mayores preocupaciones mundiales son la crisis energética y la contaminación ambiental. Las demandas energéticas mundiales siguen creciendo constantemente con el aumento de la población, lo cual se puede observar en la Figura 1.1, en la cual se puede apreciar el aumento lineal de la demanda energética en relación al aumento del Producto Interno Bruto (PIB o GDP por sus siglas en inglés, *Gross Domestic Product*) en países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD), en otros que no pertenecen a la OECD, y en el mundo en general ^[1].

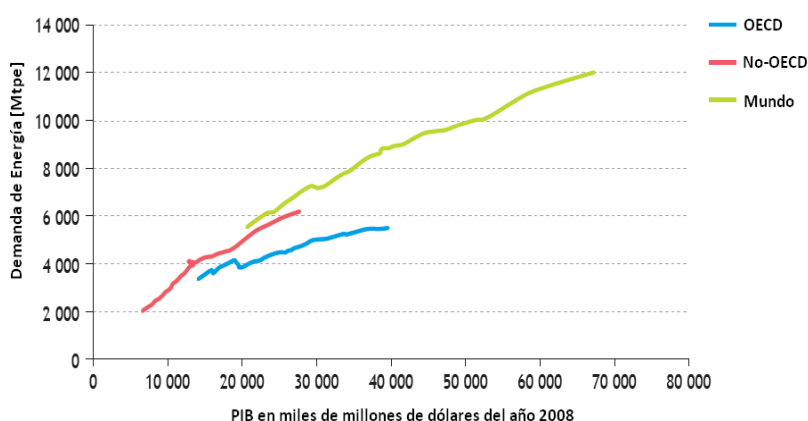


Figura 1-1: Demanda Energética versus PIB (Fuente: Adaptación WEO 2009 ^[1])

Por otro lado, según estimaciones de Pedro Prieto, el 87% de la matriz energética mundial está basada en energías del tipo fósil ^[2], lo que implica que el mundo es altamente dependiente de estas energías y por lo tanto es necesario diversificar la matriz energética mundial, para evitar una gran catástrofe cuando se acaben las fuentes de los combustibles fósiles no renovables. García et al. (2010) estima que las reservas mundiales de petróleo, gas natural y carbón se acabarán en 41, 64 y 167 años respectivamente, lo que potencia la búsqueda de combustibles alternativos ^[3].

En el caso particular del petróleo, además del hecho que cada año se dispone de menos pozos petroleros, hay que considerar el efecto derivado de la dificultad creciente para la extracción de petróleo, efecto descrito como “apretar una esponja”, por Pedro Prieto ^[2]. Este efecto genera que la tasa de retorno

energético (TRE) disminuya constantemente, es decir, cada vez se gaste más energía para obtener una menor cantidad de este combustible. Según el *World Energy Outlook* (WEO) 2009, para el año 2030 el petróleo va a mantener su posición como el principal combustible, cuya demanda se estima que aumente en 1% cada año, principalmente en los países no pertenecientes a la OECD. Es debido al sector de transporte que se genera este aumento, correspondiendo al 97% de éste ^[1]. Además a este factor hay que sumarle el creciente aumento en los precios del petróleo (ver Anexo A.1).

Por otro lado, se tienen los problemas medioambientales que causan la utilización de estas fuentes fósiles de energía, según la Agencia Internacional de Energía (IEA), la creciente demanda de energía de combustibles fósiles a jugado un papel clave en el aumento de las emisiones de CO₂, las que eran prácticamente cero antes de la revolución industrial, pero que han aumentado exponencialmente (ver Anexo A.2) ^[4]. De estas emisiones, el 23% corresponde al sector de transporte, el segundo sector más contaminante. El primer lugar lo ocupa el sector generador de electricidad y calor, con un 41%. Se estima que la demanda global del sector de transporte va a aumentar en un 40% hacia el 2035, donde el transporte en carretera juega el rol principal.

El dióxido de carbono (CO₂) es uno de los principales gases que causa el efecto invernadero, junto con el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O). Estos tres gases son generados predominantemente por las variadas actividades relacionadas con la energía, desde los procesos de obtención hasta los de distribución y consumo. El 92% corresponde a CO₂, el que es esencialmente producido a partir de procesos de combustión (ver Anexo A.2) ^[4].

1.2. Crisis energética y medioambiental en Chile

Chile no se encuentra exento de estos problemas, es más, como se puede apreciar en la Tabla 1-1, Chile incluso presenta problemas energéticos que otros países no tienen. Esto se debe a que la mayor parte de la energía es importada, correspondiendo a un 62,3% del total de la energía consumida en Chile. Además, se tiene que el 53% de la producción energética nacional proviene de la madera. Esto implica una alta dependencia de los mercados de energía internacionales y una matriz energética poco diversificada, lo cual es una condición bastante desfavorable en comparación con otros países.

Tabla 1-1: Balance Energético de Chile, año 2008

Fuente Energía	Producción Nacional (PJ)	Importación (PJ)
Petróleo	5,85	455,55
Gas natural	82,46	30,51
Carbón	11,58	181,71
Hidroelectricidad	89,99	0
Energía eólica	0,14	0
Madera y otros	214,24	0
Total	404,26	667,77

(Fuente: Adaptación García et al. ^[3])

La producción energética nacional está basada principalmente en la madera, lo que se debe a que Chile cuenta con grandes extensiones de terreno dedicadas a las plantaciones forestales y además cuenta con gran cantidad de bosques nativos. Los bosques en Chile cubren el 21,5% de la superficie total del territorio nacional, lo que equivale a 16 millones de hectáreas de bosques, de las cuales 13,7 millones de hectáreas son bosques nativos (18,4%) y 2,7 millones de hectáreas corresponden a plantaciones forestales (3,1%) ^[5]. El problema reside en que la utilización de la madera con fines energéticos consiste en la combustión como leña o en la generación de carbón vegetal. En ninguno de los dos casos la energía producida se puede utilizar en el sector de transporte.

Con respecto a la contaminación en Chile, según la IEA, las emisiones totales de CO₂ en este país han aumentado en un 109% entre 1990 y 2009, llegando hasta 64,9 millones de toneladas de CO₂. En particular, las emisiones de CO₂ por combustión de combustibles fósiles han aumentado en un 62,7% en el mismo periodo ^[4].

Por todos los motivos señalados anteriormente, es necesario buscar fuentes alternativas de energía, que sean renovables, que satisfagan y reemplacen la alta demanda de los combustibles fósiles, que no contaminen el medio ambiente y en el caso de Chile, que aprovechen el principal recurso disponible, como son la madera y otros residuos lignocelulósicos.

1.3. Biocombustibles como alternativa ¹

Los biocombustibles consisten en combustibles que se generan de manera renovable y que son considerablemente más amigables con el medio ambiente que sus alternativas fósiles, como el petróleo, el carbón o el gas natural. Los biocombustibles se encuentran en distintos estados, lo que permite destinarlos a distintos usos. Estos pueden estar en estado sólido, como los pellets de madera y el carbón vegetal, líquido como biodiesel, butanol o bioetanol, o en estado gaseoso, como biogás ^[6].

En el caso particular del bioetanol, este biocombustible es considerado como una muy buena alternativa para reemplazar la gasolina, debido a que el bioetanol es renovable y limpio. Se considera que sus emisiones netas de CO₂ son prácticamente cero ^[7,8]. Según señala Mussatto et al. (2010), combustionar etanol en vez de gasolina ayuda a reducir en más de un 80% las emisiones de carbono y elimina por completo las emisiones de dióxido de sulfuro (SO₂), compuesto que causa la lluvia ácida. Es por esto que el bioetanol es considerado como el biocombustible líquido más importante en el mundo, y su utilización está aumentando constantemente.

Países como Brasil y Estados Unidos han sido los pioneros en la investigación e implementación de bioetanol, siendo este último el mayor productor de este tipo de biocombustible ^[4,8,9]. Ambos países cuentan con políticas que fomentan el desarrollo de la industria del bioetanol, al punto en que el 84% de los automóviles producidos en Brasil el año 2009 pueden funcionar con un 100% de etanol o con las mezclas autorizadas de gasolina-etanol ^[4].

¹ Las políticas del uso de biocombustibles en Chile se encuentran en el Anexo A.3

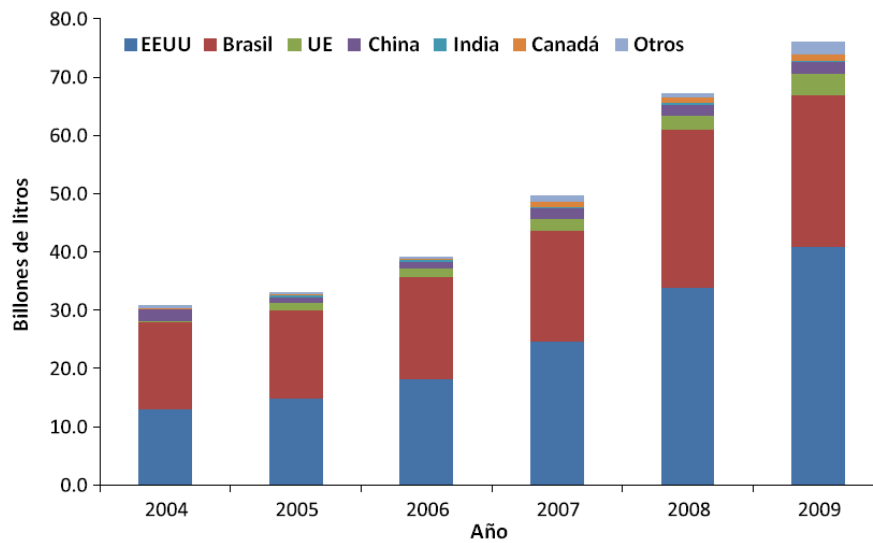


Figura 1-2: Producción mundial de bioetanol (Fuente: Adaptación Timilsina ^[10])

En la Figura 1-2 se puede observar cómo la producción mundial de bioetanol ha aumentado considerablemente estos últimos años, mostrando un crecimiento exponencial. Históricamente, Brasil fue el primer país en industrializar su producción de bioetanol, pero desde el año 2006 Estados Unidos se convirtió en el principal productor de este biocombustible ^[10].

Tabla 1-2: Producción mundial de bioetanol, año 2008

País	Producción [Mm ³] II	Porcentaje
Estados Unidos	34.070	52
Brasil	24.500	37
China	1.900	3
Francia	1.000	2
Otros	3.892	6
Total	65.362	100

(Fuente: Adaptación Mussatto et al. ^[8])

Esta producción mundial logra cubrir menos del 24% de la demanda para el transporte en Brasil, y no alcanza el 6% en Estados Unidos o en la Unión Europea ^[4]. Según las políticas planteadas en estos países, mediante las cuales se propone alcanzar cierta producción mínima de bioetanol para reemplazar la gasolina, estos valores son muy bajos, por lo que falta aumentar considerablemente la producción de este combustible para cumplir las metas respectivas de cada país (ver Anexo A.2).

Por otro lado, el bioetanol producido en estos países es bioetanol de primera generación, es decir, es generado a partir de materias primas como el maíz, trigo, girasol y caña de azúcar. Estados Unidos basa su producción de bioetanol en un 95% a partir de maíz y en el caso de Brasil, su principal materia prima es la caña de azúcar. En resumen, el 95% del total del bioetanol generado hoy en día proviene de productos agrícolas ^[8]. Como señala Ajanovic ^[9], en el 2006 aproximadamente 14 millones de hectáreas estaban destinadas a la producción de biocombustibles, para suplir solamente el 1% de la demanda global de

^{II} Mm³ = miles de metros cúbicos

combustibles para transporte; esto sugiere que es prácticamente imposible cubrir el 100% del bioetanol requerido, ya que se requeriría cultivar demasiado terreno. Llevar los biocombustibles a gran escala es muy poco factible, a menos que se desarrollen tecnologías basadas en material lignocelulósico para su producción. Esa biomasa requiere menor cantidad de terrenos arables y no compiten con la industria alimenticia, es por esto que los combustibles derivados de ella se denominan biocombustibles de segunda generación.

1.4. Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

Las materias primas compuestas de biomasa lignocelulósica son las más abundantes en el mundo, por lo que representan la fuente de azúcares con mayor potencial para la producción de bioetanol de segunda generación ^[11].

Particularmente en Chile, este proceso para la producción de bioetanol es el que más se acomoda, ya que este sistema no interfiere con la industria de los alimentos y permite una utilización de los residuos generados por una de las industrias más importantes en este país, la industria forestal. El problema de este proceso es que es bastante más complejo y costoso que la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar ^[6,8,10]. Un análisis comparativo de costos de ambos procesos, muestra que producir un litro de bioetanol a partir de caña de azúcar cuesta entre 0,18-0,20 US\$, en cambio un litro de bioetanol producido desde material lignocelulósico cuesta aproximadamente 1,00 US\$ ^[10].

Como se puede observar en la Figura 1-3, este proceso requiere de etapas extras, como la molienda del material para aumentar el área superficial del material y un pre-tratamiento, que son pasos necesarios para aumentar el rendimiento de la siguiente etapa, la hidrólisis enzimática o sacarificación. Además, en este caso hay que considerar 2 etapas de fermentación, una en la cual se fermenta la glucosa y otra en la que se utilizan otros azúcares fermentables, como las pentosas. Esto se debe a que la biomasa lignocelulósica está conformada principalmente por 3 macromoléculas: celulosa, hemicelulosa y lignina, compuestos que al formar una red tridimensional que recubre a la celulosa dificultan el acceso de las enzimas para poder monomerizarla en glucosa ^[12]. Además se tiene que la hemicelulosa está compuesta por hexosas y pentosas, siendo estas últimas más complejas de fermentar en etanol ^[13]. Estos puntos serán explicados con mayor detalle en la sección 2 del Capítulo I.

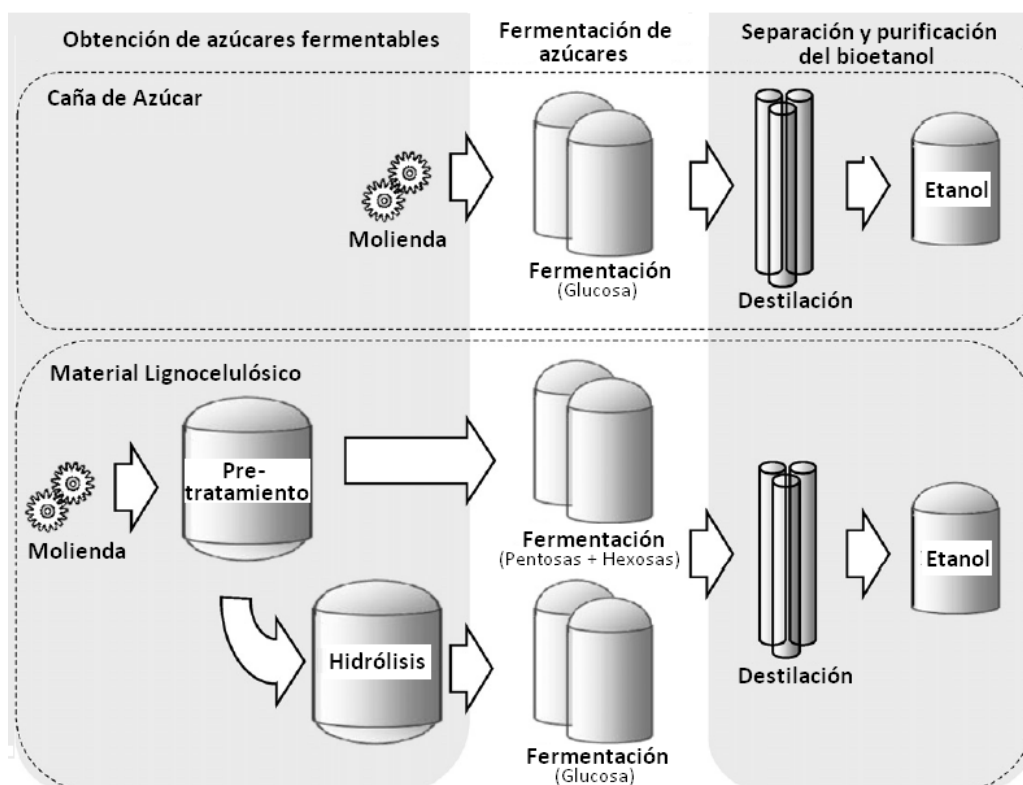


Figura 1-3: Comparación del diagrama de flujos de la producción de bioetanol, a partir de distintas biomásas (Fuente: Adaptación Mussato et al. ^[8])

1.5. Proyección para la producción de bioetanol en Chile, a partir de material lignocelulósico

Con los balances energéticos del año 2007 y 2008 se puede hacer una proyección de la demanda de gasolina hacia el año 2012, estimando un crecimiento anual de 100 mil m³ en la demanda de gasolina, se tiene un requerimiento de 3,6 millones de m³ de gasolina ^[14]. Según la legislación chilena, las mezclas autorizadas para el bioetanol son aquellas en que se reemplaza un 2 o un 5% de la gasolina con bioetanol ^[3]. Si se considera esta proyección de demanda de gasolina y los porcentajes de bioetanol que se pueden utilizar en reemplazo de este combustible fósil, se tiene lo siguiente:

Tabla 1-3: Requerimientos de bioetanol año 2012 en Chile

Porcentaje de reemplazo de gasolina por bioetanol [%]	Requerimiento de bioetanol [m ³]
2%	72.000
5%	180.000

(Fuente: Elaboración Propia, basada en los Balances Energéticos ^[15])

Según el Ministerio de Energía, ex Comisión Nacional de Energía (CNE), el 45% de la superficie total de Chile tiene aptitud forestal, lo que equivale a 33,8 millones de hectáreas, sin embargo, de estas sólo 15,6 millones de hectáreas están cubiertas con plantaciones forestales y bosques nativos, ya que las restantes son áreas protegidas. La principal ventaja es que en Chile estos bosques están bastante

concentrados en ciertas regiones, ya que el 38,1% de las plantaciones forestales se encuentran en la VIII Región y el 62,8% de los bosques nativos^{III} se encuentran en las X y XI Región^[16]. Lo anterior implicaría un gran beneficio, ya que se reducirían los costos de transporte de la materia prima hacia una planta productora de bioetanol.

En este estudio, el material lignocelulósico a utilizar para la producción de bioetanol corresponde a residuos de *Eucalyptus globulus Labill* (desde ahora eucalipto), la segunda especie más común en Chile. Las 483 mil hectáreas plantadas equivalen al 23% de las plantaciones forestales del país, luego del pino radiata; éstas corresponden a alrededor del 68%, es decir, a 1,43 millones de hectáreas plantadas^[17].

Para poder estimar cuánto del bioetanol requerido se podría cubrir, a partir del material lignocelulósico disponible, es necesario conocer los rendimientos de cada etapa del proceso productivo, los cuales dependen de distintos factores, como el tipo de madera a utilizar y el tipo de pre-tratamiento a realizar, entre otros^[11,13]. Como esta información no está disponible, no se puede realizar un análisis de los rendimientos. Por lo tanto, es imperioso realizar estudios para poder determinarlos y de esta manera poder optimizar los procesos. En estudios previos se han estimado rendimientos de 200-300 litros de bioetanol por tonelada de material lignocelulósico, pero hasta el momento no se han estudiado todas las variables que influyen en este proceso productivo^[18,19,20].

1.6. Motivación y Justificación

Según fue señalado en las secciones anteriores, es necesario realizar un estudio del proceso productivo de bioetanol, a partir de material lignocelulósico, que en este trabajo corresponde a residuos de eucalipto. Como este tipo de biomasa requiere un pre-tratamiento, en este caso se propone utilizar distintos líquidos iónicos en esta etapa, para poder comparar los rendimientos de cada uno y con los rendimientos obtenidos en estudios previos^[13,18,20], en los cuales se utilizaron distintas condiciones en los pre-tratamiento.

Con este estudio se pretende entregar una aproximación a los rendimientos en la producción de bioetanol que se podrían obtener en caso de utilizar residuos de eucalipto como materia prima y líquidos iónicos en la etapa de pre-tratamiento. Además, con este trabajo se busca poder:

- Contribuir a un proceso que disminuya las altas emisiones de CO₂ y SO₂, gases que causan el efecto invernadero y el aumento del calentamiento global.
- Aumentar la factibilidad de generar bioetanol, de tal manera que se pueda usar para reemplazar parcialmente la gasolina, contrarrestando la constante disminución de las reservas de petróleo y el aumento en el precio de este combustible (ver Anexo A.1).
- Aportar a la utilización de los residuos forestales que hoy en día se descartan o queman de manera ineficiente y muy contaminante.
- Contribuir a la diversificación de la matriz energética chilena, para disminuir la dependencia de importación de combustibles.

^{III} Cabe destacar que solo el 40% de los bosques nativos son productivos, ya que el resto corresponde a bosques protegidos.

2. Marco teórico

Para esta sección es necesario tener presente el proceso productivo del bioetanol, desde la selección de la biomasa a utilizar hasta la recuperación de este biocombustible. En la Figura 2-1 se tiene un diagrama de bloques simplificado de este proceso, el cual se detallará más adelante.

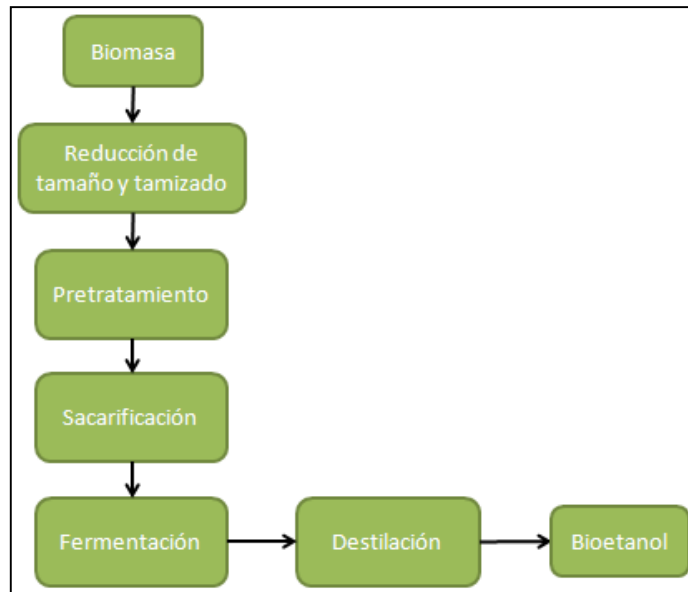


Figura 2-1: Diagrama de bloques simplificado del proceso productivo del bioetanol (Fuente: Elaboración Propia)

2.1. Biomasa

La biomasa corresponde a la materia prima a utilizar para la producción de bioetanol. Dependiendo de la biomasa seleccionada para la producción del bioetanol, éste se puede clasificar como de primera, segunda o tercera generación^[6]. El bioetanol de primera generación compite con la industria alimenticia, por lo que es necesario buscar otras materias primas para evitar el aumento de los precios de los alimentos^[21]. En este estudio se considera la producción de bioetanol de segunda generación, ya que utiliza residuos de eucalipto como materia prima, que corresponden a un tipo de biomasa lignocelulósica, la cual se describe en mayor detalle a continuación.

2.1.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por 3 polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran en distintos porcentajes, dependiendo del tipo de biomasa y de las condiciones de crecimiento, entre otros.

Tabla 2-1: Composición de distintas biomásas lignocelulósicas

Biomasa Lignocelulósica	Celulosa [%]	Hemicelulosa [%]	Lignina [%]
Residuos de maderas duras ^{IV}	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Residuos de maderas blandas	45 - 50	25 - 35	25 - 35
Mazorcas de Maíz	45	35	15
Paja de arroz	32	24	18
Bagazo	33	30	19
Paja de Trigo	30	50	15
Hojas	15 - 20	80 - 85	0
Pasto	45	31	12

(Fuente: Adaptación de Pereira ^[22])

En particular, en la Tabla 2-2 se encuentran la composición química de los residuos de eucalipto.

Tabla 2-2: Composición química del residuo de eucalipto

	Composición	
	% Teórico	% Experimental
Lignina	17 – 20	18
Holocelulosa ^V	75 – 85	77
Celulosa	40 – 50	40
Hemicelulosa		37
Extraíble	2 – 6	4,8
Ceniza	1	0,2

(Fuente: Adaptación de Sotomayor ^[23] y Cortínez ^[18])

Estos componentes se localizan en la pared celular de las células vegetales de las plantas y árboles, formando una matriz tridimensional, como la que se señala en la Figura 2-2.

^{IV} En este caso el eucalipto corresponde a una madera dura ^[19]

^V La celulosa y la hemicelulosa en conjunto se denominan como holocelulosa.

