



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

# COMPARACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN RESIDUOS FORESTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: HIDRÓLISIS ÁCIDA Y LÍQUIDOS IÓNICOS.

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA MENCIÓN QUÍMICA Y  
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

**VICTORIA ANDREA CORTÍNEZ VILLALOBOS**

PROFESOR GUÍA:

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

RENÉ CARMONA CERDA

JUAN ASENJO DE LEUZE

CARLOS CARLESÍ JARA

SANTIAGO DE CHILE

ENERO DE 2010

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO Y MAGISTER EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA  
POR: VICTORIA ANDREA CORTÍNEZ VILLALOBOS  
FECHA: 18/01/2010  
PROF. GUIA: MARIA ELENA LIENQUEO

## **“COMPARACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN RESIDUOS FORESTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: HIDRÓLISIS ÁCIDA Y LÍQUIDOS IÓNICOS”**

El etanol producido desde material lignocelulósico es parte de las conocidas Energías Renovables No Convencionales. Para la producción de bioetanol de segunda generación es necesario realizar un pretratamiento a la madera, cuyo objetivo es romper la pared de lignina para así poder sacarificar la celulosa expuesta a glucosa, que finalmente pueda ser fermentada mediante microorganismos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de tres pretratamientos: ácido diluido, alcalino diluido y líquidos iónicos, bajo sus mejores condiciones, sobre los residuos forestales Lenga (*Nothofagus pumilio*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*). El primero fue elegido por ser un árbol nativo masivo y el segundo por el alto potencial de plantaciones en Chile. Los pretratamientos ácido y alcalino se utilizaron a modo de comparación con el pretratamiento de líquidos iónicos, del cual solo se tienen referencias sobre disolución de celulosa y no de material lignocelulósico.

Lenga y Eucalipto fueron pretratados con los tres métodos anteriormente nombrados, posteriormente se realizó la sacarificación enzimática del material sólido resultante. Luego se analizó la liberación de azúcares totales y monómeros específicos posterior al pretratamiento y después de la hidrólisis enzimática.

Para el pretratamiento ácido y alcalino se utilizó ácido sulfúrico al 0,50%, 0,75%, 1,00% y 1,25% (v/v) por 30 y 60 minutos a una temperatura de 121°C. Para el pretratamiento alcalino se uso NaOH al 2% (v/v) por 60 minutos a una temperatura de 121°C. En el pretratamiento de líquidos iónicos se utilizó [emim]<sup>+</sup> [Cl]<sup>-</sup> y [A336]<sup>+</sup> [OH]<sup>-</sup> a 80°C, 121°C y 150°C por 30 y 60 minutos. Por último, para la hidrólisis enzimática se utilizaron enzimas celulasas comerciales, Celluclast 1.5 L (Novo Co., Denmark) y Novozyme 188 (Novo Co., Denmark), con cargas enzimáticas de 102 FPU/g y 147 CBU/g respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que todos los pretratamientos utilizados mejoran la eficiencia en términos de rendimientos y tasas de reacción de la hidrólisis enzimática en la obtención de azúcares reductores frente al material no tratado. Además, se obtuvo que un pretratamiento ácido posee bajos rendimientos en comparación a los otros pretratamientos, donde el mejor caso de Lenga es T=121°C, t=30 min, 1,00 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Eucalipto es T=121°C, t=30 min, 1,00 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con un rendimiento de un 30% y 27% respectivamente, con una relación glucosa/xilosa de un 7/93%.

Por otro lado, si el objetivo es una fermentación de pentosas y hexosas, el pretratamiento alcalino es el indicado con un rendimiento de 49% para Lenga y un 45% para Eucalipto. Las condiciones en la hidrólisis ácida para Lenga en este caso son T=121°C, t=60 min, 0,75% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y para Eucalipto son T=121°C, t=60 min, 1,00% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Si, por el contrario, si la fermentación es de glucosa, el pretratamiento con líquidos iónicos es el más efectivo, donde las condiciones de operación encontradas para Lenga son T=150°C, t=30min, IL [emim]<sup>+</sup>[Cl]<sup>-</sup> y para Eucalipto son T=150°C, t=60min, IL [emim]<sup>+</sup>[Cl]<sup>-</sup> con una conversión con respecto a los azúcares teóricos del 40% y 29% respectivamente y una relación xilosa/glucosa del 25/75%.

Otro punto interesante viene dado por los perfiles cinéticos durante 72 horas en la sacarificación, donde se concluyó que con pretratamiento alcalino y con líquidos iónicos el máximo de los azúcares se obtiene en un tiempo menor a las 24 horas.

Finalmente, se recomienda continuar el trabajo de pretratamiento con líquidos iónicos, probando otros aniones y/o cationes, técnicas de separación y tamaños de partícula para la obtención de azúcares.

## AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta tesis de magister quisiera agradecer a mi familia por su infinito apoyo y alegrías brindadas durante toda mi vida. A mis amigos Maricelle, Belén, Patricia, María José, Sonia, Pilar, Catalina, Macarena, Ricardo, Andrés, Emilio, Maurice, Rolando y Tomás por acompañarme en esta larga aventura que ha sido mi vida universitaria y a Gina Madariaga, por ser la mejor Secretaria Docente, por su ayuda y disponibilidad en todo momento.

Agradezco a mi profesora guía María Elena Lienqueo por su disposición y ayuda brindada, además de darme la oportunidad de participar en el proyecto “Optimal Treatment Processes of Lignocelluloses for Bioethanol, consortium” (OPTBIO) y con ello tener la oportunidad de ir a Finlandia a aprender sobre los líquidos iónicos.

Todo mi reconocimiento a Åbo Akademy University y en especial a Sari Hyvärinen por su apoyo en mi estadía en Turku, Finlandia.

Finalmente me gustaría reconocer el apoyo financiero de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) a través de su Programa Bicentenario (CCF05) y al Proyecto Domeyko de la Universidad de Chile.

Espero que mi trabajo pueda contribuir al conocimiento sobre pretratamientos en la madera y sea un apoyo a la introducción de biocombustibles en Chile.

Victoria Cortínez Villalobos, Enero 2010

# INDICE DE CONTENIDOS

---

## PARTE I

### INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

<b>CAPÍTULO 1: MOTIVACIÓN</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 BIOMASA	- 1 -
1.2 MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS	- 2 -
1.3 BIOETANOL DESDE BIOMASA	- 4 -
1.3.1 Bioetanol	- 4 -
1.3.2 Etanol como combustible	- 4 -
1.4 PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	- 6 -
<b>CAPÍTULO 2: BIOMASA CELULÓSICA: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS</b>	<b>- 8 -</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.	- 8 -
2.2 CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA.	- 10 -
<b>CAPÍTULO 3: PRETRATAMIENTOS E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA</b>	<b>- 13 -</b>
3.1 INTRODUCCIÓN	- 13 -
3.2 HIDRÓLISIS CON ÁCIDO DILUIDO	- 15 -
3.3 HIDRÓLISIS ALCALINA	- 16 -
3.4 LÍQUIDOS IÓNICOS (IL'S)	- 16 -
3.4.1 La disolución de celulosa en líquidos iónicos	- 17 -
3.4.2 Líquidos iónicos como pretratamiento de lignocelulósicos.	- 19 -
3.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	- 21 -
<b>CAPÍTULO 4: SUBPRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA</b>	<b>- 23 -</b>
4.1 ÁCIDOS ORGÁNICOS.	- 24 -
4.2 COMPUESTOS FENÓLICOS	- 24 -
4.3 COMPUESTOS FURANOS	- 25 -
<b>CAPÍTULO 5: OBJETIVOS</b>	<b>- 26 -</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL	- 26 -
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 26 -

## PARTE II

### METODOLOGÍA

CAPÍTULO 6: ETAPAS DEL TRABAJO	- 28 -
6.1 MATERIALES	- 28 -
6.1.1 Material lignocelulósico	- 28 -
6.1.2 Líquidos iónicos	- 29 -
6.1.3 Enzimas	- 29 -
6.2 MÉTODOS	- 30 -
6.2.1 Secado y determinación del porcentaje de humedad del material	- 30 -
6.2.2 Pretratamiento de hidrólisis ácida	- 31 -
6.2.3 Detoxificación del ácido hidrolizado	- 32 -
6.2.4 Pretratamiento de hidrólisis alcalina	- 32 -
6.2.5 Pretratamiento con líquidos iónicos (IL's)	- 33 -
6.2.6 Hidrólisis enzimática	- 34 -
6.2.7 Determinación de azúcares reductores	- 34 -
6.2.8 Determinación de xilosa y glucosa	- 34 -
6.2.9 Análisis de monosacáridos en líquidos iónicos	- 35 -
6.2.10 Análisis estadístico	- 35 -
6.2.11 Modelamiento de los perfiles cinéticos en la hidrólisis enzimática	- 35 -

## PARTE III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>CAPÍTULO 7: PRETRATAMIENTO CON HIDRÓLISIS ÁCIDA Y POSTERIOR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA</b>	<b>- 37 -</b>
7.1 EFECTO DE UN PRETRATAMIENTO CON HIDRÓLISIS ÁCIDA	- 37 -
7.1.1 Efecto del tiempo y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento	- 38 -
7.1.2 Composición de glucosa y xilosa en la fracción líquida del pretratamiento ácido	- 41 -
7.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRETRATADA EN CONDICIONES ÁCIDAS.	- 43 -
7.2.1 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de reacción	- 43 -
7.2.2 Composición de glucosa y xilosa liberadas en la hidrólisis enzimática	- 45 -
7.2.3 Comparación de materias primas utilizadas y conversión total del proceso considerando la concentración de azúcares reductores teóricos.	- 46 -
7.2.4 Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico pretratado con ácido diluido.	- 50 -
7.3 EFECTO DE UN PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ALCALINA POSTERIOR A UN PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA	- 53 -
7.3.1 Azúcares reductores liberados en el pretratamiento de hidrólisis alcalina	- 53 -
7.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRETRATADA EN CONDICIONES ALCALINAS.	- 54 -
7.4.1 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de reacción	- 54 -
7.4.2 Composición de glucosa y xilosa liberadas en la hidrólisis enzimática	- 56 -
7.4.3 Comparación de materias primas utilizadas y conversión total del proceso considerando la concentración de azúcares reductores teóricos	- 57 -
7.4.4 Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática para el material lignocelulósico.	- 60 -
<b>CAPÍTULO 8: PRETRATAMIENTO DE LÍQUIDOS IÓNICOS (IL'S) Y POSTERIOR TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA</b>	<b>- 62 -</b>
8.1.1 Efecto del líquido iónico, temperatura y tiempo de reacción en los azúcares liberados por la hidrólisis enzimática.	- 63 -
8.1.2 Conversión de glucosa y xilosa respecto a los azúcares teóricos	- 63 -
8.1.3 Azúcares reductores en la fracción líquida del pretratamiento con líquido iónico	- 68 -
8.1.4 Generación de compuestos inhibidores en el tratamiento de hidrólisis enzimática	- 70 -
8.1.5 Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico.	- 73 -
<b>CAPÍTULO 9: COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS</b>	<b>- 76 -</b>
9.1.1 Comparación de xilosa, glucosa y azúcares reductores en el pretratamiento y la posterior hidrólisis enzimática.	- 76 -

9.1.2 Comparación con la literatura.	- 78 -
CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES	- 79 -
REFERENCIAS	- 82 -
ANEXO A	- 87 -
ANEXO B	- 88 -
ANEXO C	-94-
ANEXO D	-99-
ANEXO E	-105-
ANEXO F	-107-
ANEXO G	-112-
ANEXO H	-114-
ANEXO I	- 118 -

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 7-1: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES OBTENIDOS EN UN PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO PARA LENGUA A DISTINTOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO.	- 39 -
GRÁFICO 7-2: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES OBTENIDOS EN UN PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO A DISTINTOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO PARA EUCALIPTO.	- 40 -
GRÁFICO 7-3: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES LIBERADOS DESDE LENGUA CON UN TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR 72 HORAS.	- 44 -
GRÁFICO 7-4: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES LIBERADOS DESDE EUCALIPTO CON UN TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR 72 HORAS.	- 45 -
GRÁFICO 7-5: PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA UN PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO SULFÚRICO	- 52 -
GRÁFICO 8-1: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES OBTENIDOS EN UN TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PRECEDIDO POR PRETRATAMIENTO ALCALINO Y ÁCIDO POR DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO SULFÚRICO Y TIEMPOS DE OPERACIÓN PARA LENGUA.	- 55 -
GRÁFICO 8-2: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES OBTENIDOS EN UN TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PRECEDIDO POR PRETRATAMIENTO ALCALINO Y ÁCIDO POR DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO SULFÚRICO Y TIEMPOS DE OPERACIÓN PARA EUCALIPTO.	- 56 -
GRÁFICO 8-3: PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA UN PRETRATAMIENTO ÁCIDO A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO SULFÚRICO, SEGUIDO POR UNA HIDRÓLISIS ALCALINA.	- 61 -
GRÁFICO 9-1: EFECTO DE LA TEMPERATURA, TIEMPO Y TIPO DE IL EN LA MATERIA PRIMA LENGUA Y EUCALIPTO REGENERADA. EN ELLA SE REALIZA UN PRETRATAMIENTO CON IL, [EMIM][CL] Y [A336][OH] A DISTINTAS TEMPERATURAS [°C] TIEMPOS DE REACCIÓN [MIN]. SE PRESENTAN LAS CANTIDADES DE AZÚCARES COMO MONÓMEROS Y LOS AZÚCARES TOTALES COMO LA SUMA DE LOS AZÚCARES REDUCTORES LIBERADOS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A LAS 72 HORAS.	- 65 -
GRÁFICO 9-2: PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LENGUA PRETRATADA CON IL [EMIM][CL]	- 74 -
GRÁFICO 9-3: PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE EUCALIPTO PRETRATADO CON [EMIM][CL]	- 75 -

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1: PRINCIPALES RUTAS DE CONVERSIÓN DE BIOMASA.	- 2 -
FIGURA 1-2: PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	- 7 -
FIGURA 2-1: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MADERA	- 9 -
FIGURA 2-2: MODELO DE MOLÉCULAS DE CELULOSA UNIDAS POR PUENTES DE HIDRÓGENO	- 10 -
FIGURA 2-3: ESTRUCTURA GENERAL DE LA LIGNINA	- 12 -
FIGURA 3-1: EFECTOS DEL PRETRATAMIENTO EN EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.	- 14 -
FIGURA 3-2: MECANISMO DE DISOLUCIÓN DE CELULOSA EN LÍQUIDOS IÓNICOS	- 17 -
FIGURA 3-3: PROCESO PROPUESTO POR VARANASI PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES CON UN PRETRATAMIENTO CON IL	- 20 -
FIGURA 4-1: ALGUNAS REACCIONES SECUNDARIAS OCURRIDAS DURANTE LA HIDRÓLISIS DE LIGNOCELULÓSICOS.	- 23 -
FIGURA 6-1: RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO. (A) EUCALIPTO, (B) LENGA. .	- 29 -
FIGURA 6-2: METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA.	- 31 -
FIGURA 6-3: METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ALCALINA	- 32 -
FIGURA 6-4: METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS.	- 33 -
FIGURA 7-1: ESQUEMA DE PRETRATAMIENTO Y FERMENTACIÓN, USANDO UN ESQUEMA DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SEPARADA	- 48 -
FIGURA 8-1: MECANISMO PROPUESTO PARA EL PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS EN EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO LENGA.	- 67 -
FIGURA 8-2: MECANISMO PROPUESTO PARA EL PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS EN EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO EUCALIPTO	- 68 -
FIGURA 8-3: (A) MUESTRAS POST PRETRATAMIENTO DE EUCALIPTO (B) LÍQUIDO IÓNICO CON ALTO CONTENIDO DE AZÚCARES Y PAPEL FILTRO DONDE QUEDARON LOS RESTOS DE MADERA, NO SE PUDO RECUPERAR EL MATERIAL	- 69 -
FIGURA 8-4: OTROS COMPUESTOS EN UNA MUESTRA DE LENGA PRETRATADA CON $[EMIM^+][Cl^-]$ A 150°C, POR 30 MINUTOS Y TRATADA CON UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR 72 HORAS (ARRIBA) Y EUCALIPTO PRETRATADA CON $[EMIM^+][Cl^-]$ A 150°C, POR 60 MINUTOS Y TRATADA CON UNA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR 72 HORAS Y (ABAJO).	- 71 -
FIGURA 8-5: SUBPRODUCTOS DEL LEVOGLUCOSANO	- 72 -

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1-1: PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE ALGUNOS OXIGENADOS DE ALTO OCTANAJE [8]	- 4 -
TABLA 2-1: COMPOSICIÓN DE CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA EN RESIDUOS AGRÍCOLAS, FORESTALES Y DESECHOS. (FUENTE [20])	- 9 -
TABLA 2-2: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RESIDUOS FORESTALES EN ESTUDIO	- 10 -
TABLA 7-1: CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO CON HIDRÓLISIS ÁCIDA	- 37 -
TABLA 7-2: VALORES DE GLUCOSA Y XILOSA EN MUESTRAS DE PRETRATADAS CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO	- 43 -
TABLA 7-3: NIVELES DE GLUCOSA Y XILOSA GENERADAS POR LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LENGUA Y EUCALIPTO PRETRATADA CON ÁCIDO DILUIDO	- 46 -
TABLA 7-4: COMPARACIÓN DE CONVERSIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DESDE LENGUA Y EUCALIPTO OBTENIDOS EN UN PROCESO QUE INCLUYE UN PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO POR 30 Y 60 MINUTOS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO SULFÚRICO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. EN ROJO SE ENCUENTRAN LOS VALORES CONFIABLES ENCONTRADOS EN LOS ANÁLISIS ANTERIORES.	- 47 -
TABLA 7-5: RESUMEN DE FUENTES ESTADÍSTICAMENTE INFLUYENTES EN LA LIBERACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	- 49 -
TABLA 7-6: COMPARACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES OBTENIDOS EN UNA HIDRÓLISIS ALCALINA DE LENGUA Y EUCALIPTO, POSTERIOR A UN PRETRATAMIENTO ÁCIDO A DISTINTOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO.	- 54 -
TABLA 7-7: LA TABLA MUESTRA ALGUNOS VALORES DE GLUCOSA Y XILOSA EN MUESTRAS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PRECEDIDA POR UN TRATAMIENTO ALCALINO ÁCIDO	- 57 -
TABLA 7-8: RENDIMIENTO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR OBTENIDA EN CADA ETAPA Y PARA EL PROCESO RESPECTO A LOS AZÚCARES REDUCTORES.	- 58 -
TABLA 7-9: RESUMEN DE FUENTES ESTADÍSTICAMENTE INFLUYENTES EN LA LIBERACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	- 59 -
TABLA 8-1: CONDICIONES UTILIZADAS EN EL PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS	- 62 -
TABLA 8-2: CONVERSIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR 72 HORAS DE MUESTRAS DE LENGUA EN CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO VARIABLE. DESTACADO CON ROJO SE ENCUENTRA LA CONDICIÓN ÓPTIMA	- 66 -
TABLA 8-3: CONVERSIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR 72 HORAS DE MUESTRAS DE EUCALIPTO EN CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO VARIABLE. DESTACADO CON ROJO SE ENCUENTRA LA CONDICIÓN ÓPTIMA	- 67 -
TABLA 8-4: AZÚCARES REDUCTORES PRESENTES EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA DEL PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDO IÓNICO. EL RESULTADO SE PRESENTA COMO EL RENDIMIENTO CON RESPECTO A LOS AZÚCARES TEÓRICOS TOTALES PRESENTES EN LA MATERIA PRIMA SIN TRATAR	- 69 -
TABLA 9-1: COMPARACIÓN DE GLUCOSA, XILOSA Y AZÚCARES REDUCTORES EN PRETRATAMIENTOS PARA LENGUA	- 77 -
TABLA 9-2: COMPARACIÓN DE GLUCOSA, XILOSA Y AZÚCARES REDUCTORES EN PRETRATAMIENTOS PARA EUCALIPTO	- 77 -
TABLA 9-3: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE EXPLOSIÓN A VAPOR EN MADERA DE ÁLAMO (OBTENIDO DE [56])	- 78 -

# PARTE I

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

---

### CAPÍTULO 1: MOTIVACIÓN

BIOMASA  
MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS  
BIOETANOL DESDE BIOMASA  
PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

### CAPÍTULO 2: BIOMASA CELULÓSICA: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS

CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA  
CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA

### CAPÍTULO 3: PRETRATAMIENTOS E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

INTRODUCCIÓN  
HIDRÓLISIS CON ÁCIDO DILUIDO  
HIDRÓLISIS ALCALINA  
LÍQUIDOS IÓNICOS (IL'S)  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

### CAPÍTULO 4: SUBPRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

ACIDOS ORGÁNICOS  
COMPUESTOS FENÓLICOS  
COMPUESTOS FURANOS

### CAPÍTULO 5: OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL  
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

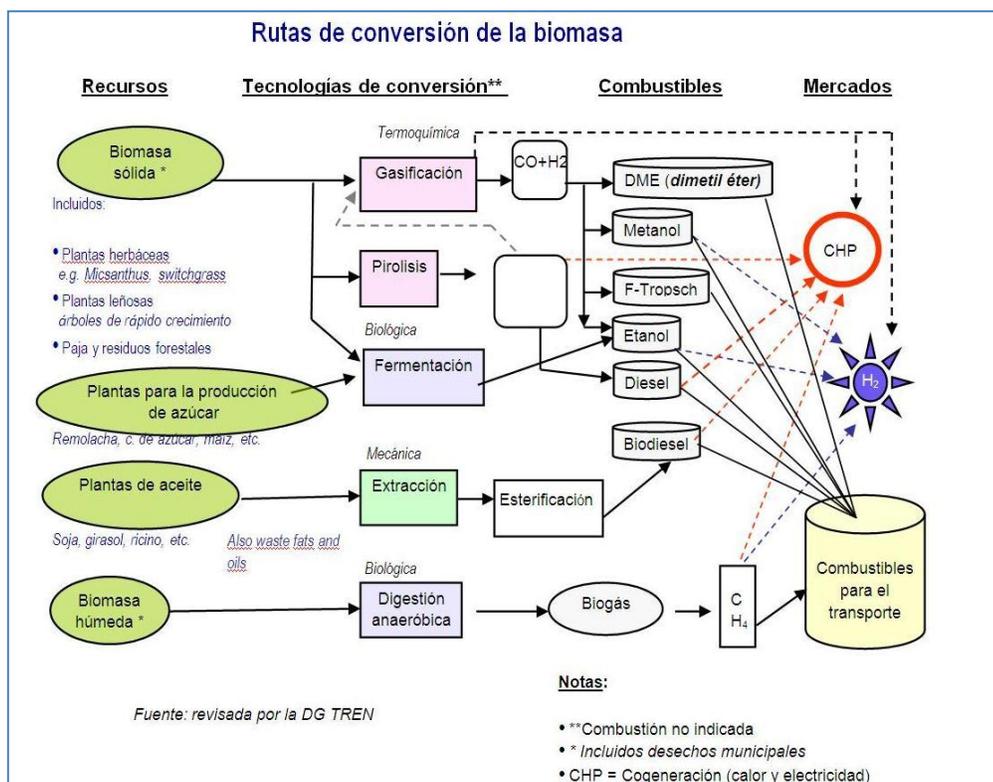
---

## MOTIVACIÓN

*Este capítulo describe la motivación del tema en estudio y la producción del biocombustible bioetanol de segunda generación a partir de desechos forestales. Se presenta las rutas de conversión, los productos, el bioetanol como combustible sus propiedades y su contexto histórico, así como la demanda internacional y del mercado chileno. Por último, se explican los distintos procesos de producción de bioetanol a través de materias primas como cereales, azúcares y lignocelulósicos.*

### **1.1 Biomasa**

Los recursos renovables cada día tienen una mayor atención, por lo que el potencial de cultivos energéticos (la biomasa moderna, biomasa cosechada con el objetivo de producir energía) ha ganado importancia. El término biomasa es utilizado para describir todo material orgánico renovable [1] tanto de origen animal o vegetal; entre ellos se encuentran plantas, árboles, cosechas, residuos agrícolas y forestales. En el mundo se extrae cerca del 11% de la energía desde la biomasa, esto corresponde a cerca de 44 EJ (exajoules=  $10^{18}$ J) (donde la forma más tradicional de uso es la quema) pero el potencial de biomasa es bastante considerable, alcanzando el valor de 2900 EJ. Un hecho aún más interesante es que 270 EJ pueden ser considerados técnicamente disponible [2]. En el contexto actual, con el aumento por políticas medioambientales y con la biomasa bien distribuida alrededor del mundo, la opción por extender el uso de este recurso renovable debe ser considerado seriamente [3]. Las principales rutas de conversión de biomasa en energía son mostradas a continuación en la Figura 1-1



**Figura 1-1: Principales rutas de conversión de biomasa. (Adaptación de [4])**

El trabajo de tesis se enfoca en los llamados biocombustibles, específicamente en la producción de etanol. Cabe destacar que la conversión de biomasa posee una mejor economía a través de la producción de más de un producto en una planta, por ejemplo, la producción de combustible y de energía calórica desde una planta de biodiesel.