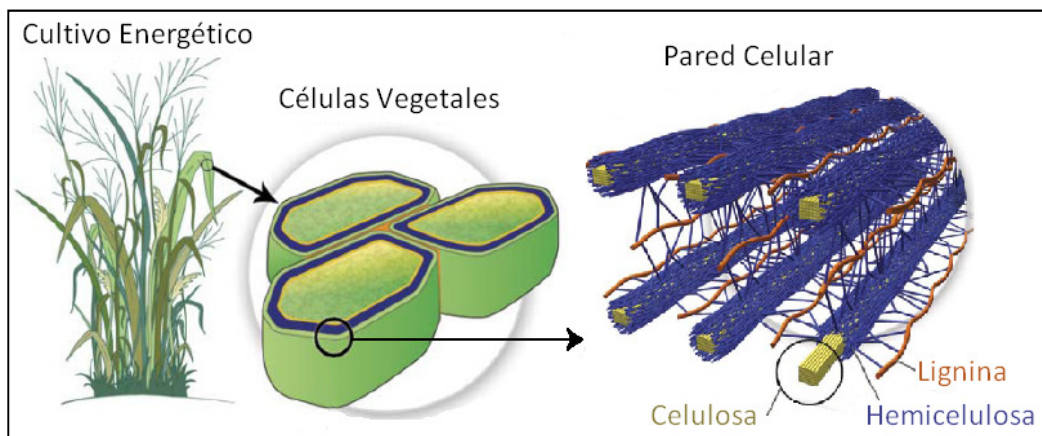


Figura 2-2: Esquema de la estructura de la biomasa lignocelulósica (Fuente: Adaptación de García [24])

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza. Se estima una producción anual en la biosfera de $90 * 10^9$ toneladas, por lo que claramente representa la fuente renovable más importante para la generación de biocompuestos como el bioetanol [25]. Además, este compuesto no es usado como alimento, por lo que su utilización no interfiere con la industria alimenticia [26]. Específicamente, la celulosa es un polisacárido lineal con zonas muy estructuradas y con alta cristalinidad, denominadas microfibrillas, y con regiones amorfas, compuesto por monómeros de glucosa [27]. En el caso de eucalipto el número de monómeros de glucosa en la celulosa es de aproximadamente 10.000 [25].

Los monómeros de glucosa en la celulosa están unidos por medio de enlaces β -(1-4)-glucosídicos, con lo que se forman dímeros denominados celobiosas; las cadenas de celulosa están unidas entre sí inter y extra-molecularmente por medio de puentes de hidrógeno, como se puede apreciar en la Figura 2-3. Estos enlaces hacen que la estructura de la celulosa sea muy rígida en ciertas zonas, debido a las microfibrillas, y a la vez la hacen muy estable, condiciones que hacen a la celulosa muy resistente a la hidrólisis [25].

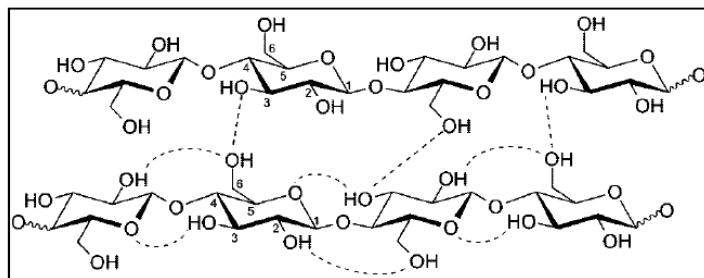


Figura 2-3: Enlaces intra- y extra-moleculares en la celulosa (Fuente: Pinkert et al. [25])

En esta matriz tridimensional, la celulosa se encuentra recubierta por hemicelulosa, polisacárido amorfo (no cristalino) compuesto por hexosas (como glucosa) y pentosas (principalmente xilosa), la que se encuentra en estrecha relación con la lignina, polímero aromático (fenilpropanoico) con estructura amorfa [27].

La presencia de estos compuestos dificulta la hidrólisis, debido a que previenen el acceso de las enzimas hidrolíticas a la celulosa, ya que, como se puede apreciar en la Figura 2-2, estos compuestos la

recubren. Es por esto y por la gran estabilidad de la celulosa que se hace necesario realizar etapas que faciliten la hidrólisis enzimática, como lo son la reducción de tamaño y el pre-tratamiento.

2.2. Reducción de tamaño y tamizado

Esta etapa consiste en reducir el tamaño de la materia prima a utilizar, que en este caso es biomasa lignocelulósica. El objetivo de esto es aumentar su área superficial, para lograr facilitar el acceso a las enzimas y finalmente aumentar el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa. En este caso hay que llegar a un equilibrio entre la energía que se gasta en esta etapa versus el rendimiento de la sacarificación, ya que para generar partículas de menor tamaño, y por lo tanto más hidrolizables, más energía se debe gastar en la molienda (una imagen de este proceso se puede observar en el Anexo B.1). El tamaño óptimo para la biomasa lignocelulósica fue determinado en estudios previos y en este caso el eucalipto a utilizar requiere un tamaño denominado como “pin-chip”, correspondiente a 0,5-1 mm de ancho, 0,5-1 de espesor y 10-20 mm de largo ^[20]. Para obtener este tamaño se requiere utilizar tamices, en los que queda retenido el material de cierto tamaño dependiendo del número del tamiz.

2.3. Pre-tratamiento

En este estudio, el microorganismo fermentador a utilizar corresponde a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual genera etanol anaeróbicamente a partir de hexosas, como la glucosa y la manosa. Este microorganismo no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa o la arabinosa, ni polisacáridos como la celobiosa o la celulosa ^[28,29]. Es por esto que se hacen necesarias las etapas de pre-tratamiento y de hidrólisis enzimática, de esta manera se puede obtener monómeros de glucosa a partir de los polisacáridos.

El objetivo del pre-tratamiento es liberar la celulosa presente en esta fuerte estructura tridimensional, aumentando su porosidad y área superficial (Figura 2-4). De esta manera, en la sacarificación las enzimas pueden acceder a la celulosa más fácilmente y la puedan degradar a monómeros de glucosa ^[27,30,31]. El pre-tratamiento es crítico dentro del proceso productivo del bioetanol, ya que determina el rendimiento de las etapas posteriores y los costos del proceso, ya que el pre-tratamiento de la biomasa lignocelulósica es uno de las etapas más costosas de este proceso productivo ^[32].

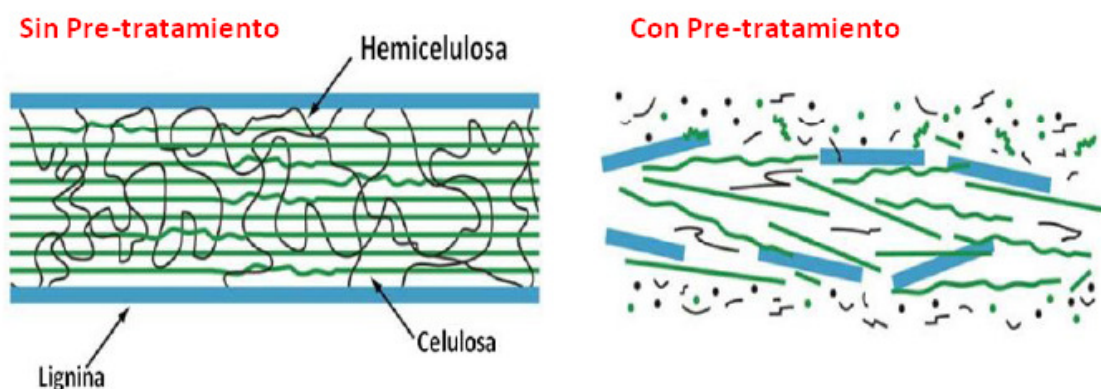


Figura 2-4: Esquema de la matriz de biomasa lignocelulósica con y sin pre-tratamiento (Fuente: Adaptación Juri ^[20])

2.3.1 Pre-tratamiento con líquidos iónicos

Existen distintos tipos de pre-tratamientos, cada uno con ventajas y desventajas, las cuales se resumen en el Anexo B.2 ^[25,27,31]. En este estudio, el pre-tratamiento utilizado es el de líquidos iónicos. Estos compuestos son sales orgánicas conformadas por un catión orgánico de gran tamaño y un anión, que puede ser orgánico o inorgánico, con menor peso molecular ^[25,27]. Los líquidos iónicos pueden ser clasificados en 2 tipos: líquidos iónicos Aprotónicos (AIL) y líquidos iónicos Protonados (PIL) ^[33]. Ambos tipos son capaces de disolver la matriz tridimensional en la que se encuentra la celulosa, pero es necesario destacar que no todos los líquidos iónicos logran reaccionar con esta matriz, ya que esta capacidad depende de qué catión y qué anión contenga ^[25]. En el Anexo B.2 se pueden observar las estructuras más comunes de los líquidos iónicos involucrados en la disolución de la celulosa.

Hasta el momento, existen numerosos estudios que abarcan el tema de la disolución del material lignocelulósico utilizando LIs ^[34], pero habiendo más de 10^9 combinaciones posibles entre cationes y aniones para los AILs, y sumando las combinaciones posibles de los PILs (del orden de 10^{12}), se puede concluir que aún faltan muchos estudios por hacer ^[25,27]. Hasta el momento, la mejor alternativa para realizar pre-tratamientos es utilizar AILs, pero estos también presentan desventajas como son su baja biodegradabilidad y alto costo de producción. Los costos de producción se pueden reducir mediante el reciclaje de los LIs, pero estos se pueden reciclar solo unas 3 a 4 veces, ya que si se reciclan más veces, disminuye su capacidad de extraer la lignina y de liberar la celulosa. Lo anterior se debe a que, a medida de que los LIs se van utilizando, se va acumulando la lignina y otros extractos, por lo que se requiere de una serie de etapas potencialmente complejas para eliminar estos extractos y la lignina para poder re-utilizarlos más veces. Existen varias metodologías para realizar este tipo de reciclajes, desde las más tradicionales como la destilación a más avanzadas como la utilización de fluidos supercríticos o una extracción mediante un sistema de 3 fases, pero estos últimos métodos aún no se han estudiado en su totalidad ^[27].

En la Tabla 2-3 se puede observar un resumen de las características de los líquidos iónicos y las diferencias entre los AILs y los PILs.

Tabla 2-3: Características y diferencias entre los Líquidos Iónicos Aprotónados (AIL) y Protonados (PIL)

Característica	Aprotónado (AIL)	Protonado (PIL)
Catión más usado	Imidazol	hidroxiethylamonio
Degradabilidad	baja	alta
Toxicidad	mayoritariamente alta	muy baja
Solubilidad en agua	baja	alta
Estado (a temperatura ambiente)	líquido (la mayoría)	líquido
Volatilidad	baja	baja
Estabilidad térmica	Muy alta (hasta 300°C)	Alta (hasta 130°C)
Costo de producción	alto	bajo
Reciclable	Si	Si
Mecanismo de acción	Catión interacciona con la lignina y el anión interacciona con los puentes de hidrógeno de la celulosa	Aún no determinado
Observaciones	Requiere altas temperaturas para el pre-tratamiento	Poco estudiados en disolución de celulosa

(Fuente: Elaboración propia a partir de [25,26,27,35])

A pesar que los AILs a primera vista parecen una mala opción en comparación a los PILs, existen algunos que no son tóxicos y que presentan buenos rendimientos a la hora de disolver la celulosa [20,34]. Un ejemplo de esto es el [EMIM][AC]. Este LI es líquido a temperatura ambiente, lo que facilita su manipulación en comparación a otros ALI como el [EMIM][Cl] [36]. Es un buen disolvente de celulosa, ya que el catión y el anión interaccionan con la lignina y generan la extracción de ésta, además de que el acetato interfiere con los puentes de hidrógeno presentes en la celulosa [27,30]. Por otro lado, el [EMIM][AC] no es tóxico, incluso ayuda a un mejor crecimiento de los microorganismos, debido a que funciona como un regulador del pH del medio de cultivo [37,38]. Además, en el estudio de Mäki-Arvela et al. [34] se postula al [EMIM][Ac] como el mejor candidato para aplicaciones industriales, ya que no tiene problemas de corrosión y es altamente biodegradable, e incluso el [EMIM][Ac] es capaz de disolver totalmente los chips de picea, en vez de parcialmente como es el caso del [EMIM][Cl].

Cabe destacar que en el caso del pre-tratamiento con LI se hace necesaria una etapa extra antes de realizar la sacarificación. Esta etapa corresponde a un lavado del material pre-tratado para eliminar restos del LI usado en el pre-tratamiento, ya que éste inhibe la sacarificación y/o fermentación, reduciendo por lo tanto los rendimientos [30,37,39]. Estos lavados pueden realizarse con agua destilada [36,40] (ver Anexo B.3).

2.4. Sacarificación o hidrólisis enzimática

Como fue señalado anteriormente, el objetivo del pre-tratamiento es romper la matriz lignocelulósica, de manera de liberar la celulosa. Posteriormente se requiere la sacarificación donde las moléculas de glucosa son liberadas para ser fácilmente accesibles para las levaduras. Las enzimas que logran este efecto son principalmente las endoglucanasas y exoglucanasas, denominadas celulasas, que hidrolizan la celulosa en moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa), y las celobiasas, que hidrolizan la celobiosa en monómeros de glucosa. Lamentablemente estas enzimas presentan inhibición por producto,

es decir, disminuyen considerablemente sus rendimientos cuando aumenta demasiado la concentración de producto como celobiosa y glucosa ^[19,41].

Para estas enzimas, los rangos de operación óptimos para los parámetros más relevantes son los que se encuentran en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4: Rangos óptimos de operación para la sacarificación

Parámetro	Rango óptimo de operación
Temperatura	45 – 55°C (óptimo = 50°C)
pH	4 – 5 (óptimo = 4,8)
Carga enzimática	10 – 30 [FPU/gr material lignocelulósico]
Tiempo de operación	48 – 72 horas

(Fuente: Adaptación Juri ^[20])

El material lignocelulósico también contiene hemicelulosa compuesta principalmente por pentosas, y hexosas como la glucosa, por lo que si además se utilizaran enzimas que hidrolicen la hemicelulosa, se obtendrían rendimientos aún mayores.

2.5. Fermentación

La fermentación corresponde a un proceso mediante el cual un microorganismo obtiene energía, gracias a la degradación de hidratos de carbono, como la glucosa. Técnicamente, es un proceso biológico de oxidación incompleta, llevada a cabo en un ambiente anaeróbico, es decir, en un medio carente de oxígeno ^[19,20].

Existen distintos tipos de fermentaciones, pero la involucrada en este estudio es la fermentación alcohólica, en la cual los microorganismo (MO), que en este caso levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae* degradan la glucosa en etanol, dióxido de carbono y en energía, como se puede observar en la Ecuación 2-1, donde $C_6H_{12}O_6$ es glucosa, C_2H_5OH es etanol y CO_2 es dióxido de carbono ^[19,20]. En muchos casos se usa cepas de *S. cerevisiae* que son variantes más tolerantes a altas concentraciones de etanol, como es el caso de la cepa Ethanol Red™. Esta levadura presenta rendimientos superiores a 0,43 [gr de etanol/gr de glucosa asimilada], en condiciones de operación óptimas, y resiste concentraciones superiores a 12 [gr/l] de etanol ^[20].



Como se puede observar en la Ecuación 2-1, de un mol de glucosa se puede obtener dos moles de etanol, si se considera la ecuación 2-4 y los pesos moleculares de cada uno^{VI}, se tiene que de un gramo de glucosa se puede obtener 0,51 gr de etanol, lo que corresponde al rendimiento teórico máximo.

$$\text{Masa} = \text{Peso molecular} * \text{Número de Moles} \quad \text{Ecuación (2 - 2)}$$

La sacarificación y la fermentación se pueden llevar a cabo como procesos separados, lo que se conoce como SHF, o en conjunto, lo que se denomina Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF)^[41]. Una importante ventaja de la SSF es que se reduce la inhibición por producto (glucosa), por lo que las enzimas mantienen altos rendimientos; además se tiene que algunos de los inhibidores de las enzimas pueden ser metabolizados por los MOs, lo que también contribuiría a mantener el rendimiento de las enzimas. Debido a estas ventajas, la SSF presenta rendimientos mayores que la estrategia SHF. Por otro lado, la SSF sólo se requiere de un recipiente o reactor y no de dos, como en el caso de la SHF. Con esto se disminuye considerablemente los costos de instalación en el caso de llevar este proceso a un nivel industrial^[41].

La estrategia SSF también tiene desventajas. La principal se deriva del hecho que al realizar la sacarificación y la fermentación en conjunto se debe usar las mismas condiciones de operación (temperatura, pH) para la sacarificación y para la fermentación. Sin embargo, las condiciones de operación óptimas de ambas etapas son distintas. Por ejemplo, se tiene que la temperatura óptima para la sacarificación es de 50°C, pero como la temperatura óptima para la fermentación por *S. cerevisiae* es 37°C, no es posible subir tanto la temperatura en SSF. Es por esto que se debe llevar a un compromiso entre estas condiciones y para el caso de la temperatura, se determinó que 40°C era una temperatura favorable para la SSF^[20,41].

Como fue señalado anteriormente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no es capaz de degradar pentosas para obtener energía. Por lo tanto, para obtener rendimientos mayores se pueden utilizar otro tipo de MO en la fermentación, por ejemplo, se ha demostrado la capacidad de fermentar pentosas en las levaduras *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Candida tropicalis*, pero ninguno de estos MO puede degradar eficientemente pentosas y hexosas al mismo tiempo^[28]. Para solucionar esto, se pueden utilizar co-cultivos de levaduras, es decir, se pueden inocular las muestras con más de un tipo de levadura y de esta manera mejorar los rendimientos, pero a la vez aumentan los costos. Existen numerosas soluciones alternativas a este problema. Para más información se sugiere revisar el estudio de Kuhad et al.^[29].

^{VI} PM(glucosa) = 180 gr/gmol, PM(etanol) = 46 gr/gmol

3. Antecedentes del trabajo a desarrollar

A continuación se presentan algunos estudios realizados previamente con respecto a la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, con sus resultados respectivos y tecnologías específicas utilizadas.

3.1. Pre-tratamiento con PILs

Como se señaló anteriormente, este tipo de LI es denominado “no convencional”, ya que han sido poco estudiados en el ámbito de la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. Hasta el momento, los principales estudios que se han hecho con PILs han sido para determinar sus características y propiedades, como son los trabajos de Álvarez et al. [35,42]. A través de estos estudios se ha determinado la baja toxicidad de estos LI, sus bajos costos de producción y la simpleza de la síntesis. Los estudios que se han realizado sobre sus posibles usos son muy generales, por lo que son necesarios estudios que profundicen en esta área.

En el estudio de Pinkert et al. [43], se investigó la capacidad de ciertos PILs para disolver celulosa cristalina; estos PILs fueron formados con las combinaciones de los cationes y aniones señalados en la Tabla 3-1. Una de estas combinaciones es 2-HEAA, uno de los PILs considerados en este estudio.

Tabla 3-1: Cationes y aniones utilizados para la síntesis de PILs en el estudio de Pinkert et al.

Tipo de ión	Acrónimo	Nombre
Cación	[HEA]	2-hidroxietilamonio
	[HPA]	3-hidroxipropilamonio
	[DEA]	bis(2-hidroxietil)amonio
	[TEA]	tris(2-hidroxietil)amonio
	[DAA]	dialilamonio
Anión	Fmt	formato
	Ac	acetato
	Mal	malonato
	Cit	citrato

(Fuente: Adaptación de Pinkert et al. [43])

Cabe destacar que la celulosa utilizada en el estudio de Pinkert et al. [43] corresponde a una celulosa micro-cristalina con un grado de polimerización (DP)^{VII} de 163 y con tamaños de partícula de 20 a 160 µm, lo cual difiere levemente de lo que se puede encontrar en la celulosa proveniente de madera.

Los autores de este estudio pudieron concluir que ninguno de estos PILs es capaz de disolver la celulosa cristalina, a pesar de extender los tratamientos hasta por 12 horas, con temperaturas hasta 80°C; se destaca que los cationes con grupos alil (como el [DAA]) no interaccionan con la celulosa y que los alcanilamonio (todos los cationes de la Tabla 3-1 menos el [DAA] con acetato o formato) no disuelven la celulosa cristalina. Cabe señalar que, como es destacado en el estudio de Mora-Pale et al. [27], el ión acetato ayuda enormemente en el pre-tratamiento; sin embargo, el efecto de reducción de la cristalinidad

^{VII} DP corresponde al número de repeticiones de unidades de glucosa en la molécula de celulosa. En el caso de la celulosa de madera este valor asciende a 10⁴ [25].

de la madera se debe a la interacción del ión acetato con la lignina, por lo que no se debería descartar su uso. Se sugiere hacer estudios no con celulosa pura, sino que con biomasa que represente de mejor manera la estructura original de la matriz lignocelulósica.

3.2. Pre-tratamiento con AILs

Uno de los primeros antecedentes sobre el uso de LI convencionales en la etapa de pre-tratamiento de materiales lignocelulósicos, agrícolas y forestales, se encuentran en el trabajo realizado por Varanasi et al. ^[13]. En este trabajo se detallan ejemplos de pre-tratamientos de rastrojos de maíz y álamo con [EMIM][Ac], en los cuales se varía la temperatura y el tiempo de operación. El LI fue mezclado con la biomasa en una razón de 1:20 p/p (gr de biomasa/gr de LI) para el pre-tratamiento. Se utilizó tiempos de operación de 30 o 60 minutos y temperaturas de 70, 100 y 120°C. Luego del pre-tratamiento, se realizó primero una etapa de lavado y luego la sacarificación, con una carga de celulasas de 15 FPU/gr de celulosa y 60 CBU de celobiasas por gramo de celulosa, usando un 1% de biomasa por gramo de buffer de sacarificación. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2 Porcentajes de liberación de glucosa (rendimiento), luego de 10 o 24 horas de hidrólisis enzimática (H.E.), con un pre-tratamiento con [EMIM][Ac], con distintas condiciones de operación (temperatura y tiempo), con álamo y rastrojos de maíz como material lignocelulósico, según el estudio de Varanasi et al.

Temperatura [°C]	Tiempo [hrs]	Álamo		Rastrojos de maíz	
		10 hrs de H.E.	24 hrs de H.E.	10 hrs de H.E.	24 hrs de H.E.
120	0,5	89	97	-	-
120	1	-	-	90	92
100	1	75	86	80	82
75	1	62	75	72	74

(Fuente: Adaptación de Varanasi et al. ^[13])

En este mismo estudio realizaron otro ensayo, en el cual analizaron las cargas de biomasa (álamo), manteniendo un pre-tratamiento a 120°C durante una hora (que también incluye una etapa de lavado para separar la celulosa del LI), luego de una sacarificación de 10 o 24 horas, manteniendo las mismas proporciones descritas anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Rendimiento en la hidrólisis de celulosa en glucosa, post-pre-tratamiento con [EMIM][Ac] con distintas cargas de álamo, según el estudio de Varanasi et al.^{viii}

Condición de Pre-tratamiento	Condiciones de la hidrólisis		Rendimiento (%)	
	Razón gr Biomasa/gr LI	Carga enzimática	Carga de biomasa	10 hrs de H.E.
1:10	15 FPU, 60 CBU	1%	86	97
1:5	15 FPU, 60 CBU	1%	85	92
1:3	15 FPU, 60 CBU	1%	75	82
1:3	10 FPU, 60 CBU	10%	79*	75

Hidrólisis por 10 o 24 horas (Fuente: Adaptación de Varanasi et al.^[1313])

Como se observa en las Tablas 3-2 y 3-3, la carga de biomasa en el pre-tratamiento es un factor muy relevante en el rendimiento de la sacarificación. A menor razón biomasa/ LI, se obtiene mayor rendimiento; cabe destacar, sin embargo, que al utilizar menores razones de biomasa/LI, se requiere mayor cantidad de LI para pre-tratar la misma cantidad de biomasa, lo que aumenta considerablemente los costos de la etapa de pre-tratamiento.

Cortínez^[18] y Juri^[20] trabajaron pre-tratando eucalipto y lenga (*Nothofagus pumilio*) con LI; en particular utilizaron [EMIM][Cl] y [A336][OH] en el caso de Cortínez.

En su trabajo de tesis Cortínez utilizó tres tipos de pre-tratamientos distintos: ácido diluido, alcalino y con líquidos iónicos. Midió el rendimiento de la hidrólisis, como una forma de evaluar la eficiencia del pre-tratamiento. Lo más relevante de este trabajo de tesis, en relación con el presente estudio, son las condiciones de operación que varió en el pre-tratamiento con LI: tiempos de 30 y 60 minutos, temperaturas de 80, 121 y 150°C y una carga de biomasa en una razón de 1:20 p/p con respecto al LI. A la vez varió la biomasa a pre-tratar, y el LI utilizado en el pre-tratamiento. Las condiciones de la hidrólisis enzimática son las mismas para todos los pre-tratamientos y se señalan en la Tabla 3-4. Cortínez obtuvo mejores resultados con los pre-tratamientos con [EMIM][Cl] que con [A336][OH].

Por otro lado, Juri estudió tres tipos de pre-tratamientos: con líquidos iónicos puros, reciclados y con hongos de pudrición blanca. Al igual que en el caso anterior, lo más relevante para este estudio son los pre-tratamientos con LI puros y reciclados, en el cual utilizó distintas razones de cargas de biomasa y de LI en el pre-tratamiento. Al igual que Cortínez, Juri también utilizó lenga y eucalipto en sus estudios, pero en este caso los resultados que se considerarán son los con respecto al pre-tratamiento con eucalipto.

^{viii} FPU y CBU por gr de celulosa, 79* indica que las horas de sacarificación fueron 12 en vez de 10.

Tabla 3-4: Rendimiento de la hidrólisis enzimática de eucalipto por 72 horas, post-pre-tratamiento con [EMIM][Cl]

	Condiciones Pre-tratamiento			Condiciones H.E.		Mejor Rendimiento (%)
	Temp.	Tiempo	Razón gr biomasa/gr LI	FPU/gr de material	CBU/gr de material	
Cortínez	150°C	60 min.	1:20	102	147	44%
Juri	150°C	30 min.	1:3	37	4,9	44%
						30% para LI reciclado

(Fuente: Elaboración propia ^[13,18,20])

En la presente memoria se usarán las condiciones de operación determinadas por Juri, ya que Juri utilizó una menor carga enzimática y una menor cantidad de LI, a pesar de lo cual obtuvo el mismo rendimiento que Cortínez cuando usó LI puro.

3.3. Sacarificación y fermentación simultáneas

Niklitschek ^[19] en su memoria de título comparó las técnicas de sacarificación y fermentación por separado (SHF) y simultáneas (SSF). Asimismo, estudió cuales eran los factores que afectaban el rendimiento de estas etapas y varió las condiciones de operación de manera de identificar la combinación más favorable en términos de rendimiento en la sacarificación. Los factores que afectan el rendimiento, identificados por Niklitschek, se señalan en la Tabla 3-5. En esta tabla se señalan además los parámetros que no varió pero considerados como relevantes en el rendimiento del proceso de producción de bioetanol.

Tabla 3-5: Parámetros en estudio y rangos/alternativas de trabajo del estudio de Niklitschek ^{IX}

Parámetro	Rango o alternativa contemplada
En estudio	
Tipo de MO	Levaduras <i>S. cerevisiae</i> , cepas RED STAR - ATCC 4126
Concentración inicial de MO	0,1 - 10 [gr p.s./l]
Tipo de pre-tratamiento	Ácido sulfúrico diluido y LI ([EMIM][Cl])
Carga enzimática	7, 13, 10, 37 FPU/gr de material lignocelulósico
Carga de biomasa	5, 7, 9, 10 % p/v
Fijos	
Temperatura	37 o 40°C
Tiempo de operación	72 horas
Material lignocelulósico	residuos de lenga
Velocidad de agitación	300 rpm

(Fuente: Adaptación de Niklitschek ^[19])

^{IX} [gr p.s./l] corresponde a gramos en peso seco por litro. La razón FPU:CBU corresponde a 7,5:1. Temperatura: 37°C para la cepa ATCC 4126 y 40°C para la cepa RED STAR.

Niklitschek concluyó en su estudio que usando las siguientes condiciones de operación puede llegar a rendimientos mayores:

- Carga de biomasa en el pre-tratamiento: razón 1:3 p/p (gr biomasa/gr LI)
- Carga enzimática: 37 FPU/gr de material lignocelulósico
- Microorganismo fermentador: levaduras *S. cerevisiae* cepa RED STAR
- Temperatura SSF: 40°C
- Carga de biomasa en la sacarificación y fermentación simultánea: 9% p/v

Niklitschek obtuvo un rendimiento en la fermentación de 47% respecto al valor teórico máximo, con un pre-tratamiento con LI, lo que equivale a 146 litros de etanol por tonelada de material pre-tratado con LI. Por otro lado, al comparar la SHF con la SSF obtuvo un aumento del 103% en la producción de etanol con la segunda estrategia, ya que con la primera sólo se logran 72 litros de bioetanol por tonelada de material pre-tratado.

Por otro lado, estimó una cantidad potencial de residuos de lenga, correspondiente a 254 mil toneladas anuales y con los mejores resultados obtenidos (señalados anteriormente), estimó una producción anual de 32 mil m³ de bioetanol, lo que supliría el 50% o el 20% de la demanda de este combustible, considerando un reemplazo del 2% o un 5% etanol-gasolina respectivamente.

Los antecedentes descritos anteriormente serán considerados para la realización de este estudio, además de la información señalada en el marco teórico (punto 2).

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar los niveles de producción de bioetanol de segunda generación, a partir de residuos de eucalipto pre-tratados con distintos líquidos iónicos.

4.2. Objetivos Específicos

- Estudiar el rendimiento de la sacarificación de residuos de eucalipto pre-tratados con distintos líquidos iónicos, a distintos tiempos y temperaturas.
- Seleccionar las mejores condiciones de operación del pre-tratamiento para cada líquido iónico.
- Obtener las mejores condiciones de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF), variando las cargas de biomasa y el líquido iónico utilizado en la etapa de pre-tratamiento.
- Seleccionar la mejor combinación de pre-tratamiento y condiciones de SSF para la producción de bioetanol a partir de residuos de eucalipto.

CAPÍTULO II: MATERIALES, PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGÍAS

En este capítulo se señalan los materiales requeridos para realizar un estudio de esta naturaleza, además se señalan los procedimientos que hay que llevar a cabo para analizar los distintos factores expuestos anteriormente, que influyen en el proceso productivo del bioetanol. Finalmente, se señalan las metodologías específicas utilizadas en este estudio.

5. Materiales ^X

5.1. Madera

El material lignocelulósico utilizado en este estudio corresponde a residuos de eucalipto. En este estudio se utilizaron 2 residuos de eucalipto distintos, el primero, proporcionado por la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile, es de aproximadamente 15 años (M1) y proviene de Melipilla, y el segundo, proporcionado por Don Ricardo Harris, es de aproximadamente 9 años y proviene de Curicó (M2).

5.2. Líquidos iónicos

En este estudio se utilizaron 3 distintos PILs, los cuales fueron donados por el profesor Miguel Iglesias desde la Universidad Federal Da Bahia en el Salvador, Brasil. Cabe destacar que estos LI tienen un porcentaje de impurezas menor al 1% y presentan cantidades de agua menores a 500 ppm ^[44].

- Acetato de 2-hidroxydietilamonio (2-HDEAA)
- Acetato de 2-hidroxyetilamonio (2-HEAA)
- Lactato de 2-hidroxyetilamonio (2-HEAL)

Los AILs utilizados en este estudio fueron adquiridos a la empresa SIGMA-ALDRICH®:

- Cloruro de 1-etil-3-metilimidazol ([EMIM][Cl]), con una pureza del 95% (N° catálogo: 4.90054.0025)
- Acetato de 1-etil-3-metilimidazol ([EMIM][Ac]), con una pureza del 90% (N° catálogo: 51053-100G-F)

En la Tabla 2-3 se pueden observar las principales características de estos LI.

^X En el Anexo C se encuentra un listado de los equipos e instrumentos utilizados en este estudio.

5.3. Enzimas

Las enzimas utilizadas en este estudio fueron adquiridas a la empresa SIGMA-ALDRICH® y éstas fueron las siguientes:

- Endo y exoglucanasas (celulasas): estas enzimas provienen del hongo *Trichoderma reesei* y su nombre comercial es Cellucast® 1,5L (CatC2730). La actividad de estas enzimas es de 87 FPU/ml, 700 U/gr ^[20].
- β-glucosidasa (celobiasa): esta enzima proviene del hongo *Aspergillus niger* y su nombre comercial es Novozyme® 188 (CatC6105). La actividad de estas enzimas es de 650 CBU/ml, 250 U/gr ^[20].

5.4. Microorganismo fermentador

En este estudio se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la etapa de fermentación del proceso productivo del bioetanol. En particular, se utilizó la cepa Ethanol Red® (RED STAR), la cual fue donada por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS.

6. Procedimientos

En la Figura 6-1 se presenta el diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol a partir de residuos de material lignocelulósico, usado en este estudio. Cabe destacar que en este trabajo no se consideró la última etapa del proceso productivo (la destilación para la obtención del bioetanol).

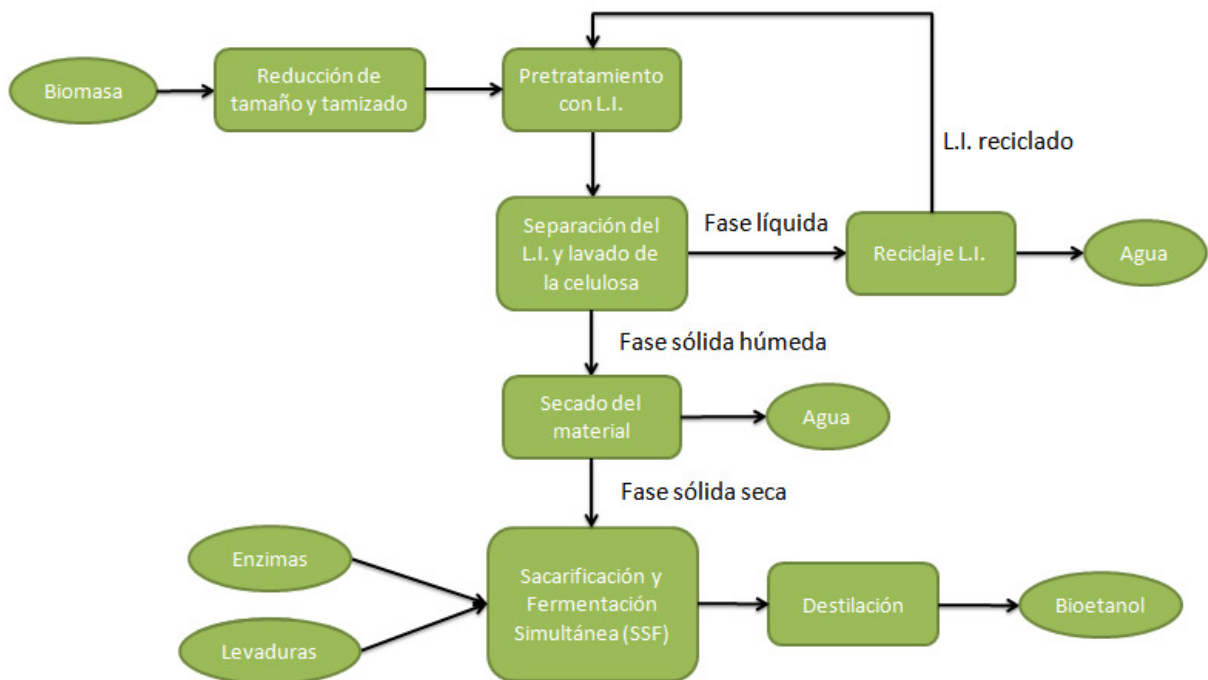


Figura 6-1: Diagrama de bloques del proceso productivo de bioetanol a partir de material lignocelulósico (Fuente: Elaboración propia)

El procedimiento para la realización de este estudio constan de **tres partes**, que se señalan a continuación. Cabe destacar que este formato se mantendrá para la presentación de los resultados y las discusiones en el capítulo III.

1.- Pre-tratamiento y sacarificación con PILs:

Esta etapa consistió en pre-tratar residuos de eucalipto con los distintos líquidos iónicos protonados, los cuales fueron: Acetato de 2-hidroxydiethylamonio (2-HDEAA), Acetato de 2-hidroxyethylamonio (2-HEAA) y Lactato de 2-hidroxyethylamonio (2-HEAL). Luego de los pre-tratamientos con estos PILs, y como se puede observar en la figura 6-1, siguen las etapas de lavado y secado de material, para finalmente terminar con una sacarificación sin fermentación, ya que en este caso se busca comparar los rendimientos de los distintos PILs de acuerdo a la liberación de glucosa (luego de exponer al material a diferentes condiciones de pre-tratamiento). En este caso, esta etapa del estudio no cuenta con el reciclaje de PILs.

Las condiciones a variar en el pre-tratamiento son las siguientes:

- PIL a utilizar (en la razón 1:3 p/p de gr de biomasa/gr de LI)
- Temperatura: 60°C, 70°C, 80°C y 90°C.
- Tiempo de reacción: 30 y 60 minutos.

Las variaciones de estas condiciones equivalen a 16 experimentos (2 tiempos y 2 temperaturas), teniendo en cada uno tres pre-tratamientos con PILs y un control negativo, es decir, sin ningún tipo de pre-tratamiento. A la vez se debe considerar que cada experimento se debe realizar en duplicado.

2.- Pre-tratamiento y sacarificación con AILs:

Esta segunda etapa consiste en pre-tratar residuos de eucalipto con líquidos iónicos aprotonados o “convencionales”, que en este caso son los siguientes: [EMIM][Cl] y [EMIM][Ac], puros o reciclados. Al igual que en el caso anterior, se busca comparar los rendimientos de estos AILs en base a cual genera la mayor liberación de glucosa, por lo que tampoco se considera la etapa de fermentación, pero en este caso sí se considera la etapa de reciclaje de líquidos iónicos.

Las condiciones a variar en esta etapa son las siguientes:

- a. AIL a utilizar en el pre-tratamiento (en la razón 1:3 p/p de gr de biomasa/gr de LI puro o reciclado).
- b. Tiempo de reacción del pre-tratamiento: 30 y 60 minutos.
- c. Condiciones de lavado del material.
- d. Condiciones de secado del material.

En este caso, la cantidad de experimentos a realizar equivale a 31, separados en 7 ensayos distintos, debido a que se varía una condición de operación a la vez. En este caso también se debe considerar que todos los experimentos se realizan en duplicado.

3.- Sacarificación y fermentación simultánea:

Esta etapa final del estudio consiste en utilizar las mejores condiciones de pre-tratamiento obtenidas en las etapas 1 y 2 para realizar sacarificaciones y fermentaciones simultáneas, con el fin de determinar cuál de estas condiciones es la que genera mayor producción de bioetanol.

Para esta etapa, las condiciones a variar son las siguientes:

- a. Carga de biomasa: 5%, 10% y 15% p/v.
- b. Metodología de obtención del inóculo de levadura (ver el punto 7.3).
- c. LIs utilizado en la etapa de pre-tratamiento.

La cantidad de experimentos a realizar en este caso corresponde a 5, en los cuales se varían las condiciones de operación descritas anteriormente.

A continuación se detallan los distintos procedimientos llevados a cabo para realizar este estudio.

6.1. Molienda y tamizado^{XI}

En la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile se realizó la preparación de la biomasa, que consiste en una molienda y tamizado (con una malla n°40) del material, con el fin de obtener eucalipto con tamaño denominado “pin-chip”, correspondiente a 0.5 – 1 mm de espesor, 0.5 – 1 mm de ancho y 10 – 20 mm de largo^[20]. Finalmente, para obtener este tamaño se

^{XI} Ver Anexo B.1 y B.4, en los cuales se encuentran imágenes de este proceso y del tamaño del material

requiere utilizar 2 tamices, el N°18 (1 mm) y el N° 10 (2 mm). Cabe considerar que este material presenta una humedad de un 10% aproximadamente, valor determinado según la ecuación 7-1, punto 7.1.

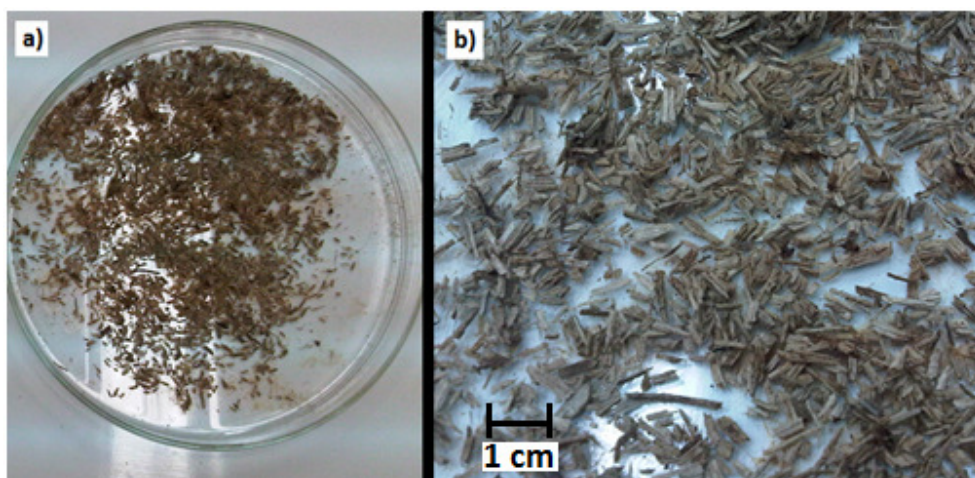


Imagen 6-1: a) Eucalipto tamaño pin-chip, b) acercamiento de a)

6.2. Pre-tratamiento del material con Líquidos Iónicos^{XII}

El pre-tratamiento con LI se realiza según las condiciones óptimas determinadas en estudios previos, por lo que se debe considerar una proporción de material lignocelulósico/LI de 1:3 p/p para el pre-tratamiento, utilizando una base de 0,5 gr de biomasa seca ^[19]. Para realizar un pre-tratamiento, primero se pesa la cantidad correspondiente de LI en un vial de vidrio (según la base de 0,5 gr de biomasa, se deben pesar 1,5 gr de LI), luego se agrega los 0,5 gr de eucalipto, para luego llevar el vial al baño termorregulado por 30 o 60 minutos, según corresponda. La temperatura del baño de silicona depende del tipo de LI con el que se esté tratando, si éste es del tipo AIL, la temperatura óptima es de 150°C, la cual fue determinada en estudios previos ^[19,20]. Por otro lado, en el caso de los PIL, la temperatura óptima aún no ha sido determinada, pero se sabe que no puede superar los 130°C, ya que a temperaturas mayores, los PILs se degradan y por lo tanto pierden la propiedad de disolver la matriz lignocelulósica ^[44]. Todos los ensayos deben realizarse en duplicado, para luego promediar los resultados obtenidos para cada experimento.

Cabe destacar que el peso de biomasa debe corresponder a peso seco, es decir, con 0% de humedad. Para determinar la humedad del material lignocelulósico se utiliza la ecuación 7-1 (punto 7.1 en esta sección). Luego de determinar la humedad, se agrega el material necesario para tener 0,5 gr compuestos por un 100% de biomasa^{XIII}.

^{XII} En el Anexo B.2 se pueden observar imágenes de este proceso.

^{XIII} Por ejemplo: si se tiene un 10% de humedad, los 0,5 gr están compuestos por sólo un 90% de madera (el 10% restante corresponde a agua), por lo que se puede determinar cuánto debe pesar para tener un 100% de biomasa, que en este caso corresponde a:

$$x \text{ gr} = \frac{0,5 \text{ gr} * 90\%}{100\%} = 0,56 \text{ gr}$$

6.3. Lavado del material pre-tratado

En el pre-tratamiento se genera la disolución de la matriz de celulosa, hemicelulosa y lignina, por lo que queda pendiente extraer el líquido iónico y la lignina material de esta mezcla. Para esto se realizan centrifugaciones sucesivas con agua destilada en tubos Falcon de 50 ml, lavando el material pre-tratado con 200 veces su masa en agua. Esto quiere decir que, si se tienen 0,5 gr de biomasa, se debe lavar con un total de 100 gr de agua destilada, la cual se debe repartir en 3 centrifugaciones sucesivas, agitando los tubos luego de agregar el agua, lo que se puede hacer con un Vortex. Estos lavados requieren una centrifugación a 8.000 o 10.000 rpm (8.228 a 12.857g), y durante 5 o 10 minutos cada una (ver Anexo B.3).

6.4. Secado de la celulosa pre-tratada

Según resultados previos ^[36], ésta es una etapa clave para realizar un proceso óptimo para la obtención de bioetanol, debido a que los rendimientos varían drásticamente si es que se utiliza un material húmedo en la sacarificación. En este caso se realizó el secado del material pre-tratado durante la noche por aproximadamente 15 horas. Con el fin de obtener una temperatura más adecuada para este proceso, se probó distintas temperaturas en esta etapa, seleccionándose finalmente temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C.

Es necesario registrar la humedad de las muestras, por lo que es necesario pesarlas antes y después del secado para luego medir el porcentaje de humedad según la ecuación 7-1. En el Anexo B.4 se puede observar una imagen de cómo disponer el material para la etapa de secado.

6.5. Sacarificación y Fermentación

Dependiendo de la etapa de este estudio, se consideró una sacarificación sin fermentación o una sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

En ambos casos, la carga enzimática es la misma y es la siguiente:

- Celulasas (Endo y Exoglucanasas): se requieren 37 FPU/gr de material.
- Celobiosa (β -glucosidasa): se requieren 4,9 CBU/gr de material, volumen determinado según la relación Celulasas/Celobiasas v/v de 7,5:1.

6.5.1 Sacarificación sin fermentación

En este caso, las condiciones óptimas para la sacarificación fueron determinadas en estudios previos y por lo tanto para este estudio se consideran las siguientes ^[19,20]:

- Volumen de reacción: 4 ml, el cual considera una carga de 5% p/v de material, lo que equivale a 0,2 gr de biomasa.
- Temperatura: 50°C.
- Tiempo de reacción: 72 horas.
- Agitación: 200 rpm.
- Buffer: tampón sodio acetato (50 mM, pH = 4,8) y Tween 20 (2,5 gr/l).

Luego de agregar el material, las enzimas y el buffer en tubos Falcon de 15 ml, éstos se deben incubar en un Shaker (como los señalados en el Anexo C) bajo las condiciones de operación señaladas anteriormente. Para evaluar los resultados de los distintos ensayos se deben tomar muestras en duplicado de 100 µl cada una, a las 0, 6, 24, 48 y 72 horas, las cuales deben ser almacenadas a 4°C hasta que se haga el análisis de la determinación de la concentración de glucosa en cada muestra.



Imagen 6-2: Tubo Falcon de 15 ml con el material lignocelulósico, las enzimas y el buffer

6.5.2 Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

En este caso, las condiciones óptimas para la SSF fueron determinadas en estudios previos y son las siguientes ^[19,20]:

- Volumen de reacción: 40 ml.
- Carga de inóculo: 10 gr/l de levadura *Saccharomyces cerevisiae* RED STAR (ver punto 7.3).
- Temperatura: 40°C.
- Tiempo de reacción: 96 horas.
- Agitación: 250 rpm.
- Medio de cultivo: tampón sodio acetato 50 mM, pH = 4,8, de extracto de levadura 5 gr/l, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,5 gr/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 gr/l y Tween 20 2,5 gr/l. El volumen requerido de medio de cultivo se determina según los volúmenes de enzima e inóculo utilizados.

En este caso, las cargas de material lignocelulósico pre-tratado varían de 5%, 10% o 15% p/v, considerando el volumen de reacción señalado anteriormente. Para realizar las SSF primero se pesa el material pre-tratado en los matraces Erlenmeyer modificados previamente esterilizados (ver Anexo B.5). Luego se agrega la cantidad correspondiente de enzimas, de inóculo y de medio de cultivo, manteniendo la esterilidad de los matraces, para finalmente dejarlos en un Shaker durante el tiempo y bajo las condiciones señaladas anteriormente. Estos ensayos también se realizan en duplicado, y los resultados de cada experimento se promedian.

Para analizar los distintos ensayos se deben tomar muestras en duplicado de 700 µl cada una, a las 0, 6, 24, 48, 72 y 96 horas, las cuales deben ser centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm (15.294g), para

luego obtener el sobrenadante y almacenarlo en un tubo Eppendorf a 4°C hasta que se haga el análisis de la determinación de la concentración de etanol en cada muestra.

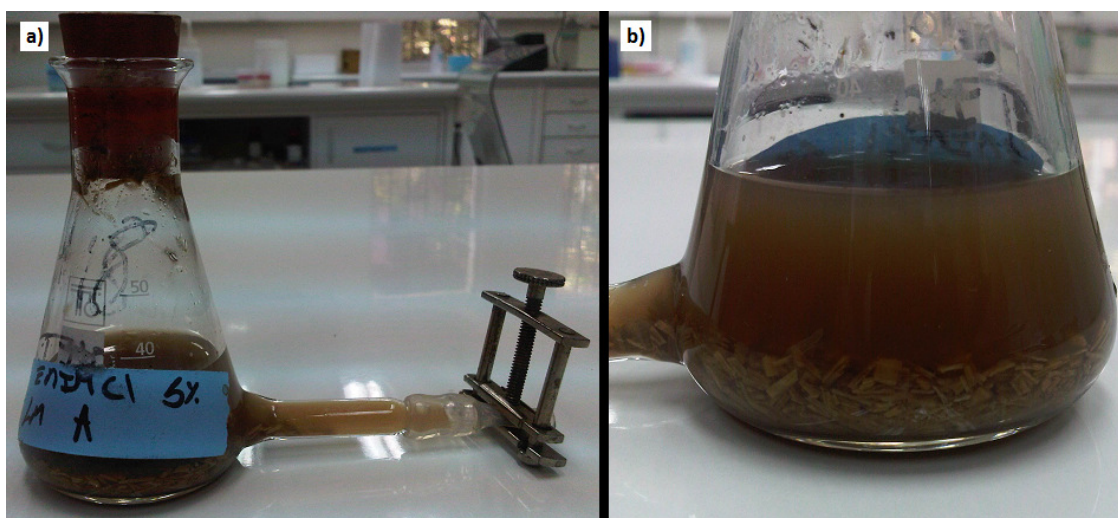


Imagen 6-3: a) Matraz Erlenmeyer modificado con el material lignocelulósico, las enzimas, el inóculo y el buffer para la SSF, b) acercamiento de a)

7. Metodologías

A continuación se detallan las distintas metodologías utilizadas en este estudio.

7.1. Secado del material

Para secar la biomasa lignocelulósica, ésta se incubó durante aproximadamente 15 horas en una estufa Gallenkamp a 40°C. Para la determinación del porcentaje de humedad que presentaba el material se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Masa Inicial} - \text{Masa Final}}{\text{Masa Inicial}} * 100 \quad \text{Ecuación (7 - 1)}$$

7.2. Reciclaje de Líquidos iónicos

Esta etapa consistió en separar el líquido iónico del agua que fue utilizada en la etapa de lavado. Para esto se trasvasijó la mezcla de LI-agua en un vaso precipitado, el cual se dejó en un baño de silicona a 130°C durante aproximadamente 15 horas. Este tiempo se estimó suficiente como para asegurar la evaporación de la mayor parte del agua presente en esta mezcla ^[36].

7.3. Aislamiento de colonias de levadura y obtención del inóculo

La metodología a utilizar para el aislamiento de colonias de levadura es la misma utilizada en los estudios de Niklitschek y Juri^[19,20]. Para la obtención del inóculo, se consideraron 2 metodologías distintas:

- a. Con propagación de la levadura: esta metodología corresponde a la misma utilizada por de Niklitschek y Juri, en la cual finalmente se obtiene una concentración de levaduras de 10 gr/l, mediante la utilización de una curva de calibración^[19,20].
- b. Sin propagación de la levadura: en este caso solo se realiza una hidratación de la levadura liofilizada entregada por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS. Esta hidratación se hace con agua destilada, manteniendo una concentración de 10 gr/l de levadura.