## 1.2 Materias primas y productos

Las materias primas para obtener biocombustibles son diversas, pero estas pueden ser divididas en cuatro grupos principales (obtenido de [3])

- Cereales y granos pueden ser fermentados para producir etanol, el cual puede ser usado puro o en mezclas con petróleo.
- Materiales celulósicos como pastos, árboles y distintos productos de desechos y residuos de cosechas, procesamiento de maderas y desechos sólidos municipales, pueden ser convertidos en alcohol o gas de síntesis (pero el proceso requiere una mayor cantidad de etapas).

- Cosechas de semillas de aceite (como soya, girasol) o microalgas pueden ser convertidos en metilesteres, que pueden substituir a combustibles fósiles como diesel. Estos se pueden utilizar puros o como mezclas.
- Desechos orgánicos, como desechos de la industria pesquera y aceites usados pueden ser convertidos en biodiesel. Desechos domiciliarios pueden ser convertidos en biogás.

Los productos y las rutas de conversión son diversas, pero se pueden dividir en cinco grupos principales

1. Biodiesel
2. Alcoholes (metanol/etanol/butanol)
3. Biogás
4. Combustible sintético (biomasa húmeda)
5. Hidrógeno

Aumentar la seguridad de la energía, disminuir la contribución de la contaminación atmosférica por parte de los vehículos, y reducir u ojalá eliminar las emisiones de gases invernadero son las principales metas que urgen a los gobiernos para identificar y comercializar alternativas al petróleo que actualmente domina a los medios de transporte [5]. Indicando el contexto nacional, para el año 2010 a 2015 se estableció la obligación de inyectar a la matriz energética en Chile el 5% en Energías Renovables No Convencionales (ERNC).

Cabe señalar que respecto a las ERNC, se espera el uso de hidrógeno como solución a mediano plazo para producir energía calórica y/o eléctrica; y el bioetanol y biodiesel aportarían una solución en el transporte vehicular.

## 1.3 Bioetanol desde biomasa

### 1.3.1 Bioetanol

El etanol o alcohol etílico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) es una importante especie química orgánica por sus propiedades únicas y sus variados usos. Bajo condiciones ordinarias, el etanol es volátil, inflamable, se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares.

La producción de etanol tiene dos rutas: sintética y biológica. La producción sintética es llevada a cabo a través de una reacción catalítica de hidratación de etileno en fase vapor. El etanol producido con este proceso es mayormente usado como solvente (60%) y como reactivo químico (40%). El etanol producido a través de una fermentación es la otra ruta y corresponde al 93% del total de producción de etanol en el mundo[6]. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más popular usado para la producción de etanol ya que con él se obtienen altos rendimientos y posee una gran tolerancia a altas concentraciones de etanol. El etanol producido es mayormente usado como combustible (92%), solventes industriales y reactivos químicos (4%) y para bebidas (4%) [7].

### 1.3.2 Etanol como combustible

El uso del etanol como combustible se remonta al origen de los vehículos mismos. Por ejemplo, cuando Henry T. Ford diseñó el Modelo T en 1908, el combustible utilizado era etanol. En tanto, en Alemania, Rudolf Diesel tenía entre sus bocetos un motor que podía funcionar con aceites vegetales [5].

El etanol es usado como combustible en vehículos tanto puro o mezclado con gasolina. Las propiedades fisicoquímicas de algunos oxigenados de alto octanaje son mostrados en la Tabla 1-1:

Tabla 1-1: Propiedades fisicoquímicas de algunos oxigenados de alto octanaje [8]

Propiedades	Gasolina	Metanol	Etanol	MTBE <sup>1</sup>
Densidad a 15,6°C [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]	719-779	794	792	742
Calor [kJ/kg]				
Combustión	41.800-44.200	19.934	26.749	35.123
Evaporación	349	1.104	839	326
Punto de flash [°C]	-42,8	6,5	12	-28
Numero de octanos Investigado (RON)	90-100	107	108	116
Presión vapor [kPa]	55-103	32	16	54

<sup>1</sup> MTBE: éter metil ter-butílico

Entre las distintas opciones de biocombustibles, el etanol constituye una alternativa particularmente interesante dado que:

- Es una fuente renovable y por lo tanto inagotable. [1,9]
- Es una fuente más limpia de combustibles ya que al ser mezclado con gasolina aumenta el octanaje promoviendo una mejor combustión y por lo tanto reduce la necesidad de incorporar aditivos altamente tóxicos como el benceno. [10]
- Es virtualmente utilizable en todos los vehículos, siendo fácil de producir y almacenar. [11]
- Su combustión sólo produce CO<sub>2</sub> y agua. El CO<sub>2</sub> producido es principalmente neutro (sin impurezas) y dependiendo de la ruta de conversión de la biomasa en combustible y mediante el uso de aditivos, este puede ser utilizado y vendido comercialmente [5].
- Reduce las emisiones de CO<sub>2</sub> al quemarse que la gasolina, pero el impacto total depende del proceso de destilación y la eficiencia de los cultivos. [9,12]
- Reduce las emisiones de CO en un 25% a 30% cuando con el 10% de etanol en la mezcla [9]
- Su combustión en motores aporta los menores niveles de gases de efecto invernadero (entre un 12 y un 26% [13]), siendo el transporte el sector económico generador del mayor porcentaje de este tipo de gases a escala global. [14]

Sin embargo posee desventajas como:

- El costo de producción de biocombustibles casi dobla el de la gasolina, por esto no es competitiva sin ayudas públicas.
- Aunque el etanol tiene relativamente baja presión de vapor, cuando se utiliza como aditivo de la gasolina su presión de vapor efectiva es muy alta, llegando a un valor RVP (Reid Vapor Pressure) de 18 psi (124 KPa), que al compararse con la presión de vapor de la gasolina 10 psi (69 KPa), representa una desventaja para su uso.
- Para poder utilizar el bioetanol como combustible puro (E100) se necesita llevar a cabo varias modificaciones dentro del motor, de manera tal no alterar significativamente el consumo. Estas son: aumentar la relación de compresión, variar la mezcla de combustible/ aire, bujías resistentes a mayores temperaturas y presiones, conductos resistentes al ataque de alcoholes y se debe agregar un mecanismo que facilite el arranque en frío [15].

## 1.4 Procesos de producción de bioetanol

Según el tipo de materia prima la producción de bioetanol se puede dividir en dos: el bioetanol de primera y de segunda generación. El de primera generación lo componen las materias primas con alto contenido de azúcares y las fuentes con alto contenido de almidón. El bioetanol de segunda generación es aquel se obtiene desde residuos forestales y agrícolas. En la Figura 1-2 se presenta un esquema de producción de bioetanol desde estas tres fuentes [16]<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> El capítulo referente al Mercado de Bioetanol se encuentra disponible en el Anexo A

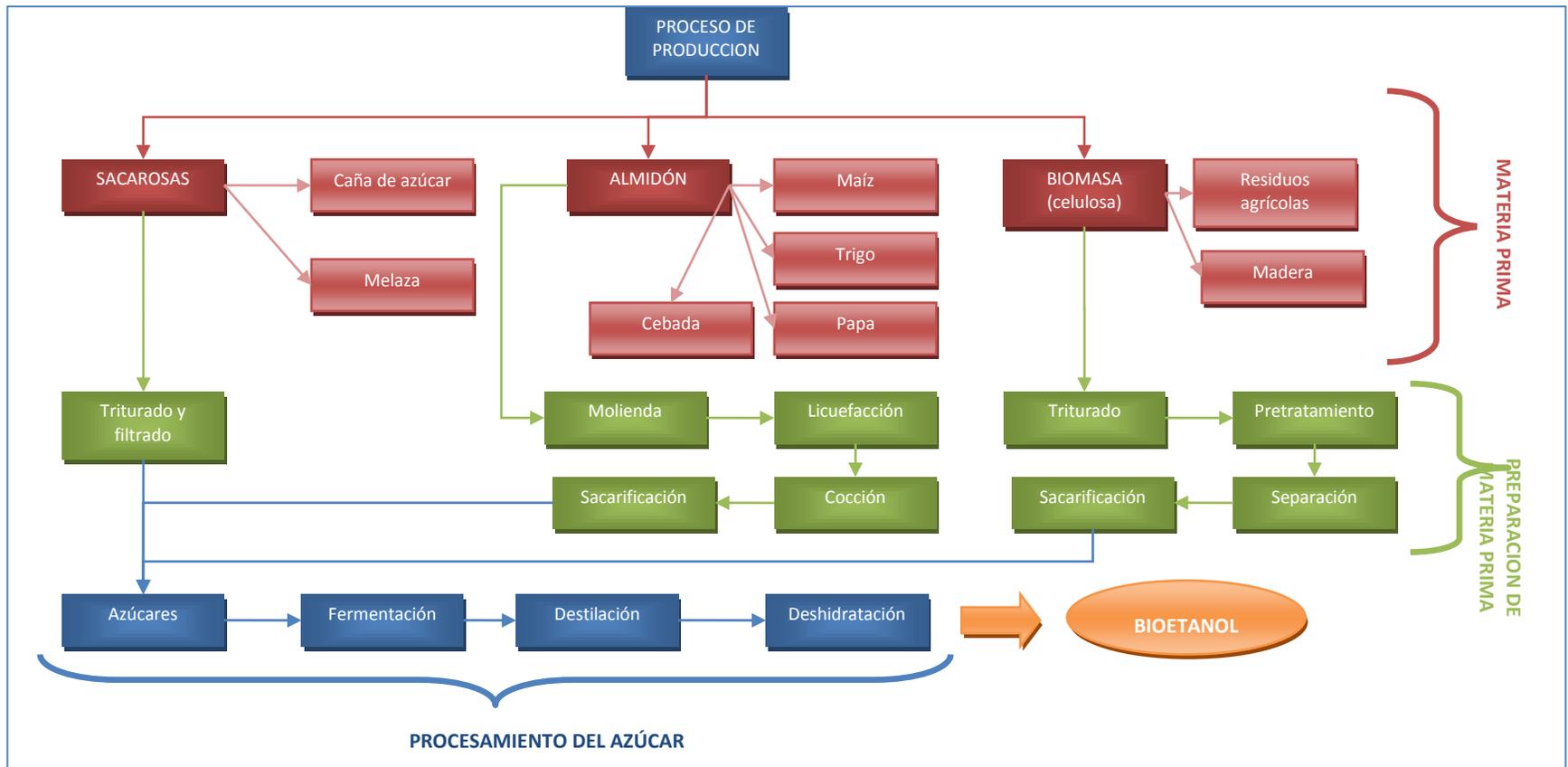


Figura 1-2: Procesos de Producción de Bioetanol (Adaptado de [17])

### BIOMASA CELULÓSICA: PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS

*En este capítulo se describen las propiedades y características de la biomasa lignocelulósica. Se explican brevemente los conceptos de hemicelulosa, celulosa y lignina, y los contenidos de éstos en las maderas duras en estudio.*

#### 2.1 Características de la biomasa lignocelulósica.

Las principales fuentes lignocelulósicas están conformadas por: [18]

- *Madera:* Bosques vírgenes, plantaciones, residuos primarios de bosques, residuos de procesamiento secundarios
- *Residuos agrícolas:* De cereales (trigo, arroz, cebada), bagazo (caña de azúcar, sorgo dulce), rastrojos o ameros (maíz), nabo forrajero.
- *Residuos municipales*
- *Residuos de papel*
- *Micro y macro algas.*

La lignocelulosa está presente como un bloque dentro de la estructura de la pared celular de la planta. Los principales constituyentes de la lignocelulosa son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. A continuación se presenta un esquema con las componentes de la madera:

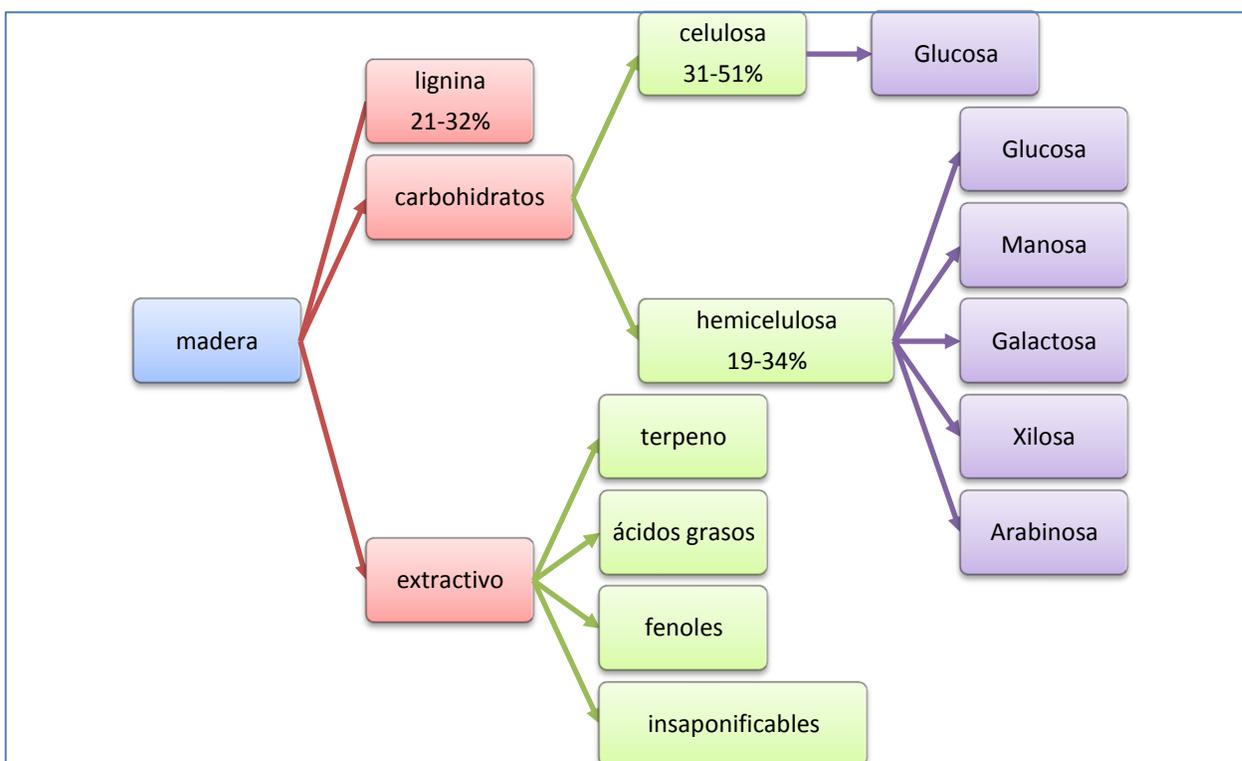


Figura 2-1: Composición química de la madera (Adaptado de [19])

La composición de estos constituyentes varía de una especie a otra. Por ejemplo, las maderas duras contienen una mayor cantidad de celulosa que la paja. Esto se observa en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Composición de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas, forestales y desechos. (Fuente [20])

Material Lignocelulósico	Celulosa [%]	Hemicelulosa [%]	Lignina [%]
Tallos de maderas duras	40-55	24-40	18-25
Tallos de maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Mazorca de maíz	45	35	15
Paja de arroz	32,1	24	18
Bagazo	33,4	30	18,9
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Pasto	45	31,4	12
Papel	85-99	0	0-15
Hojas	15-20	20	20
Papel de diario	40-55	25-40	18-30
Papel de desecho de pulpas químicas	60-70	10-20	5-10
Sólidos primarios de aguas de desecho	8-15	N/A	24-29
Desechos de puercos	6	28	N/A
Estiércol sólido de ganado	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7

Para el trabajo de tesis se debe considerar los desechos forestales de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y Lengua (*Nothofagus pumilio*) que corresponden ambos a madera dura. La composición química es mostrada a continuación:

Tabla 2-2: Composición química de residuos forestales en estudio<sup>34</sup>

Componente	Residuos de Eucalipto [%]	Residuos de Lengua [%]
Lignina	19	17
Celulosa	42	45
Hemicelulosa	39	38
Sustancias extraíbles	5	4
Cenizas	0,2	0,8

## 2.2 Celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa es parte de la pared celular. Se forma por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucosa mediante enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídicos. A través de la hidrólisis se origina glucosa. La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un valor mínimo de  $n = 200$ .

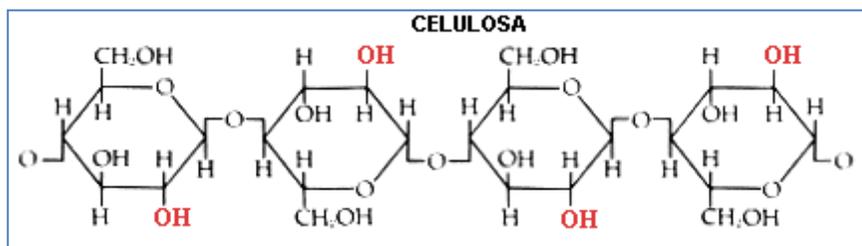


Figura 2-2: Modelo de moléculas de celulosa unidas por puentes de Hidrógeno

La celulosa tiene una estructura lineal y fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, lo que hace que sea insoluble en agua. [7]

<sup>3</sup> Datos proporcionados por Pablo Santibáñez, Ingeniería de la Madera, Universidad de Chile

<sup>4</sup> Notar que los valores presentados suman más de 100%, esto es debido a que los ensayos realizados para cada componente son independientes entre sí.

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos (polisacárido compuesto por más de un tipo de azúcar) unido por enlaces  $\beta$  (1-4) (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico), que forman una cadena lineal ramificada. Entre estos monosacáridos destacan más: la glucosa, xilosa, galactosa y fructosa [21].

La hemicelulosa se caracteriza por ser una molécula con ramificaciones, tal como el ácido urónico, capaz de unirse a las otras moléculas mediante enlaces que constituyen la pared rígida que protege a la célula de la presión ejercida sobre ésta por el resto de las células que la rodea.

La hemicelulosa se clasifica en pentosanos y hexosanos. Los pentosanos están constituidos fundamentalmente por aldopentosas (monosacáridos de 5 átomos de carbono) y los hexosanos están formados por aldohexosas (monosacáridos de 6 átomos de carbono). En el Anexo B se encuentran disponibles las imágenes de la estructura de aldopentosas y aldohexosas [21].

Por su parte, la lignina es un compuesto básicamente hidrófobo, característica frecuente en los compuestos aromáticos. Por ello, no puede ser disuelto en un medio acuoso, a no ser que se introduzcan en su estructura grupos sustituyentes polares mediante reacciones químicas, los cuales sean capaces de estabilizar la disolución de lignina en agua. Éste procedimiento se lleva a cabo en ocasiones, haciendo reaccionar la lignina con compuestos derivados del azufre, que introducen sustituyentes sulfonados en la estructura de la lignina, haciéndola entonces soluble [19].

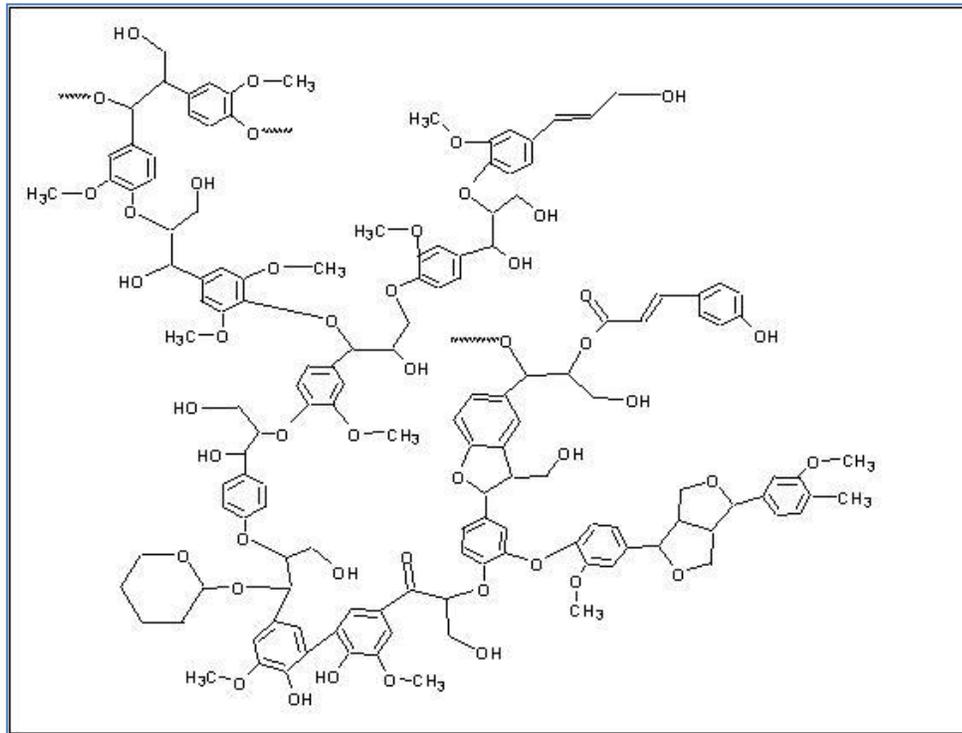


Figura 2-3: Estructura general de la lignina

## PRETRATAMIENTOS E HIDRÓLISIS ENZÍMÁTICA A LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

*En este Capítulo se describen con detalle los pretratamientos utilizados en el trabajo de Tesis a la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol, la hidrólisis con ácido diluido, la hidrólisis alcalina y el uso de líquidos iónicos. Por último se detalla la hidrólisis enzimática, paso posterior al pretratamiento y cuyo fin es convertir la biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables.*

### 3.1 Introducción

El efecto del pretratamiento en materiales lignocelulósicos ha sido reconocido en el tiempo [20]. El propósito del pretratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad del material.

En una materia prima no tratada, las fibras de celulosa, con una alta cristalinidad, se encuentra dentro de una no muy bien organizada matriz de hemicelulosa y envuelta en una pared de lignina que le da la rigidez al material lignocelulósico.

La Figura 3-1 es una representación esquemática ideal del pretratamiento en biomasa. La lignina, hemicelulosa y celulosa están representadas por los colores rosado, verde y negro, respectivamente. En el pretratamiento ideal de biomasa se pueden distinguir tres etapas o hitos representados en esta figura:

- (a) Desplazar / remover el revestimiento de lignina
- (b) Dejar al descubierto/ remover la hemicelulosa
- (c) Reducir/ eliminar la cristalinidad de la fracción de celulosa

La Figura 3-1 retrata estos hitos en dos pasos: el paso 1 incluye el punto (a) y (b), y el paso 2 está representado con el punto (c). Cabe señalar que la mayoría de los métodos de pretratamiento solo realizan el paso 1, pero no el paso 2. De todas maneras, el paso 2 es de suma importancia, ya que con él se reducen los tiempos y cargas de enzima necesaria para realizar eficientemente la hidrólisis del material.

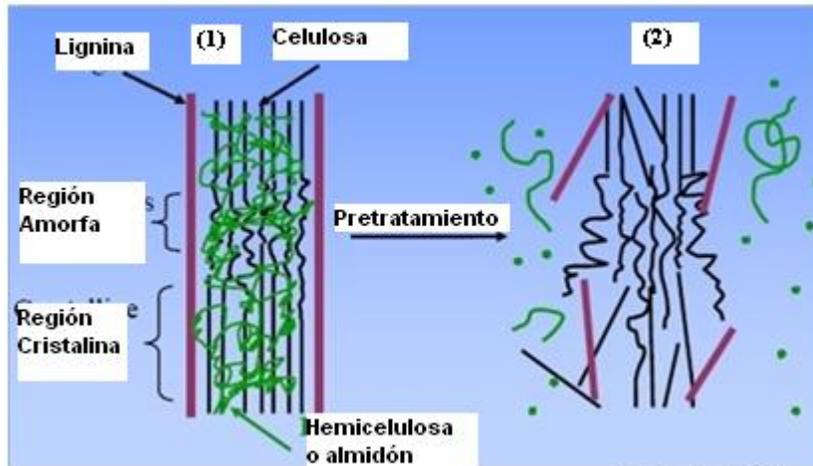


Figura 3-1: Efectos del pretratamiento en el material lignocelulósico.

Un pretratamiento debe tener las siguientes características [20]:

- (1) Mejorar la digestibilidad de la celulosa y la hemicelulosa en la posterior hidrólisis enzimática
- (2) Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos
- (3) Evitar la formación de subproductos inhibidores para los procesos posteriores, hidrólisis enzimática y fermentación de azúcares.
- (4) Ser costo-efectivo.