7.4. Medición de glucosa^{XIV}

Para estimar la concentración de glucosa en los distintos ensayos se utilizó el kit comercial de ensayo Gluc-Pap, de Randox (GL2623). Previo al análisis se deben agitar y luego centrifugar los tubos Eppendorf por un minuto a 13.000 rpm (17.949g). Finalmente, la estimación de la concentración de glucosa se llevó a cabo de la misma manera que fue realizada en estudios previos^[19,20].

7.5. Medición de etanol

Las mediciones de etanol se realizaron en un cromatógrafo de gases (CG), marca PerkinElmer modelo Clarus 500, el cual utiliza un detector de llama ionizante (FID) que se encuentra a 250°C, de manera de poder gasificar las muestras en estado líquido. Este CG utiliza una columna capilar Supelco Nukol de sílica (catálogo N° 25326) para detectar el etanol en las muestras analizadas. El gas utilizado como fase móvil fue helio y los estándares utilizados para la elaboración de la curva de calibración correspondían a muestras de etanol diluido en agua destilada. Este CG cuenta con una interfaz, que entrega el área bajo los “peaks” o picos, la que se relaciona con el volumen de etanol en las muestras mediante una curva de calibración confeccionada previamente.

Para realizar estas mediciones, primero se centrifugaron nuevamente las muestras por 5 minutos a 12.000 rpm (18.514g) para separar restos celulares y otros sólidos. Luego se inyectaron 5 µl de muestra en el CG. Mediante la utilización de una curva de calibración que relaciona el área bajo los “peaks” con la concentración de etanol, se determinó la concentración de etanol en las muestras. Estas mediciones se realizaron en triplicado para disminuir la variabilidad de la técnica de medición de etanol. En el Anexo D se puede observar un “peak” de etanol entregado por la interfaz del cromatógrafo.

^{XIV} En el Anexo E.2 se encuentra un ejemplo de cálculo del rendimiento con respecto al porcentaje de liberación de glucosa.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describe los resultados de los diferentes ensayos realizados en este trabajo, los cuales se encuentran divididos según las distintas etapas de progreso de este estudio. A la vez, se presenta la discusión de estos resultados.

8. Resultados y Discusiones

A continuación se presentan los resultados y la discusión de los ensayos con PILs, posteriormente los de los AILs. Finalmente se presentan los resultados y discusión de los experimentos de sacarificación y fermentación simultáneas.

8.1. Pre-tratamientos con PILs

En esta primera etapa, se realizaron pre-tratamientos con 3 PILs: 2-HDEAA, 2-HEAA y 2-HEAL. En la Tabla 8-1 se resumen las condiciones de operación usadas en el pre-tratamiento.

Tabla 8-1: Parámetros en estudio y rangos de trabajo para el pre-tratamiento con 2-HDEAA, 2-HEAA o 2-HEAL

Parámetro	Rango de trabajo
Temperatura	60 o 70°C
Tiempo de reacción	30 o 60 minutos

Como los pre-tratamientos se realizan según una base de material lignocelulósico de 0,2 gr, se tiene que la glucosa potencial es de 0,111 gr (en el Anexo E.1 se encuentra el detalle de los cálculos). En la Figura 8-1 se muestran los resultados de estos ensayos. En este experimento el Control Negativo corresponde a una sacarificación de residuos de eucalipto que no han sido pre-tratados (ver Figura 6-1). En cambio, las demás muestras fueron tratadas con las condiciones señaladas en la Tabla 8-1, con un lavado a 8.000 rpm (8.228g) durante 5 minutos y con una etapa de secado a 40°C. Este control sirve para investigar qué tan favorable es un pre-tratamiento con PIL's en comparación a una sacarificación sin pre-tratamiento.

Los rendimientos se miden con respecto a la glucosa liberada luego de la sacarificación, en comparación con la glucosa potencial, que es la totalidad de glucosa proveniente de la celulosa presente en los residuos de eucalipto (ver Anexo E.2).

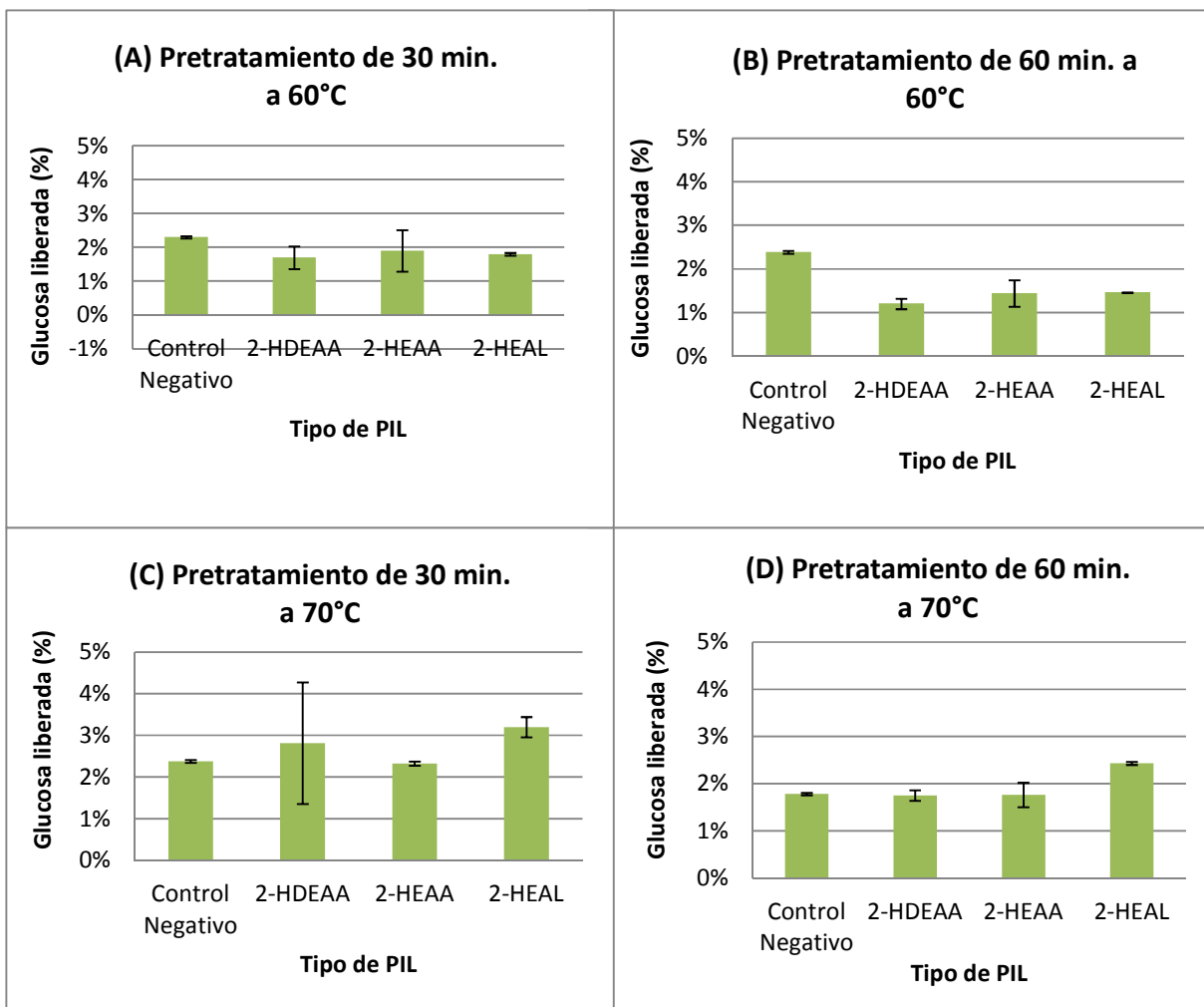


Figura 8-1: Rendimientos de la hidrólisis enzimática, post-pre-tratamientos con PILs a 60 y 70°C, durante 30 y 60 minutos. Barras de error indican la desviación estándar.

Como se puede observar en la Figuras 8.1, el rendimiento del control negativo es cercano al 2%, siendo este un porcentaje bastante bajo. Este resultado era esperable, ya que, al no tener un pre-tratamiento, las enzimas sólo podrían haber degradado algunas moléculas de celulosa superficiales y fácilmente accesibles.

Por otro lado, se puede observar que el rendimiento de glucosa en la biomasa pre-tratada con los distintos PILs es similar al control negativo, resultado que se repite en todas las condiciones utilizadas. Esto puede deberse a que 3 lavados sucesivos no son suficientes para estos PILs. Una etapa de lavado no eficiente implica que quedan residuos de PILs en las muestras, lo que genera una disminución en el rendimiento de la sacarificación. Esto no es una causa probable, ya que según estudios previos, los PILs son LI no tóxicos, por lo que no deberían influir en las enzimas y por lo tanto no deberían afectar el rendimiento de la sacarificación^[44].

Si en la Figura 8-1 se comparan los gráficos (A) y (C), con los (B) y (D) se puede observar una pequeña disminución de los rendimientos de los 3 PILs al aumentar el tiempo de pretratamiento de 30 a 60 minutos. Al igual que en estudios previos, este resultado no era esperado, ya que se esperaba que a mayor

tiempo de operación en el pre-tratamiento, se obtuviera una mayor liberación de glucosa luego de la sacarificación ^[18,19]. Este efecto negativo puede explicarse de la siguiente manera: condiciones más extremas en el pre-tratamiento producidas por mayores temperaturas o mayores tiempos de operación, pueden generar no sólo el rompimiento de la matriz lignocelulósica, sino que además pueden degradar las moléculas de celulosa, lo que implica una solubilización de moléculas de glucosa, las cuales quedan en el medio líquido. Al quedar en esta fase, estas moléculas de glucosa son posteriormente eliminadas en la etapa de lavado de este proceso (esto se puede comprobar al realizar mediciones de la concentración de glucosa en los distintos lavados, estudio realizado por Patricio Bosch ^[45]) y por lo tanto dejan de ser consideradas en la medición de concentración de glucosa de las muestras y finalmente se obtienen menores porcentajes de liberación de glucosa. Este mismo efecto fue observado en el trabajo de tesis de Cortínez ^[18], en el cual se observó una disminución de un 54% a un 40% al pre-tratar lenga a 150°C durante 30 y 60 minutos respectivamente. Es por esto que se debe pre-tratar a menores tiempos de operación.

Con pre-tratamientos a 70°C y durante 30 minutos, los PILs 2-HDEAA y 2-HEAL obtienen resultados positivos, es decir, generan porcentajes de liberación de glucosa levemente mayores en comparación con el control negativo (Figura 8-1 (C) 2,8% y 3,2% respectivamente contra 2,3% del control negativo). Este leve aumento no es suficiente como para considerar estos PILs como alternativas factibles para la etapa de pre-tratamiento a las temperaturas estudiadas, ya que el porcentaje de liberación de glucosa es aún muy bajo, por lo que se requerirían grandes cantidades de material lignocelulósico como para obtener volúmenes relevantes de etanol.

Con respecto al 2-HEAA, se puede observar que en los 4 gráficos de la Figura 8-1, éste no presenta porcentajes de liberación de glucosa mayores al control negativo, resultado que concuerda con los obtenidos en un estudio previo por Pinkert et al. ^[43], a pesar de que este PIL contiene el anión acetato que es capaz de interaccionar con la lignina. Este efecto puede deberse a que el anión acetato interacciona con la lignina sólo a mayores temperaturas de operación o porque el catión 2-hidroxietilamonio no es capaz de interaccionar con la celulosa, por lo que ésta se mantuvo cristalina. Esta última alternativa también podría explicar el leve desempeño del 2-HEAL, pero para poder realmente descartar una opción se deben profundizar los estudios y por lo tanto se deberían realizar pre-tratamientos a mayores temperaturas. Cabe destacar, como es señalado en los estudios de Mäki-Arvela et al. ^[34], el anión acetato es efectivo siempre y cuando sea conjugado con un catión apropiado.

8.2. Pre-tratamientos con AILs

8.2.1 Pre-tratamientos con [EMIM][Cl]

Los primeros ensayos exploratorios con AILs fueron realizados con [EMIM][Cl], de manera de comparar los resultados obtenidos con los presentados en los antecedentes, realizados por Juri ^[20]. En este caso, la única diferencia relevante en los procedimientos y materiales, con respecto a los utilizados por Juri, fue el origen del LI, ya que en esta memoria, el [EMIM][Cl] es de la marca SIGMA-ALDRICH® (con una pureza del 95%), en cambio el del estudio de Juri era de la marca Merck® (con una pureza del 98%), y el procedimiento de lavado de las muestras luego del pre-tratamiento.

Efecto del secado, forma de lavado y origen de la materia prima

En este caso, el primer ensayo se realizó para determinar una temperatura de secado del material^{XV}, ya que según los resultados obtenidos en trabajos previos, esta etapa era fundamental para obtener mayores rendimientos. El material pre-tratado se dispuso sobre placas Petri, como se puede observar en la Imagen 8-1, para su posterior secado a distintas temperaturas. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 8-2.

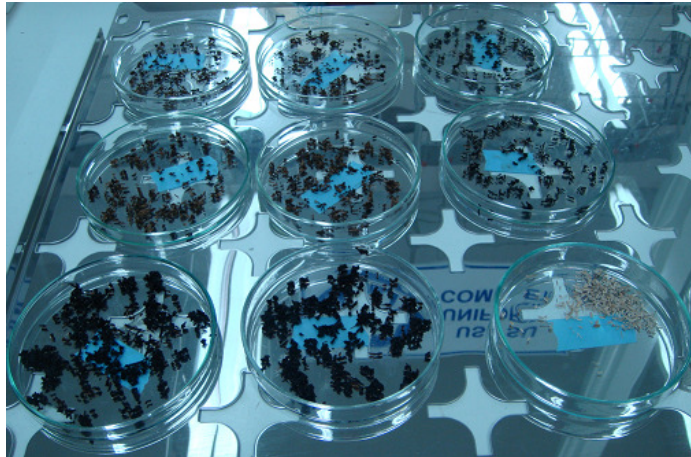


Imagen 8-1: Material pre-tratado con [EMIM]Cl dispuesto para la etapa de secado a distintas temperaturas

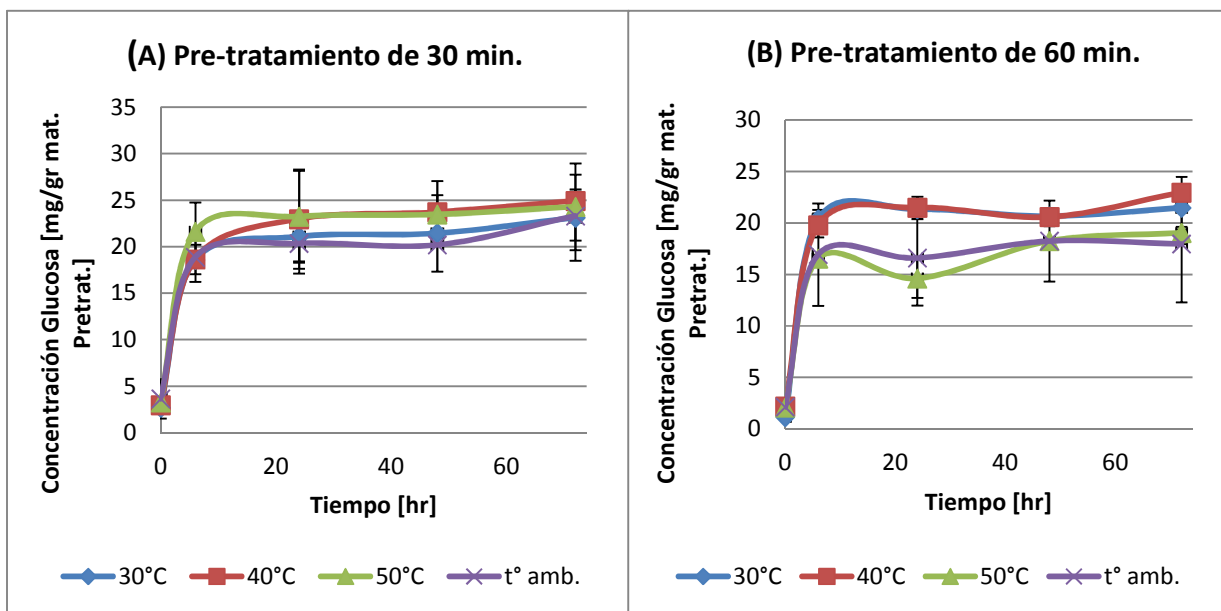


Figura 8-2: Perfiles cinéticos de la sacarificación, post-pre-tratamiento con [EMIM]Cl durante (A) 30 minutos y (B) 60 minutos, con una posterior etapa de secado a 30°C, 40°C, 50°C y a temperatura ambiente^{XVI}

^{XV} En este caso se utilizó el eucalipto de 15 años, proveniente de Melipilla.

^{XVI} La temperatura ambiente (t° amb.) era aproximadamente 22°C. La comparación con un control negativo, es decir, con pre-tratamiento pero sin etapa de secado, se puede observar en la figura 8-8.

Como se puede observar en la Figura 8-2, independiente del tiempo de operación del pre-tratamiento, los rendimientos estuvieron en el rango de 20 – 25 mg de glucosa por gr de biomasa pre-tratada, lo que equivale a un rendimiento de 4,5% aproximadamente (ver Anexo E.2) Estos valores son considerablemente menores a los señalados en estudios anteriores, ya que las concentraciones de glucosa no superan los 25 mg/gr de material pre-tratado. Este resultado corresponde a una cantidad de glucosa liberada, luego de la sacarificación, casi 8 veces menor al resultado obtenido por Juri ^[20], quien obtuvo un rendimiento del 44% pre-tratando residuos de eucalipto con [EMIM][Cl] (ver Tabla 3-4). Este resultado equivale a obtener una concentración de glucosa en el medio, luego de las 72 horas de sacarificación, de 185,05 mg por gramo de eucalipto pre-tratado. Cabe destacar que, según el cálculo del rendimiento ejemplificado en el Anexo E.2, 185,05 mg de glucosa gr de material pre-tratado equivale a un rendimiento del 33,34%, en vez de un 44% como señala Juri en su memoria. Esta diferencia se debe a la manera de calcular el rendimiento, ya que en este estudio se considera la conservación de moles de celulosa y glucosa, no la conservación de masa de ambos compuestos.

Independiente de los bajos rendimientos, en la Figura 8-2 se puede observar como la temperatura de secado no influye considerablemente en los rendimientos, ya que no hay una diferencia significativa entre las curvas. A la vez, en esta figura se puede observar que a mayor tiempo de pre-tratamiento, mayor es el efecto de la temperatura de secado en el rendimiento de la sacarificación, ya que se observan mayores diferencias entre las curvas. Pero en ambos casos, la curva roja, correspondiente a una temperatura de secado de 40°C, es la que presenta mejores resultados. Aunque sea una diferencia muy pequeña, incluso en condiciones más extremas de pre-tratamiento, como es el caso de un tiempo de operación de 60 minutos (gráfico (B)), se decidió que las posteriores etapas de secado en este estudio se realizaran a 40°C.

Fue debido a estos resultados que se decidió realizar pre-tratamientos con eucaliptos de diferentes procedencias y edad, y con distintos proceso de lavados, para determinar si estas condiciones de operación pueden afectar el rendimiento. Estas son parte de las diferencias entre los procedimientos de esta memoria y los estudios realizados por Juri ^[20]. Los resultados se presentan en la Figura 8-3.

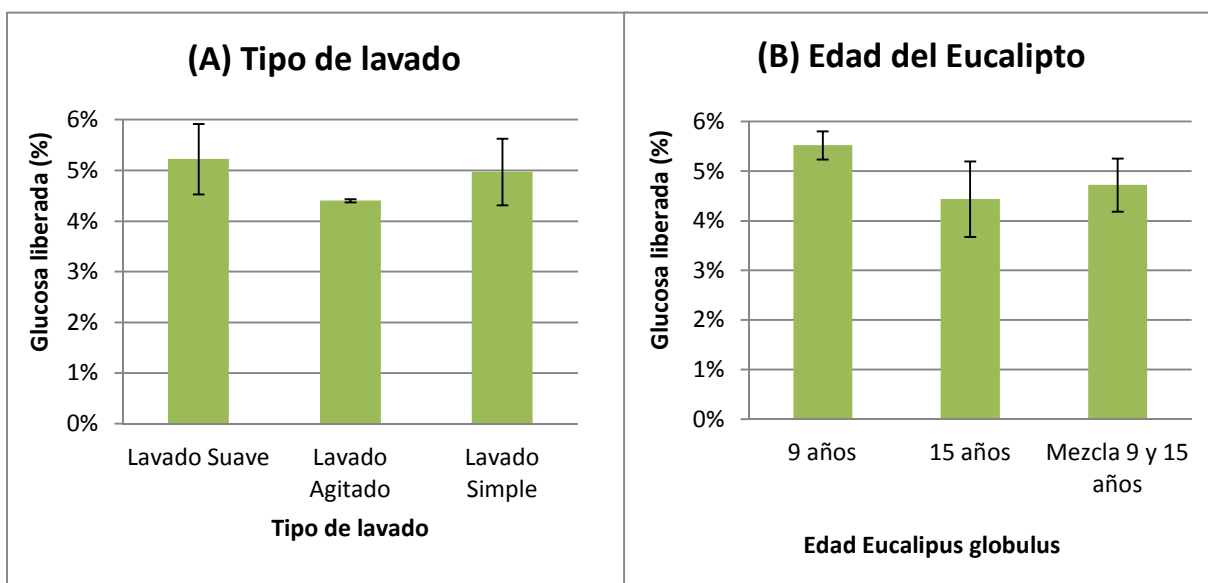


Figura 8-3: Efecto del tipo de lavado y de la edad de la biomasa en la sacarificación, (A) con distintos tipos de lavado, (B) con un pre-tratamiento con biomasa de distintas edades, ambos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p, con [EMIM][Cl] y con una posterior etapa de secado a 40°C

Los lavados se realizaron a 8.000 rpm (8.228g), durante 10 minutos, usando tres diferentes estrategias de lavado:

- Lavado suave: La biomasa pre-tratada se suspende en agua y se centrifuga. El procedimiento se realiza un total de tres veces.
- Lavado Agitado: La biomasa pre-tratada se suspende en agua, se agita durante 10 segundos en un Vortex, y se centrifuga. El procedimiento se realiza un total de tres veces.
- Lavado simple: Como el lavado suave, pero utilizando sólo 2 de los 3 lavados sucesivos.

En este caso es importante analizar las diferencias en los rendimientos al realizar distintos tipos de lavados, ya que como se ha señalado anteriormente esta etapa es muy importante para eliminar los inhibidores en el medio, debido a que estos afectan el rendimiento de las enzimas en la sacarificación.

En la Figura 8-3 (A) se puede observar cómo el rendimiento de la sacarificación no varía considerablemente entre las distintas estrategias de lavado. Como el lavado suave es el que presenta un mayor rendimiento, es ésta la estrategia de lavado que se utilizó siguientes experimentos.

En la Figura 8-3 (B) se pueden observar los diferentes rendimientos al utilizar eucaliptos de distintas procedencias y edades. En este caso tampoco se observan mayores diferencias en el rendimiento de la sacarificación, por lo que, debido a la disponibilidad de cada uno de estos residuos, se decidió utilizar en experimentos posteriores, una mezcla de ambos, en la cual aproximadamente el 50% corresponde a cada tipo de eucalipto.

Luego de analizar ambos gráficos, en los cuales no se evidencia una gran diferencia entre las distintas condiciones, se decidió seguir en los posteriores ensayos con la mezcla de eucaliptos y con un lavado suave. A la vez se decidió realizar sólo 2 de las 3 etapas de lavado, ya que incluso se obtuvo

rendimientos mayores a los obtenidos en el ensayo anterior (con pre-tratamiento de 30 minutos, secado a 40°C y 3 etapas de lavado), en el cual se obtuvo rendimientos menores a 4,5% (ver Figura 8-2), al contrario del 5% de rendimiento señalado en la Figura 8-3. Con estos resultados se descartó que estos factores fueran determinantes para obtener rendimientos 8 veces menores a los obtenidos en los estudios de Juri ^[20], por esto se decidió considerar la procedencia del [EMIM][Cl] como el factor determinante. Existe diferencia en el grado de pureza de ambos LI, siendo del 98% para el [EMIM][Cl] de Merck (con un porcentaje de humedad menor o igual al 1%), y del 95% para el de Sigma-Aldrich (porcentaje de humedad no disponible) ^[46] (ver Anexo F).

En algunos estudios se destaca la importancia de la pureza de los líquidos iónicos, y el efecto que tienen en sus propiedades, entre las que se cuenta, su capacidad de disolver la matriz lignocelulósica ^[25,47]. Dentro de estas impurezas se pueden encontrar bases orgánicas, aniones, haluros, e incluso las moléculas de agua pueden afectar enormemente el rendimiento de los LI. En el estudio de Pinkert et al. ^[25] se discute sobre la alta higroscopicidad del [EMIM][Cl], estudio en el cual se concluye que al tener la propiedad de absorber fácilmente agua del medio ambiente, este LI disminuye considerablemente sus propiedades y de esta manera reduce su capacidad de disolver la celulosa. Es posible que ese 3% de diferencia entre las impurezas de estos [EMIM][Cl] sea suficiente como para disminuir su capacidad de disolver la matriz lignocelulósica del eucalipto en 8 veces. Según el estudio de Seddon et al. ^[47], el agua influye en las propiedades del LI debido a que forma puentes de hidrógeno con el anión y con el catión, por lo que estos dejarían de interactuar con la matriz lignocelulósica. Además, cabe destacar que el envase del [EMIM][Cl] utilizado en este estudio había sido abierto varias veces antes, por lo que el LI fue adquiriendo cada vez más agua del ambiente.

Por otro lado se quiso determinar las condiciones de operación más favorables para la centrifugación de la etapa de lavado. Para este ensayo se realizó un pre-tratamiento con [EMIM][Cl], durante 60 minutos, para luego realizar la etapa de lavado con diferentes configuraciones, las cuales se muestran en la Tabla 8-2.

Tabla 8-2: Parámetros en estudio de la centrifugación en la etapa de lavado

Configuración	Velocidad de centrifugación [rpm xg]	Tiempo de operación [minutos]
1	8.000 8.228	10
2	8.000 8.228	5
3	10.000 12.857	10
4	10.000 12.857	5

Para analizar estos resultados, se decidió definir una eficiencia, la cual se señala en la Ecuación 8-1, de manera de poder comparar las distintas configuraciones señaladas en la Tabla 8-2. ^{XVII}

$$Eficiencia = \frac{Cantidad\ de\ glucosa\ liberada\ [mg/gr\ mat.\ pretrat.]}{Velocidad\ de\ agitación\ [rpm] * tiempo\ de\ operación\ [min.]} \quad Ecuación\ (8 - 1)$$

^{XVII} Decisión tomada en conjunto con el Sr. Christian Wilken, quien a la vez estaba realizando una práctica profesional en el mismo tema de este estudio.

Cabe destacar que la cantidad de glucosa considerada en los resultados es la que se obtiene luego de 72 horas de sacarificación. Estos resultados se presentan en la Figura 8-4.

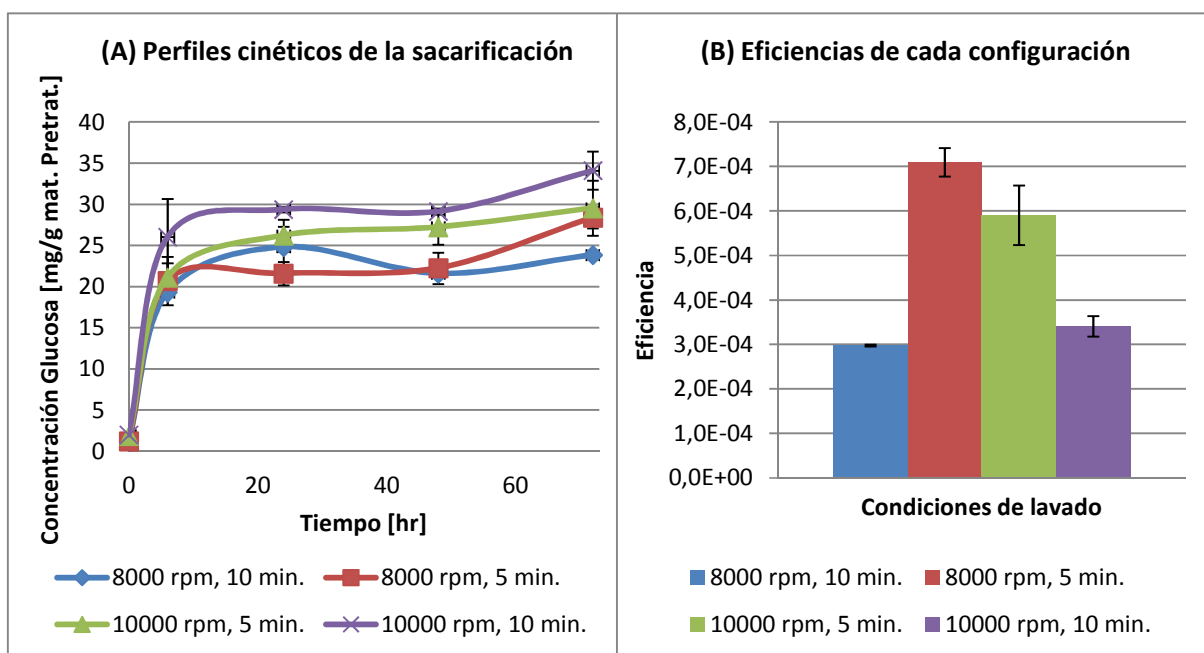


Figura 8-4: Efecto en la hidrólisis enzimática, de las condiciones de lavado post-pre-tratamiento. (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Eficiencias de cada configuración, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p, con [EMIM][Cl] y con una posterior etapa de secado a 40°C

Como se puede observar en la Figura 8-4, según los perfiles cinéticos (A), la configuración 10.000 rpm durante 10 minutos logra el mejor rendimiento desde el comienzo de la sacarificación. Ahora, si se consideran las eficiencias (B), se tiene que la configuración 8.000 rpm durante 5 minutos es la más favorable, ya que su relación cantidad de glucosa liberada versus el tiempo y la velocidad de centrifugación que requiere, es la mayor. La definición de esta eficiencia fue definida según la Ecuación 8-1 debido a que, mientras menos tiempo requiera la etapa de lavado y menor sea la agitación, menor será el gasto energético de esta etapa. Es por esto que los siguientes ensayos consideran esta última configuración en las etapas de lavado.

8.2.2 Pre-tratamientos con [EMIM][Ac]

El objetivo de estos experimentos es comparar los rendimientos de la hidrólisis enzimática al utilizar distintas condiciones de pre-tratamiento con [EMIM][Ac]. En estos estudios, el control negativo corresponde a una sacarificación con material lignocelulósico no pre-tratado.

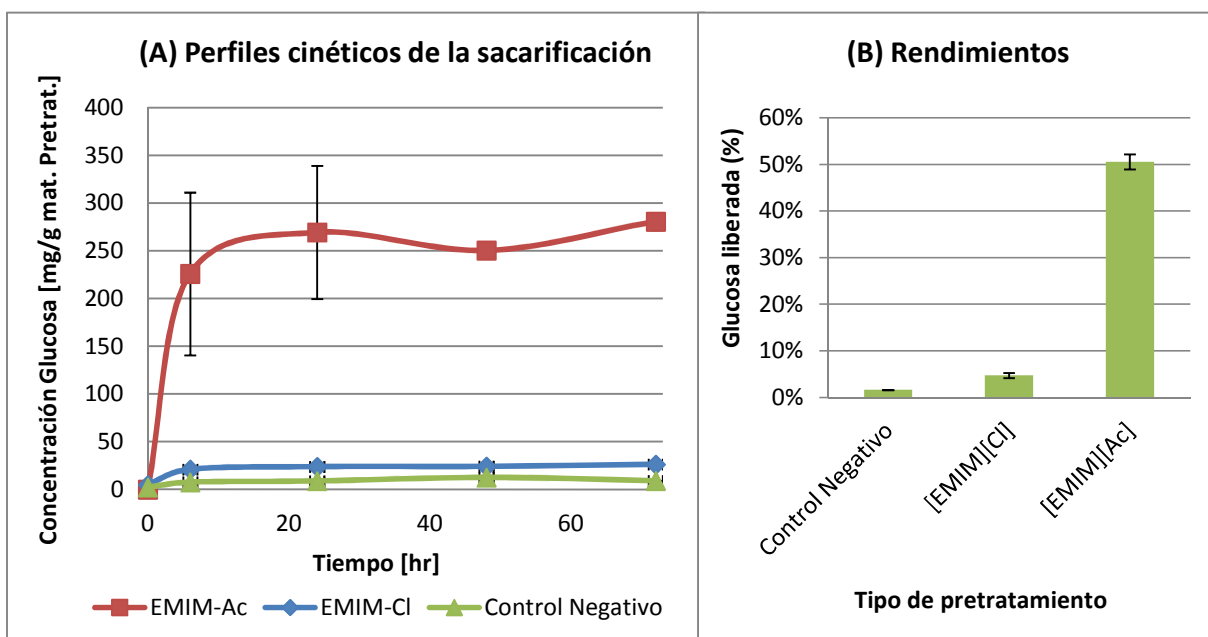


Figura 8-5: Resultados del pre-tratamiento con distintos AIL's, (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 60 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C

Como se puede observar en la Figura 8-5, al pre-tratar la madera con [EMIM][Ac] se obtiene un rendimiento en la sacarificación mucho mayor comparado con los obtenidos con [EMIM][Cl], llegando a 281 miligramos de glucosa por gramo de material pre-tratado, lo que equivale a un rendimiento del 50,63% (ver Anexo E.2), en vez de los rendimientos menores a 5,5% obtenidos con [EMIM][Cl] (ver Figura 8-3). Estos resultados reflejan un aumento de más de un 45% al pre-tratar con [EMIM][Ac] en vez de [EMIM][Cl].

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los estudios de Juri sobre pre-tratamientos con [EMIM][Cl], en los cuales obtuvo 185 mg de glucosa/gr de material pre-tratado como mejor resultado [20], que equivale a un rendimiento del 33,34% (ver Anexo E.2), se obtiene un aumento en el rendimiento de un 17,3%.

Cabe destacar que los experimentos de la Figura 8-5 se realizaron con un pre-tratamiento de 60 minutos. Se decidió probar un pre-tratamiento que durara solo 30 minutos, ya que mayor tiempo de pre-tratamiento no implica necesariamente mejor rendimiento.

También se incluyó en este nuevo ensayo un lavado simple, es decir, sólo considera 2 de las 3 etapas de lavado sucesivas, ya que según la Figura 8-3 con esta configuración se deberían obtener mejores resultados. Los resultados se muestran en la Figura 8-6.

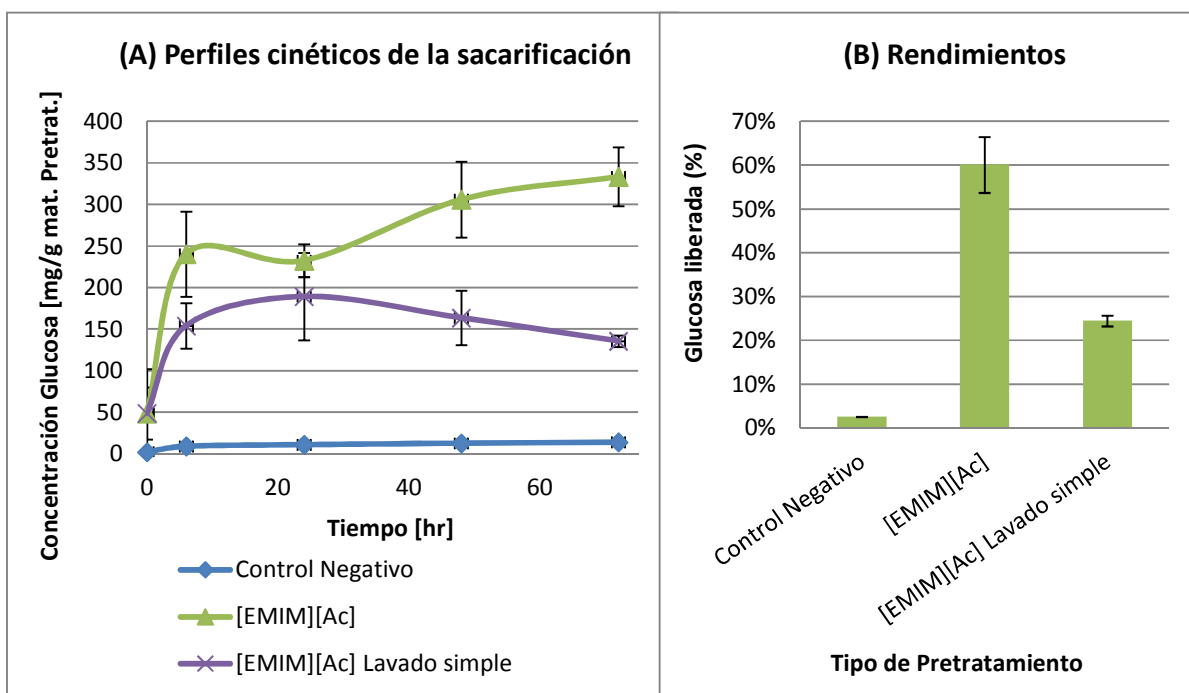


Figura 8-6: Resultados del pre-tratamiento con [EMIM][Ac], (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 30 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C

Se puede observar que el rendimiento con [EMIM][Ac] puede llegar hasta un 60%, lo que equivale a 334 mg de glucosa/gr de material pre-tratado. En este caso el aumento en el rendimiento de un 51% a un 60% se atribuye a un manejo de las técnicas de pre-tratamiento, lavado, secado y sacarificación. Además, en esta figura se puede observar que el rendimiento disminuye considerablemente en el caso de realizar solo 2 etapas de lavado luego de un pre-tratamiento con [EMIM][Ac], ya que en este caso sólo se obtienen 136 mg de glucosa/gr de material pre-tratado. Este efecto es contrario a lo ocurrido con [EMIM][Cl] (Figura 8-3), pero similar al ocurrido en el estudio de Wang et al. ^[30], en el cual se observa una clara disminución de la actividad relativa de las enzimas al aumentar la concentración de [EMIM][Ac] en la etapa de sacarificación. En el estudio de Wang, luego de 24 horas de sacarificación a 50°C, las enzimas mantuvieron un 86% y un 76% de la actividad, en presencia de un 5% y 10% de [EMIM][Ac] respectivamente. Este efecto podría deberse a la presencia del ión acetato en este AIL, con el que se genera ácido acético y por lo tanto se disminuye el pH del medio. Las enzimas utilizadas en la sacarificación tienen un rango de operación de pH entre 4 y 5 (ver Tabla 2-4), por lo que si el pH disminuye bajo este rango, estas enzimas a la vez disminuyen su rendimiento y finalmente se obtendrá un peor rendimiento en la sacarificación. En la Imagen B-4 del Anexo B.3 se puede observar cómo se va aclarando el medio luego de las sucesivas etapas de lavado, en esta imagen se recalca la necesidad de realizar un tercer lavado al pre-tratar con [EMIM][Ac], ya que en el segundo lavado aún queda LI en el medio, lo que se puede observar según la coloración de este.

En particular, en la Figura 8-6 (A) se puede observar, en el caso del lavado simple, que la concentración de glucosa va disminuyendo a partir de las 24 horas de sacarificación. Este efecto se atribuye a la variabilidad entre los duplicados de los datos.

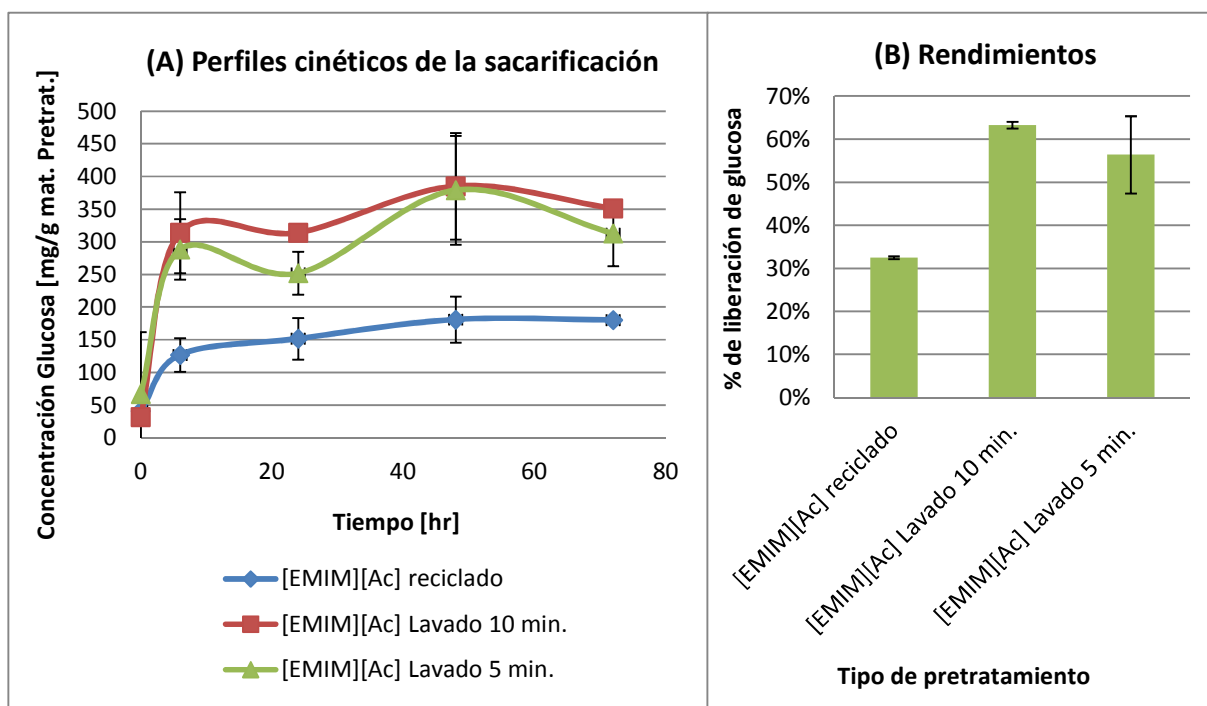


Figura 8-7: Comparación de la sacarificación de eucalipto pre-tratado con [EMIM][Ac] puro o reciclado, (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 30 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 y 10 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C

En la Figura 8-7 se puede observar la diferencia en los rendimientos entre usar [EMIM][Ac] puro o reciclado y entre usar una etapa de lavado que dure 5 o 10 minutos.

Al utilizar el [EMIM][Ac] reciclado, se obtuvo que el rendimiento disminuye en un 48,7% (considerando el [EMIM][Ac] puro con lavados de 10 minutos como mejor resultado), ya que la glucosa producida disminuye de 351 a 180 mg por gramo de material pre-tratado. Esta disminución es bastante considerable e indica que si el [EMIM][Ac] se quiere utilizar por una segunda vez, se requiere aproximadamente el doble de material lignocelulósico y de LI reciclado para obtener la misma cantidad de glucosa disponible. Según el estudio de Mora-Pale et al. ^[27], el [EMIM][Ac] puede ser reciclado por lo menos unas 4 veces sin deteriorar su habilidad de extraer la lignina, aunque recalca que el reciclaje de LI no se puede realizar indefinidamente, debido a que la lignina y otros compuestos deben ser extraídos. Cabe destacar que en el estudio de Mora-Pale se consideraron otras técnicas de reciclaje de AILs, como el uso de líquidos supercríticos, resinas de intercambio iónico (en particular de aniones) o mediante el uso de un sistema de tres fases formado por la adición de soluciones concentradas (40%) de K_3PO_4 y K_2HPO_4 , que pueden ser más eficientes que evaporar el agua que quedó en conjunto con el líquido iónico, en términos de efectividad remanente en el AIL.

En la Imagen 8-2 se puede observar la diferencia entre el [EMIM][Ac] puro y reciclado. El cambio en la coloración se debe a que el AIL ha adquirido lignina y otros compuestos que disminuyen su capacidad de extraer la lignina y disolver la matriz lignocelulósica. Para aumentar el rendimiento con [EMIM][Ac] reciclado es necesario remover estos compuestos. En el estudio de Mora-Pale et al. ^[27], se señalan distintas técnicas de reciclaje de líquidos iónicos como el uso de fluidos supercríticos o el uso de resinas de intercambio aniónico, que permite una precipitación parcial de la lignina acumulada en el LI.

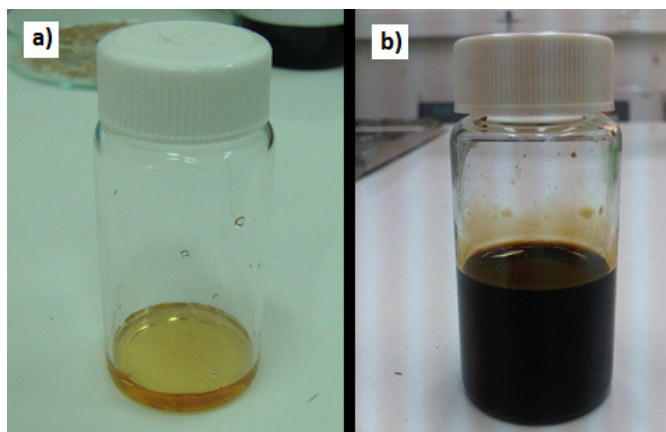


Imagen 8-2: [EMIM][Ac] a) puro, b) reciclado

Además, se probaron dos tiempos de lavado para el [EMIM][Ac] puro y se obtuvo que 10 minutos de lavado era levemente más favorable que 5 minutos, ya que la concentración de glucosa aumenta de 313 mg a 351 mg por gramo de material pre-tratado, lo que equivale a un 12,1% de aumento. Esta diferencia se puede deber a que el lavado durante 5 minutos genera una menor remoción del LI y por lo tanto, al haber un exceso de ión acetato, se estaría afectando la hidrólisis enzimática, lo que genera una disminución en el rendimiento. En la Tabla 8-3 se presentan los resultados de este ensayo, según la eficiencia definida en la Ecuación 8-1.

Tabla 8-3: Efecto del tiempo de lavado en la eficiencia de las etapas de lavado durante 5 o 10 minutos, a 8.000 rpm (8.228xg)

Velocidad de centrifugación [rpm xg]	Tiempo de operación [minutos]	Eficiencia (* 10 ⁻³)
8.000 8.228	10	4,4
8.000 8.228	5	7,8

El lavado a 8.000 rpm (8.229xg) durante 5 minutos generó un rendimiento más de 2 veces superior que el de 10 minutos. A pesar de que en este caso se obtiene un resultado contrario al obtenido con [EMIM][Cl] (ver Figura 8-4). Al considerar las eficiencias, nuevamente confirma que es más conveniente realizar lavados durante sólo 5 minutos.

En el siguiente ensayo se analizó el rendimiento según la aplicación de distintas etapas de secado, cuyo resultado se muestra en la Figura 8-8.

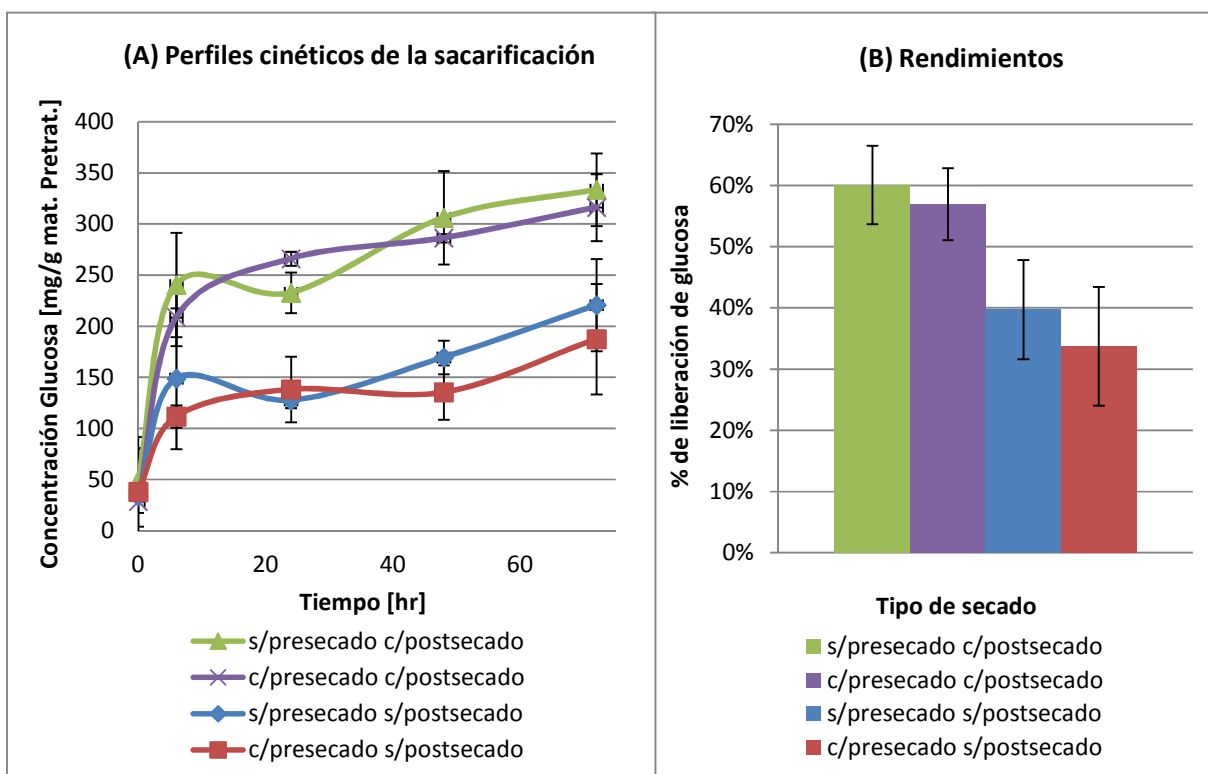


Figura 8-8: Efecto del secado antes y después del pre-tratamiento con [EMIM][Ac], (A) perfiles cinéticos de la sacarificación, (B) Rendimientos de cada pre-tratamiento, todos con una carga biomasa (eucalipto) de 1:3 p/p en el pre-tratamiento (de 30 minutos), con 3 lavados sucesivos a 8.000 rpm durante 5 minutos y con una posterior etapa de secado a 40°C

En la Figura 8-8 se pueden observar 2 resultados importantes con respecto a la aplicación de una etapa de secado. Con respecto al secado previo al pre-tratamiento (presecado), se puede destacar que no es relevante en el rendimiento de la sacarificación. Por otro lado, los dos mejores resultados se produjeron cuando se incluyó la etapa de secado luego del pre-tratamiento y lavado (postsecado). De estos resultados se desprende que el presecado no es relevante, en cambio, la etapa de postsecado si genera un aumento considerable en el rendimiento, de un 68,8% y un 51,2%, con y sin aplicación de la etapa de presecado respectivamente.