Tomando en cuenta los puntos anteriores, la literatura reporta cuatro tipos principales de pretratamientos según la forma de atacar al material lignocelulósico. Estos son: pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos.<sup>5</sup>

A continuación se describen los pretratamientos con ácido diluido, alcalino diluido y el de líquidos iónicos.

---

<sup>5</sup> Para una mayor información sobre los otros métodos de pretratamientos consultar Anexo C.

### 3.2 Hidrólisis con ácido diluido

La hidrólisis con ácido diluido es un método viejo (1819) y fue utilizado durante la Segunda Guerra Mundial en Alemania. En la actualidad, la hidrólisis con ácido diluido se usa comúnmente como un pretratamiento anterior a la hidrólisis enzimática [7].

El pretratamiento químico con ácido sulfúrico diluido ha sido reportado por sus altas tasas de reacción y por su efectiva hidrólisis de la celulosa [20]. A una temperatura moderada la sacarificación tiene bajos rendimientos. A altas temperaturas el tratamiento con ácido diluido favorece la hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del 80% de la hemicelulosa. La lignina no se solubiliza pero si aumenta los rendimientos de la hidrólisis enzimática. Está documentado que la producción de altas conversiones de xilano a xilosa hace el proceso económicamente favorable [20].

Existen dos condiciones típicas del pretratamiento con ácido diluido: (1) altas temperaturas (entre 160-200°C), en un proceso continuo con bajas cargas de sólido (5-10% peso sustrato/peso mezcla) o (2) bajas temperaturas (120-160°C), en un proceso con alta carga de sólidos (10-40%). La hidrólisis con ácido diluido ha sido exitosamente probada en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos como desechos de maíz, bagazo de caña, madera y astillas de álamo, paja de trigo y pasto. Ésta utiliza  $H_2SO_4$ , HCl,  $HNO_3$  entre 1-5% [20, 22-26]. Las variables comúnmente estudiadas son la temperatura, la concentración del ácido y la razón sólido/líquido [27].

El pretratamiento con ácido diluido aumenta significativamente la hidrólisis de la celulosa, pero el costo es usualmente más alto que el de algunos pretratamientos fisicoquímicos, como la explosión a vapor o AFEX (explosión de fibra con amonio). Se debe neutralizar el pH para la hidrólisis enzimática y la fermentación aguas abajo [28]. Es por esta razón que la hidrólisis con ácido diluido se ha vuelto impopular.

Las investigaciones sugieren el uso de reactores flujo pistón, reactores de percolación, reactores progresivos batch/percolación, reactores contra y co-corriente, además de indagar en la cinética de la reacción para conocer los rangos de uso de parámetros como temperatura y concentración de ácido [5].

### 3.3 Hidrólisis alcalina

El uso de este pretratamiento depende del contenido de lignina en el material. El mecanismo de la hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces de ester que atraviesan los xilanos en la hemicelulosa y otras componentes como la lignina y otra hemicelulosa. Así, el tratamiento con NaOH diluido aumenta el área superficial y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad por la remoción de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos [20].

Según Musatto [29], al utilizar el método de la hidrólisis alcalina en una muestra no tratada de grano de cerveza con un contenido de lignina del 28%, se produce un aumento del rendimiento de glucosa y celobiosa en 3,5 veces. Las condiciones óptimas de uso de este pretratamiento son una solución al 5% (p/v) de NaOH al 2% (p/v) a 120°C por 90 minutos.

La literatura reporta que la digestibilidad de las maderas duras tratadas con NaOH aumenta de un 14% a un 55% con una remoción de lignina del 24-55%, con un contenido inicial del 20%. Para maderas blandas (contenido de lignina mayor al 26%) el método no es tan efectivo [20].

### 3.4 Líquidos iónicos (IL's)

Los líquidos iónicos son sustancias líquidas formadas exclusivamente por iones. El ejemplo más común es la sal, cloruro sódico, que a temperatura ambiente es sólida, pero si se calienta por encima de su punto de fusión, 800°C, se fundirá y se convierte en un líquido que sigue teniendo su carácter iónico. Sin embargo, cuando se disuelve un cristal de sal en agua se obtiene una solución iónica, es decir iones que se rodean por un número determinado de moléculas de agua [30].

Los líquidos iónicos son sales que permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, incluida la temperatura ambiente (room temperature ionic liquids, RTIL's) [31]. Obviamente, estos líquidos iónicos están constituidos por un catión y un anión, por lo que las combinaciones posibles son muy elevadas. Una estimación realizada indica una cifra de un trillón de posibilidades. Las propiedades físicas y químicas que posean estos líquidos son función de la naturaleza del tipo del catión y del anión, lo cual permite seleccionarlos de acuerdo con las aplicaciones. Muchos de los IL han sido desarrollados para

problemas específicos. Por esta razón, los líquidos iónicos se han denominado los “solventes de diseño” (designer solvents) [31].

Entre las propiedades interesantes para la aplicación industrial se encuentran [30]:

- (1) Alta conductividad iónica.
- (2) Una tensión de vapor prácticamente nula, es decir, no se evaporan y son difícilmente inflamables, se mantienen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, con alta estabilidad térmica, que en muchos casos supera los 300°C. Por encima de esta temperatura suelen descomponerse.
- (3) Poseen un alto poder disolvente con distintas materias orgánicas e inorgánicas, dentro de un amplio espectro de sustancias, desde carbón hasta plásticos, metales e incluso, rocas.

### 3.4.1 La disolución de celulosa en líquidos iónicos

Como se señaló en el punto 3.4, los líquidos iónicos son unos solventes prometedores por su gran poder disolvente. Por esta razón nace la idea de usar los IL en la disolución de celulosa. El mecanismo de disolución de la celulosa se presenta a continuación:

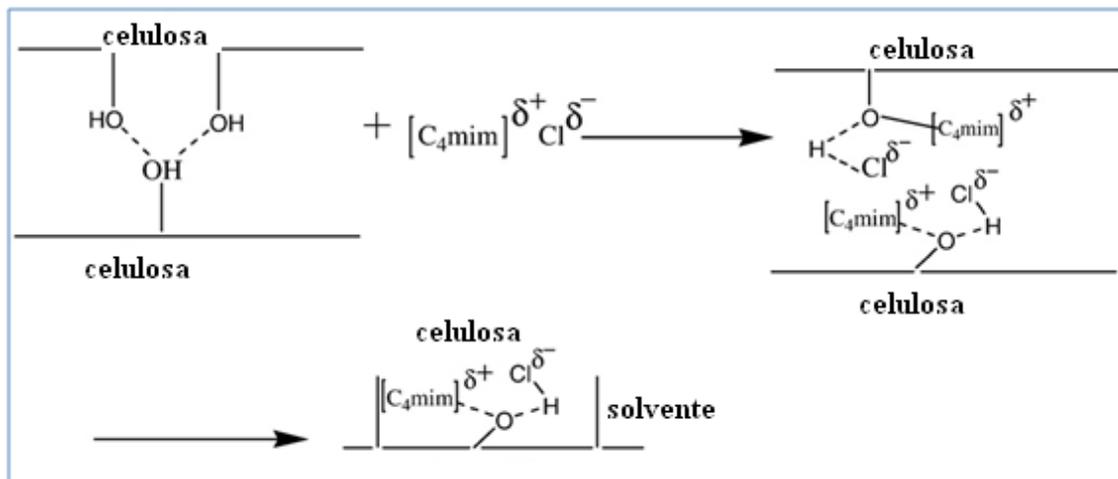


Figura 3-2: Mecanismo de disolución de celulosa en líquidos iónicos (Adaptación de [32]).  
 $[C_4mim]^+$  corresponde al anión  $R=CH_3CH_2CH_2CH_2$

Este mecanismo involucra a los átomos de oxígeno e hidrógeno de la celulosa que al interactuar con el líquido iónico, forman el par electrón dador-electrón aceptor (EDA). Para su interacción, los átomos de

celulosa donan un par de electrones y el átomo de hidrógeno actúa como un electrón aceptor. Con esto, los cationes del líquido iónico actúan como electrones aceptores y el anión como electrón dador. Los dos centros deben estar localizados lo suficientemente cerca para permitir la interacción y la formación del complejo EDA. Por la interacción de la celulosa-OH y el líquido iónico, los átomos de oxígeno e hidrógeno forman grupos hidroxilos por separado, rompiendo los enlaces puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa y finalmente la celulosa se disuelve [32].

Entre los líquidos iónicos probados que disuelven celulosa se encuentran:

- N,N-dimetil acetamida/litio clorhidro (DMAc/LiCl)
- Dinitrogen tetroxido/dimetil formamida ( $N_2O_4$ /DMF)
- 1, 3-N-metil-morfolina-N-oxido (NMMO)
- Dimetil sulfoxido/tetrabutylamonio fluor (DMSO/TBAF),
- Sales fundidas hidratadas (como  $LiClO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $LiSCN \cdot 2H_2O$ ) [33]

Sin embargo, estos solventes tienen problemas como su alta toxicidad, la dificultad del reciclado, el alto costo, y la inestabilidad en el uso. Con esta premisa nacieron nuevos IL's como 1-butil-3-metilimidazolio cloro [ $bmim^+$ ] $Cl^-$  y 1-alil-3-metilimidazolio cloro [ $amim^+$ ] $Cl^-$ , que con la adición de temperatura (100-110°C) es capaz de disolver celulosa [34]. Estos líquidos iónicos son capaces de disolver hasta el 10% (p) de celulosa [35]. Entre otros aniones utilizados se encuentra  $Br^-$  y  $SCN^-$ .

Las investigaciones sobre el tema han proporcionado información sobre los fenómenos ocurridos en el proceso:

- 1) El largo de la cadena alquilo lineal imidazol cloro incluido en los IL [ $C_4mim^+$ ] $Cl^-$ , [ $C_6mim^+$ ] $Cl^-$ , [ $C_8mim^+$ ] $Cl^-$ , influye en la solubilidad de la celulosa. Mientras más larga es la cadena, menos soluble se vuelve la celulosa. La solubilidad de los IL mencionados fue 10% y 5% a 100°C, respectivamente [32].
- 2) La solubilidad de la celulosa con distintos grados de polimerización es distinta para el mismo IL. Por ejemplo, la solubilidad para celulosa pura ( $DP \approx 283$ ) y madera de arroz ( $DP \approx 593$ ) a 83°C fueron 18 y 10% respectivamente [32].
- 3) El calor aumenta la solubilidad de la celulosa. La solubilidad de la celulosa ( $DP \approx 1000$ ) aumenta un 25% con calor [32].

### ***3.4.2 Líquidos iónicos como pretratamiento de lignocelulósicos.***

Los líquidos iónicos como pretratamiento de lignocelulósicos se perfilan como un nuevo método de conversión de carbohidratos a azúcares. Esta nueva estrategia de pretratamiento sugiere aumentar la eficiencia (en términos de rendimiento y tasas de reacción) en la sacarificación de biomasa lignocelulósica. Este nuevo pretratamiento tiene un mayor impacto económico en el proceso de producción de azúcares desde biomasa (en comparación con los otros pretratamientos presentes en el mercado).

Es importante recalcar que el objetivo de este pretratamiento es **la extracción de la celulosa desde la biomasa y no la disolución de ésta.**

El pretratamiento de biomasa lignocelulósica con IL contempla las siguientes ventajas [36]:

- a) La capacidad procesar una variedad de biomasa lignocelulósica con IL's, capaz de dejar expuestas la estructura de la celulosa nativa.
- b) La capacidad de usar cargas mayores de biomasa durante la realización del pretratamiento con IL. Según [36] se puede incubar álamo y [emim][Acetato] al 20% peso sin afectar la conversión de xilosa y glucosa.
- c) La capacidad de completar la sacarificación con menor carga de enzimas.
- d) La posibilidad de recuperar fácilmente y reutilizar el líquido iónico en material lignocelulósico.
- e) La capacidad de producir hidrólisis sin compuestos inhibidores aguas abajo para la producción de etanol.
- f) Permite la recuperación de gran parte de la lignina al término de la sacarificación.

Sin embargo, la completa disolución del material lignocelulósico (particularmente maderas) en el IL es difícil, incluso la disolución parcial requiere un alto tiempo de incubación de la biomasa en IL a temperaturas elevadas [36].

Por la razón anterior, el pretratamiento con IL de materiales lignocelulósicos difiere del enfoque clásico de los IL cuyo fin es disolver lignocelulosa, sino más bien la idea es poner en contacto el material y el líquido iónico por un corto tiempo suficiente para romper la pared de lignina y provocar el hinchamiento de la madera.

El pretratamiento con líquido iónico permite realizar la posterior hidrólisis enzimática en un periodo de tiempo menor, y así obtener rendimientos cuantitativos de glucosa y azúcares de pentosa. Cualquier líquido iónico capaz de perturbar el enlace de hidrógeno y que reduce la cristalinidad de la celulosa de la biomasa se puede utilizar en la estrategia de tratamiento previo; entre ellos se encuentra los iones imidazolio, piridinio y fosfonio [36].

Cabe destacar, que posterior a la disolución/disrupción de la celulosa, ésta tiene que ser regenerada con el uso de anti-solventes (como acetona o agua) [35,37]. La razón es que un líquido iónico del tipo [Cation]-Cl desactiva la celulasa e induce a la enzima a pérdida de actividad y denaturación por acción de la deshidratación [38].

Por último, según Varanasi [36] el líquido iónico puede ser recuperado desde el lavado con solventes y desde cualquier biomasa a través de métodos de separación como: carbón activado, destilación, separación con membranas, técnicas electroquímicas de separación, extracción de fase sólida y extracción líquido-líquido. El líquido iónico puede ser reciclado para incubar nuevamente biomasa. Con altas conversiones de polisacáridos en azúcares monoméricos, la enzimas pueden potencialmente ser recuperadas desde el reactor de sacarificación y recicladas. Por último, no es necesaria una completa remoción del solvente de lavado para que el IL sea reciclado. Con esto, Varanasi [36] propone el siguiente esquema de proceso:

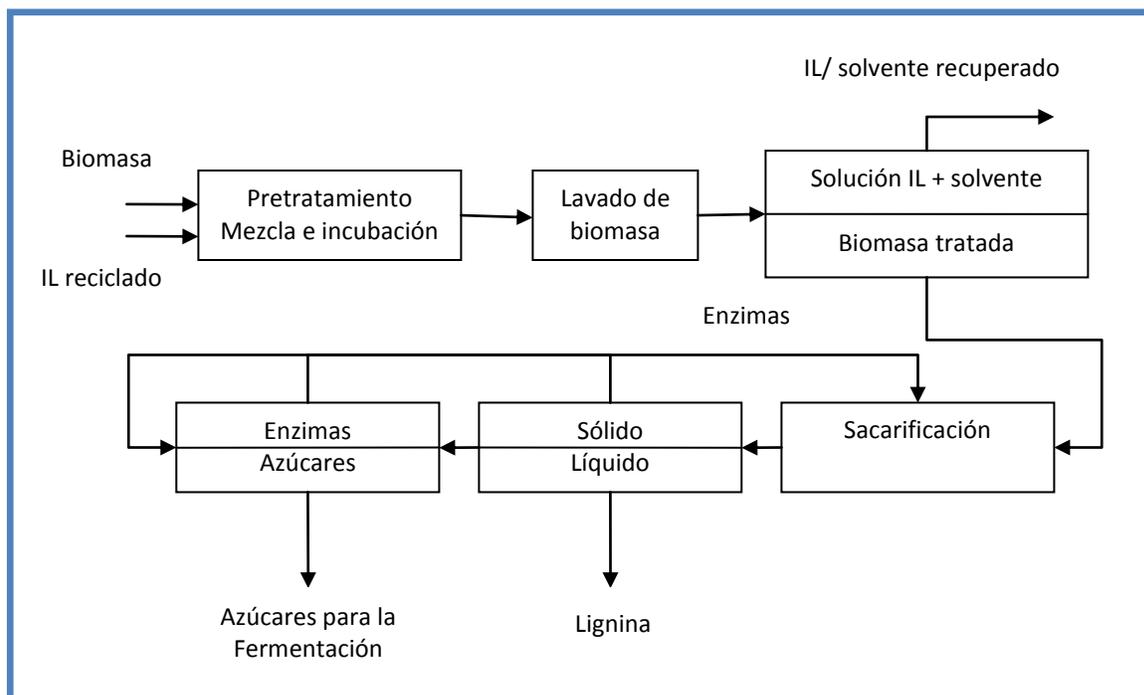


Figura 3-3: Proceso propuesto por Varanasi para la obtención de azúcares con un pretratamiento con líquido iónico [36].

### 3.5 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada a cabo por enzimas celulasas que poseen una alta especificidad. Los productos de la hidrólisis son en su mayoría pentosas y hexosas, incluida la glucosa, que pueden ser fermentadas por levaduras o bacterias a etanol. Las condiciones de uso de la hidrólisis enzimática son suaves (pH 4,8 y temperatura entre 45-50°C) [26,28] y no posee el problema de la corrosión.

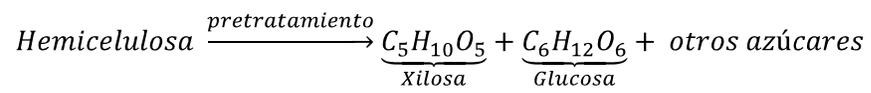
Bacterias y hongos son capaces de producir celulasas para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos y otros. Estos microorganismos pueden actuar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Algunos microorganismos capaces de producir celulasas son las bacterias del género *Clostridium*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces*. Las celulasas comerciales están centradas en hongos como *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* [20].

Las celulasas son usualmente una mezcla de varias enzimas. Al menos tres grupos de celulasas están involucradas en el proceso de hidrólisis:

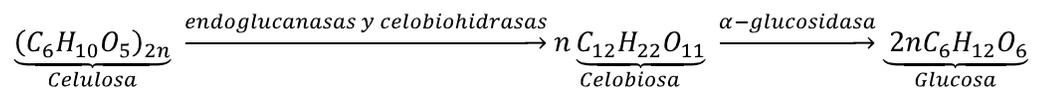
- (1) Endoglucanasas: estas atacan las regiones internas de baja cristalinidad en las fibras de celulosa, creando cadenas libres de enlaces.
- (2) Exoglucanasas o celobiohidrasas: degradan las moléculas por la eliminación de unidades de celobiosa desde los extremos de las cadenas.
- (3)  $\beta$ -glucosidasas: hidrolizan celobiosa para producir glucosa.

Además de estos tres grupos principales de enzimas celulasas existen otras enzimas que atacan la hemicelulosa como las glucoronidasas, acetilsterasas, xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, galactomanasas y glucomanasas.

El proceso se puede representar estas ecuaciones [39]:



**Ecuación 3.1**



**Ecuación 3.2**

## SUBPRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

*En este Capítulo se describe los principales subproductos de la hidrólisis de la biomasa y los principales inhibidores en el proceso de producción de etanol.*

Como se mencionó en el Capítulo 3, ciertos pretratamientos presentan la generación de subproductos, algunos de estos son tóxicos para los microorganismos, incluida las levaduras [40]. Estos inhibidores disminuyen el rendimiento y la producción de etanol. Investigaciones en el tema se han dedicado a resolver el problema de los inhibidores, por ejemplo, convirtiendo los materiales tóxicos en otros compuestos menos tóxicos para las levaduras o aumentando la tolerancia de ésta.

En la Figura 4-1 se presentan algunas de las reacciones ocurridas durante la hidrólisis de lignocelulósicos.

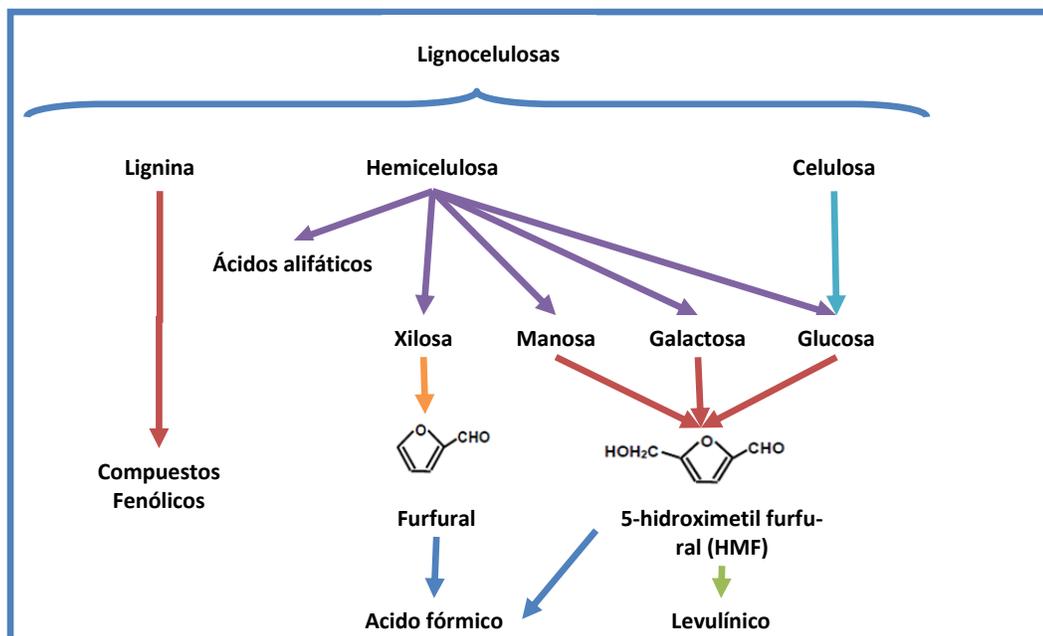


Figura 4-1: Algunas reacciones secundarias ocurridas durante la hidrólisis de lignocelulósicos. (Obtenido de [7])

Celulosa, hemicelulosa y lignina pueden romper sus enlaces para formar glucosa, xilosa, manosa, galactosa y compuestos fenólicos respectivamente (Figura 4-1). De los monómeros producidos, algunos de ellos se puede descomponer durante el proceso y formar compuestos como 5-hidroximetil furfural (HMF) desde las hexosas, y furfural desde las pentosas. HMF y furfural pueden también descomponerse en ácido levulínico y ácido fórmico. Más aún, el ácido acético es liberado desde los grupos acetilo contenidos en la hemicelulosa y también se pueden liberar compuestos fenólicos desde la lignina [7].

#### **4.1 Ácidos orgánicos.**

En el método de hidrólisis con ácido diluido se genera un gran número de ácidos alifáticos que son originados desde los extraíbles de madera, la degradación de la lignina y la degradación del azúcar desde la hemicelulosa (Ver Figura 4-1) [40]. De éstos, el ácido acético es el mayor constituyente y se produce por la degradación del grupo acetil en los polisacáridos; en cambio, el ácido levulínico y el ácido fórmico son productos de la degradación de azúcares como manosa, galactosa y fructosa (ver Figura 4-1)

Se producen también algunos tipos de ácidos grasos como ácido hexadecanoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido oleico y ácido octadecanoico que en su mayoría provienen desde los extraíbles de la madera. Además, se tienen ácidos alifáticos como ácido 2-metil-2-hidroxi-butanoico, ácido metil propanodioico y ácido metil butanodioico [40]. En términos de concentración estos últimos ácidos son menos importantes, ya que no afectan considerablemente a la levadura en la fermentación alcohólica.

#### **4.2 Compuestos fenólicos**

Entre los compuestos fenólicos reconocidos se encuentran 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxiacetofenona, vanilina, acetovanilina, ácido ferúlico, ácido vanilínico y ácido 4-hidroxibenzoico [40].

Hay compuestos que son liberados mayormente por la degradación de la lignina. Estos son los aldehídos fenólicos, el cual se reconoce como el mayor inhibidor de la fermentación [7].

### 4.3 Compuestos furanos

Furfural y 5-hidroximetil furfural (HMF) son productos de la descomposición de pentosas y hexosas, respectivamente (ver Figura 4-1). Se ha reportado que el furfural es un fuerte inhibidor de la *S. cerevisiae*. Una concentración de furfural de 1 g/l puede disminuir significativamente la tasa de crecimiento (liberación) de CO<sub>2</sub> y el número de células totales en la fase de fermentación [41].

HMF afecta la fermentación de forma similar que el furfural. Estudios reportan que la adición de 4 g/L de HMF disminuye en un 32% la tasa de producción CO<sub>2</sub>, la producción de etanol disminuye en un 40% y la tasa específica de crecimiento disminuye en un 70% [40]. Cabe señalar que el efecto inhibitor del HMF es menor que el furfural. Por otro lado, la tasa de conversión del furfural es mucho más rápida que la del HMF, dado que la primera viene desde las pentosas y el segundo desde las hexosas.