Este efecto se puede deber a que la etapa de postsecado puede considerarse como un pre-tratamiento adicional, y no así en el caso del presecado, a pesar de que la biomasa es expuesta a la misma temperatura y durante la misma cantidad de tiempo. Esta diferencia se genera debido a que en el postsecado, que es realizado después del pre-tratamiento, la matriz lignocelulósica ya se encuentra afectada por el LI, por lo que un pre-tratamiento con calor puede ser más efectivo que en el caso de aplicarlo antes del pre-tratamiento, cuando la matriz se encuentra intacta. Utilizar la exposición a cierta temperatura por un tiempo determinado ha sido una de las técnicas más utilizadas como pre-tratamiento para las biomásas lignocelulósicas, como fue señalado por Phyl Speser en el 1^{er} Encuentro de Transferencia Tecnológica realizado en Chile el año 2011 ^[48].

8.3. Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF)

En este caso el objetivo de comparar los mejores resultados obtenidos en los estudios anteriores, según el rendimiento alcanzado en la producción de etanol. En esta parte del estudio se realizaron 10 experimentos, cuyas configuraciones se señalan en la Tabla 8-4. Estos estudios son necesarios para evaluar la potencial producción de compuestos inhibitorios que disminuyen la eficiencia de las levaduras en la fermentación. Los resultados de los niveles de etanol obtenidos son los señalados en las Figuras 8-9 y 8-10.

Tabla 8-4: Parámetros en estudio en la sacarificación y fermentación simultáneas

Nº	Abreviación en la Figura 8-9	LI utilizado en el pre-tratamiento	Carga de biomasa [%]	Metodología de obtención del inóculo ^{XVIII}
1	EMIM Cl (5% Biomasa)	[EMIM][Cl]	5	Con propagación
2	EMIM Ac (5% Biomasa) (s/propagación)	[EMIM][Ac]	5	Sin propagación
3	EMIM Ac (5% Biomasa)	[EMIM][Ac]	5	Con propagación
4	EMIM Ac (10% Biomasa)	[EMIM][Ac]	10	Con propagación
5	EMIM Ac (15% Biomasa)	[EMIM][Ac]	15	Con propagación

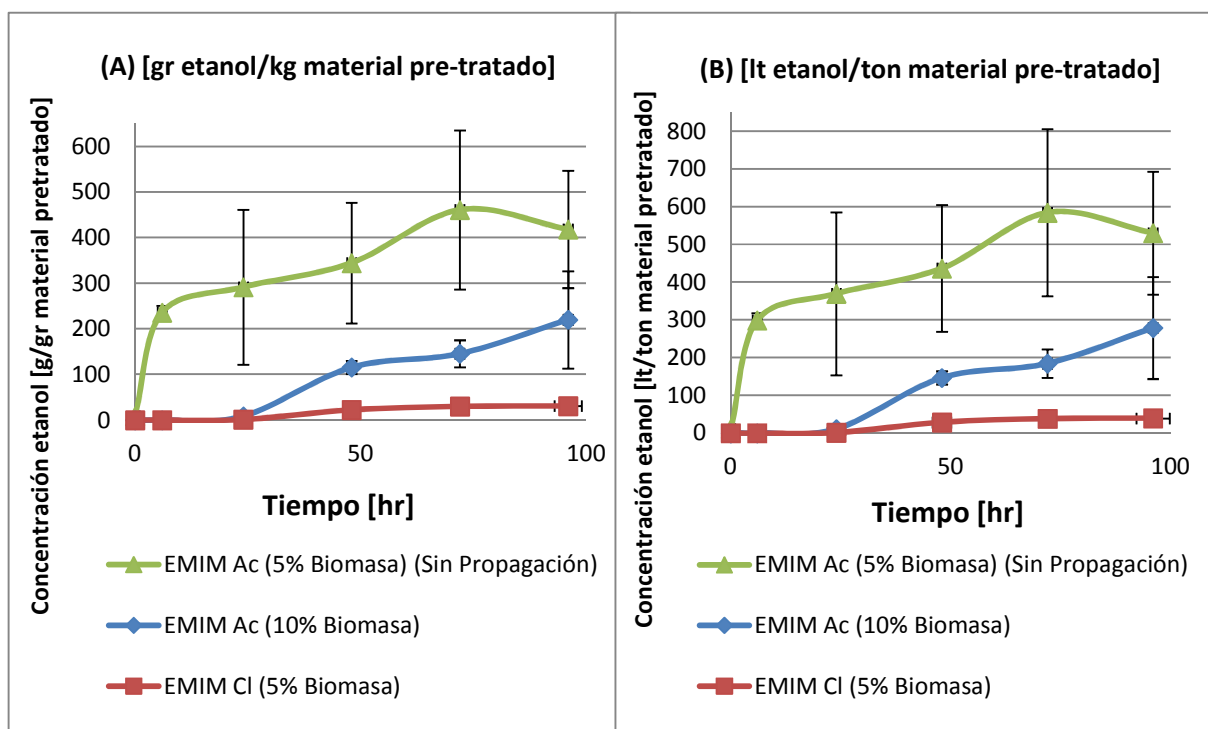


Figura 8-9: Perfiles cinéticos de la sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto, pre-tratado con [EMIM][Ac] o con [EMIM][Cl], (A) gramos de etanol por kilogramo de material pre-tratado, (B) litros de etanol por tonelada de material pre-tratado. Las condiciones de sacarificación/fermentación se detallan en la Tabla 8-4

^{XVIII} La diferencia entre estas 2 metodologías de obtención del inóculo está señalada en el punto 7.3.

En la Figura 8-9 se observan los perfiles cinéticos de la sacarificación y fermentación simultánea de eucalipto pre-tratado con [EMIM][Ac] o con [EMIM][Cl]. Al cabo de 24 horas, el [EMIM][Ac] con un 5% de biomasa ya alcanzó más de la mitad de su producción de bioetanol, en cambio los otros 2 casos estaban recién empezando su producción.

Durante la realización de experimentos se obtuvieron 2 resultados inesperados, por lo que no pudieron ser considerados en los resultados finales:

1. Utilizar una carga de biomasa de un 15% no es efectivo para este tipo de experimentos, debido a que es demasiado alta, con lo que se genera problemas de transferencia de masa y problemas de agitación dentro del matraz.
2. Para el caso de los matraces con un 5% de carga, con [EMIM][Ac] y con propagación de las levaduras (ver punto 7.3), se produjo una gran cantidad de dióxido de carbono entre las 24 y 48 horas de SSF, lo que generó que las tapas de los matraces se salieran, debido a la gran presión dentro de éstos. Al destaparse, los matraces perdieron biomasa, con inóculo y enzimas (ver Imagen 8-3), además de perder la esterilidad, por lo que los datos obtenidos de estos matraces no son representativos de lo que ocurre realmente y es por esto que no serán considerados en los resultados finales.

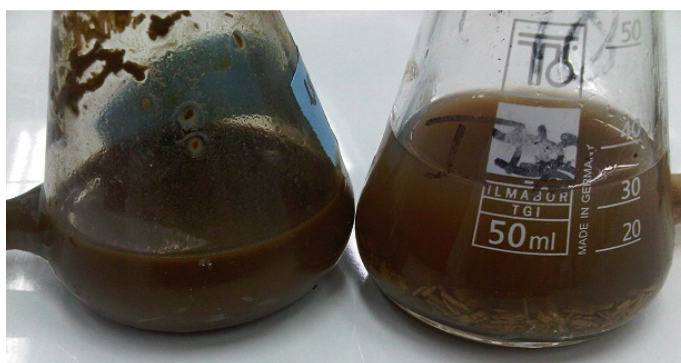


Imagen 8-3: Disminución en la cantidad de material dentro del matraz debido a la pérdida de las tapas, generada por la alta presión dentro de estos (izq.), matraz normal al finalizar la SSF (der.)

Los rendimientos de cada configuración se presentan en la Figura 8-10 (ver Anexo E.3). Cabe destacar que estos rendimientos consideran las 96 horas de fermentación, por lo que son los resultados finales y no necesariamente los mayores, ya que como se puede observar en la Figura 8-9, a las 72 horas se obtienen mayores concentraciones de etanol que a las 96 horas. Esta disminución de la concentración del etanol se puede deber a la evaporación de este compuesto, ya que los matraces se encuentran a 40°C y a presiones mayores que la atmosférica. Por otro lado, también puede ocurrir que las levaduras comiencen a consumir el etanol producido, efecto que se genera una vez acabada la glucosa en el medio, por lo que el etanol se convierte en la principal fuente de carbono.

Cabe destacar que para la comparación del rendimiento en estos ensayos, se considerarán los menores valores obtenidos al cabo de 96 horas, ya que como se puede observar en la Figura 8-9, estos ensayos presentan grandes desviaciones estándar, debido a que en la etapa de SSF ya hay una gran cantidad de factores que afectan el rendimiento, los que se van acumulando a medida que se van realizando más etapas en un proceso productivo. La obtención de estos rendimientos se ejemplifica en el Anexo E.3.

Los rendimientos máximos con respecto a la concentración de etanol corresponden a 285 [gr de etanol/kg de material pre-tratado] o el equivalente en litros de etanol que corresponde a 361 [lt de etanol/ton de material pre-tratado] (ver Anexo E.3 para detalles del cálculo).

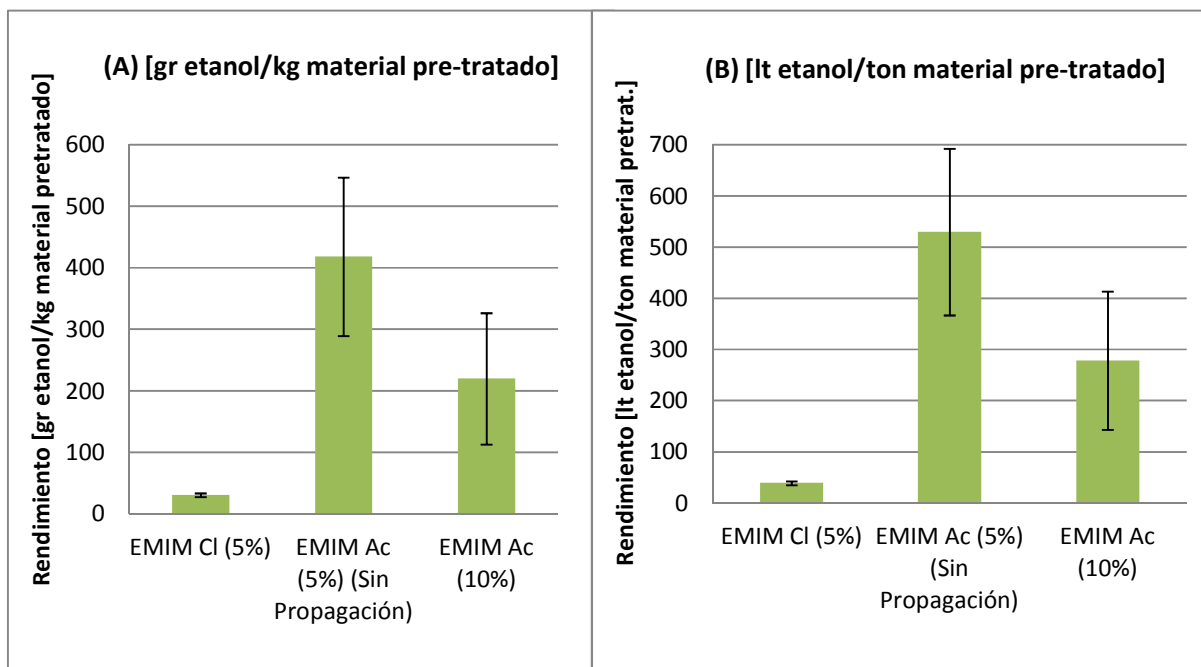


Figura 8-10: Rendimientos de la SSF a las 96 horas, (A) En gramo de etanol por kilogramo de material pre-tratado, (B) en litros de etanol por tonelada de material pre-tratado

En las Figuras 8-9 y 8-10 se observa claramente que el mejor rendimiento se obtiene al utilizar [EMIM][Ac] en el pre-tratamiento, en vez de [EMIM][Cl], pero a la vez se destaca la obtención del inóculo sin propagación, ya que obtiene mejores rendimientos (ver punto 7.3).

Tabla 8-5: Rendimientos de las distintas configuraciones de la SSF^{XIX}

Configuración	Abreviación	Rendimiento [%]	Rendimiento [gr etanol/kg material pre-tratado]	Rendimiento [lt etanol/ton material pre-tratado]
1	EMIM Cl (5%)	10	29	37
2	EMIM Ac (5%) (s/propagación)	114	325	412
3	EMIM Ac (10%)	51	145	183

En la Tabla 8-5 se puede observar que en el caso de la 2° configuración se obtienen rendimientos mayores a los teóricos. Es probable que este resultado se deba a la desviación estándar de las mediciones experimentales, mostrada en la Figura 8-9. Otra posibilidad a considerar es el [EMIM][Ac] sea capaz de liberar la glucosa presente en la hemicelulosa, la cual no es considerada al momento de calcular la cantidad de glucosa potencial (ver Anexo E.1).

^{XIX} Los rendimientos consideran 96 horas de sacarificación y fermentación simultánea.

La diferencia en los rendimientos entre el [EMIM][Cl] y el [EMIM][Ac] se puede deber a numerosos factores. Uno de ellos es una mayor efectividad del [EMIM][Ac] en el rompimiento de la matriz lignocelulósica en la etapa del pre-tratamiento. También es posible que el ión acetato del [EMIM][Ac] afecte positivamente en la fermentación^[37,38]. Según el estudio de Taherzadeh et al.^[37] el ácido acético generado a partir del ión acetato en ciertas concentraciones genera un aumento en la producción de este compuesto, mejorando hasta 20% el rendimiento de bioetanol. Se postula que este compuesto actúa como un regulador de pH, lo que genera un mejor crecimiento de las levaduras y por lo tanto una mayor producción de bioetanol.

Por otro lado, el ácido acético genera un efecto hormético, es decir, dependiendo de la concentración de este compuesto se pueden generar dos tipos de respuestas, con efectos opuestos^[49]. Este efecto también es evidenciado en el estudio de Taherzadeh et al.^[37], ya que dependiendo de la concentración del ácido acético se aumentaba o disminuía el rendimiento de la producción de bioetanol. Este efecto puede explicar por qué en el caso de los experimentos de SSF con biomasa al 10% se obtienen peores resultados que cuando la biomasa es 5% en la SSF y se fermenta con *S. cerevisiae* sin propagación (Figura 8-9), a pesar que el primero presenta mayor cantidad de biomasa, por lo que se hubiera esperado que presentara un mejor rendimiento. Como en el primer experimento hay mayor cantidad de material pre-tratado, también contiene mayor cantidad residual de [EMIM][Ac]. Como ambas matraces tienen el mismo volumen, la configuración [EMIM][Ac] (10%) presenta una mayor concentración del ión acetato y por lo tanto se generará una mayor cantidad de ácido acético (estará en mayor concentración). Es posible que este aumento en la concentración del ácido acético sea suficiente como para generar el efecto contrario y por lo tanto disminuir el rendimiento de la producción de bioetanol, debido a su efecto hormético. También hay que considerar que en ambos experimentos la preparación del inóculo fue diferente (ver punto 7.3). Es posible que las levaduras hidratadas estén más activas que las que se obtienen mediante propagación, debido a que al propagar las levaduras, éstas pueden ir disminuyendo su actividad e incluso pueden ir muriendo, por lo que se obtendrán peores rendimientos. Pero la desventaja de considerar la hidratación de las levaduras liofilizadas es el costo que implicaría, en este caso las levaduras fueron donadas por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS, pero estas tienen un costo, el cual disminuye considerablemente si se considera la propagación de las levaduras como la alternativa para la obtención del inóculo.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los estudios de Niklitschek^[19], se concluye que en la presente memoria el rendimiento es 182% mayor que el rendimiento de etanol producido en litros por tonelada de material pre-tratado (considerando el pre-tratamiento con [EMIM][Ac] y una fermentación sin propagación de levaduras al 5%). En los experimentos de Niklitschek se obtuvo un rendimiento máximo en la SSF de un 47%, equivalente a 146 litros de etanol por tonelada de material pre-tratado, en cambio en la presente memoria el rendimiento fue cercano al 100% (ver Tabla 8-7).

8.4. Cobertura Potencial de Bioetanol

El estudio de la Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GTZ) en conjunto con la Comisión Nacional de Energía (CNE) y el Instituto Forestal (INFOR) ^[50], informó la cantidad de residuos aprovechables energéticamente (RAE) de residuos de eucalipto que se generan por año en el país. Estos valores se señalan en la Tabla 8-6.

Tabla 8-6: Residuos de eucalipto aprovechables energéticamente, según tipo de aserradero ^[50]

Tipo de aserradero	Total RAE [ton/año]	Porcentaje correspondiente a eucalipto [%]	Total RAE de eucalipto [ton/año]
Móvil portátil	38.059	1,6	609
Permanente con elaboración	840.078	0,3	2.520
Móvil tradicional	203.036	0,1	203
Permanente tradicional	1.156.657	0	0
Permanente con remanufactura	1.015.893	0	0
TOTAL [ton/año]			3.332

Al considerar los porcentajes correspondientes a la producción de eucalipto, se obtiene la cantidad de RAE para este tipo de biomasa. Cabe destacar que sólo un 0,1% de la madera aserrada corresponde a eucalipto, ya que lo demás va directamente a la industria de la celulosa; el 96,7% de la madera aserrada corresponde a pino radiata, el 0,7% corresponde a álamo, 0,6% a pino oregón y el 1,9% restante corresponde a maderas nativas ^[50].

Considerando el mejor resultado obtenido en este estudio, en el cual se realizó un pre-tratamiento con [EMIM][Ac] y una fermentación sin propagación de levaduras al 5% y se obtuvo un rendimiento de 412 litros de etanol por tonelada de material pre-tratado, y considerando una generación de 3.332 toneladas al año de RAEs de eucalipto, se tiene la producción potencial de bioetanol. Sin embargo, es necesario considerar que gran parte de los residuos son utilizados por los mismos aserraderos con distintos fines, entre ellos se encuentra la calefacción para el secado de la madera (Tabla 8-7).

Tabla 8-7: Producción potencial de bioetanol, según la cantidad de RAEs de eucalipto

	Rendimiento [lt etanol/ton Eucaliptus]	Máxima Producción [m ³ /año]
Bioetanol	412	1.373

En la Tabla 8-8 se señalan los distintos destinos de los RAEs, y si se consideran como disponible para la producción de bioetanol todos los RAE menos el porcentaje de autoconsumo, se tiene un 65,5% disponible para este proceso productivo.

Tabla 8-8: Destino de los RAEs, según porcentaje

Destino de los RAE	Porcentaje [%]
Comercializa	55,6
Regala	6,0
Autoconsume	34,5
Acumula	3,9
Total menos autoconsumo	65,5

Considerando este 65,5% disponible, se tiene que la producción potencial de bioetanol disminuye de 1.373 [m³/año] a 899 [m³/año].

Según los balances energéticos de los años 2006, 2007 y 2008 ^[15], el consumo de gasolina ha aumentado en 0,1 [MMm³] por año aproximadamente, por lo que si en el 2008 el consumo fue de 3,15 [MMm³], se puede estimar un consumo de 3,6 [MMm³] para el año 2012.

Si se considera una producción de 899 [m³/año] de bioetanol en base a residuos de aserradero y un requerimiento de 3,6 [MMm³] para el año 2012, se tienen los siguientes porcentajes de cobertura, dependiendo si se busca reemplazar un 2% o un 5% de la gasolina:

Tabla 8-9: Porcentajes de cobertura de bioetanol, según el porcentaje de reemplazo de gasolina

Porcentaje de reemplazo de gasolina	Equivalente en [m ³ /año]	Cobertura [%]
2%	72.000	1,2
5%	180.000	0,5

En la Tabla 8-9 se señala la cantidad requerida de bioetanol para reemplazar el 2% o el 5% del consumo estimado de gasolina para el año 2012, lo que equivale a 72 y 180 [Mm³] respectivamente; sin embargo, debido a que la producción potencial máxima de bioetanol equivale a 899 [m³/año], sólo se logra cubrir un 1,2% y 0,5% respectivamente. Estos porcentajes de cobertura son bastante limitados y es por esta razón que se hace necesario seguir estos estudios, con el fin de poder optimizar aún más este proceso productivo y de esta manera aumentar estos porcentajes de cobertura.

Según otro estudio conjunto de GTZ, la CNE y el INFOR ^[16], la superficie plantada de eucaliptos en Chile equivale a 490.000 [ha] aproximadamente (datos del 2004). Si sólo el 0,1% de esta superficie es aprovechada en los aserraderos, la cantidad de residuos que se pueden obtener a partir del eucalipto es muy baja, ya que las 3.332 [ton/año] de RAEs de eucalipto se obtienen a partir de 490 [ha] de eucaliptos plantados aproximadamente. Si se considera el total de la superficie plantada con eucaliptos, se podrían obtener 3.332.000 [ton/año] de RAEs, con lo que obtiene un rendimiento de 899.231 m³ de bioetanol al año. Con este rendimiento se puede suplir fácilmente la gasolina consumida; sin embargo, el 99,9% de los eucaliptos van directamente a la industria de la celulosa.

Reducir la cantidad de eucalipto destinado a la industria de la celulosa no es una opción factible, ya que ésta es una de las industrias más importantes de Chile; una alternativa sería considerar cultivos dendroenergéticos de eucaliptos, de esta manera se tendría más cantidad de eucaliptos que se podrían aprovechar completamente para el proceso productivo del bioetanol.

Si se consideran sólo los RAEs, para tener un 100% de cobertura se necesitarían las siguientes cantidades de hectáreas de eucalipto:

Tabla 8-10: Cantidad de hectáreas de eucalipto para tener un 100% de cobertura, según el porcentaje de reemplazo de gasolina

Porcentaje de reemplazo de gasolina	Eucalipto [ha]	Cobertura [%]
2%	39.243	100
5%	90.109	100

Según la Tabla 8-10 se necesitaría un aumento de 80 veces la superficie destinada a los aserraderos para reemplazar el 2% de gasolina o de 184 veces para reemplazar el 5%. Cabe destacar que si se consideran las plantaciones dendroenergéticas, todo el eucalipto es aprovechado energéticamente, por lo que la cantidad de hectáreas requeridas para estos reemplazos de gasolina sería considerablemente menor.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9. Conclusiones

Debido al aumento mundial de los requerimientos energéticos y a la disminución de los yacimientos petrolíferos, se hace inminente la búsqueda de fuentes alternativas de energía, que sean capaces de reemplazar a esta fuente energética. Por otro lado, es necesario que estas fuentes alternativas sean lo más “verdes” posibles, es decir, que sean amigables con el medio ambiente, ya que el petróleo es uno de los combustibles más contaminantes y el efecto invernadero se ha hecho notar debido al alto consumo de éste. Una de estas fuentes alternativas son los biocombustibles, entre los cuales se encuentran el bioetanol, el biodiesel y el biogás. Ya que en Chile la industria forestal es una de las más importantes, los residuos forestales están en gran cantidad y generalmente son mal utilizados, siendo uno de estos usos la combustión de los residuos para generar calor. En esta memoria se evalúa la producción de bioetanol si gran parte de estos residuos forestales son usados con este fin.

Luego del análisis de los resultados obtenidos en este estudio, en el cual se variaron distintas condiciones de operación del proceso productivo del bioetanol a partir de residuos de eucalipto pre-tratados con LI, se desprenden las siguientes conclusiones:

Con respecto a los líquidos iónicos protonados (PILs), aún es necesario realizar más estudios para poder determinar si estos LI pueden lograr mejores rendimientos en la sacarificación, ya que hasta el momento sólo se ha podido determinar que los PILs estudiados no son eficientes al realizar pre-tratamientos a 60°C o 70°C, durante 30 o 60 minutos. Estos experimentos se deben realizar con mayores temperaturas de operación, pero manteniendo un tiempo de operación no mayor a 30 minutos.

Por otra parte, de los AILs estudiados, el que presentó mejores resultados fue el [EMIM][Ac], ya que exhibe los mejores rendimientos, en la conversión de celulosa en glucosa y también en la generación de bioetanol en la etapa de fermentación. Con este AIL se obtuvo un rendimiento de 412 litros de etanol por tonelada seca de residuo de eucalipto pre-tratado, según este resultado, se generó un aumento de un 182% en el rendimiento en comparación con el mejor resultado del estudio de Niklitschek con [EMIM][Cl]. Con respecto al reciclaje de este LI, como se pudo observar en este estudio, al utilizar [EMIM][Ac] reciclado el rendimiento disminuye en un 48,7%. Debido a que esta disminución es bastante considerable se concluye que el método utilizado para el reciclaje de LI no es el más adecuado y por lo tanto se debe buscar maneras alternativas para reciclar estos LI.

Particularmente, se puede concluir que la temperatura en la etapa de secado no influye considerablemente en los rendimientos, ya que se varió desde la temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) hasta 50°C y se obtuvieron resultados similares en todos los casos. Por otro lado, se puede concluir que llevar a cabo la etapa de secado post-pre-tratamiento sí genera un aumento en el rendimiento, en cambio si el secado se realiza antes del pre-tratamiento, el rendimiento no mejora considerablemente.