### 5.1 Objetivo General

- Comparar los pretratamientos de **hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina** y el uso de **líquidos iónicos**, bajo sus mejores condiciones de operación, para la producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos forestales.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Determinar las mejores condiciones de operación del pretratamiento de hidrólisis ácida y alcalina, variando tiempo de reacción y concentración de ácido, para el procesamiento de residuos de *Nothofagus pumilio* (Lenga) y *Eucalyptus globulus* (Eucalipto).
- Determinar las mejores condiciones de operación del pretratamiento con líquidos iónicos, variando tiempo, temperatura de reacción y tipo de líquido iónico, para el procesamiento de residuos de *Nothofagus pumilio* (Lenga) y *Eucalyptus globulus* (Eucalipto).
- Determinar la digestibilidad de la celulosa posterior a cada pretratamiento y en la hidrólisis enzimática a través de la cuantificación de glucosa y xilosa, para así diseñar la mejor estrategia de fermentación de los azúcares obtenidos y para determinar la eficiencia de cada pretratamiento.
- Comparar los rendimientos obtenidos de los procesos de pretratamiento en base a la producción de azúcares reductores, glucosa y xilosa desde los residuos forestales utilizados.

# PARTE II

## METODOLOGÍA

---

### CAPÍTULO 6: ETAPAS DEL TRABAJO

#### MATERIALES

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

LÍQUIDOS IÓNICOS

ENZIMAS

#### MÉTODOS

SECADO Y DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL MATERIAL

PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA

DETOXIFICACIÓN DEL ÁCIDO HIDRÓLIZADO

PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ALCALINA

PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (IL'S)

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

DETERMINACIÓN DE XILOSA Y GLUCOSA

ANÁLISIS DE MONOSACÁRIDOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

MODELAMIENTO DE LOS PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

---

## ETAPAS DEL TRABAJO

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Material lignocelulósico

Como material lignocelulósico se utilizaron dos maderas duras:

- a) Astillas de madera de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) procedentes de una planta de astillado ubicada en la V Región, cuya edad aproximada es 15 años y los árboles fueron talados hace 6 meses desde el comienzo del estudio. Se empleó tamaño de pinchips de dimensiones 1 mm de espesor, 2 cm de ancho y 2-4 cm de largo (ver Figura 6-1 a). Eucalipto corresponde a un subproducto del proceso de astillado, previo a un tamizado cuyo fin es homogeneizar el sustrato.
- b) Madera de Lengua (*Nothofagus pumilio*), con un tamaño inicial de chip (2 mm espesor, 2-3 cm ancho y 2-4 cm largo), provenientes de un aserradero ubicado en el sector de Santa Alicia, Tierra del Fuego, XII región. La edad de los árboles utilizados son 60 años y fueron talados hace 6 meses desde que se inició el estudio. Para la molienda se utilizó un molino de martillo marca Condux Werk modelo LHM 20116. Posteriormente se emplea un tamiz de 3 mm quedando el material con tamaño de pin-chips, cuya granulometría aproximada de cada partícula es de 1-2 mm de espesor, 1-3 mm de ancho y 5-7 mm de largo, con una densidad aparente de 156 kg/m<sup>3</sup> y con un contenido de humedad del 10 al 15%.

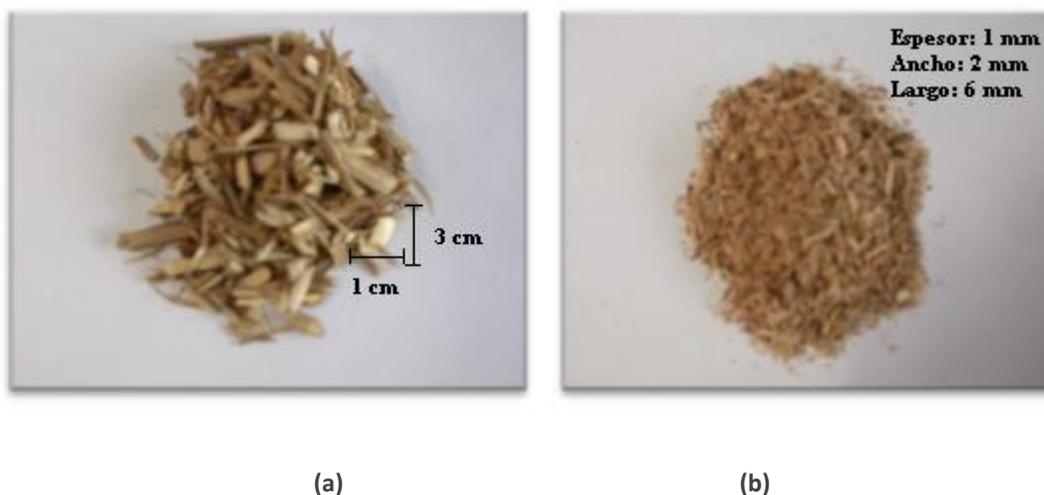


Figura 6-1: Residuos lignocelulósicos utilizados en el estudio. (a) Eucalipto, (b) Lengua. Se observa la diferencia de tamaño entre materias primas utilizadas.

### 6.1.2 Líquidos iónicos

Se utilizaron los líquidos iónicos 1-etil-3-metilimidazolio  $[\text{emim}]^+ [\text{Cl}]^-$  y metiltrioctilamonio hidroxilo  $[\text{A336}]^+ [\text{OH}]^-$ .  $[\text{emim}]^+ [\text{Cl}]^-$  es un producto comercial de la empresa Merck (Merck KGaA, Germany) y  $[\text{A336}]^+ [\text{OH}]^-$  fue preparado desde el producto comercial Aliquat 336<sup>®</sup> (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany), a través de la metátesis de aniones con KOH. En resumen, el procedimiento de preparación fue el siguiente: Aliquat 336<sup>®</sup> seco se disolvió en triclorometano, cloroformo y tabletas secas KOH en exceso (1,1:1 mol: mol). El sistema se colocó en vacío y se agitó durante 24 horas, resultando un intercambio de iones entre el cloruro e hidróxido. El precipitado sólido de KCl fue filtrado y el residuo del solvente diclorometano fue evaporado bajo condiciones de vacío.

Por último cabe señalar las precauciones en el manejo del IL  $[\text{emim}]^+ [\text{Cl}]^-$ . Dado que el IL absorbe la humedad ambiental, conviene trabajar en condiciones sin humedad, generalmente bajo campana y bajo un exceso de gas argón.

### 6.1.3 Enzimas

Se utilizaron celulasas comerciales que incluyen Celluclast 1.5 L (Novo Co., Denmark) y Novozyme 188 (Novo Co., Denmark).

Celluclast 1.5 L en una preparación de enzimas de *Trichoderma reesei*. Posee más de un tipo de endocelulasa, exocelulasa y  $\beta$ - glucosidasas

Novozym 188 es una preparación de celulasas de *Aspergillus niger*. Además posee  $\beta$ - glucosidasas adicionales.

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Secado y determinación del porcentaje de humedad del material

El secado se realizó a través de un horno marca Gallenkamp durante 24 horas a 48°C, para después calcular la pérdida de masa. Así el porcentaje de humedad es calculado según:

$$\%humedad = \frac{masa\ inicial - masa\ final}{masa\ inicial} \cdot 100$$

Ecuación 6.1

El secado de muestras para pretratamiento con líquidos iónicos se realizó en un liofilizador (ver Anexo D, Figura D-5) durante 1 día.

## 6.2.2 Pretratamiento de hidrólisis ácida

En primer lugar se presenta la metodología utilizada en el pretratamiento de hidrólisis ácida

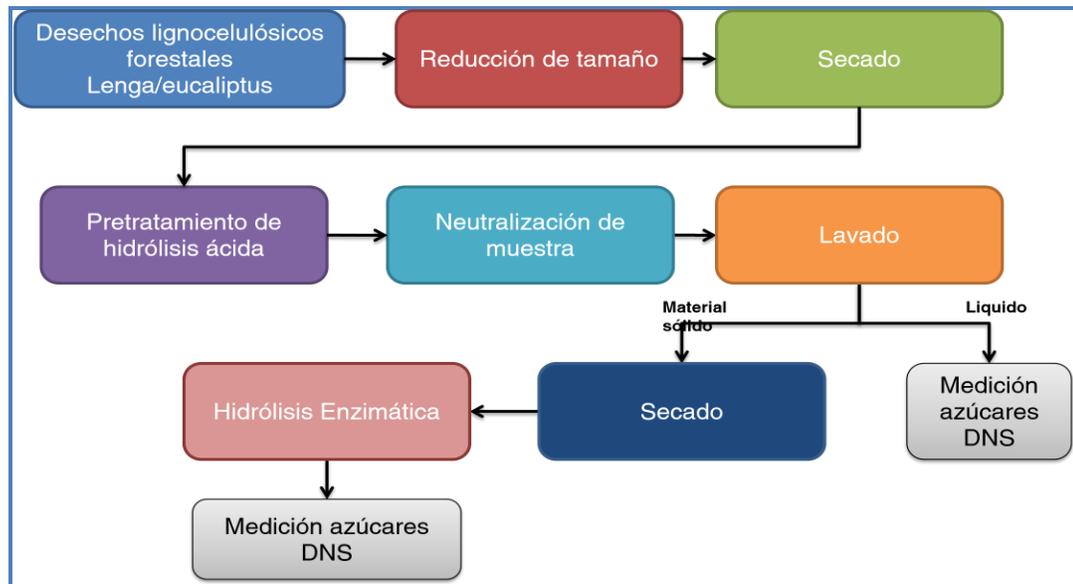


Figura 6-2: Metodología utilizada en el pretratamiento de hidrólisis ácida.

En un tubo Falcon de 50 ml se agregaron en una razón 1:10 (peso) el material a tratar y ácido sulfúrico a distintas concentraciones de (0; 0,75%; 1%; 1,25% (v/v)). Para realizar la hidrólisis se dispuso de un autoclave que alcanzaba una temperatura fija de 121°C (la temperatura y presión no fueron monitoreadas). Se adicionó al autoclave un volumen de 1,5 L de agua destilada, las muestras se cerraron, se dispuso el sistema experimental dentro de una campana evacuadora de gases y se calentó el sistema mediante mechero. En el momento en que el agua destilada comenzó a hervir, se midió el tiempo de operación variable según experiencia (30 o 60 minutos). Cuando ha transcurrido el tiempo deseado se apagó el mechero y se enfrió el autoclave, para ello se utilizó un baño de hielo. Se extrajeron las muestras y se colocaron en un baño de hielo para detener la reacción. Se procuró observar el estado del agua destilada dentro del autoclave, puesto que si ella posee un color amarillo naranja es porque se han perdido azúcares por derrame o evaporación y conviene repetir la experiencia. Las experiencias se realizaron en triplicado. Las fotografías del montaje experimental se encuentran disponibles en el Anexo D.

### 6.2.3 Detoxificación del ácido hidrolizado

En el momento que la muestra alcanzó la temperatura ambiente se vació en un vaso de 250 ml y mediante agitación se neutralizó con hidróxido de sodio 2M hasta alcanzar un pH entre 8 y 11. Posteriormente se realizó la filtración del material sólido remanente y el lavado del mismo con 50 ml de agua destilada y un equipo de filtrado al vacío. Los filtros utilizados fueron de fibra de vidrio 0,2  $\mu\text{m}$ . El material sólido se dispuso en placas Petri y llevado a la estufa donde se realizó el secado del material durante 1 día a 48°C. El sobrenadante fue aforado a un volumen conocido, de preferencia en matraces de 100 ml. De este volumen se tomó una alícuota de 2 ml y se almacenó en tubos Ependorf a 4 °C.

### 6.2.4 Pretratamiento de hidrólisis alcalina

La Figura 6-3 presenta un esquema de la metodología de hidrólisis alcalina.

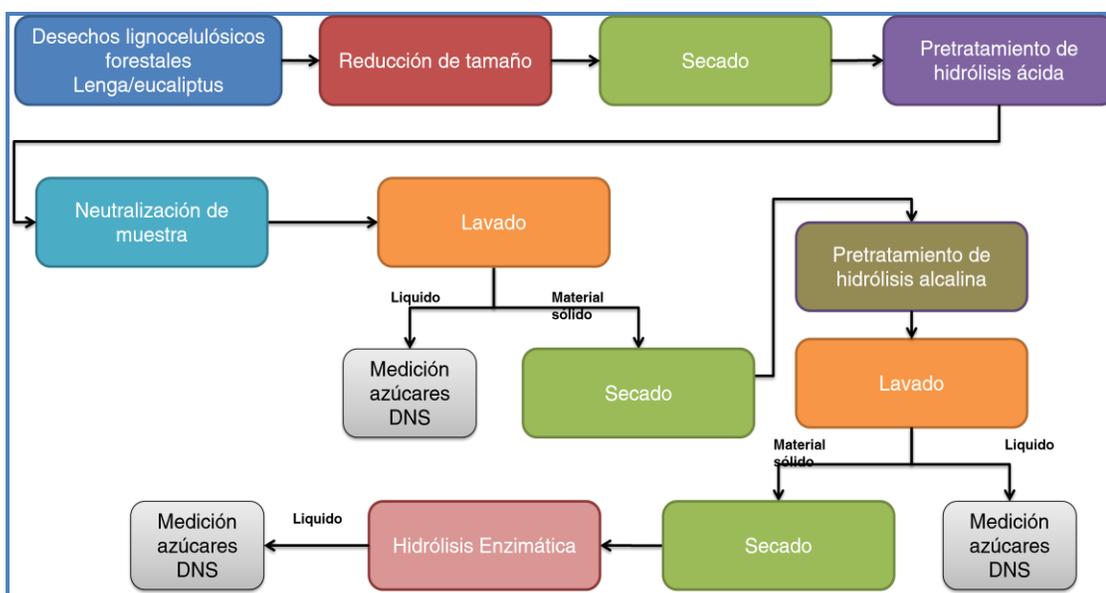


Figura 6-3: Metodología utilizada en el pretratamiento de hidrólisis alcalina

En tubos Falcon de 15 ml se colocó el material seco (tratado anteriormente con ácido diluido) e hidróxido de sodio al 2% (p/p). La razón del material lignocelulósico y el NaOH es 1:20 (peso). Se repitieron los pasos señalados en el punto 6.2.2 por un tiempo de 60 minutos. Todas las experiencias se realizaron en duplicado.

### 6.2.5 Pretratamiento con líquidos iónicos (IL's)

La Figura 6-4 presenta la metodología utilizada en el pretratamiento con líquidos iónicos.

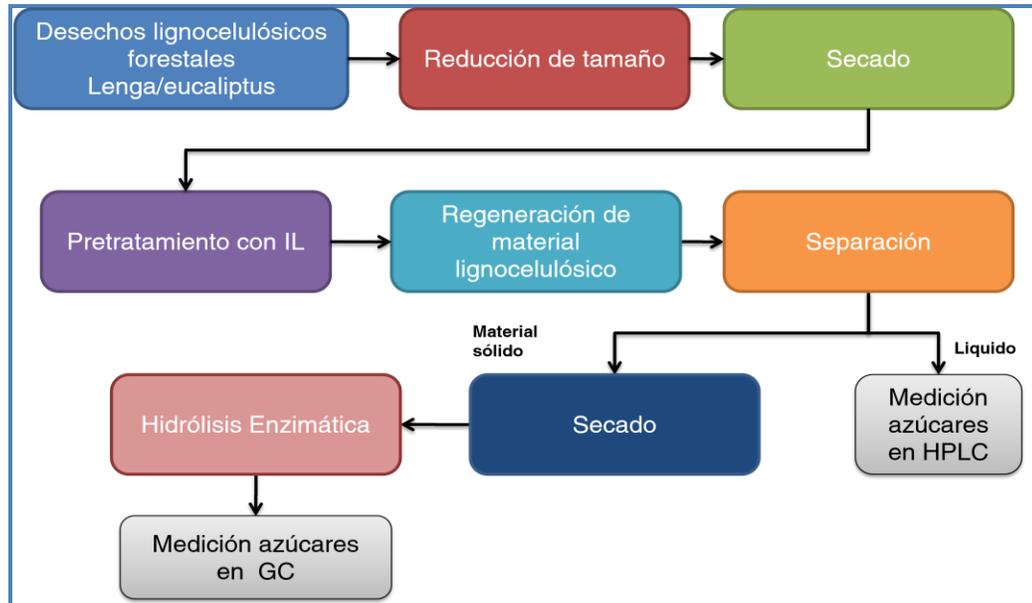


Figura 6-4: Metodología utilizada en el pretratamiento con líquidos iónicos. Cabe señalar que la medición de azúcares de la fracción líquida mediante HPLC si se realizó, pero dadas las especificaciones del equipo no se obtuvieron resultados. Por esto, las muestras fueron medidas nuevamente mediante el método DNS.

Se colocó en tubos de ensayo de 10 ml el líquido iónico y material lignocelulósico en una razón 1:20 peso. Los tubos se ubicaron en un baño de aceite con un calentador controlado por una termocupla. Se trabajó a distintas temperaturas (80°C, 121°C, 150°C y 170°C) y tiempos de residencia (30 y 60 minutos). Cuando el tiempo de reacción cumplió se sacaron los tubos de ensayo del baño de aceite, se agregaron 5 ml de agua desionizada, se agitaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente el material sólido fue filtrado, regenerado y lavado con 50 ml de agua destilada y un equipo de filtrado al vacío. El sólido se liofilizó. Todas las experiencias se realizaron en triplicado. En el Anexo D se presentan las imágenes de los equipos y montajes experimentales utilizados.

### ***6.2.6 Hidrólisis enzimática***

Para la sacarificación se utilizó un complejo enzimático de celulasas comerciales: Celulasa (Celluclast C2730 Sigma de Novo), compuestas por endo- $\beta$ -glucanasas, exo- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasa (Novozyme, C6105 Sigma).

Una suspensión de 100 mg de materia prima tratada a una razón de 1:20 fue incubada en una solución buffer acetato de sodio (50 mM, pH 4,8) a temperatura entre 47 y 50°C bajo agitación (150 rpm). La actividad medida de la celulasa fue 85 FPU/ml y la de  $\beta$ -glucosidasa fue 916 CBU/ml.

La reacción fue iniciada cuando se agregó en relación a cada gramo de material seco cargado en la hidrólisis ácida las siguientes cantidades de enzima: 1,2 ml de celulasa y 0,16 ml de  $\beta$ -glucosidasa, que corresponden a 102 FPU/g y 147 CBU/g respectivamente.

La reacción se mantuvo por 72 horas y se tomaron muestras de 20  $\mu$ l cada 6, 24, 48 y 72 horas para la determinación de monosacáridos y la concentración de azúcares reductores. Las experiencias se realizaron en triplicados.

### ***6.2.7 Determinación de azúcares reductores***

La concentración de azúcares reductores en la fracción líquida de todos los pretratamientos y la hidrólisis enzimática del pretratamiento ácido y alcalino se midió con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar [42]. El protocolo se encuentra disponible en el Anexo E.

### ***6.2.8 Determinación de xilosa y glucosa***

Para la determinación de xilosa y glucosa se utilizó un sistema comercial de ensayo de D-Xilosa marca Megazyme y un sistema comercial de ensayo GLuc-Pad marca Randox, respectivamente.

### ***6.2.9 Análisis de monosacáridos en líquidos iónicos***

Para el análisis de monosacáridos se utilizó cromatografía de gases (GC), con un instrumento marca Perkin-Elmer AutoSystem XL. El análisis fue hecho en una columna de 20 mm × 0,199 mm (J&W HP-1) con un espesor de película de 0,11 µm. Los parámetros de la cromatografía son los siguientes: 100°C, 8 min, elevada a 2°C/min a 170°C y elevada a 12°C/min a 300°C (10 min); inyector divisor (25:1), 250 °C; FID detector, 310 °C; volumen de inyección, 1 µL. El gas utilizado es hidrógeno (45 mL/min, presión: 14 psi). El análisis de GC fue realizado posterior a una silanización de las muestras (método de análisis sin metanólisis de ácido o hidrólisis ácida). Xilitol fue utilizado como estándar.

### ***6.2.10 Análisis estadístico***

El análisis estadístico comprende un ANOVA factorial, ANOVA simple, contraste múltiple de rangos y probabilidad acumulada con el software EXCEL y STATGRAPHICS Plus 5.1.

### ***6.2.11 Modelamiento de los perfiles cinéticos en la hidrólisis enzimática***

El modelamiento de los perfiles cinéticos en la hidrólisis enzimática comprende el ajuste los datos obtenidos a modelos conocidos. Para ello se utilizó el Software CurveExpert 1.4.

# PARTE III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### CAPÍTULO 7: PRETRATAMIENTO CON HIDRÓLISIS ÁCIDA Y POSTERIOR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

EFFECTO DE UN PRETRATAMIENTO CON HIDRÓLISIS ÁCIDA

EFFECTO DEL TIEMPO Y LA CONCENTRACION DE ÁCIDO SULFÚRICO EN EL PRETRATAMIENTO

COMPOSICION DE GLUCOSA Y XILOSA EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA DEL PRETRATAMIENTO ÁCIDO

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN BIOMASA PRETRATADA EN CONDICIONES ÁCIDAS

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ÁCIDO SULFÚRICO Y TIEMPO DE REACCIÓN

COMPOSICIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA LIBERADAS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

COMPARACIÓN DE MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS Y CONVERSIÓN TOTAL DEL PROCESO CONSIDERANDO LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TEÓRICOS

PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO PRETRATADO CON ÁCIDO DILUIDO

EFFECTO DE UN PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ALCALINA POSTERIOR A UN PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ÁCIDA

AZÚCARES REDUCTORES LIBERADOS EN EL PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ALCALINA

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRETRATADA EN CONDICIONES ALCALINAS

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ÁCIDO SULFÚRICO Y TIEMPO DE REACCIÓN

COMPOSICIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA LIBERADAS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

COMPARACIÓN DE MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS Y CONVERSIÓN TOTAL DEL PROCESO CONSIDERANDO LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TEÓRICOS

PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

### CAPÍTULO 8: PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (IL'S) Y POSTERIOR TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

EFFECTO DEL LÍQUIDO IÓNICO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN EN LOS AZÚCARES LIBERADOS POR LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

CONVERSIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA RESPECTO A LOS AZÚCARES TEÓRICOS

AZÚCARES REDUCTORES EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA DEL PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDO IÓNICO

GENERACIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES EN EL TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

PERFILES CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

### CAPÍTULO 10: COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS

### CAPÍTULO 11: CONCLUSIONES

## PRETRATAMIENTO CON HIDRÓLISIS ÁCIDA Y POSTERIOR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

*Este Capítulo presenta los resultados y discusiones obtenidas al realizar un pretratamiento con ácido diluido y posterior sacarificación del material sólido remanente. El objetivo del pretratamiento es aumentar la digestibilidad de la celulosa que es hidrolizada mediante enzimas celulasas, para la obtención de azúcares que pueden ser fermentados para producir etanol.*

*Este Capítulo además presenta los resultados y discusiones obtenidas al realizar un pretratamiento alcalino posterior al pretratamiento con ácido diluido. El objetivo es incrementar las tasas de sacarificación de la hidrólisis enzimática en comparación al realizar solo el tratamiento con ácido diluido.*

### 7.1 Efecto de un pretratamiento con hidrólisis ácida

Para el estudio del pretratamiento con ácido diluido se utilizó Lenga y Eucalipto en 10 condiciones diferentes (Gráfico 7-1 y Gráfico 7-2). Estas condiciones se presentan en la Tabla 7-1:

**Tabla 7-1: Condiciones de pretratamiento con hidrólisis ácida**

Serie	Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [%v/v]	Tiempo de reacción [min]	Temperatura de operación [°C]
A1	0,5	30	121
B1	0,75	30	121
C1	1,0	30	121
D1	1,25	30	121
A2	0,5	60	121
B2	0,75	60	121
C2	1,0	60	121
D2	1,25	60	121
Blanco 1	1,0	60	20
Blanco 2	0	60	121

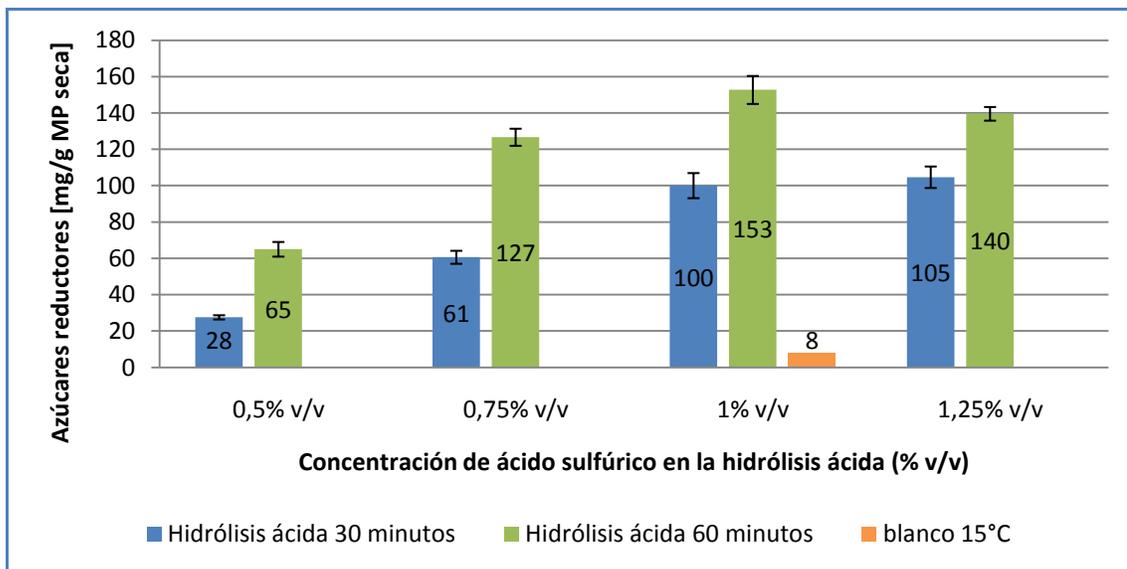
Posterior al pretratamiento se realizó la detoxificación de la solución obtenida, el lavado, filtrado y secado del material sólido remanente. Finalmente al sólido obtenido se le realizó una hidrólisis enzimática por 72 horas donde se determinó y analizó el tipo de azúcares presentes y su posible método de fermentación. A estos resultados además se les realizó un análisis estadístico de ANOVA factorial, ANOVA simple, contraste múltiple de rangos y probabilidad acumulada con el software EXCEL y STATGRAPHICS Plus 5.1, para analizar si los resultados presentan diferencias estadísticas significativas entre condiciones en la hidrólisis ácida y la sacarificación enzimática.

#### ***7.1.1 Efecto del tiempo y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento***

Para Lengua, los resultados se encuentran disponibles en el Gráfico 7-1; en primer lugar, el blanco realizado fue a temperatura ambiente, con una concentración de ácido sulfúrico del 1% (v/v) por 1 hora y se analizó solo una muestra. Esta muestra obtuvo 8 mg/g materia prima seca cargada, muy inferior al mínimo de azúcares reductores obtenidos al agregar temperatura (120°C) a la reacción (28 mg/g MP; 0,5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Por otro lado, al aumentar la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aumenta la liberación de azúcares reductores en el pretratamiento alcanzándose un máximo al 1% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en ambos tiempos de reacción (30 y 60 minutos). Con ello, se puede deducir que una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mayor a 1% (v/v) no libera una mayor cantidad de azúcares reductores o existe una degradación de azúcares a otros productos como furfural o HMF. Cuando se comparan tiempos de reacción se tiene que en todas las concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a un mayor tiempo de exposición, mayores son las concentración de azúcares reductores obtenidos. Un caso especial es 0,75% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el cual dobla la cantidad de azúcares reductores obtenidos (61 sobre 127 mg/g) al aumentar el tiempo de exposición de 30 a 60 minutos.

Gráfico 7-1: Comparación de azúcares reductores obtenidos en un pretratamiento con ácido diluido para LENGA a distintos tiempos de exposición y concentración de ácido sulfúrico.



Del estudio estadístico, en base a los p-valores, se desprende que los tres factores (temperatura, tiempo y concentración de ácido sulfúrico) tienen efecto estadísticamente significativo en la hidrólisis ácida de Lengua; además el cociente-F indica que el factor preponderante en la reacción es el **tiempo de reacción** (detalles disponibles en Anexo F).

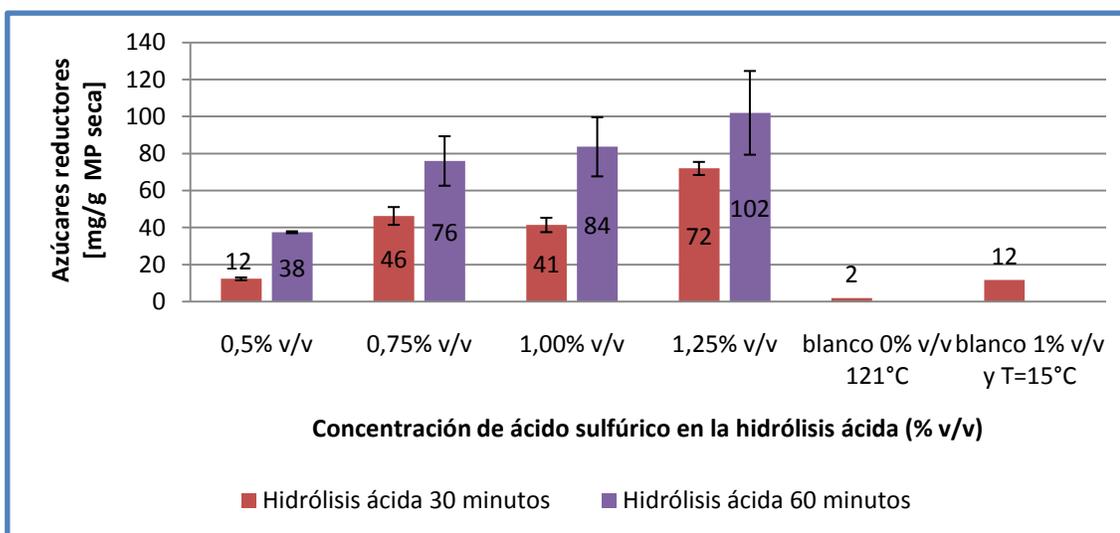
El análisis probabilístico muestra que para el mejor caso estimado por un análisis de probabilidad acumulada (considerando que los datos siguen una distribución normal) es para una concentración de  $H_2SO_4$  1% (v/v) y 60 minutos de reacción (caso C2), con una probabilidad del 99,25%. Este valor además representa un grupo no homogéneo. Así, según lo comentado anteriormente, el mejor caso encontrado considerando los valores obtenidos y el análisis probabilístico realizado es con una **concentración de  $H_2SO_4$  del 1% (v/v) y 60 minutos de reacción.**

Para la materia prima Eucalipto los resultados obtenidos en el pretratamiento con hidrólisis ácida se presentan en el Gráfico 7-2. En él se tiene que con el blanco 1, a temperatura ambiente y con 1% (v/v) de ácido sulfúrico, se obtienen 12 mg de azúcares reductores/g materia prima seca cargada, que en este caso alcanza el mismo valor que al utilizar 0,5% (v/v)  $H_2SO_4$  por 30 minutos. De esto se puede decir que el tiempo de exposición y la concentración de  $H_2SO_4$  juegan un papel importante, ya que en las mínimas condiciones utilizadas no se observan cambios en la materia prima. Para ver el efecto de la temperatura se realizó otro blanco cuya solución solo contenía solo agua por 60 minutos a 121°C. Del él se obtuvie-

ron solo 2 mg azúcares reductores/g muestra seca, por lo que se concluye que el efecto de la temperatura no es suficiente para la liberación de azúcares desde la materia prima.

Por otro lado, se tiene que al aumentar el tiempo de reacción y la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aumenta la liberación de azúcares reductores, cuyo mayor valor se obtiene a una concentración de 1,25% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y un tiempo de reacción de 1 hora. De este resultado se puede inferir que se podría obtener una mayor liberación de azúcares reductores si se aumentara aún más la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o el tiempo de exposición. El hecho de que Eucalipto necesite una mayor concentración de ácido sulfúrico que Lenga para la liberación de azúcares se puede explicar por el mayor porcentaje de lignina, que en el caso de Eucalipto es de un 19% y de Lenga un 17%. A una mayor cantidad de lignina se dificulta la disrupción del material lignocelulósico y la solubilización de la hemicelulosa, debido a que la lignina forma una matriz protectora al ataque de microorganismos.

**Gráfico 7-2: Comparación de azúcares reductores obtenidos en un pretratamiento con ácido diluido a distintos tiempos de exposición y concentración de ácido sulfúrico para EUCALIPTO.**



En base al estudio estadístico realizado se puede indicar que no existe diferencia significativa entre los azúcares reductores obtenidos en los casos: concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,75% (v/v) [B2] y 1% (v/v) [C2] con 60 minutos de reacción, por lo que las condiciones más suaves de operación (que posee un menor costo operacional) son consideradas el mejor caso.

Por otro lado, el mismo estudio indica que el mayor valor estimado de azúcares reductores se obtiene para la experiencia **D1 ([H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 1,25% (v/v), tiempo 30 minutos)** con una probabilidad acumulada del

99,4%, por lo que esta condición de operación se considera como el mejor caso estimado. Por último se puede considerar también el caso **B2 ([H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 0,75% (v/v), tiempo 60 minutos)** en condiciones más suaves de tratamiento con respecto a la concentración de ácido sulfúrico como un buen caso.

Finalmente los p-valores obtenidos para los efectos principales (tiempo y concentración de ácido) son cero, por lo que ambos poseen inferencia estadística en la liberación de azúcares reductores. Por el contrario, la interacción tiempo-concentración de ácido no provoca un cambio en la liberación de azúcares. Además, de esta tabla se observa a través del cociente-F que **la fuente más importante es el tiempo.**

### ***7.1.2 Composición de glucosa y xilosa en la fracción líquida del pretratamiento ácido***

Con los valores de azúcares reductores de hidrólisis ácida se procede a medir la concentración de glucosa y xilosa en las mejores condiciones encontradas anteriormente. El objetivo es determinar la digestibilidad de la celulosa y hemicelulosa provocada por el pretratamiento.

Los azúcares teóricos en todo el trabajo de tesis se calculan según la Tabla 2-2, de la cual se desprende que el porcentaje de celulosa teórica en Lengua corresponde al 42% y para Eucalipto es un 45%. Para calcular el porcentaje de xilosa teórica se considera el dato de hemicelulosa disponible, en Lengua es un 38% y en Eucalipto un 39%. Cabe aclarar que esta consideración subestima el rendimiento de xilosa liberada, puesto que desde la hemicelulosa se pueden obtener otros monómeros como manosa, arabinosa, galactosa, etc. (ver Anexo B).

La Tabla 7-2 muestra esos resultados, donde los valores obtenidos de glucosa no sobrepasan los 11 mg/g para las muestras, por el contrario los valores de xilosa bordean los 80 mg/g. Cabe señalar que los valores presentados no alcanzan a sumar la cantidad de azúcares reductores entregados por el método DNS (sólo un 70% promedio), por lo que se sugiere que existe otro tipo de azúcares presentes en la muestra de hidrólisis ácida. Esta hipótesis es corroborada con la literatura. Según Ballesteros [27], en una hidrólisis ácida de cardo existe la generación de monómeros como glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa [43], por lo que se sugiere que el 30% de azúcares totales provienen de los azúcares nombrados anteriormente. Por otro lado un estudio indica que el método DNS mide la presencia de compuestos que no son azúcares reductores, que disueltos en el hidrolizado son medidos como azúcares reductores [44]. Cabe señalar que la mayoría de los estudios sobre hidrólisis en residuos lignocelulósicos presentan

que el tipo de pentosa predominante liberada corresponde a xilosa. En cuanto a la hexosa existente en mayor proporción corresponde a la glucosa.

Otra explicación posible al hecho de que el método DNS sobreestime la concentración de azúcares, es debido a que los ensayos realizados entre los métodos DNS y kit glucosa no es 1:1. Esta hipótesis está basada en las curvas de calibración y una comparación realizada de los métodos de medición de azúcares (ver Anexo G).

Otro punto importante que se desprende de la Tabla 7-2 es que la relación xilosa/glucosa liberada es de un 93/7%. Este hecho concuerda con lo informado por Wyman [45], quien indica que durante el pretratamiento ácido, una gran porción de hemicelulosa y algo de celulosa son hidrolizadas y solubilizadas. Cabe señalar que la ventaja de este pretratamiento es que no sólo solubiliza la hemicelulosa, sino que además la hidroliza. El líquido resultante, que consiste en una mezcla de pentosas y hexosas, puede ser convertido en etanol por microorganismos específicos [46], por ejemplo con las levaduras *Pichia stipitis*, *Candida Shehatae* y *Pachysolen tannophilus* o con bacterias entéricas modificadas genéticamente [47]. Este líquido contiene también otros compuestos como furfural y hidroximetilfurfural (HMF), que aparecen como productos de las reacciones de degradación del azúcar. Dado las bajas condiciones de temperatura, se espera que las concentraciones de compuestos inhibidores sean bajas. Según Nguyen [48], usando una temperatura mayor a 201°C por 305 segundos, se produce menor conversión de xilosa y mayor conversión de furfural, lo que indica que el material ha sido pretratado excesivamente.

Dado el bajo valor de glucosa obtenido, que indica que la celulosa contenida en la madera no se hidrolizó en el pretratamiento ácido, se puede suponer que la recuperación de glucosa en la posterior hidrólisis enzimática debería ser alta.

La Tabla 7-2 muestra algunos valores de glucosa y xilosa en muestras de hidrólisis ácida.

**Tabla 7-2: Valores de glucosa y xilosa en muestras de pretratadas con ácido sulfúrico diluido**

Hidrólisis ácida			Clave	Glucosa		Xilosa		Glucosa + Xilosa		Azúcar DNS		Dif. <sup>6</sup>
Muestra	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] [%]	Tiempo [min]		Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ <sup>7</sup>	Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ	[%]
Lenga	0,50	30	A1	3,0	2,7	---	---	---	---	---	---	
Lenga	0,75	60	B2	11,3	6,8	---	---	---	---	---	---	
Lenga	1,00	60	C2	7,0	3,0	89,3	29,1	96	27	153	8	37
Eucalipto	0,50	30	A1	4,1	4,0	---	---	---	---	---	---	
Eucalipto	0,75	30	B1	4,1	0,7	---	---	---	---	---	---	
Eucalipto	1,25	30	D1	1,9	0,5	---	---	---	---	---	---	
Eucalipto	0,75	60	B2	4,1	3,3	51,2	15,7	55	15	76	13	28
Eucalipto	1,25	60	D2	2,3	1,6	75,8	35,8	78	35	102	23	24

## 7.2 Hidrólisis enzimática de biomasa pretratada en condiciones ácidas.

Terminado el pretratamiento de hidrólisis ácida se procede con el tratamiento de hidrólisis enzimática del material sólido remanente. A continuación se relatan los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática.

### 7.2.1 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de reacción

El Gráfico 7-3 y Gráfico 7-4 presenta una comparación de los azúcares reductores obtenidos a las 72 horas de hidrólisis enzimática de celulosa de Lenga y Eucalipto.

Para Lenga, del Gráfico 7-3 se observa que la mayor cantidad de azúcares reductores se obtiene después de pretratar con 0,5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, esta es también la experiencia que obtuvo la mayor desviación estándar (ver Anexo F). Cabe señalar que todas las otras experiencias los valores obtenidos son bastante similares en todas las concentraciones de ácido y tiempo (cerca de los 120 mg/g). Esto se corrobora con el análisis de contraste múltiple de rangos (Anexo F). De este análisis estadístico se observa también que el mayor valor obtenido de azúcares reductores corresponde a la experiencia ([H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de 1,25% (v/v); 30 minutos de reacción) con un valor mínimo de 123 mg/g a una probabilidad fija de 98,9%. Esta muestra es

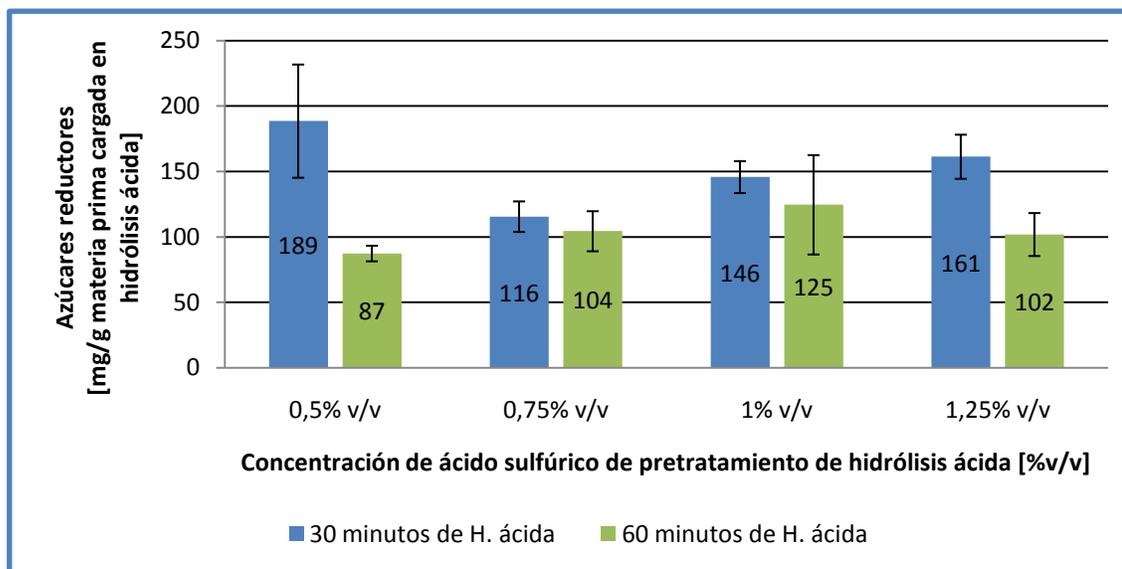
<sup>6</sup>  $Dif = \frac{|medición\ DNS - medición\ kit|}{medición\ DNS} * 100$

<sup>7</sup> σ = desviación estándar

grupo homogéneo<sup>8</sup> con **C1 ([H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de 1,00%(v/v); 30 minutos de reacción)** con un valor mínimo estimado de azúcares reductores de 118 [mg/g] por lo que este es considerado el mejor caso.

Finalmente del análisis estadístico se desprende que solo el **tiempo de pretratamiento con ácido sulfúrico** es el factor estadísticamente influyente en la liberación de azúcares reductores.

Gráfico 7-3: Efecto de las condiciones de pretratamiento con ácido sulfúrico en efectividad de la hidrólisis enzimática por 72 horas de LENGA



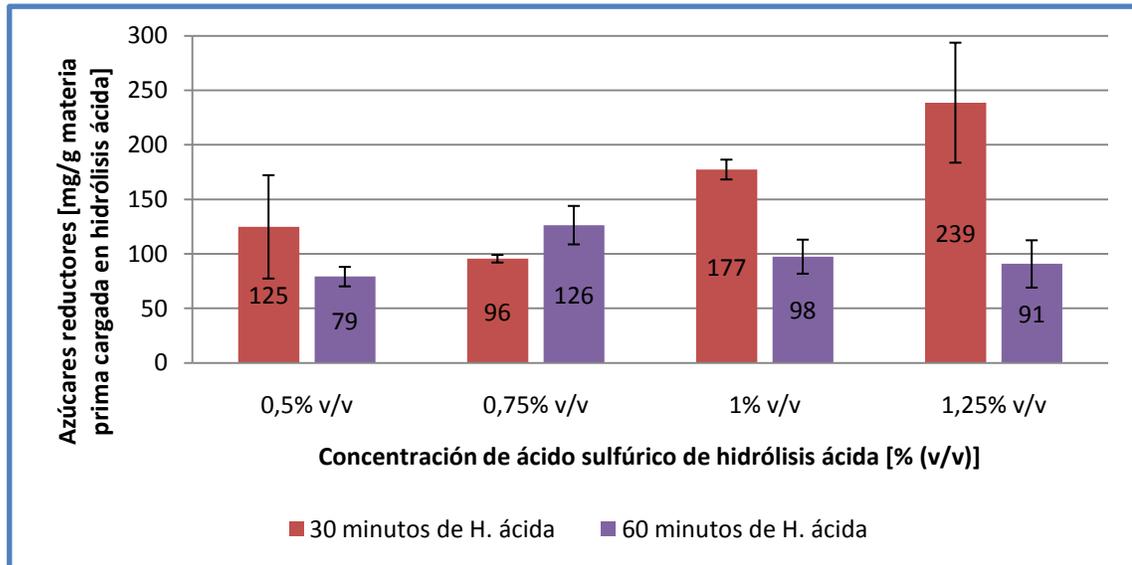
El Gráfico 7-4 muestra una comparación de los azúcares reductores obtenidos a las 72 horas de hidrólisis enzimática para Eucalipto pretratado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De él se observa que los valores obtenidos después de 60 minutos de hidrólisis ácida son todos similares y no superan los valores de los 30 minutos de a excepción del caso 0,75% (v/v). Una explicación a este hecho es que con 60 minutos de pretratamiento se provocó la degradación de la glucosa liberada a subproductos como HMF o ácido acético.

Por otro lado, se tiene que el máximo valor de azúcares reductores obtenidos se alcanza después de una hidrólisis ácida de 30 minutos de reacción y una concentración de ácido sulfúrico de 1,25% (v/v) pero es también el caso muestra la desviación estándar de mayor valor (ver Anexo F). Es por esto que el análisis de contraste múltiple entrega que el valor óptimo se encuentra para la experiencia **C1 ([H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de 1,00%(v/v); 30 minutos de reacción).**

<sup>8</sup> Grupo homogéneo: Ver anexo F.

El análisis estadístico realizado indica que ambos factores, concentración de ácido sulfúrico y tiempo, son estadísticamente influyentes (por separado o como interacción) en la liberación de azúcares reductores. Finalmente, al analizar el cociente-F se tiene que el factor con mayor preponderancia es el **tiempo de pretratamiento con ácido sulfúrico**

Gráfico 7-4: Efecto de las condiciones de pretratamiento con ácido sulfúrico en efectividad de la hidrólisis enzimática por 72 horas de EUCALIPTO



### 7.2.2 Composición de glucosa y xilosa liberadas en la hidrólisis enzimática

Los valores de xilosa y glucosa se muestran en la Tabla 7-3. Cabe señalar que es importante medir estos monómeros porque entregan una idea del tipo de azúcares que se encuentran presentes en la solución y con ello se puede diseñar la estrategia de fermentación más adecuada. De la Tabla 7-3 se desprende que las cantidades de glucosa varían entre 56,8 y 112,5 mg/g, mientras que las de xilosa varían entre 23 y 54 mg/g; esto quiere decir que los valores de glucosa/xilosa están en una relación 70/30% en ambas materia primas. Este valor es concordante con la literatura [39], donde se indica que el objetivo de las enzimas celulasas es hidrolizar la celulosa para producir glucosa. Además se observa que el total de xilosa y glucosa no es igual a la concentración de los azúcares reductores obtenidos por el método DNS. Las posibles hipótesis a este hecho son las mismas que en el caso de la hidrólisis ácida.

**Tabla 7-3: Niveles de glucosa y xilosa generadas por la hidrólisis enzimática de Lenga y Eucalipto pretratada con ácido diluido**

Hidrólisis ácida			Clave	Glucosa		Xilosa		Glucosa + Xilosa		Azúcar DNS		Dif. <sup>9</sup> [%]
Muestra	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	Tiempo		Valor [mg/g]	σ <sup>10</sup>	Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ	
Lenga	0,75%	30 min	B1	56,8	3,8	23,2	2,2	<b>80</b>	3,3	<b>116</b>	11,7	31%
Lenga	1,00%	30 min	C1	102,8	4,2	53,8	3,6	<b>157</b>	4,0	<b>146</b>	12,2	7,5%
Lenga	0,75%	60 min	B2	112,5	107,1	---	---	---	---	104	15,3	
Lenga	1,00%	60 min	C2	67,9	14,6	---	---	---	---	125	38,0	
Eucalipto	1,00%	30 min	C1	78,3	87,1	---	---	---	---	177	9,1	
Eucalipto	1,25%	30 min	D1	101,5	28,7	39,0	7,3	<b>140</b>	22,7	<b>239</b>	55,0	41%
Eucalipto	0,75%	60 min	B2	86,9	5,7	---	---	---	---	126	17,7	

### **7.2.3 Comparación de materias primas utilizadas y conversión total del proceso considerando la concentración de azúcares reductores teóricos.**

La Tabla 7-4 muestra el rendimiento del pretratamiento calculado según los azúcares teóricos de cada materia prima y la concentración de azúcares reductores, xilosa y glucosa obtenidos para el proceso descrito anteriormente. De ella se desprende que cuando se comparan materias primas en iguales condiciones de concentración de ácido y tiempo (por ejemplo: A1 Lenga-A1 Eucalipto) la liberación de azúcares reductores es siempre mayor en todas las etapas del proceso para Lenga. Este resultado podría explicarse por la diferencia de tamaño de pinchip entre Lenga y Eucalipto (2mm, 1-3 mm, 5-7 mm para Lenga, sobre 1 mm, 2 cm, 2-4 cm para Eucalipto). El menor tamaño de Lenga podría explicar una mayor transferencia de masa entre el ácido sulfúrico y los enlaces de hemicelulosa, lo que puede provocar una mayor liberación de azúcares reductores y un rompimiento mayor de la pared de lignina en la primera etapa del proceso. Como consecuencia, la hidrólisis enzimática se vería afectada porque las enzimas celulasas no podrían atacar a la celulosa y se quedarían absorbidas en la lignina presente que fue degradada parcialmente. Una forma de comprobar esta hipótesis sería analizando el cambio en la estructura del material procesado mediante microscopio, tal como lo realiza Mussato en su estudio [29].

El tamaño de partícula y la remoción de lignina fueron estudiados por Teramoto [49]. Este autor concluye que el tamaño de partícula tiene un efecto en el pretratamiento. Además, agrega que al remover la hemicelulosa y lignina de Eucalipto en partículas de mayor tamaño, provoca que los valores de glucosa

<sup>9</sup>  $Dif = \frac{|medición\ DNS - medición\ kit|}{medición\ DNS} * 100$

<sup>10</sup> σ: desviación estándar

obtenidos se igualen a los de partículas de menor tamaño. Es más, agrega que la conversión de celulosa-glucosa decrece cuando aumenta el tamaño de partícula (96,6%→ 80,9% de 0,2 a 2 mm respectivamente). Esto se explicaría por el área superficial de contacto con el ácido y la transferencia de masa que ello involucra.

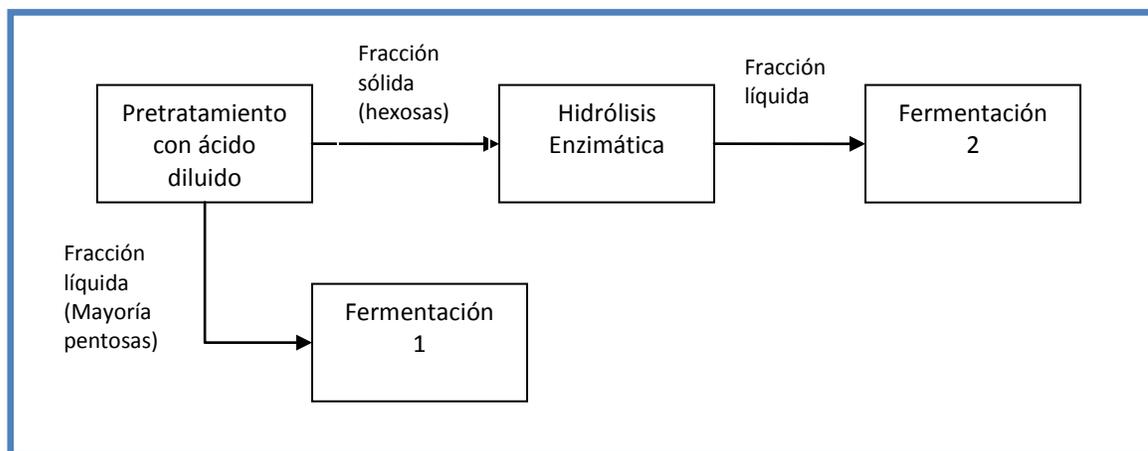
La comparación entre materias primas se justifica porque se trata de maderas duras con contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa similares. Al comparar los resultados obtenidos, y dado que el mejor caso de Lengua reporta una conversión del 30% y el de Eucalipto un 27% se recomienda no incorporar una etapa de molienda, ya que esta encarece el proceso [20] y no aporta un incremento considerable en la conversión.

**Tabla 7-4: Comparación de conversión de azúcares reductores desde Lengua y Eucalipto obtenidos en un proceso que incluye un pretratamiento con ácido diluido por 30 y 60 minutos a distintas concentraciones de ácido sulfúrico e hidrólisis enzimática. En rojo se encuentran los valores confiables encontrados en los análisis anteriores.**

Experimento	Hidrólisis ácida		Hidrólisis enzimática		Total proceso	
	Conversión [%]	$\sigma$ [%]	Conversión [%]	$\sigma$ [%]	Conversión [%]	$\sigma$ [%]
<b>LENGA</b>						
A1	3	0,1	23	5,2	26	4,6
B1	7	0,1	14	1,4	21	1,1
C1	12	0,4	<b>18</b>	1,4	<b>30</b>	1,2
D1	13	0,6	19	2,0	32	1,6
A2	8	0,5	10	0,7	18	0,6
B2	15	0,6	13	0,6	28	1,1
C2	<b>18</b>	0,9	15	4,6	33	2,5
D2	17	0,5	12	1,9	29	1,1
<b>EUCALIPTO</b>						
A1	2	0,1	15	5,8	17	5,3
B1	6	0,6	12	0,4	18	0,5
C1	5	0,5	<b>22</b>	1,1	<b>27</b>	1,0
D1	9	0,4	30	6,8	38	5,3
A2	5	0,1	10	1,1	14	0,7
B2	<b>9</b>	1,6	16	2,2	25	2,0
C2	10	2,0	12	2,0	22	2,0
D2	13	2,8	11	2,7	24	2,7

Por otro lado, los resultados obtenidos en este pretratamiento reportan una baja eficiencia de sacarificación en comparación los otros pretratamientos realizados en el trabajo (ver Capítulo 8 y 9). Este hecho se puede explicar porque el pretratamiento ácido remueve la porción de hemicelulosa y una parte de la lignina, pero el resto de ella queda intacta en el sustrato celulósico. Durante la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica las componentes de la celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y endoglucanasas tienen mayor afinidad hacia la lignina que por los carbohidratos, resultando una baja eficiencia en la sacarificación [50].

Cuando se compara la conversión de azúcares reductores entre ambas biomásas, se tiene que en el caso de Lenga la contribución de azúcares reductores por parte de la hidrólisis ácida es de un 40%, en cambio en el caso de Eucalipto, la contribución del pretratamiento es sólo de un 19%. Estos valores indican que el pretratamiento ácido provoca un efecto positivo en la liberación de azúcares de cinco carbonos en el caso de Lenga, eliminando o reduciendo la necesidad de utilizar enzimas hemicelulasas en la sacarificación. Los azúcares provenientes de la celulosa y hemicelulosa obtenidos a través de una hidrólisis ácida y enzimática pueden ser eficientemente usados para la fermentación de etanol por una fermentación separada o una fermentación mezclada usando co-cultivos. De todas maneras, en co-cultivos las condiciones óptimas de crecimiento de las levaduras que fermentan pentosas y hexosas pueden ser diferentes y resultar en una baja eficiencia del producto deseado. Para una mejor eficiencia en la producción de etanol, se prefiere utilizar una hidrólisis y fermentación separadas (SHF) [50] (ver Figura 7-1).



**Figura 7-1: Esquema de pretratamiento y fermentación, usando un esquema de hidrólisis y fermentación separada (SHF por su sigla en inglés)**

La baja obtención de glucosa en general (ver Tabla 7-4) indica que la celulosa sufrió una escasa degradación, por lo que se sugiere que el pretratamiento ácido es bastante selectivo. Este punto se explica dado que las condiciones de hidrólisis no son tan severas como para provocar la solubilización de la celulosa, ya que su estructura cristalina dificulta la hidrólisis.

Por otro lado, al observar la conversión para ambas materias primas en la hidrólisis enzimática (ver Tabla 7-4) se tiene que tiempo de exposición efectivamente afecta el rendimiento de azúcares reductores, ya que el óptimo se alcanza para el tiempo de 30 minutos, sin mejoras a los 60 minutos. Lo mismo ocurre cuando se incrementa la concentración de ácido sulfúrico. Estos hechos hacen pensar que ocurrió descomposición de azúcares a otros productos en el pretratamiento. Según la literatura, autores que han realizado la hidrólisis con ácido diluido a una concentración entre 2 y 8% (v/v) a temperatura ambiente y un tiempo de reacción de 4 a 12 horas, reportan degradación de azúcares [51].

Finalmente, la literatura reporta que la tasa de conversión óptima se obtiene a una concentración de ácido aproximada de 1% (v/v), la que usualmente se utiliza en el proceso de pretratamiento de lignocelulósicos por ser costo efectivo [44]. Este hecho concuerda en cuanto a la concentración de ácido sulfúrico encontrada, con los resultados obtenidos en este trabajo.

**Tabla 7-5: Resumen de fuentes estadísticamente influyentes en la liberación de azúcares reductores**

<b>Etapa de proceso</b>	<b>Fuente estadísticamente influyente en la liberación de azúcares</b>
<b>Hidrólisis ácida</b> <b>Lenga</b> <b>Eucalipto</b>	Tiempo Tiempo
<b>Hidrólisis enzimática desde hidrólisis ácida</b> <b>Lenga</b> <b>Eucalipto</b>	Tiempo Tiempo

#### *7.2.4 Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico pretratado con ácido diluido.*

El Gráfico 7-5 presenta los perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática para Lengua y Eucalipto. En ellos se observa que a un mayor tiempo de hidrólisis, aumenta la cantidad de azúcares reductores obtenidos.

En el caso de Lengua, con 30 minutos de pretratamiento de hidrólisis ácida (caso A), a las 24 horas se obtienen entre el 10 y el 16% de los azúcares reductores totales a las 72 horas de sacarificación. Por otro lado, cuando se pretratan por 60 minutos de hidrólisis ácida (caso B), a las 24 horas se obtiene el 48% de los azúcares totales obtenidos a las 72 horas.

En el caso de Eucalipto, después de 30 minutos de hidrólisis ácida (caso C) se observa que entre 24 y 48 horas de reacción de hidrólisis enzimática no hay cambios en los azúcares liberados, dado que en promedio se tiene un aumento de los azúcares reductores de solo un 22%. De las 48 a las 72 horas de reacción se observa un aumento promedio de un 40% en los azúcares reductores liberados. Ahora bien, en el caso de 60 minutos de hidrólisis ácida (caso D) se tiene que desde las 24 a las 48 horas el aumento promedio de los azúcares reductores es de un 100% y de las 48 a las 72 horas es de solo un 15%, a excepción del caso de la concentración de ácido sulfúrico del 0,75% v/v donde se tiene un aumento en la liberación de azúcares del 30%.

De los resultados descritos anteriormente y al comparar los tiempos de incubación con ácido sulfúrico, se tiene que para 30 minutos de pretratamiento existe una pendiente más pronunciada que para 60 minutos de pretratamiento, donde la curva a las 72 horas de operación se encuentra en un estado estacionario. Este hecho sugiere que la reacción de sacarificación hidrolizada por 30 minutos no ha terminado a las 72 horas y por lo tanto, se podría seguir obteniendo azúcares desde los materiales.

Para explicar lo anterior se propone lo siguiente: para el caso de 60 minutos de hidrólisis ácida, se tiene que existe una mayor cantidad de celulosa disponible, dado que el pretratamiento actuó de mejor manera en el caso de 60 minutos que para 30 minutos para las dos materias primas, liberando una mayor cantidad de hemicelulosa del material. Al existir una mayor cantidad de celulosa, y dado que en todas las experiencias se utilizó la misma proporción de enzimas celulasas y celobiasa, (donde la celobiasa se encarga de impedir la inhibición por exceso de celobiasa), es posible que en ese caso, la celobiasa no fue suficiente y ocurrió inhibición por producto.

La literatura se refiere a la acción de cada una de las enzimas presentes en este coctel. Primero las endoglucanasas hidrolizan el polímero de celulosa exponiendo extremos reductores y no reductores de un polímero lineal de glucosa, luego las exoglucanasas y celobiohidrolasas actúan sobre estos extremos y liberan dímeros de glucosa llamados celobiosa, y finalmente las  $\beta$ -glucosidasas (BGL) cortan estas unidades y generan glucosa, el producto final. El microorganismo que se utiliza en la producción comercial de estas enzimas produce muy bajas cantidades de BGL en comparación con las otras enzimas, y son inhibidas por su producto final celobiosa [52,53]. Producto de este control negativo la eficiencia de la hidrólisis enzimática no puede mejorarse significativamente por aumento de la carga, quedando parte de la enzima cargada inutilizada.

La hipótesis de la inhibición por producto se apoya en la comparación de los azúcares reductores liberados a las 24 horas de operación. Para Lenga se obtiene una mayor liberación de azúcares en 60 minutos de hidrólisis ácida que en 30 minutos de pretratamiento, es decir, existen una mayor cantidad de azúcares disponibles en la fracción líquida del pretratamiento.

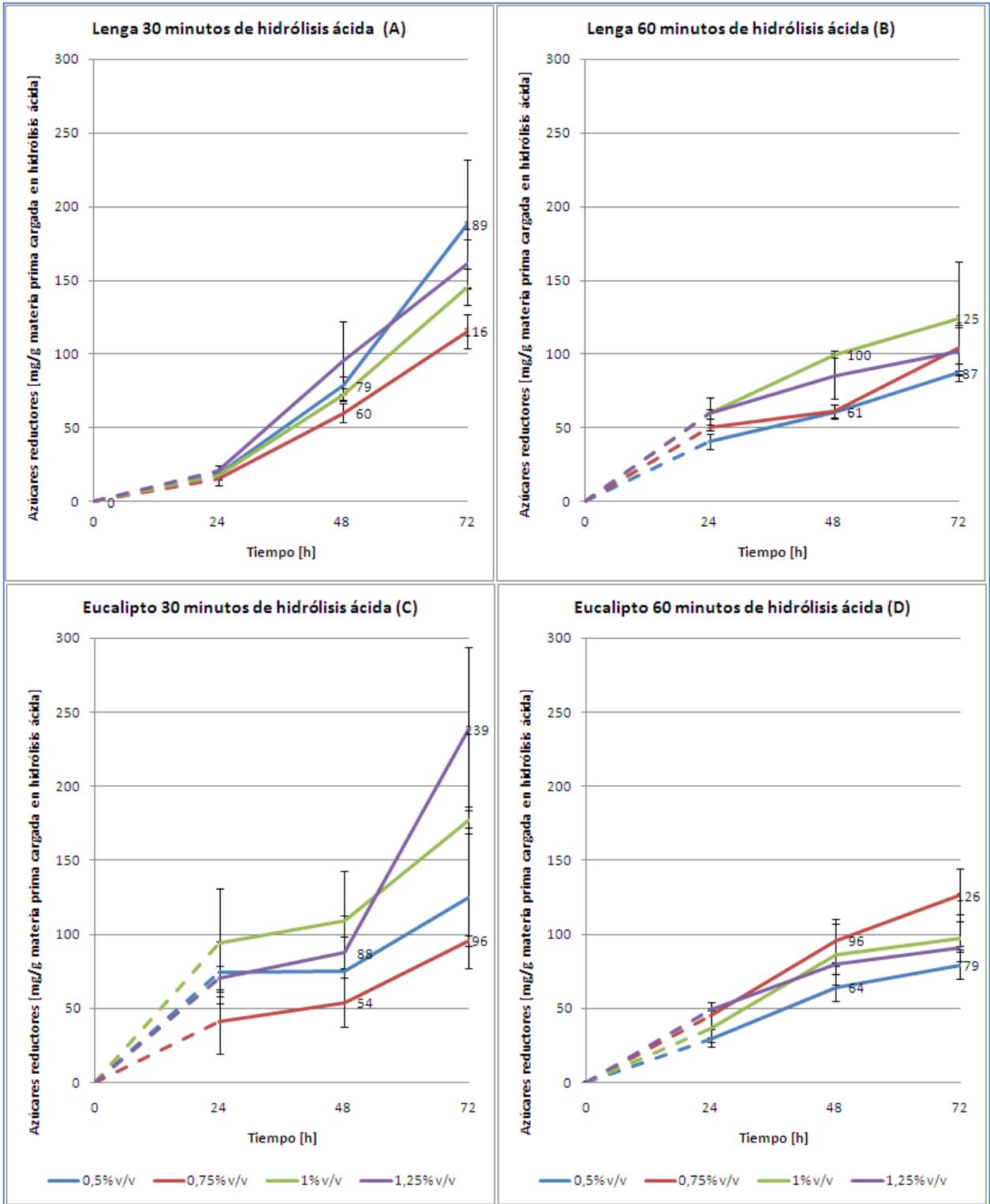
Otra explicación posible es que porque las enzimas celulolíticas degraden rápidamente las fracciones amorfas más accesibles del sustrato. Con el progreso de la hidrólisis, la celulosa se vuelve cada vez más resistente a la hidrólisis, como resultado de su creciente cristalinidad y por lo tanto no se siguen obteniendo azúcares. Para comprobar la hipótesis del aumento de cristalinidad sería necesario realizar un análisis microscópico al material antes y después del tratamiento de hidrólisis enzimática [29].

Otros factores asociados a la naturaleza de la enzima y que influyen en la liberación de azúcares son la pureza, la inactivación térmica, la adsorción irreversible y la inhibición por producto; donde los factores más probables que pueden estar ocurriendo en este caso son la inhibición por producto y la adsorción irreversible.

De esta forma, la optimización de las condiciones de sacarificación para obtener una mayor cantidad de glucosa deberá ser estudiada en el futuro, dado que no se encuentra dentro de los alcances de este trabajo y constituye una etapa intermedia importante en la producción de etanol.

Por último, al modelar las curvas de la cinética de hidrólisis ácida (ver Anexo H) se desprende que en todos los casos se pudo seguir liberando azúcares posterior a las 72 horas de operación, siendo el caso de Lenga el más pronunciado. Este efecto se puede explicar dado que con Lenga el pretratamiento ácido funciona mejor, por lo tanto, existe una mayor cantidad de celulosa disponible para convertir en glucosa.

Gráfico 7-5: Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con distintas concentraciones de ácido sulfúrico



Caso (A) Lenga, 30 min de pretratamiento ácido, Caso (B) Lenga, 60 min de pretratamiento ácido, Caso (C): Eucalipto, 30 min de pretratamiento ácido, Caso (D): Eucalipto, 60 min de pretratamiento ácido

### 7.3 Efecto de un pretratamiento de hidrólisis alcalina posterior a un pretratamiento de hidrólisis ácida

Dado los pobres resultados obtenidos en la sacarificación al utilizar solo el pretratamiento de hidrólisis ácida, se decidió realizar un pretratamiento de hidrólisis alcalina post pretratamiento ácido.

El material sólido seco resultante del pretratamiento ácido es pretratado con hidróxido de sodio diluido (ver Métodos), la fracción líquida resultante contiene lignina solubilizada y una pequeña concentración de azúcares; y la fracción sólida, que posteriormente es sacarificada, contiene en su mayoría celulosa y una pequeña porción de hemicelulosa. Es decir, el objetivo de este pretratamiento es obtener un material lignocelulósico sin lignina.

Cabe señalar que los valores de azúcares reductores de la hidrólisis ácida se encuentran disponibles en el Capítulo 7.1.

#### *7.3.1 Azúcares reductores liberados en el pretratamiento de hidrólisis alcalina*

La Tabla 7-6 presenta los valores de los azúcares reductores liberados en el pretratamiento de hidrólisis alcalina. De ella se puede apreciar que los niveles de estos azúcares reductores bordean los 13 a 23 mg/g materia prima cargada en la hidrólisis ácida para Lenga y 9 a 21 mg/g de materia prima seca para Eucalipto. Estos valores concuerdan con los señalados en la literatura [7]. En ella se señala que el objetivo de este pretratamiento es modificar la estructura del material, solubilizando la lignina y la hemicelulosa de la muestra. Esto quiere decir que la hemicelulosa se encuentra en la fracción líquida sin hidrolizarse y por lo tanto no se obtienen azúcares reductores. Por lo dicho anteriormente, se puede inferir que los pocos azúcares liberados en el pretratamiento corresponden a los liberados desde la hemicelulosa (xilosa, manosa y galactosa). Cabe señalar que estos azúcares son descartados del proceso ya que como se dijo anteriormente, no es el objetivo del pretratamiento.

Por otro lado, del análisis estadístico (ver Anexo F) se concluye que para Lenga los efectos principales (concentración y tiempo) y la interacción entre ambos influyen en la liberación de azúcares reductores ya que el p-valor de estos es menor a 0,05. Del mismo análisis se tiene que el **tiempo de pretratamiento ácido** es la fuente más importante para la obtención de azúcares. Para Eucalipto se tiene que solo la **concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** tiene un efecto en la liberación de azúcares reductores.

Tabla 7-6: Comparación de azúcares reductores obtenidos en una hidrólisis alcalina de Lenga y Eucalipto, posterior a un pretratamiento ácido a distintos tiempos de exposición y concentración de ácido sulfúrico.

Concentración de ácido sulfúrico en hidrólisis ácida % (v/v)	Lenga				Eucalipto			
	Tiempo de reacción de H. ácida [minutos]							
	30 min		60 min		30 min		60 min	
	azúcares reductores [mg/g]	$\sigma^{11}$	Azúcares reductores [mg/g]	$\sigma$	azúcares reductores [mg/g]	$\sigma$	Azúcares reductores [mg/g]	$\sigma$
0,5	<b>17,3</b>	1,0	<b>18,3</b>	1,8	<b>9,1</b>	1,1	<b>11,7</b>	0,0
0,75	<b>18,3</b>	0,9	<b>22,8</b>	0,9	<b>14,5</b>	3,8	<b>10,7</b>	2,3
1,00	<b>19,0</b>	0,4	<b>23,4</b>	0,5	<b>16,4</b>	2,6	<b>21,2</b>	0,6
1,25	<b>13,4</b>	0,9	<b>22,6</b>	3,4	<b>16,1</b>	3,4	<b>18,0</b>	0,0

## 7.4 Hidrólisis enzimática de biomasa pretratada en condiciones alcalinas.

Al concluir la hidrólisis alcalina se realizó la hidrólisis enzimática por 48 horas de la fracción sólida obtenida. Los resultados se presentan a continuación.

### 7.4.1 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de reacción

Del Gráfico 7-6 se observa que para Lenga el pretratamiento de hidrólisis ácida al 0,5% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 30 minutos de reacción es el que libera la mayor cantidad de azúcares reductores, pero es también, el caso con una mayor desviación estándar (ver Anexo F). La principal razón por la gran desviación estándar de la experiencia se debe a que el tubo usado para la reacción de hidrólisis enzimática no permitía un mezclado uniforme por lo que no existe una adecuada transferencia de masa, y por lo tanto, existían muestras en las que la enzima actuaba correctamente solubilizando la glucosa y muestra del triplicado en la que no ocurría reacción. Esta explicación puede usarse también en los otros casos donde la desviación estándar es importante.

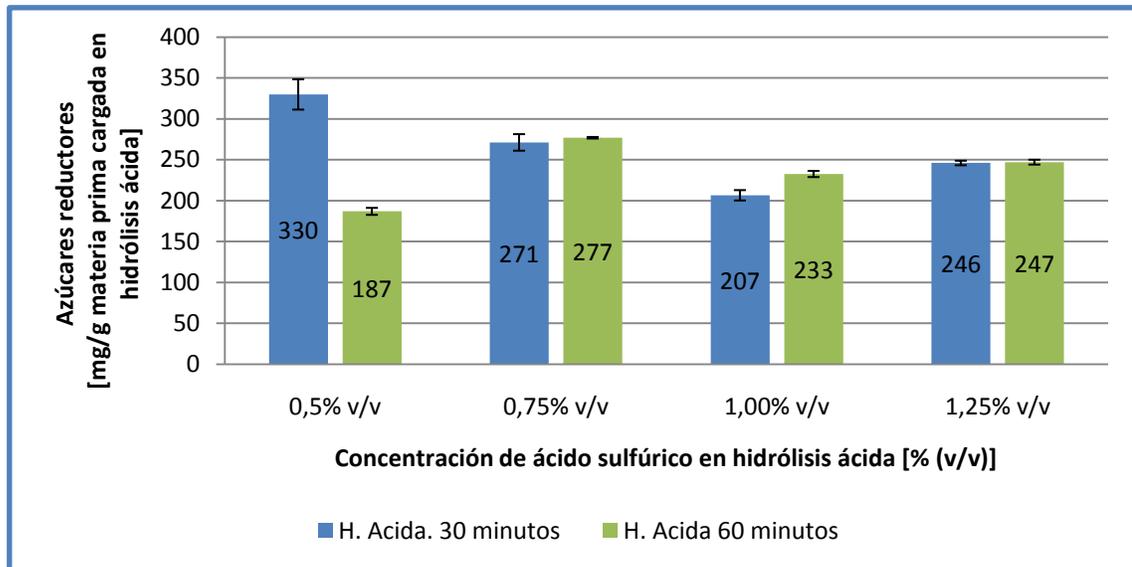
Por otro lado se observa que en el caso de 0,75% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se obtienen buenos resultados para ambos tiempos de exposición y con  $\sigma$  pequeñas. Además las muestras se analizaron estadísticamente (Anexo F). De éste análisis se concluye que el mayor valor estimado de azúcares reductores corresponde al caso **[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de 0,5%(v/v); 30 minutos de reacción** con un mínimo de 286 mg/g. Otro valor que se acerca al máximo y entrega una mayor “confianza” dada su menor desviación estándar es **[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de**

<sup>11</sup>  $\sigma$ = desviación estándar

**0,75%(v/v); 60 minutos de reacción** con un mínimo de 274 mg/g y una probabilidad del 91,91% por lo que éste sería la condición óptima.

Por último, del análisis ANOVA se obtiene que los factores, concentración de ácido sulfúrico y tiempo y la interacción entre ellos influyen en la liberación de azúcares. En este caso, observando el cociente-F se tiene que el factor más importante es el **tiempo**.

Gráfico 7-6: Efecto del pretratamiento alcalino en la obtención de azúcares reductores de la hidrólisis enzimática en Lengua.