Luego de analizar los rendimientos obtenidos con [EMIM][Cl] se puede concluir que las impurezas presentes en el LI afectan considerablemente su capacidad de disolver la matriz lignocelulósica y por lo tanto disminuye el rendimiento total del proceso. Es por esto que se deben dar preferencia a LI que no sean tan susceptibles a contraer impurezas, particularmente el agua.

Con respecto a la etapa de lavado, se puede concluir que es una etapa del proceso muy importante, ya que si se realizan 2 en vez de 3 etapas de lavado, el rendimiento del proceso disminuye de 334 [mg de glucosa/gr de material pre-tratado] a 136 [mg de glucosa/gr de material pre-tratado], lo que equivale a una disminución del rendimiento de un 59%. Esta etapa es fundamental, ya que si no se realiza, se acumulan compuestos inhibitorios que generan una disminución considerable del rendimiento del proceso productivo. Por otro lado, el método lavado también afecta el rendimiento, ya que cuando se hacen lavados centrifugando a 10.000 rpm (12.857g) durante 10 minutos, se obtienen mejores rendimientos que al centrifugar a 8.000 rpm (8.228g) durante 5 minutos. Sin embargo, en términos de eficiencia es más conveniente lavar usando centrifugaciones más cortas a menor velocidad, ya que se gasta menos energía y dura menos tiempo.

En la etapa de sacarificación y fermentación simultáneas, no se deben utilizar cargas de biomasa mayores al 10%, ya que los resultados no son los óptimos, probablemente debido a que se generan problemas de transferencia de masa. En esta memoria, los mejores resultados para la SSF se obtuvieron con una carga de biomasa del 5%, con material pre-tratado con [EMIM][Ac] y con levaduras usadas directamente, sin previa propagación. En este caso no se puede concluir si el aumento del rendimiento se debe al porcentaje de carga de biomasa o al método de obtención del inóculo, ya que para poder concluir cuál de estos factores afecta en mayor medida en el rendimiento se deben realizar estudios en los cuales se separen estos factores para luego comparar los resultados de parámetro por separado.

Finalmente si se busca reemplazar un 2% o un 5% del requerimiento de gasolina, al considerar el mejor rendimiento obtenido en este estudio y la cantidad disponible de residuos de eucalipto que sí se pueden aprovechar energéticamente, sólo se logra cubrir 1,2% o un 0,5% de esta demanda respectivamente. Estos porcentajes de cobertura son bastante limitados y es por esta razón que se hace necesario seguir estos estudios, con el fin de poder optimizar aún más este proceso productivo y de esta manera aumentar estos porcentajes de cobertura. Otra alternativa que podría aumentar los porcentajes de cobertura sería la plantación de cultivos dendroenergéticos de eucalipto, los cuales serían aprovechados sólo con fines energéticos, por lo que se tendría mayores cantidades de eucalipto para su utilización en este proceso productivo, ya que hasta el momento el 0,1% de las plantaciones de eucaliptos (489.603 [ha]) son destinadas a aserraderos y sólo un porcentaje de la producción se puede considerar como residuo aprovechable energéticamente. Si se busca un 100% de cobertura, se requieren 80 o 184 veces la cantidad de hectáreas de eucalipto destinadas para aserraderos para reemplazar el 2% o el 5% de gasolina respectivamente.

Como conclusión final de esta memoria, se estima conveniente continuar estos estudios, ya que es eminente aumentar el rendimiento del proceso productivo del bioetanol. Para esto se recomienda realizar más pre-tratamientos con 2-HDEAA, 2-HEAL y con [EMIM][Ac], ya que estos LI presentaron los mejores resultados. Por otro lado, se recomienda estudiar la etapa de reciclaje de líquidos iónicos, ya que se deben reducir los costos de este proceso productivo.

10.Recomendaciones

- Realizar pre-tratamientos a mayor escala, manteniendo la misma proporción 1:3 (gr material / gr LI), ya que los resultados a pequeña escala difieren bastante de los que se pueden obtener en un nivel industrial. Además es necesario considerar la agitación en la etapa del pre-tratamiento, para mejorar el contacto del LI con la biomasa y con volúmenes tan pequeños se dificulta demasiado la agitación.
- Realizar más estudios con los PILs, sobre todo con los PILs 2-HDEAA y 2-HEAL, ya que con estos se obtuvieron mejores resultados que en los controles negativos. Para esto, se deben realizar pre-tratamientos con temperaturas mayores a 70°C, pero menores a 130°C, para evitar la degradación del PIL y durante 30 minutos cada uno.
- Realizar pre-tratamientos con [EMIM][Ac] con distintas temperaturas y tiempos de operación, de manera de encontrar las condiciones óptimas para el pre-tratamiento con este LI y con eucalipto como biomasa.
- Estudiar otros métodos de reciclaje de LI, en particular con [EMIM][Ac], ya que es necesario eliminar la lignina que se va acumulando en el LI.
- Realizar una Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) con PILs pero sin llevar a cabo la etapa de lavado, ya que, como estos PILs no son tóxicos, no deberían afectar los rendimientos de las levaduras y al no realizar esta etapa se evita la pérdida de glucosa de cada lavado.
- Realizar más estudios de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF) con material pre-tratado con [EMIM][Ac], pero sin aumentar la carga de material lignocelulósico a más del 10% p/v, ya que a mayores porcentajes se generan problemas de transferencia de masa dentro de los matraces. Se debe estudiar por separado el efecto de la obtención del inóculo y de la carga de biomasa en la SSF, con el fin de determinar cuál de estos factores afecta en mayor medida en el rendimiento del proceso.
- Utilizar métodos alternativos para la medición de etanol en el medio, ya que el método de medición mediante cromatografía de gases presenta una gran variabilidad en las mediciones, con lo que se afectan considerablemente los resultados finales.

REFERENCIAS

- [1] International Energy Agency (IEA). World Energy Outlook (WEO) 2009. [En Línea] <<http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2009/WEO2009.pdf>> [Consulta: 20 de Diciembre 2011].
- [2] SEMINARIO Internacional ¿Hacia dónde va la matriz energética en Chile y el mundo? (7°, 2011, Santiago, Chile). Una visión de la matriz energética mundial, 2011.
- [3] GARCÍA, A. E., et al. (2010) The current status of Liquid biofuels in Chile. Energy, 1 – 8.
- [4] International Energy Agency (IEA). CO2 Emissions From Fuel Combustion: Highlights. [En Línea] <<http://www.iea.org/co2highlights/CO2highlights.pdf>> [Consulta: 10 de Diciembre 2011].
- [5] Corporación Nacional Forestal. Bosques. [En Línea] <<http://conaf.cl/bosques/index.html>> [Consulta: 20 de Diciembre 2011].
- [6] NIGAM, P.S., SINGH, A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. Process in Energy and Combustion Science, 37:52-68.
- [7] SALAZAR, O. clase_Bioetanol_26_octubre. Material Docente Curso BT4451 - Energía Renovable a partir de Biomasa, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2010.
- [8] MUSSATTO, S.I., et al. (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnology Advances, 28:817-830.
- [9] AJANOVIC, A. (2011) Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? Energy, 36:2070-2076.
- [10] TIMILSINA, G.T., SHRESTHA, A. (2011) How much hope should we have for biofuels? Energy, 36:2055-2069.
- [11] GONZÁLEZ-GARCÍA, S. et al. (2010) Comparative environmental performance of lignocellulosic ethanol from different feedstocks. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14:2077-2085.
- [12] Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. [En Línea] <http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf> [Consulta: 20 de Diciembre 2011].
- [13] VARANASI, S., SCHALL, C.A., DADI, A.P., ANDERSON, J., RAO, K., PARIPATI, P., KUMAR, G. Biomass Pretreatment, WO 2008/112291 A2, University of Toledo, Ohio, United States, 2008.
- [14] Comisión Nacional de Energía (CNE). Balances Energéticos. [En Línea] <http://www.cne.cl/cnewww/opencms/06_Estadisticas/Balances_Energ.html> [Consulta: 10 de Diciembre 2011].

- [15] Comisión Nacional de Energía (CNE). Balances Energéticos. [En Línea] <http://www.cne.cl/cnewww/opencms/06_Estadisticas/Balances_Energ.html> [Consulta: 10 de Diciembre 2011].
- [16] Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GTZ). Potencial de Biomasa Forestal. [En Línea] <<http://www.gtz.de/de/dokumente/sp-chile-potencial-biomasa-forestal.pdf>> [Consulta: 10 de Diciembre 2011].
- [17] Corporación Nacional Forestal. Plantaciones. [En Línea] <<http://www.conaf.cl/bosques/seccion-plantaciones.html>> [Consulta: 26 de Junio 2011].
- [18] CORTÍNEZ Villalobos, Victoria Andrea. Comparación de pre-tratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis (Magíster en Ciencias, mención Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2010. 133 h.
- [19] NIKLITSCHK Contente, Tomás Andrés. Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de Bioetanol. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011. 105 h.
- [20] JURI Awad, Sebastián Andrés. Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pre-tratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011. 76 h.
- [21] GASPARATOS, A., STROMBERG, P., TAKEUCHI, K. (2011) Biofuels, ecosystem services and human wellbeing: Putting biofuels in the ecosystem services narrative. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 142:111-128.
- [22] PEREIRA JR., N. (2008) Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Río de Janeiro: Escuela de Química/UFRJ.
- [23] SOTOMAYOR Aravena, Roberto Carlos. Estudio exploratorio de producción de bioetanol y de coproductos de biorefinería a partir de residuos de eucalipto. Memoria (Ingeniero Civil Industrial y en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2010. 155 h.
- [24] GARCÍA, A. E. (2010) Energía a base de biomasa y su disponibilidad. En: charla sobre biomasa y su disponibilidad. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. P.p., s.p.
- [25] PINKERT, A., et al. (2009) Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. *Chemical Reviews*, 109:6712-6728.
- [26] PINKERT, A., et al. (2010) Reflections on the Solubility of Cellulose. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49:11121 – 11130.
- [27] MORA-PALE, M., et al. (2011) Room Temperature Ionic Liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 108:1229 – 1245

- [28] CUNHA-PEREIRA, F., et al. (2011) Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. Biosource Technology, 102:4218-4225.
- [29] KUHAD, R.C., et al. (2011) Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15:4950-4962.
- [30] WANG, Y., et al. (2011) Compatible Ionic Liquid-Cellulases System for Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. Biotechnology and Bioengineering, 108:1042-1048.
- [31] PEZOA, R., et al. (2010) Use of ionic liquids in the pretreatment of forest and agricultural residues for production of bioethanol. Cellulose Chem. Technol., 44:165 – 172.
- [32] ZHANG, Y.P., et al. (2007) Fractioning Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions. Biotechnology and Bioengineering, 97:214-223.
- [33] ÁLVAREZ, V.H., et al. (2010) Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with oleate anion. Fluid Phase Equilibria, 299:42-50.
- [34] MÄKI-ARVELA, P., et al. (2010) Dissolution of Lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids – A review. Industrial Crops and Products, 32:175-201.
- [35] ÁLVAREZ, V.H., et al. (2011) Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxyethylammonium acetate + (water, methanol or ethanol)}. J. Chem. Thermodynamics, 43: 997 – 1010.
- [36] HARRIS, R. (2011) comunicación personal.
- [37] TAHERZADEH, M.J., NIKLASSON, C., LIDÉN, G. (1996) Acetic acid – friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? Chemical Engineering Science, 52:2653-2659.
- [38] NANCHARAI, Y.V., FRANCIS, A.J. (2011) Alkyl-methylimidazolium ionic liquids affect the growth and fermentative metabolism of *Clostridium sp.* Bioresource Technology, 102:6573-6578.
- [39] LUO, C., BRINK, D.L., BLANCH, H.W. (2002) Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. Biomass & Bioenergy, 22:125-138.
- [40] BOSCH, P. (2011) comunicación personal.
- [41] OLOFSSON, K., BERTILSSON, M., LINDÉN, G. (2008) A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology for Biofuels, 1:7.
- [42] ÁLVAREZ, et al. (2010) Brønsted Ionic Liquids for Sustainable Processes: Synthesis and Physical Properties. J. Chem. Eng. Data, 55:625-632.
- [43] PINKERT, A., MARSH, K.N., PANG, S. (2010) Alkanolamine Ionic Liquids and Their Inability To Dissolve Crystalline Cellulose. Ind. Eng. Chem. Res., 49:11809-11813.

- [44] IGLESIAS, M. (2011) comunicación personal.
- [45] BOSCH, P. (2011) comunicación personal.
- [46] SIGMA-ALDRICH®. [En Línea] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=30764|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC> [Consulta: 21 de Octubre 2011].
- [47] SEDDON, K.R., STARK, A., TORRES, M-J. (2000) Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. Pure Applied Chemistry, 72:2275-2287.
- [48] ENCUESTRO Nacional de Transferencia Tecnológica (1^{er}, Santiago, Chile, 2011). Aprende a valorizar tu investigación o emprendimiento con expositores de clase mundial. Santiago, Chile, CORFO, Universidad Mayor, Asembio, 2011.
- [49] CALABRESE, E.J., BLAIN, R.B. (2011) The hormesis database: The occurrence of hermetic dose responses in the toxicological literature. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 61:73-81.
- [50] Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GTZ). Disponibilidad de Residuos Madereros. [En Línea] <<http://www.gtz.de/de/dokumente/sp-chile-residuos-madereros.pdf>> [Consulta: 10 de Diciembre 2011].

ANEXOS

Anexo A.- Introducción y Motivación

A.1 Proyección del aumento del precio del petróleo

Como se puede observar en la Figura A-1, independiente del escenario en el que se haga la proyección del aumento del precio del petróleo, en todos los casos este va en aumento.

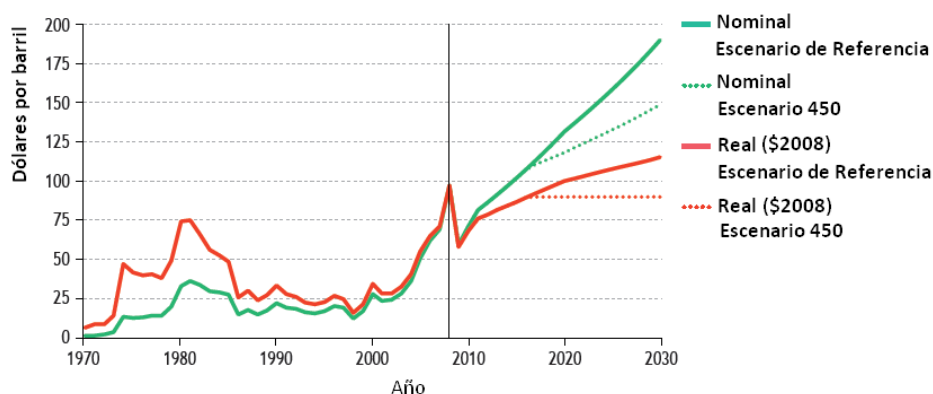


Figura A-1: Proyección del precio del petróleo ^A (Fuente: Adaptación WEO 2009 ^[1])

A.2 Emisiones de dióxido de Carbono en el mundo

En la Figura A-2 se puede observar como aumentan las emisiones mundiales de CO₂ (en giga toneladas), según el año de medición. Hay que considerar que este aumento en las emisiones es generado solamente por la combustión de combustibles fósiles, por lo que no considera otro tipo de contaminaciones.

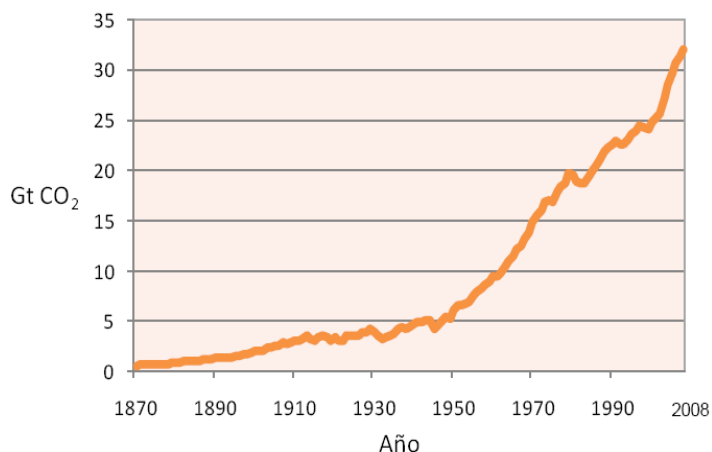


Figura A-2: Emisiones de CO₂ por combustión de combustibles fósiles (Fuente: Adaptación IEA ^[4])

^A "Escenario 450" se refiere a un escenario en el cual se asume un rápido aumento en la producción de biocombustibles de segunda generación.

La Figura A-3 señala los sectores de los cuales provienen las emisiones de los gases que generan el efecto invernadero, además señala los tipos de gases y en qué porcentajes estos son emitidos. Como se puede observar, es el sector de la energía el que más emite gases del efecto invernadero.

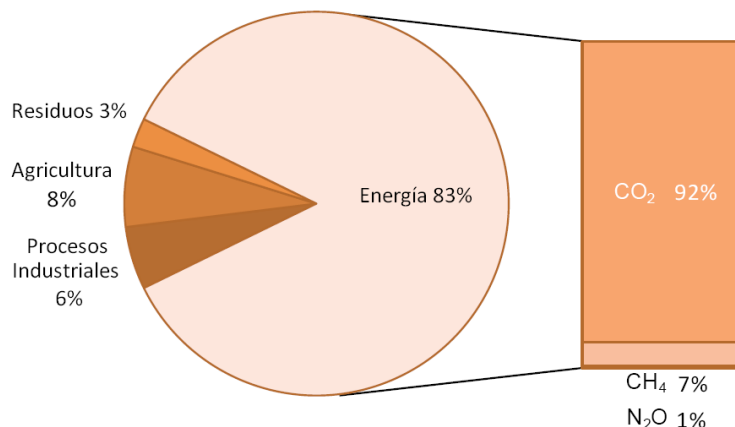


Figura A-3: Emisiones de gases del efecto invernadero, por sector (Fuente: Adaptación IEA ^[4])

A.3 Participación del bioetanol en el sector transporte

En la Figura A-4 se puede observar la participación del bioetanol (en porcentaje) en el sector de transporte en carretera en países como Estados Unidos, la Unión Europea y Brasil, siendo este último el país que cuenta con un mayor porcentaje de participación de este combustible.

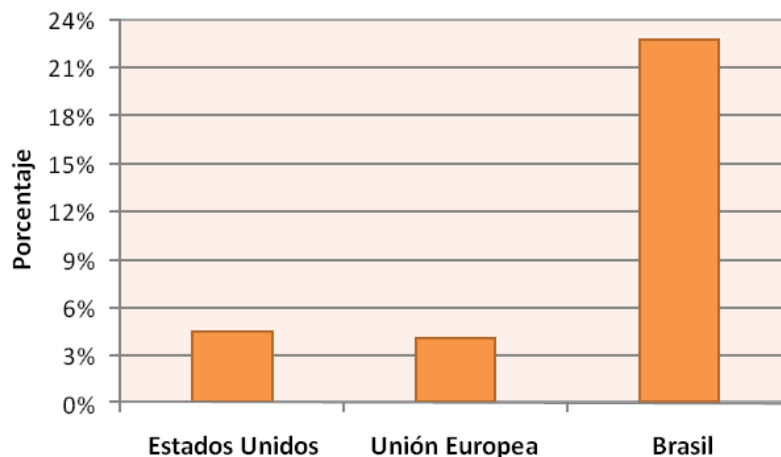


Figura A-4: Participación del bioetanol en el sector transporte en carretera (Fuente: Adaptación Mussatto et al. ^[8])

Políticas de uso de biocombustibles

En Chile existen legislaciones que fomentan la producción y el uso de biocombustibles como el bioetanol. Dentro de estas legislaciones se encuentran las siguientes ^[3]:

- Está permitido el uso de un 2 o un 5% de bioetanol mezclado con gasolina convencional.
- El bioetanol, al igual que el biodiesel, se encuentra exento del impuesto específico a la venta e importación de combustibles para vehículos como la gasolina y el petróleo.
- El bioetanol no está sujeto a los impuestos que pretenden estabilizar los precios de los combustibles.

Es debido a las razones anteriormente señaladas que se debe potenciar aún más producción de bioetanol. Esto hace necesaria la búsqueda de metodologías que disminuyan el costo de producción de Bioetanol y que a la vez mejoren la eficiencia de este proceso productivo.

Anexo B.- Marco teórico

B.1 Reducción de tamaño y tamizado

En la Imagen B-1 se puede observar el molino utilizado en la etapa de reducción de tamaño de las astillas de eucalipto. Con este molino se logró reducir considerablemente el tamaño, por lo que luego se pudieron utilizar tamices para seleccionar el tamaño adecuado para el proceso productivo del bioetanol.



Imagen B-1: Molino utilizado para la reducción de tamaño del eucalipto

B.2 Pre-tratamiento

En la Tabla B-1 se señalan las ventajas y desventajas de los distintos tipos de pre-tratamientos para mejorar el proceso productivo del bioetanol. En esta tabla se presentan las 4 categorías generales de pre-tratamiento, las cuales dependen del tipo de pre-tratamiento que se esté llevando a cabo.

Tabla B-1: Ventajas y desventajas de los distintos tipos de pre-tratamientos

Categoría	Pre-tratamiento	Ventajas	Desventajas
Físico	Molienda mecánica	Efectivo para residuos agrícolas y herbáceos	Altos requerimientos energéticos, de alto costo y no remueven la lignina
Físico-químico	Explosión a vapor	Efectivo para maderas duras	Genera degradación de una fracción de la hemicelulosa y puede formar compuestos inhibitorios
	Expansión por fibra de amonio	Bajos tiempos de residencia (hasta 15 minutos), baja inhibición	Requiere reciclaje del amonio, baja eficiencia para maderas duras
Químico	Hidrólisis ácida	Bajos tiempos de residencia, remoción de lignina y hemicelulosa	Formación de compuestos inhibitorios, alta toxicidad y alto costo, requiere tratamiento de RILES

	Hidrólisis alcalina	Disminución de la cristalinidad de la celulosa, remoción de la lignina	Baja eficiencia para maderas blandas, alta toxicidad y alto costo, requiere tratamiento de RILES
	Solvente orgánico con alta temperatura	Remoción de la lignina, solventes se pueden recuperar mediante destilación	Solventes inhiben los procesos biológicos, altos requerimientos energéticos
	Líquido Iónico aprotonado (AIL)	Buenos rendimientos de liberación de glucosa en la etapa de sacarificación	Poco biodegradables, altos costos de producción, alta higroscopicidad (ej: [EMIM][Cl])
	Líquido Iónico protonado (PIL)	Baja toxicidad, alta biodegradabilidad, bajos costos de producción, purificación simple	Hasta el momento no se han obtenido buenos rendimientos de liberación de glucosa en la etapa de sacarificación
Biológico	Degradación con hongos	Organismos degradan la lignina, bajos requerimientos energéticos	Largos tiempos de reacción (2-6 semanas)

(Fuente: Adaptación Mora-Pale et al. ^[27] y Pezoa et al. ^[31])

Como se puede observar en la Tabla B-1, a pesar de que todos estos métodos eventualmente logran la liberación de la celulosa, todos presentan desventajas considerables, por lo que se requieren nuevos métodos para realizar el pre-tratamiento. Es por esto que cabe destacar, como bien señala Mora-Pale et al., que aún falta desarrollar un proceso efectivo para el pre-tratamiento, que no sea costoso y que tenga el mínimo impacto río abajo del proceso de producción de bioetanol, como por ejemplo, que no genere compuestos que inhiban las etapas biológicas posteriores.

Con respecto a los AILs, los rendimientos que estos presentan son bastante variables. Esto se debe a que el rendimiento depende directamente de la estructura del AIL, es decir, de que catión y que anión este está compuesto, la combinación de ambos iones es muy relevante ^[27]. En el estudio de Mäki-Arvela et al. se señalan distintos factores que afectan este rendimiento, por ejemplo, determinaron que mientras menor sea el tamaño del catión, se obtienen mejores resultados, ya que si el catión es muy grande, su habilidad de formar puentes de hidrógeno con la celulosa disminuye. Esto se refleja en los rendimientos del [BMIM][Cl] en comparación al [EMIM][Cl], este último presentó mejor rendimiento, ya que el [EMIM]⁺ es menor que el [BMIM]⁺ ^[34]. Por otro lado, el efecto del anión es muy relevante, pero se puede tener un anión bastante efectivo en la disolución de la celulosa, como el Cl⁻, que al estar combinado con un catión no efectivo pierde su habilidad de disolver la celulosa, como ocurre con el AIL [PrMIM][Cl], que es incapaz de disolverla.

Las estructuras más comunes de AILs se señalan en la Figura B-1:

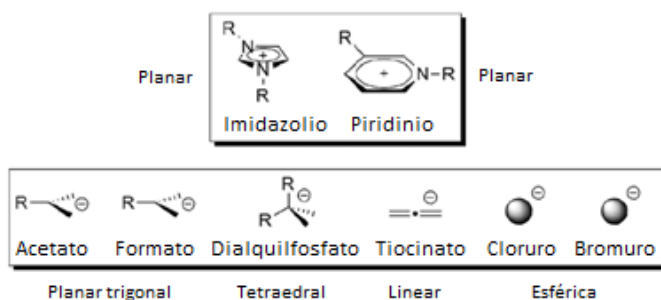


Figura B-1: Estructuras de los cationes (arriba) y aniones (abajo) más comunes en los AILs involucrados en la disolución de la celulosa (Fuente: Pinkert et al. ^[26])

En particular, en este estudio se trabajó con 2 AILs: el [EMIM][Ac] y el [EMIM][Cl], cuyas estructuras se pueden observar en la Figura B-2.