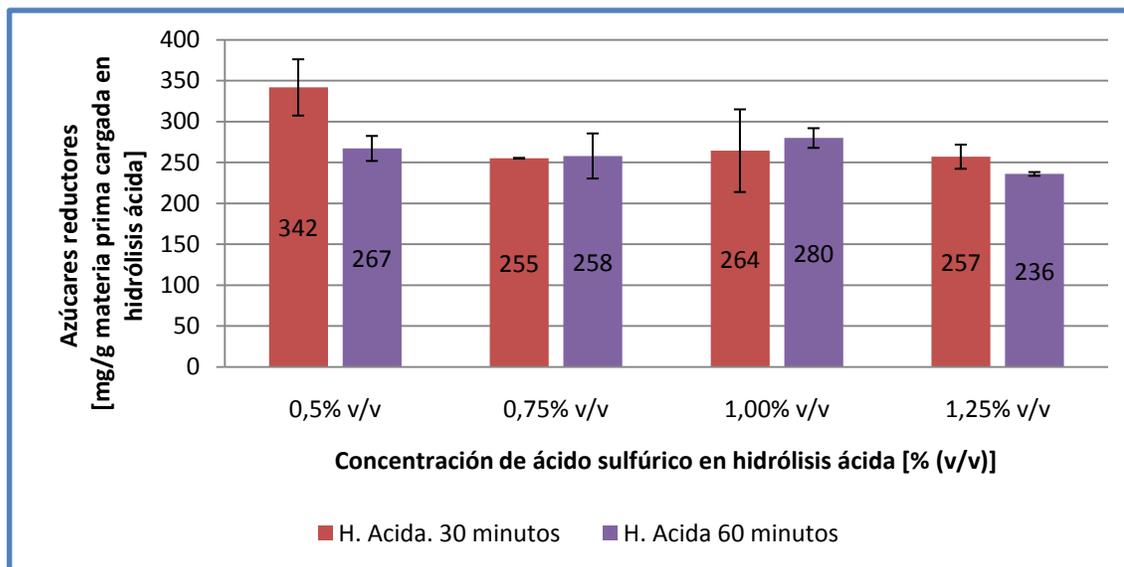


Para el caso de Eucalipto se observa del Gráfico 7-7 que los valores obtenidos a las 48 horas de hidrólisis enzimática son bastante similares y bordean los 236 a 280 mg/g, a excepción del caso de 0,5% (v/v) que se escapa del promedio con 342 mg/g. Del análisis estadístico realizado se tiene que el mayor valor mínimo estimado de azúcares reductores se obtiene con **[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de 0,5%(v/v); 30 minutos de reacción** y es de 261 mg/g y una probabilidad del 99,1%. Dado la alta desviación estándar, se debe considerar el caso **[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] de 1,00%(v/v); 60 minutos de reacción** que posee una  $\sigma$  de 12 y representa una mayor confianza.

Por otro lado, del análisis estadístico realizado se concluye que no existe un factor preponderante en la liberación de azúcares dado los p-valor mayores a 0,05, salvo levemente la concentración de ácido.

Finalmente, cabe agregar que la hidrólisis enzimática se realizó solo por 48 horas dado que existieron problemas con la incubadora, pero como a las 48 horas de operación se cumple el tiempo necesario para realizar los perfiles cinéticos y la liberación máxima de azúcares teórica, no se repitió la experiencia.

Gráfico 7-7: Efecto del pretratamiento alcalino en la obtención de azúcares reductores de la hidrólisis enzimática en Eucalipto.



#### 7.4.2 Composición de glucosa y xilosa liberadas en la hidrólisis enzimática

La Tabla 7-7 muestra los valores obtenidos para glucosa y xilosa en los mejores casos encontrados para Lengua y Eucalipto. De ella se desprende que la relación glucosa/xilosa con respecto al total medido por kits corresponde al 81/19%. Por otro lado, el valor de glucosa y xilosa en dos casos sobrepasa al valor de azúcares reductores medido por el método DNS. En los tres casos restantes el valor obtenido a través de kits corresponde al 80% de los medidos a través del método DNS. Este resultado muestra que en este caso las enzimas celulasas actuaron de mejor forma degradando en su mayoría celulosa.

La Tabla 7-7 muestra los valores de xilosa y glucosa en muestras de hidrólisis enzimática las 48 horas de operación.

**Tabla 7-7: La tabla muestra algunos valores de glucosa y xilosa en muestras de hidrólisis enzimática precedida por un tratamiento alcalino ácido**

Hidrólisis ácida			Serie	Glucosa		Xilosa		Glucosa+Xilosa		Azúcar DNS		Dif.
Muestra	[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] [%]	Tiempo [min]		Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ	Valor [mg/g]	σ	[%]
Lenga	0,50	30	A1	260,7	61,7	72,4	15,7	<b>333</b>	51,7	<b>330</b>	18,6	0,9
Lenga	0,75	60	B2	193,0	26,2	29,1	0,6	<b>222</b>	22,8	<b>277</b>	1	20
Eucalipto	0,50	30	A1	236,2	10,6	68,9	1,8	<b>305</b>	8,6	<b>342</b>	34,4	10,8
Eucalipto	0,75	30	B1	140,9	25,7	38,6	5,4	<b>180</b>	21,3	<b>255</b>	0,5	26
Eucalipto	1,00	60	C2	243,5	28,8	41,5	3,8	<b>285</b>	25,2	<b>280</b>	12	1,8
Eucalipto	1,25	60	D2	228,0	39,3	---	---	---	---	<b>236</b>	2,3	---

#### **7.4.3 Comparación de materias primas utilizadas y conversión total del proceso considerando la concentración de azúcares reductores teóricos**

La Tabla 7-8 muestra los rendimientos obtenidos con respecto a los azúcares teóricos en Lenga y Eucalipto para cada etapa del proceso. En primer lugar se observa que al disminuir el contenido de lignina en las muestras se favorece la eficiencia de la hidrólisis enzimática. De acuerdo con Mansfield [29], el material lignocelulósico en su forma original es relativamente resistente al ataque enzimático, pero la remoción de lignina y hemicelulosa provoca grandes cambios en la estructura y accesibilidad de la celulosa haciéndola más accesible al contacto con celulasas. Así, es una prioridad la remoción de la hemicelulosa y lignina en la hidrólisis enzimática de lignocelulósicos.

Además, de la misma tabla se desprende que los rendimientos en la hidrólisis enzimática para las dos materias primas son bastante similares. Dado que cuando se realiza solo un pretratamiento ácido con Lenga siempre se obtenían mejores resultados, se concluye que el pretratamiento resulta ser más efectivo para Eucalipto. Es decir, a una mayor cantidad de lignina y celulosa (caso de Eucalipto) el pretratamiento alcalino funciona de mejor manera. Este resultado se ratifica con la literatura que indica que el pretratamiento funciona de mejor forma en maderas duras donde el contenido de celulosa es alto, la cantidad de celulosa disponible post pretratamiento es mayor [29]. La lignina reduce la hidrólisis de la celulosa formando una barrera física que impide el ataque de las enzimas a la celulosa. De hecho, la lignina absorbe irreversiblemente las enzimas celulasas, previniendo su acción sobre la celulosa. Consecuentemente, las muestras con un alto contenido de lignina bloquean por absorción de la enzima en la celulosa. Además, se conoce que la lignina es uno de los factores limitantes en la hidrólisis enzimática de la celulosa [29]. En este trabajo se observó este fenómeno.

Al comparar los resultados obtenidos en los sólidos pretratados sin deslignificación (solo hidrólisis ácida), la hidrólisis enzimática resultante posee pobres resultados (ver Tabla 7-4).

Según lo estudiado, el pretratamiento alcalino que solubiliza la hemicelulosa y la lignina promueve la hidrólisis enzimática, ya que cambia la estructura del material lignocelulósico, aumentando así las conversiones de azúcares reductores.

Por otro lado, se tiene que no es necesario promover la completa remoción de la hemicelulosa y lignina para obtener altas conversiones de glucosa durante la hidrólisis enzimática. Esta hipótesis queda de manifiesto dado que los mejores casos encontrados no corresponden a las condiciones más duras de trabajo (ver Tabla 7-8).

**Tabla 7-8: Rendimiento y desviación estándar obtenida en cada etapa y para el proceso<sup>12</sup> respecto a los azúcares reductores.**

**Destacados en rojo se encuentran las experiencias con mejores resultados**

	Hidrólisis ácida		Hidrólisis enzimática		Total del proceso	
<b>LENGA</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>
A1	3	0,1	40	2,3	43	2,0
B1	7	0,1	33	1,2	40	1,1
C1	12	0,4	25	0,7	37	0,8
D1	13	0,6	30	0,4	42	0,5
A2	8	0,5	23	0,5	30	0,5
B2	15	0,6	<b>33</b>	<b>0,1</b>	<b>49</b>	<b>0,2</b>
C2	<b>18</b>	<b>0,9</b>	28	0,5	46	0,6
D2	17	0,5	30	0,4	47	0,4
<b>EUCALIPTO</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>
A1	2	0,1	42	4,2	44	4,1
B1	6	0,6	31	0,0	37	0,1
C1	5	0,5	33	6,3	38	5,4
D1	9	0,4	32	1,9	41	1,5
A2	5	0,1	33	1,9	38	1,6
B2	<b>9</b>	<b>1,6</b>	32	3,5	41	3,0
C2	10	2,0	<b>35</b>	<b>1,5</b>	<b>45</b>	<b>1,6</b>
D2	13	2,8	29	0,2	42	1,0

<sup>12</sup> El proceso incluye una hidrólisis ácida, posteriormente una hidrólisis alcalina (donde la concentración de azúcares reductores obtenidos no son contabilizados) y finalmente una hidrólisis enzimática por 48 horas.

Tabla 7-9: Resumen de fuentes estadísticamente influyentes en la liberación de azúcares reductores

Etapa de proceso	Fuente estadísticamente influyente en la liberación de azúcares
<b>Hidrólisis alcalina</b> Lenga Eucalipto	Tiempo Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Hidrólisis enzimática desde hidrólisis alcalina</b> Lenga Eucalipto	Tiempo Ninguno es concluyente

#### *7.4.4 Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática para el material lignocelulósico.*

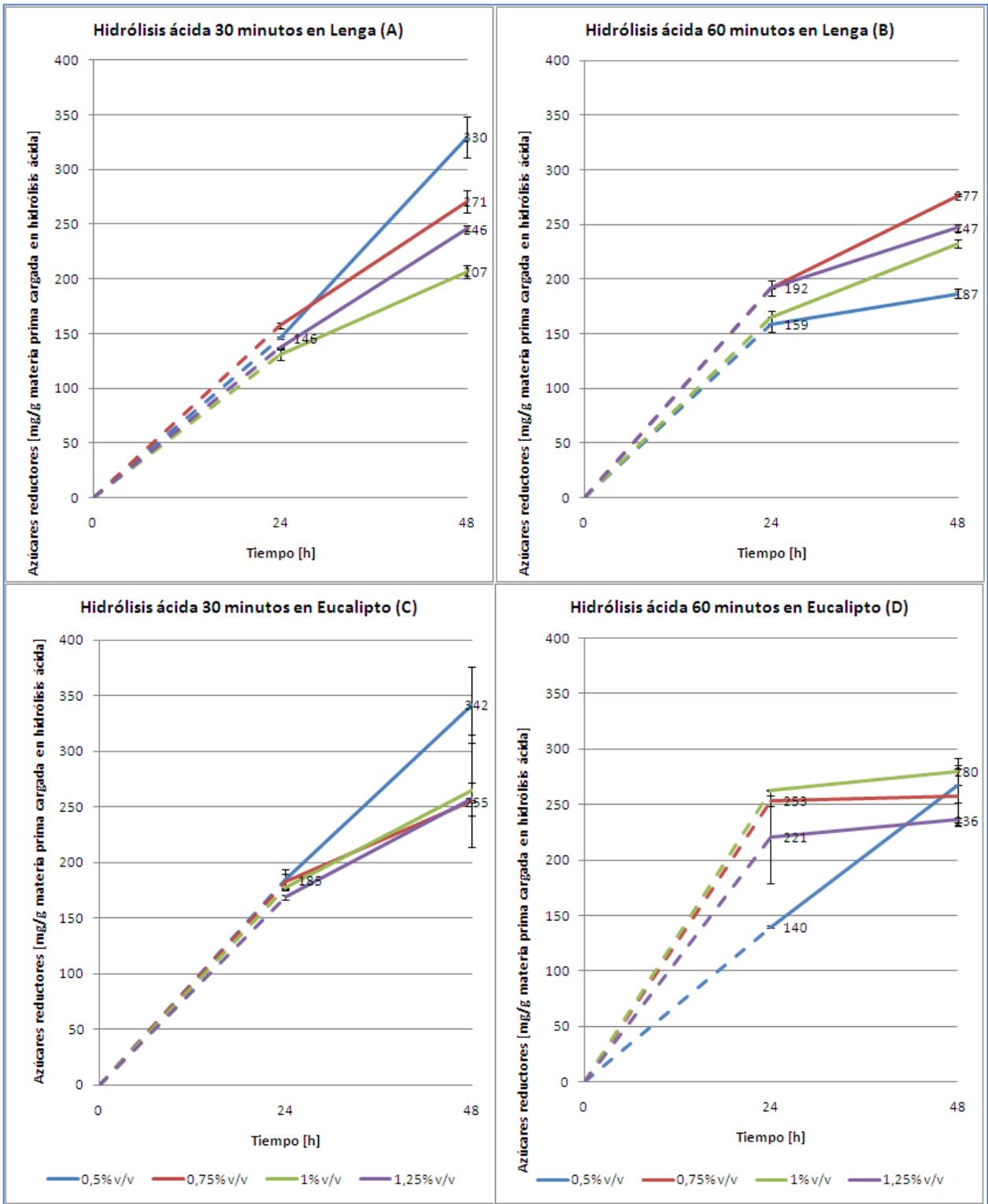
El Gráfico 7-8 muestra los perfiles cinéticos obtenidos en los materiales lignocelulósicos.

Para Lengua, del Gráfico 7-8 se tiene que en las primeras 24 horas de reacción de hidrólisis ácida se liberan en el caso (A) aproximadamente 140 mg/g de azúcares reductores para todas las concentraciones de  $H_2SO_4$ . Estos corresponden al 50% de los azúcares totales liberados durante la hidrólisis enzimática de un total de 48 horas. En cambio, para 60 minutos de reacción de hidrólisis ácida, caso (B) se liberan en promedio 170 mg/g de azúcares reductores. Estos corresponden al 40% de los azúcares totales liberados en la reacción a las 48 horas.

Para Eucalipto del mismo gráfico presentado, se tiene que el comportamiento de 30 minutos de hidrólisis ácida (caso (C)), es similar para las concentraciones de ácido sulfúrico 0,75; 1,00 y 1,25% (v/v), donde a las 24 horas de reacción de hidrólisis enzimática se tiene una liberación de azúcares reductores promedio de 180 mg/g y a las 48 horas este valor promedio asciende a 260 mg/g. El caso de 0,5% (v/v)  $H_2SO_4$  se escapa de las otras experiencias obteniéndose 342 mg/g. Ahora bien, si se observa el caso de 60 minutos de hidrólisis ácida (caso (D)), se tiene que la concentración de 0,5% (v/v)  $H_2SO_4$  tiene el mismo comportamiento que 30 minutos de hidrólisis ácida donde a las 24 horas se obtienen 140 mg/g y las 48 horas 267 mg/g. Las otras concentraciones de ácido, por el contrario no sufren un aumento considerable de azúcares reductores liberados, solo 20 mg/g.

Si se compara la cinética entre 30 y 60 minutos de hidrólisis ácida se tiene un comportamiento similar al ocurrido cuando sólo se realizaba el pretratamiento ácido. Los perfiles para 30 minutos tienen una pendiente mayor por lo que se podría continuar con la liberación de azúcares; en cambio los perfiles de 60 minutos muestran una estabilización entre las 24 y 48 horas de operación de hidrólisis enzimática. Este hecho se explica de la misma forma que en el pretratamiento ácido, existe inhibición por producto. Esto queda presente ya que si se comparan tiempos de reacción para ambas materias primas, con 60 minutos de hidrólisis ácida siempre se obtiene una mayor concentración de azúcares.

Gráfico 7-8: Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática para un pretratamiento ácido a distintas concentraciones de ácido sulfúrico, seguido por una hidrólisis alcalina.



Caso (A): 30 minutos de hidrólisis ácida en Lenga, caso (B): 60 minutos de hidrólisis ácida para Lenga, caso(C): 60 minutos de hidrólisis ácida para Lenga, caso (D): 60 minutos de hidrólisis ácida en Eucalipto

## PRETRATAMIENTO DE LÍQUIDOS IÓNICOS (IL'S) Y POSTERIOR TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En este estudio, se analizó el efecto del uso de líquidos iónicos en el pretratamiento de residuos forestales. Los líquidos iónicos utilizados fueron  $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$  y  $[\text{A336}^+][\text{OH}^-]$ .  $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$  fue elegido por su anión que según la literatura es capaz de perturbar el enlace de hidrógeno reduciendo la cristalinidad de la celulosa [36].  $[\text{A336}^+][\text{OH}^-]$  fue sugerido por el Profesor Jyri-Pekka Mikkola de Åbo Akademy University, Turku, Finlandia.

En el pretratamiento con líquidos iónicos se utilizó Lenga en 6 condiciones y Eucalipto en 8 condiciones distintas, las que se encuentran detalladas en la Tabla 8-1.

**Tabla 8-1: Condiciones utilizadas en el pretratamiento con líquidos iónicos**

N°	Sustrato	Líquido iónico	Tiempo incubación [min]	Temperatura [°C]
1	Lenga	Blanco, sin pretratamiento de líquido iónico, solo hidrólisis enzimática		
2	Lenga	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	80
3	Lenga	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	121
4	Lenga	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	150
5	Lenga	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	30	150
6	Lenga	$[\text{A336}^+][\text{OH}^-]$	60	150
7	Eucalipto	Blanco, sin pretratamiento de líquido iónico, solo hidrólisis enzimática		
8	Eucalipto	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	80
9	Eucalipto	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	121
10	Eucalipto	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	150
11	Eucalipto	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	30	150
12	Eucalipto	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	60	170
13	Eucalipto	$[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$	30	170
14	Eucalipto	$[\text{A336}^+][\text{OH}^-]$	60	150

### ***8.1.1 Efecto del líquido iónico, temperatura y tiempo de reacción en los azúcares liberados por la hidrólisis enzimática.***

Del Gráfico 8-1 se desprende que en todas las condiciones estudiadas, cuando se utiliza [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] en el pretratamiento, el material lignocelulósico se vuelve más accesible al ataque de las enzimas celulasas comerciales que las muestras sin pretratamiento.

Diferente es el caso para [A336<sup>+</sup>][OH<sup>-</sup>]; en este caso se observa que para Lenga y Eucalipto el valor de la suma total de azúcares reductores es un poco menor que el de la muestra “sin tratar”. Una razón posible a este comportamiento es el mal lavado de la muestra en la regeneración del material. Otra razón puede ser que el líquido iónico [A336<sup>+</sup>][OH<sup>-</sup>] (Metiltriocilamonio Hidroxi) no es un catión estructural que incluye imidazolio, pirrodinio, piridinio, fosfonio [36]. Como lo reporta la literatura [35], la celulosa se disuelve en IL's que contienen aniones clorhidro, formato, acetato o alquilofofosfato, dado que ellos forman un fuerte enlace con los puentes de hidrógeno de la celulosa y otros carbohidratos a elevadas temperaturas (del orden de 150-200°C), permitiendo la disolución de éstas biomoléculas, este no sería el caso de [A336<sup>+</sup>][OH<sup>-</sup>].

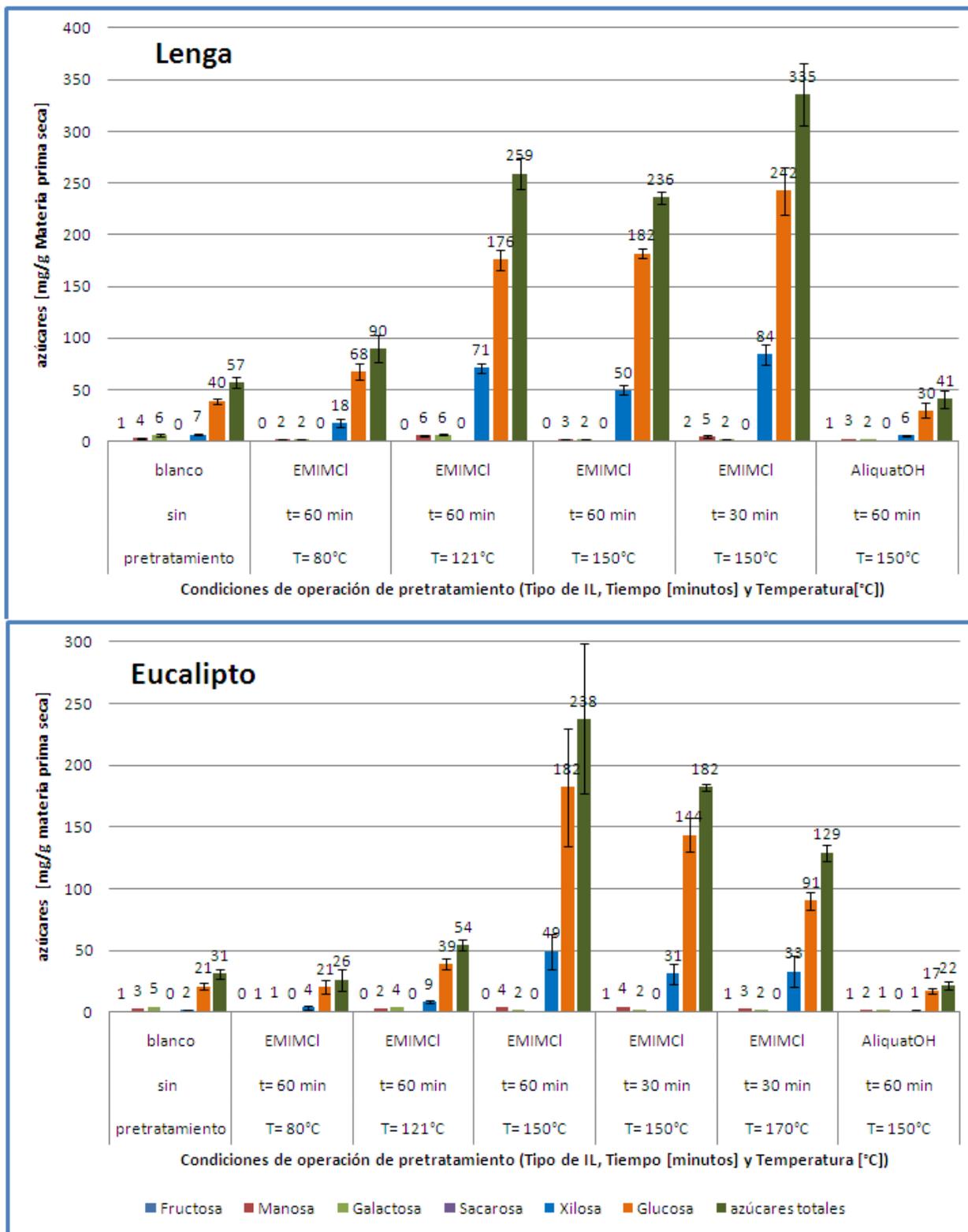
### ***8.1.2 Conversión de glucosa y xilosa respecto a los azúcares teóricos***

El Gráfico 8-1 indica que los principales monómeros liberados en la reacción enzimática corresponden a xilosa y glucosa en una relación 25%-75% para Lenga y 20%-80% para Eucalipto. Este resultado es positivo ya que el objetivo del tratamiento enzimático es romper los enlaces de celulosa y transformarlos en glucosa [46], [54].

Del Gráfico 8-1 se observa que existen otros azúcares además de glucosa en las muestras pretratadas, esto se debe a que las enzimas celulasas que se incluyen en el proceso de la hidrólisis de la celulosa son endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasa, hay también muchas enzimas capaces de atacar la hemicelulosa como la glucoronidasa, xilanasas, acetilesterasa, β-xilosidasa, galactomanasa y glucomanasa que pueden abordar la estructura de la hemicelulosa y liberar xilosa fructosa, manosa y galactosa [29]. La acción de estas enzimas, cuando catalizan la hidrólisis del material lignocelulósico, se encuentra controlada por dos etapas cruciales: (1) la adsorción de la enzima en las partículas celulósicas y (2) la formación del complejo enzima-sustrato (ES). Estas dos etapas dependen de variados factores. Entre los factores relacionados con la enzima se encuentra la inhibición por producto, la estabilidad térmica y la adsorción. Para el sustrato, entre los factores se incluye la presencia de la hemicelulosa y lignina, la cristali-

dad de la celulosa y el grado de polimerización [35]. Esta acotación es importante, ya que para Lenga la mayor liberación de azúcares no ocurre en las condiciones más extremas de pretratamiento, no así en Eucalipto. Del Gráfico 8-1 y la Tabla 8-2 se observa que la máxima liberación de azúcares se alcanza con las condiciones **temperatura 150°C, tiempo de reacción de 30 minutos, líquido iónico [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]**, donde los rendimientos de xilosa y glucosa con respecto a las cantidades teóricas son del 22% y 54% respectivamente.

Gráfico 8-1: Efecto de la temperatura [°C], tiempo [min] y tipo de IL, [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] y [A336<sup>+</sup>][OH<sup>-</sup>] en la hidrólisis enzimática a las 72 horas de operación de LENGUA y EUCALIPTO. Se presentan la concentración de azúcares como monómeros y los azúcares totales como la suma de los azúcares reductores liberados.



**Tabla 8-2: Conversión de glucosa y xilosa en la hidrólisis enzimática por 72 horas de muestras de Lengua en condiciones de pretratamiento variable. Destacado con rojo se encuentra la condición óptima**

LENGA				Conversión de 72 horas de hidrólisis enzimática		
Condiciones de Pretratamiento (temperatura, tiempo y tipo de líquido iónico)				Xilosa	Glucosa	Azúcares Reductores
(1)	Blanco sin pretratamiento			2%	9%	7%
(2)	T= 80°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	5%	16%	11%
(3)	T= 121°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	20%	41%	32%
(4)	T= 150°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	13%	40%	28%
(5)	<b>T= 150°C</b>	<b>t= 30 min</b>	<b>[emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]</b>	<b>22%</b>	<b>54%</b>	<b>40%</b>
(6)	T= 150°C	t= 60 min	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	2%	7%	5%

Cuando se compara la condición más extrema de Lengua, 150°C, 60 minutos con [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], se podría suponer el mismo comportamiento que el ocurrido con Eucalipto, un mayor rompimiento de la pared de lignina, se disminuye la cristalinidad de la celulosa y por lo tanto se recupera una mayor cantidad de azúcares. Este hecho no ocurre, por el contrario, se recupera solo el 28% de xilosa y el 40% de glucosa. Se proponen dos explicaciones para este caso. La primera es que existió una pérdida de masa posterior al pretratamiento (ver Anexo I) y por lo tanto esta pérdida se traduce en que los azúcares fueron “arrastrados” por el IL. Esta sospecha se basa en el hecho de que el caso (5) (que posee la misma temperatura de operación pero un menor tiempo de reacción, caso óptimo) se obtiene una cantidad mayor de azúcares y no existiría una pérdida de azúcares ya que la reacción fue detenida a tiempo. Otra explicación se basa en considerar el porcentaje de agua presente en el IL tratado. Como se explicó en la metodología, el líquido iónico absorbe la humedad del medio ambiente, y si se aumenta el contenido de agua en una muestra sobre el 15% peso, el IL pierde efectividad [36]. Por eso se puede suponer que al realizarse el pretratamiento en condiciones más duras en cuanto a tiempo y/o temperatura, ocurrió un desplazamiento de la reacción hacia los productos, especialmente con la glucosa, hacia la generación de compuestos como HMF y ácidos, que es lo que comúnmente ocurre en las reacciones en las que se encuentra presente el agua. Es decir, el pretratamiento en condiciones más duras, además disminuir la cristalinidad de la celulosa, la solubilizó; y la presencia de agua, desplazó la reacción en el sentido de la hidrólisis. Este mecanismo propuesto se presenta en la siguiente figura:

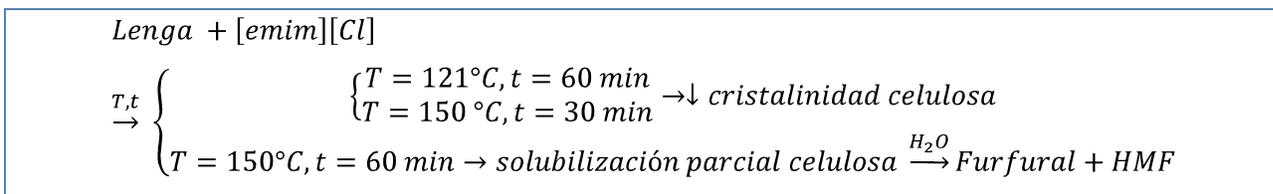


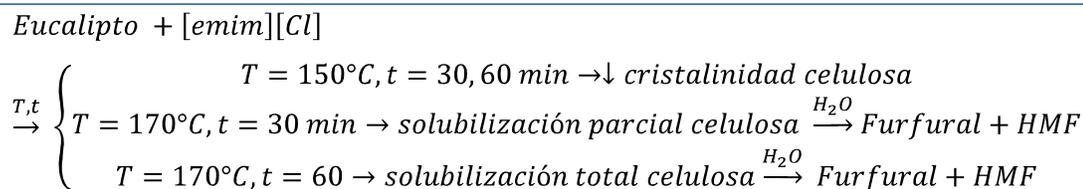
Figura 8-1: Mecanismo propuesto para el pretratamiento con líquidos iónicos en el material lignocelulósico Lenga.  
T: Temperatura, t: tiempo.

Para la materia prima Eucalipto, se observa que al aumentar las variables del pretratamiento aumenta la obtención de azúcares. El mejor caso obtenido es para las siguientes condiciones de pretratamiento: **[emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], temperatura de 150°C, tiempo de reacción de 60 minutos**, donde se obtuvo una conversión de xilosa del 13% y de glucosa del 44%. Además en este caso, la pérdida de masa posterior al pretratamiento es menor al 10%, por lo que se desprende que no existió una pérdida de azúcares considerable.

Tabla 8-3: Conversión de glucosa y xilosa en la hidrólisis enzimática por 72 horas de muestras de Eucalipto en condiciones de pretratamiento variable. Destacado con rojo se encuentra la condición óptima

EUCALIPTO				72 horas de conversión de hidrólisis enzimática		
Condiciones de Pretratamiento (temperatura, tiempo y tipo de líquido iónico)				Xilosa	Glucosa	Azúcares reductores
(1)	Blanco sin pretratamiento			0%	5%	4%
(2)	T= 80°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	1%	5%	3%
(3)	T= 121°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	2%	9%	7%
(4)	<b>T= 150°C</b>	<b>t= 60 min</b>	<b>[emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]</b>	<b>13%</b>	<b>44%</b>	<b>29%</b>
(5)	T= 150°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	8%	34%	22%
(6)	T= 170°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	9%	22%	16%
(7)	T= 150°C	t= 60 min	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0%	4%	3%

Con Eucalipto cabe destacar un caso [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>], temperatura de 170°C, tiempo de reacción de 30 minutos; con él se obtiene una menor conversión de azúcares que con el caso del mismo tiempo y líquido iónico pero con una temperatura de 150°C. Si se comparan los valores de glucosa y xilosa se observa que para el primer monómero su obtención disminuye en 50 mg/g y para el segundo se mantiene en 33 mg/g. La explicación para este hecho es la misma que para el caso anterior de Lenga, una pérdida de azúcares y una descomposición de éstos. En este caso el mecanismo propuesto se presenta en la siguiente figura:



**Figura 8-2: Mecanismo propuesto para el pretratamiento con líquidos iónicos en el material lignocelulósico Eucalipto.**  
**T: temperatura, t: tiempo**

Observando la Tabla 8-2 y la Tabla 8-3, y al detenerse en los casos anteriores, se tiene que para Lenga la variable de mayor importancia corresponde al tiempo de reacción, ya que al tener las muestras durante un mayor tiempo influye de manera negativa en la conversión de monómeros. Para Eucalipto ocurre lo mismo, pero en este caso el mayor tiempo influye de manera positiva. Otro resultado visible de las Tablas y del Gráfico 8-1, es que los monómeros liberados más importantes corresponden a xilosa y glucosa.

### **8.1.3 Azúcares reductores en la fracción líquida del pretratamiento con líquido iónico**

Como resultado del pretratamiento con líquido iónico se obtuvo: (1) una fracción sólida que fue sacrificada para la obtención de azúcares y; (2) una fracción líquida que contiene agua, líquido iónico y una concentración de azúcares reductores que fue determinada por el método DNS. Esta medición se realizó solo a los mejores casos para cada pretratamiento realizado y su objetivo es determinar si existe sólo una disrupción del material lignocelulósico o también se genera una hidrólisis de este. Estos resultados se encuentran disponibles en la Tabla 8-4.

La Tabla 8-4 indica que las sacrificaciones con mejores resultados presentan el menor porcentaje de azúcares reductores en la fracción líquida del pretratamiento. Con ello se puede concluir que las mejores condiciones de pretratamiento con líquido iónico, no se liberan azúcares en la fracción líquida o su degradación de subproductos, y los azúcares solo se obtienen por la adición de enzimas para la sacrificación de la fracción sólida. Este hecho se explica porque el objetivo del pretratamiento con líquidos iónicos no es disolver la celulosa y hemicelulosa del material, si no que romper la pared de lignina de este y disminuir la cristalinidad de la matriz de celulosa.

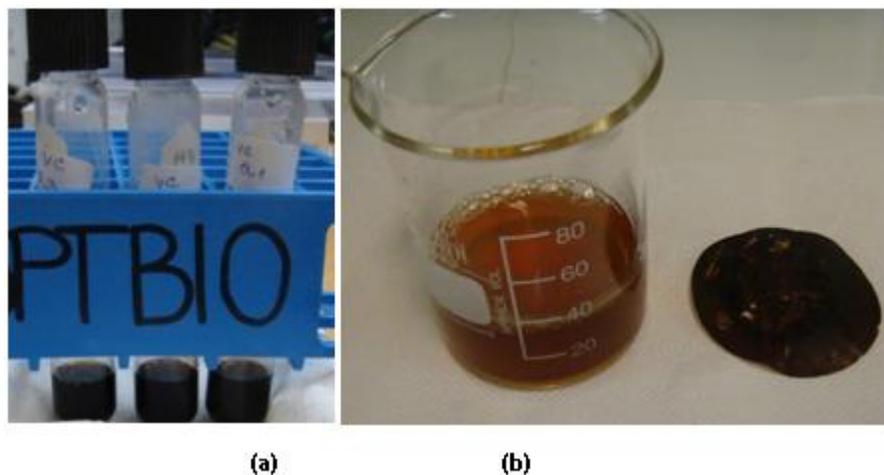
El mayor valor de azúcares reductores se obtuvo con Eucalipto tratado con  $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$  a  $170^\circ\text{C}$  por 60 minutos con un rendimiento con respecto a los azúcares teóricos de un 22,8%. Cabe explicar que en este

caso ocurrió una desintegración completa del material (ver Figura 8-3) y por lo tanto no se pudo realizar la hidrólisis enzimática. Las mismas condiciones para Eucalipto de líquido iónico y temperatura pero con 30 minutos de operación promedia un rendimiento del 15,6% de azúcares reductores, por lo que se comprueba la explicación de la solubilización de la celulosa por acción del tiempo.

**Tabla 8-4: Azúcares reductores presentes en la fracción líquida del pretratamiento con líquido iónico. El resultado se presenta como el rendimiento con respecto a los azúcares teóricos totales presentes en la materia prima sin tratar**

Serie	Condiciones de Pretratamiento			IL	Azúcares red. [%]	$\sigma$
C	Lenga	T= 150°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	5,9%	35,6
O	Lenga	T= 150°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	1,9%	0,2
D	Eucalipto	T= 150°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	2,2%	1,5
Q	Eucalipto	T= 170°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	22,8%	24,3
R	Eucalipto	T= 170°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	15,6%	64,2

La Figura 8-3 muestra el resultado del pretratamiento con líquido iónico [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] a 170°C durante 1 hora a Eucalipto, en él existió la destrucción del material, se pesaron muestras post secado y estas ponderaban los 0,02g. No se realizó la hidrólisis enzimática.



**Figura 8-3: (a) Muestras post pretratamiento de Eucalipto (b) líquido iónico con alto contenido de azúcares y papel filtro donde quedaron los restos de madera, no se pudo recuperar el material**

#### 8.1.4 Generación de compuestos inhibidores en el tratamiento de hidrólisis enzimática

En la Figura 8-4 se muestran los subproductos generados por el tratamiento de hidrólisis enzimática a las 72 horas, en las muestras con mejores resultados del pretratamiento con líquido iónico de Lenga y Eucalipto. De ella se desprende que los compuestos presentes en la muestra corresponden a acetona, propanol, ácido acético, hexanal, heptanal, octanal, 2-metil hexanol, ácido sórbico y nonanal. La presencia de estos compuestos puede ser explicada a través de la Figura 8-5, como reacciones ocurridas por parte del levoglucosano. Ácido acético es liberado desde los grupos acetil en la fracción de hemicelulosa.

Cabe destacar que no fueron encontrados compuestos fenólicos, furfural y 5-hidroximetil furfural (HMF), lo que puede ser atribuido a la alta especificidad de las enzimas y las condiciones suaves de la reacción. Según Cara [55], solo a temperaturas altas es apreciable un incremento en la concentración de furufales y HMF.

Por otro lado, el ácido acético es inhibidor de la levadura *S. cerevisiae*. El efecto inhibidor se debe a que es un ácido no disociado, que penetra en la membrana celular de la levadura, que luego se disocia en el citoplasma donde el pH es más básico. Esto conduce a la inhibición del crecimiento celular por altas concentraciones de ácido [40]. Por último, el mismo autor destaca que los grupos COOH y CH<sub>3</sub> (correspondientes al ácido acético) son los que contribuyen menos a la inhibición de la fermentación por *S. cerevisiae*.

Con el análisis anterior se puede predecir que la etapa de fermentación se realizará con una alta eficiencia [29].

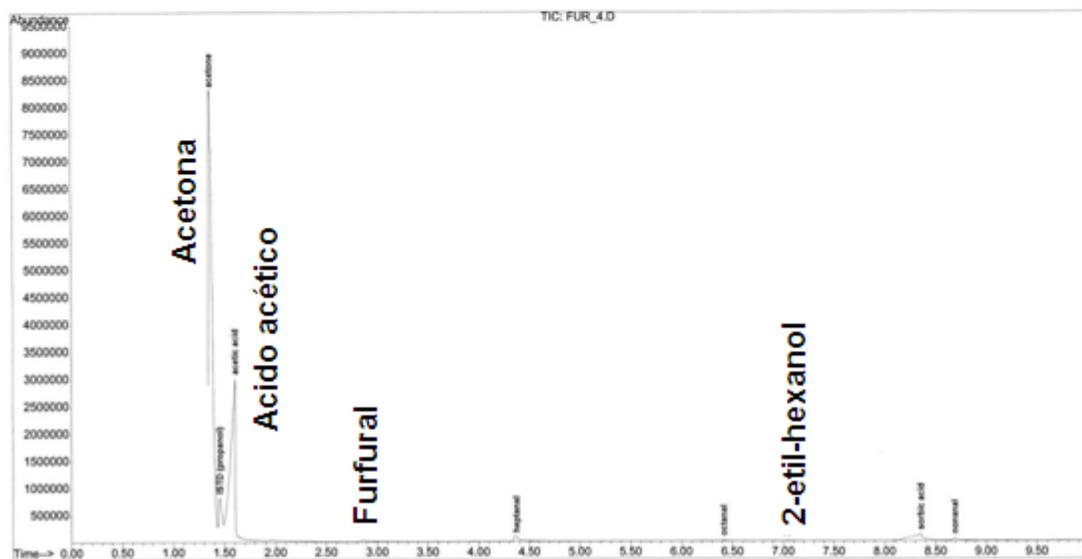
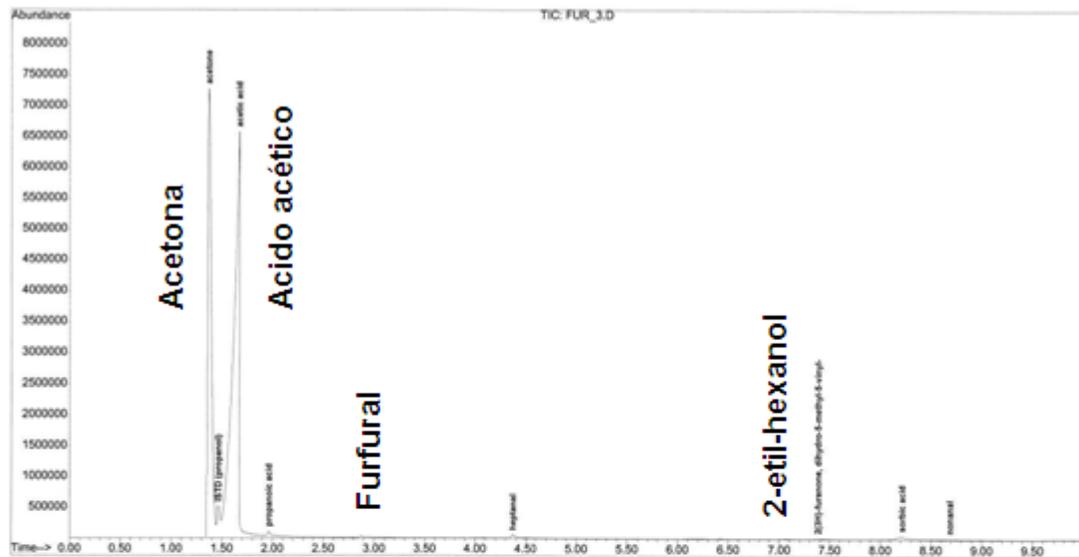


Figura 8-4: Otros compuestos en una muestra de LENGA pretratada con  $[emim^+][Cl^-]$  a  $150^\circ C$ , por 30 minutos y tratada con una hidrólisis enzimática por 72 horas (arriba) y EUCALIPTO pretratada con  $[emim^+][Cl^-]$  a  $150^\circ C$ , por 60 minutos y tratada con una hidrólisis enzimática por 72 horas y (abajo).

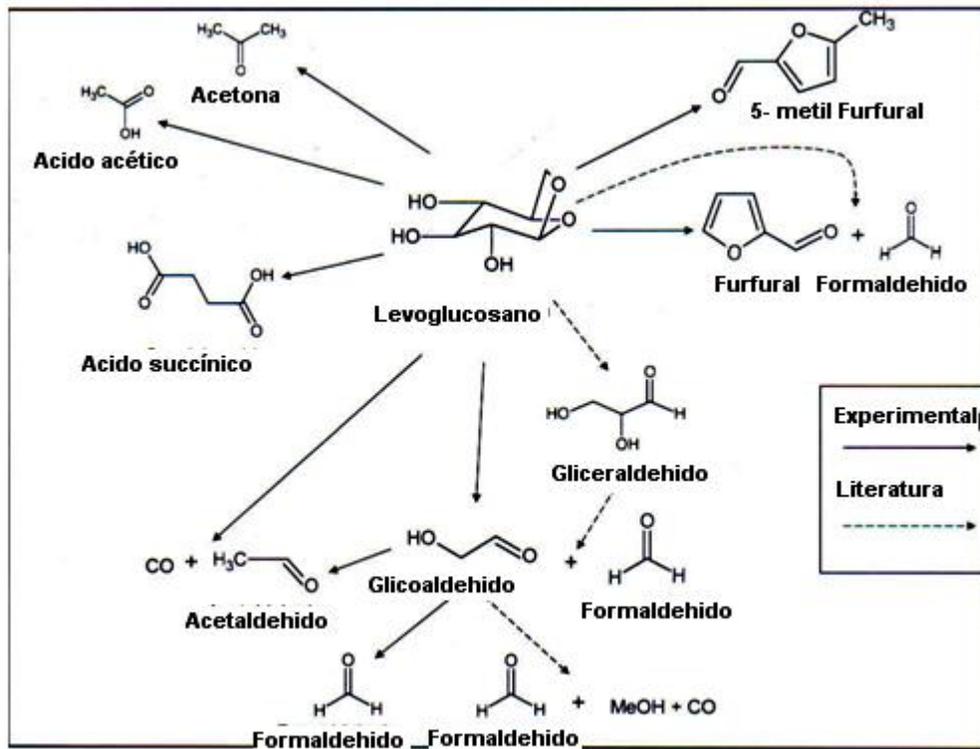


Figura 8-5: Subproductos del Levoglucosano (Información entregada por Mats Katdstrom, Åbo Akademi University)

### ***8.1.5 Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico.***

El Gráfico 8-2 y Gráfico 8-3 muestran los perfiles cinéticos para Lenga y Eucalipto respectivamente.

Del Gráfico 8-2, el caso A representa la mejor condición encontrada para Lenga. En ella, un 96% (319 mg/g M.S.) del total de los azúcares alcanzados a las 72 horas son liberados a las 6 horas de reacción y un 100% es alcanzado a las 24 horas de tratamiento de hidrólisis enzimática.

El caso B muestra que el 85% de los azúcares posibles (72 horas) son alcanzados a las 6 horas y un 96% a las 24 horas. Este caso muestra que la cinética de esta reacción es levemente menor que la del mejor caso.

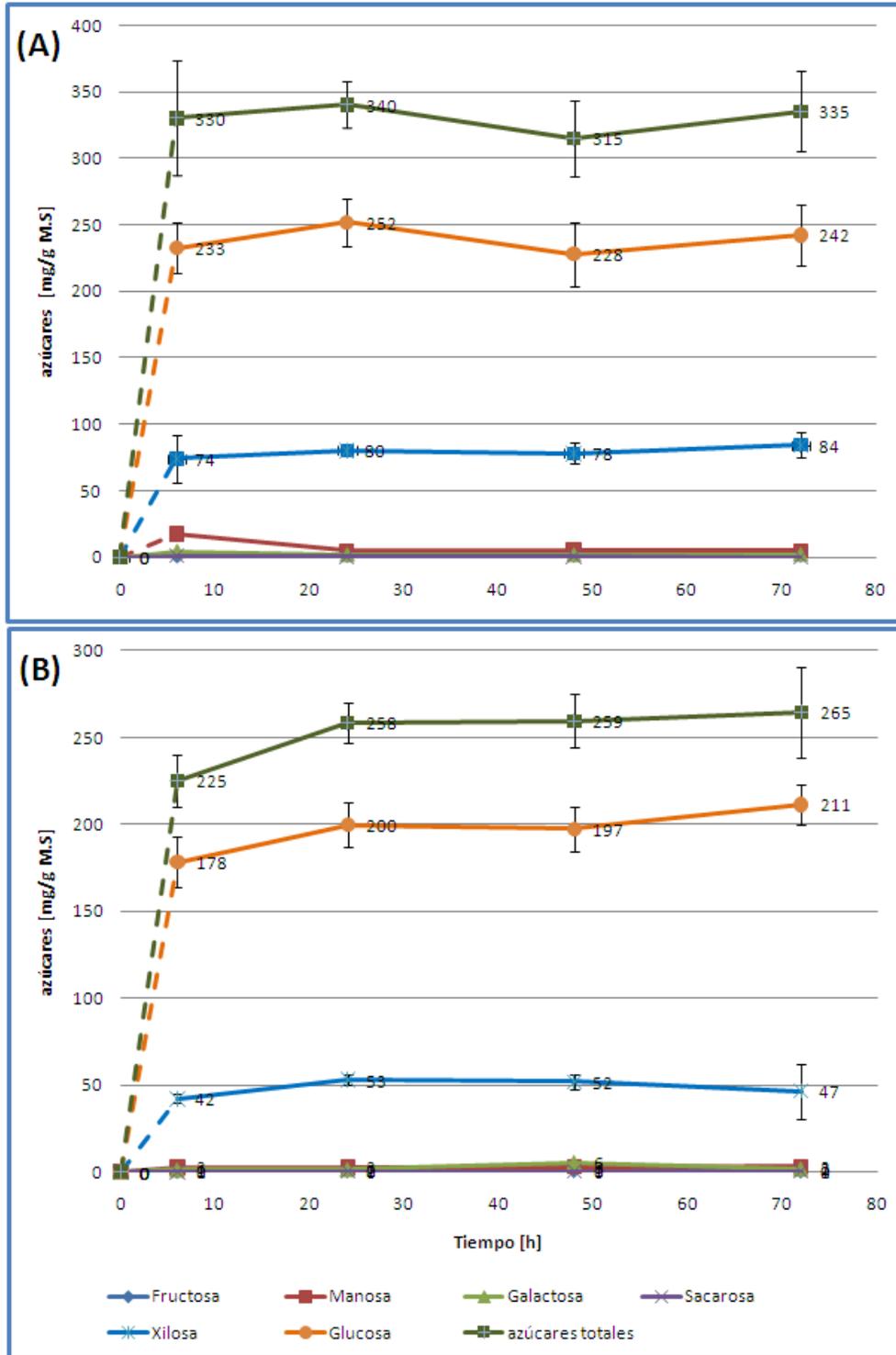
El perfil cinético de la hidrólisis de Eucalipto se presenta en el Gráfico 8-3. Del caso C se desprende que