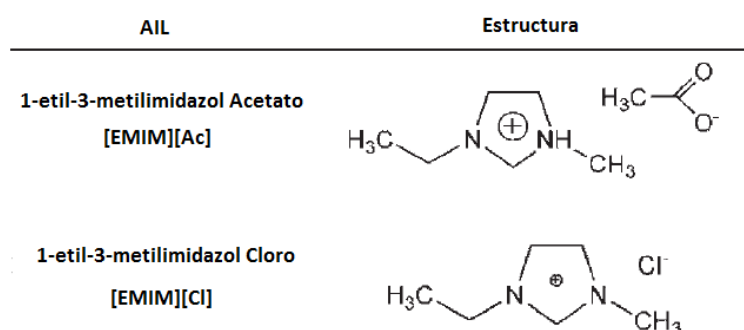


Figura B-2: Estructura de los AIL's utilizados en este estudio (Fuente: adaptación Mora-Pale ^[27])

Los AILs utilizados en este trabajo están compuestos por un catión del tipo imidazol y por los aniones acetato y cloro. Como esta estructura es básicamente la misma que presentan los PILs (están compuestos por un anión y un catión de gran tamaño), sin considerar el protón extra que contienen en comparación con los AILs, es de esperar que los diferentes PILs también tengan distintos rendimientos. Incluso algunos PILs pueden llegar a presentar rendimientos iguales a cero, ya que, del mismo modo que ocurre con los AILs, existen combinaciones de catión y anión que no son capaces de disolver la celulosa. Lo anterior se refleja claramente en un estudio previo, en el cual se demostró que PILs del tipo alcanolamino (como catión) no eran capaces de disolver la celulosa ^[27]. Pero como señalan Mora-Pale et al., existen diversos mecanismos de acción de los líquidos iónicos, siendo uno de estos la interacción del anión acetato con la lignina, independiente del catión al que esté unido, lo que genera la remoción de la lignina y por lo tanto también genera la disolución de la matriz lignocelulósica.

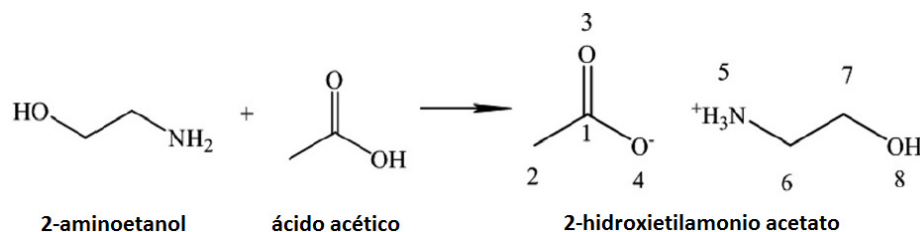


Figura B-3: Mecanismo de síntesis y estructura de un PILs (2-HEAA) (Fuente: Adaptación Álvarez et al. ^[35])

El PILs de la Figura B-3 fue uno de los examinados por Pinkert et al., es decir, este PIL no es capaz de disolver la celulosa, pero como se señaló anteriormente, al presentar el anión acetato puede que sea capaz de remover la lignina. Los demás PILs utilizados en este estudio se sintetizan de manera similar y presentan estructuras bastante similares.

Independiente del LI que se esté usando en un pre-tratamiento, el procedimiento es básicamente el mismo. En la Imagen B-2 se pueden observar los viales en los cuales se realiza el pre-tratamiento. Como fue explicado anteriormente, primero se debe pesar la cantidad correspondiente de LI, luego se debe agregar el material lignocelulósico, como se puede observar en b) y finalmente se lleva a cabo el pre-tratamiento en un baño de silicona termorregulado, como se puede observar en la Imagen B-3. El resultado del pre-tratamiento se puede observar en c) en la Imagen B-2.

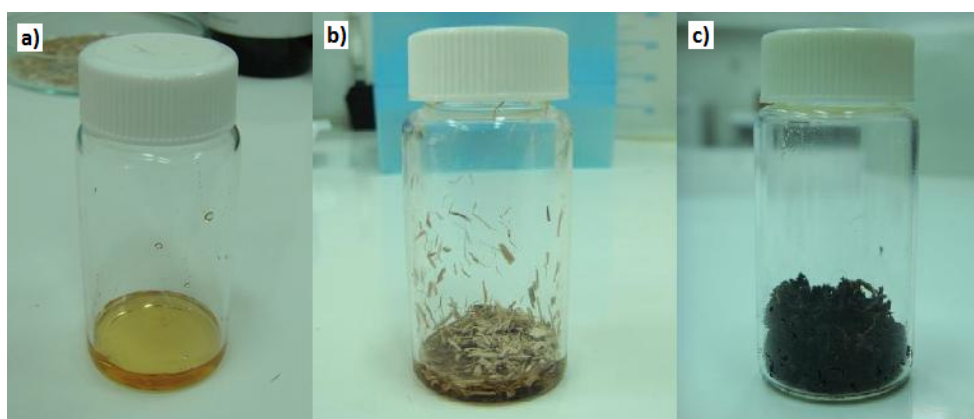


Imagen B-2: Viales de vidrio con a) Líquido iónico, b) Líquido iónico y residuos de eucalipto previo al pre-tratado y c) Resultado luego del pre-tratamiento

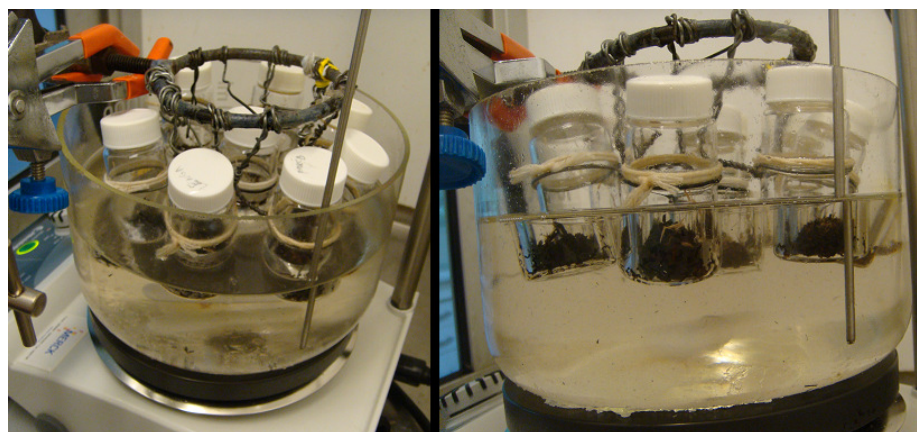


Imagen B-3: Baño de silicona termorregulado para realizar los pre-tratamientos

B.3 Lavado del material pre-tratado

Como fue señalado anteriormente, es necesario realizar etapas de lavado del material pre-tratado, ya que hay ciertos LI, como el [EMIM][Cl] que, al presentar una alta afinidad por los puentes de Hidrógeno debido a la presencia del ión Cl⁻, denatura muy fácilmente a las celulasas, inhibiendo de esta manera la etapa de sacarificación^[30]. También, en el pre-tratamiento se pueden generar compuestos que

inhiben la fermentación, ya que son tóxicos para las levaduras y si no se tiene suficiente crecimiento de las levaduras, se obtiene finalmente una menor generación de bioetanol por parte de estas ^[39,41].

Para evitar la inhibición de las etapas posteriores del proceso productivo del bioetanol, se requiere lavar el material pre-tratado con agua destilada, agitando el material pre-tratado con 200 veces su masa en agua y posteriormente centrifugando para eliminar sobrenadante compuesto por agua y LI ^[36]. Estos lavados se pueden dividir en 3 lavados sucesivos, de manera de cubrir el total de agua con la que se debe lavar. Cabe destacar que en los lavados, se pierde un poco de glucosa, por lo que a mayor cantidad de lavados, mayor es la pérdida de glucosa ^[40]. En la Imagen B-4 se puede observar cómo cambia el color del sobrenadante a medida que se realizan los lavados del material, ya que cada vez se elimina más LI (compuesto que le da la coloración al sobrenadante).

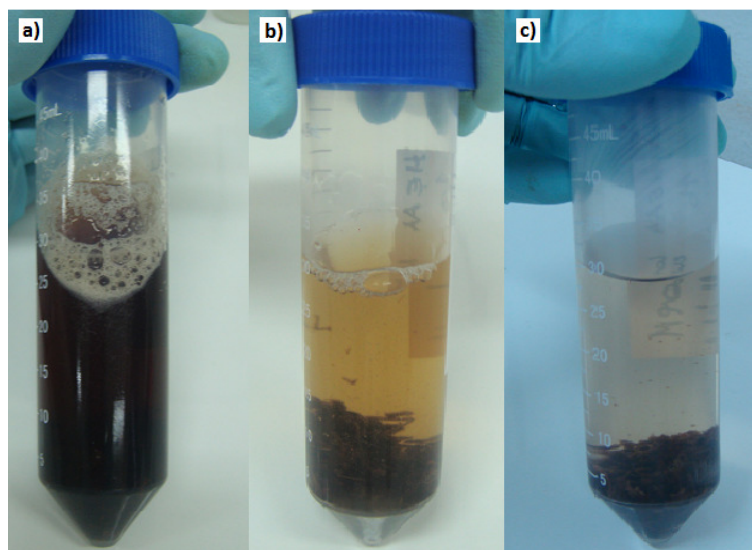


Imagen B-4: Etapas sucesivas de lavado del material pre-tratado con [EMIM][Ac]. Imágenes luego de a) primer lavado, b) segundo lavado y c) tercer lavado

B.4 Secado del material

En la Imagen B-5 se pueden observar dos placas Petri con material en ellas, dispuesto para la etapa de secado, que consiste en dejar las placas en un horno durante la noche, a 40°C. Además se puede apreciar la diferencia del material sin pre-tratamiento, que corresponde a la placa que está en la izquierda en la figura, del material pre-tratado, que se encuentra en la placa de la derecha.

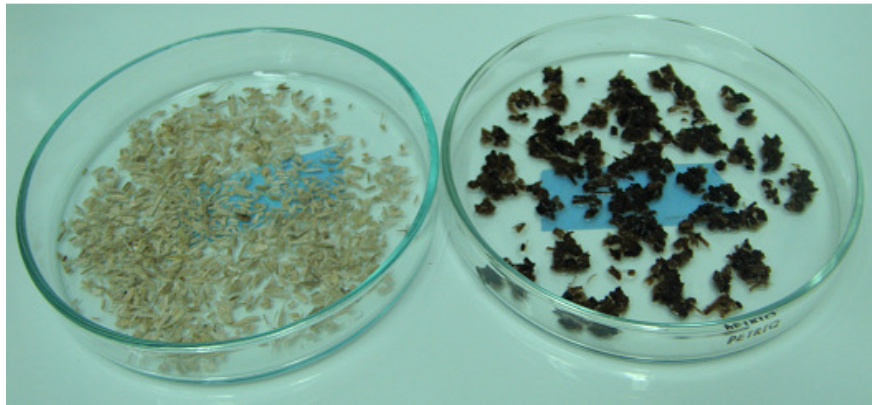


Imagen B-5: Placas Petri con material para secar. (izquierda: Material sin pre-tratar, derecha: Material pre-tratado)

B.5 Sacarificación y fermentación simultáneas

En la Imagen B-6 se puede observar tres matraces Erlenmeyer, el (A) corresponde a un matraz no modificado. El (B) corresponde a un matraz Erlenmeyer modificado, ya que presenta una extensión en la base del mismo para la toma de muestras, para de esta manera disminuir el intercambio gaseoso con el medio ambiente, debido a que las fermentaciones se deben llevar a cabo en medios anaeróbicos. Finalmente en (C) se puede observar un matraz modificado luego de una SSF, en el cual se destaca que la parte superior queda fija, el tapón no se levanta durante la toma de muestras, sino que estas se toman por medio de la extensión y mediante la utilización de una jeringa.

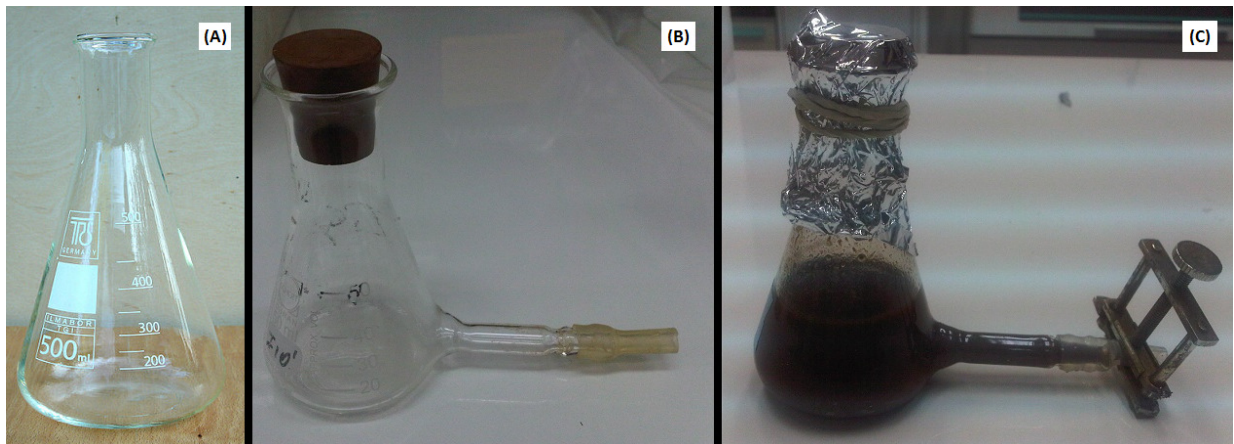


Imagen B-6: (A) Matraz Erlenmeyer, (B) Matraz Erlenmeyer modificado para la SSF (C) Matraz Erlenmeyer modificado luego de una SSF con material pre-tratado con [EMIM][Ac]

Anexo C.- Materiales

Para la realización de este estudio se requirieron los siguientes equipos e instrumentos:

- Estufa Gallenkamp para el secado del material lignocelulósico.
- Baño de silicona en un calentador/agitador magnético más una termocupla para controlar la temperatura. Estos equipos se requieren para el reciclaje y para el pre-tratamiento con líquidos iónicos.
- Cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer modelo Clarus 500 para medir etanol, el equipo presenta un software (interfaz) integrado.
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5403 para los distintos ensayos:
 - Rotor F-34-6-38: para centrifugar tubos Falcon de 15 o 50 ml (con uso de adaptadores).
 - Rotor F-45-30-11: para centrifugar tubos Eppendorf.
- Matraces Erlenmeyer-modificados de 40 ml para la SSF.
- Shaker New Brunswick modelo innova 4300 o Shaker Zhigen modelo ZHWY-100B.
- Vortex marca Thermolyne, modelo Type 16.700 Mixer Maxi-Mix I.
- Kit Gluc-Pap para la medición de Glucosa.

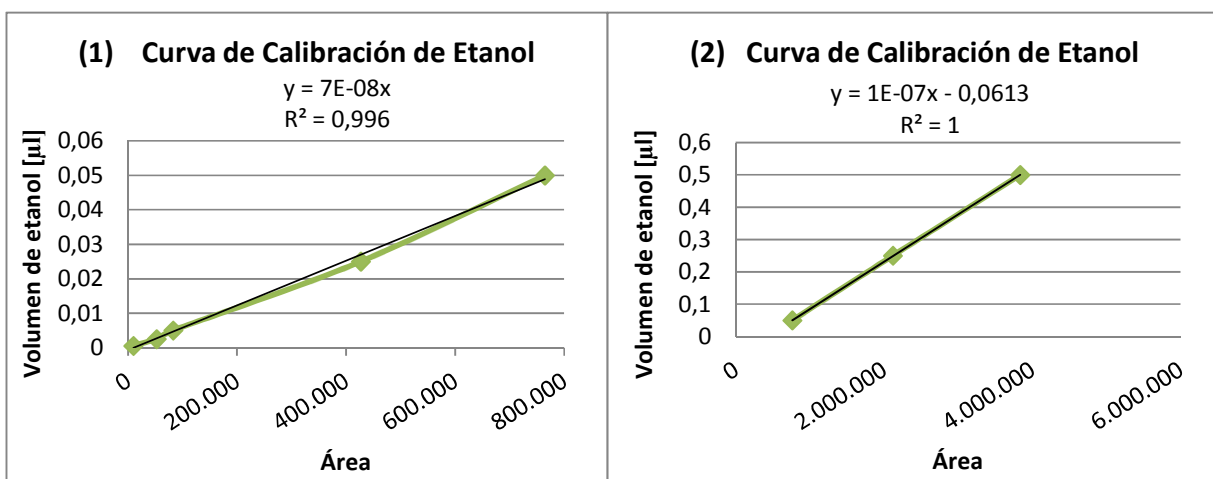


Figura D-1: Curvas de calibración de volumen de etanol versus el área entregada por la interfaz del CG. (1) Aproximación lineal de las diluciones 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1% v/v (2) Aproximación lineal de las diluciones 1, 5 y 10% v/v

Luego de tener las aproximaciones lineales de estas curvas de calibración, se estimó el punto de continuidad entre ambas, con el fin de poder determinar cuál de estas curvas de calibración hay que utilizar al momento de estimar el volumen de etanol de cada muestra.

Anexo E.- Resultados y Discusiones

E.1 Cálculo de la disponibilidad de glucosa

Para determinar la disponibilidad de glucosa, proveniente de los residuos de eucalipto, se debe considerar la Ecuación E-1:



Según Cortínez, el porcentaje de celulosa en los residuos de eucalipto es del 40% ^[18]. Si se considera que el peso molecular (PM) de este compuesto es de 1.296.000 gr/mol ^[19] y que según Pinkert “n” para residuos de eucalipto en la Ecuación E-1 es igual a 10.000 ^[25], se tiene lo siguiente:

Si se considera una cantidad de 0,2 gr de residuos de eucalipto:

$$\text{Celulosa potencial [gr]} = 0,2 \text{ gr} * 0,4 = 0,08 \text{ gr}$$

$$\text{moles de celulosa} = \frac{\text{celulosa potencial [gr]}}{PM_{\text{celulosa}}} = \frac{0,08 \text{ gr}}{1.296.000 \text{ gr/gmol}} = 6,17 * 10^{-8} \text{ moles}$$

$$\text{moles de glucosa} = n * \text{moles de celulosa} = 10.000 * 6,17 * 10^{-8} = 6,17 * 10^{-4} \text{ moles}$$

Por otro lado se tiene lo siguiente (considerando la Ecuación 2-2):

$$\text{Masa} = \text{Peso molecular} * \text{Número de Moles}$$

$$\text{Glucosa potencial [gr]} = 180 \frac{\text{gr}}{\text{gmol}} * 6,17 * 10^{-4} \text{ moles} = 0,111 \text{ gr}$$

E.2 Cálculo del rendimiento de la sacarificación

Para calcular el rendimiento, primero se debe determinar la concentración de glucosa de cada muestra luego de la sacarificación. Para esto se utiliza el Kit Gluc Pap (ver punto 7.4), el cual entrega estas concentraciones en el volumen de reacción correspondiente. En el caso de la sacarificación, se tienen volúmenes de reacción de 4 ml, los cuales consideran 0,2 gr de residuos de eucalipto. Cabe destacar que los rendimientos se miden con respecto a las concentraciones de glucosa de las muestras a las 72 horas, es decir, una vez terminada la sacarificación.

Por ejemplo: para el caso del control negativo del ensayo 8.1.1 (A), una de las densidades ópticas (DO) obtenidas fue de 0,363 (a las 72 horas). Una vez restado el blanco (promedio de los valores de las DO obtenidas para el reactivo del kit) a las DO de cada muestra, se debe utilizar la siguiente ecuación para determinar la concentración de glucosa en las muestras:

$$[\text{Glucosa Muestra}] = \frac{DO \text{ Muestra}}{DO \text{ Estándar}} * [\text{Glucosa Estándar}] \quad \text{Ecuacion (E - 2)}$$

En esta ecuación, la concentración y la DO de la muestra Estándar son conocidas, por lo que se puede obtener la concentración de glucosa de cada muestra. Volviendo al caso ejemplo, se obtuvo una concentración de 627,2 mg/l de glucosa. Pero, el volumen total de reacción fue de 4 ml, por lo que se tiene lo siguiente:

$$627,2 \frac{mg}{l} * 4 ml * \frac{1 l}{1000 ml} = 2,509 mg \text{ de glucosa en la muestra}$$

Como la glucosa potencial sigue siendo la misma e igual a 0,111 gr, el rendimiento se obtiene utilizando la Ecuación E-3 de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento (\%)} &= \frac{\text{Glucosa liberada en la muestra [gr]}}{\text{Glucosa potencial [gr]}} * 100\% && \text{Ecuación (E - 3)} \\ &= \frac{\left(2,509 mg * \frac{1 gr}{1000 mg}\right)}{0,111 gr} * 100\% = 2,2\% \end{aligned}$$

Este 2,2% equivale al porcentaje de liberación de glucosa de la muestra, es decir, el rendimiento del proceso hasta la sacarificación.

E.3 Cálculo de los rendimientos de la SSF

E.3.1 Rendimiento [%]

Este rendimiento se calcula mediante la utilización de la Ecuación E-4:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Etanol liberado en la muestra [gr]}}{\text{Etanol potencial [gr]}} * 100\% \quad \text{Ecuación (E - 4)}$$

Primero es necesario calcular la cantidad de etanol potencial, para esto se necesita la cantidad de glucosa potencial (moles), la cual se calcula según el punto E.1. Luego, según la Ecuación 2-1 se calcula la cantidad de moles disponibles de etanol, los cuales son el doble de los moles de glucosa disponible.



Por ejemplo: para la configuración EMIM Ac (5% Biomasa) (sin propagación), se tienen 2 gr de material pre-tratado, según el punto E.1, esto equivale a 0,00617 moles de glucosa disponible, siguiendo la Ecuación 2-1, esto corresponde a 0,01234 moles de etanol disponibles. Como el peso molecular del etanol es de 46 g/gmol, esto equivale a 0,57 gr de etanol potencial (considerar la Ecuación 2-2, ver punto E.1).

Para esta misma configuración, la cantidad de etanol obtenida (menor dato) fue de 0,65 gr, por lo que, reemplazando en la Ecuación E-4:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{0,65 [gr]}{0,57 [gr]} * 100\% = 114\%$$

E.3.2 Rendimiento [gr de etanol/kg de material pre-tratado]

Para el cálculo de este rendimiento es necesario utilizar la Ecuación E-5:

$$\text{Rendimiento} \left[\frac{\text{gr etanol}}{\text{kg material pretratado}} \right] = \frac{\text{Etanol liberado en la muestra [gr]}}{\text{Material pretratado [kg]}} \quad \text{Ecuación (E - 5)}$$

Siguiendo con el ejemplo anterior, en la configuración EMIM Ac (5% Biomasa) (sin propagación) se obtuvieron 0,65 gr de etanol y en este caso se utilizaron 2 gr de material pre-tratado, lo que equivale a 0,002 kg, por lo que se obtiene lo siguiente:

$$\text{Rendimiento} \left[\frac{\text{gr etanol}}{\text{kg material pretratado}} \right] = \frac{0,65 [\text{gr}]}{0,002 [\text{kg}]} = 325 \left[\frac{\text{gr etanol}}{\text{kg material pretratado}} \right]$$

E.3.3 Rendimiento [lt de etanol/ton de material pre-tratado]

Para el cálculo de este rendimiento es necesario utilizar la Ecuación E-6 y E-7. Primero es necesario obtener el volumen de etanol obtenido, en litros, por lo que se requiere utilizar la Ecuación E-6 y el valor de la densidad del etanol, que equivale a 0,789 [gr/cm³]

$$\rho = \frac{m}{V} \rightarrow V = \frac{m}{\rho} \quad \text{Ecuación (E - 6)}$$

Continuando el ejemplo anterior, se obtuvieron 0,65 gr de etanol, por lo que en volumen esto equivale a:

$$\text{Volumen [lt]} = \frac{0,65 [\text{gr}]}{0,789 \left[\frac{\text{gr}}{\text{cm}^3} \right] * \left[\frac{1000 \text{ cm}^3}{1 \text{ lt}} \right]} = 8,24 * 10^{-4} [\text{lt}]$$

Luego, utilizando la Ecuación E-7 se puede obtener el rendimiento, para esto hay que considerar que en este ejemplo se utilizaron 2 gramos de material pre-tratado, lo que equivale a 2 * 10⁻⁶ toneladas de biomasa pre-tratada.

$$\text{Rendimiento} \left[\frac{\text{lt etanol}}{\text{ton material pretratado}} \right] = \frac{\text{Etanol liberado en la muestra [lt]}}{\text{Material pretratado [ton]}} \quad \text{Ecuación (E - 7)}$$

$$\text{Rendimiento} \left[\frac{\text{lt etanol}}{\text{ton material pretratado}} \right] = \frac{8,24 * 10^{-4} [\text{lt}]}{2 * 10^{-6} [\text{ton}]} = 412 \left[\frac{\text{lt etanol}}{\text{ton material pretratado}} \right]$$

Anexo F.- Especificaciones del [EMIM][Cl] de Merck



Specification

4.90054.0025 1-Ethyl-3-methylimidazolium chloride for synthesis

	Spec. Values	
Purity (HPLC, area%)	≥ 98.0	%
Identity (NMR)	passes test	
Water (K. F.)	≤ 1.0	%

Dr. Wolfgang Götzmann

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature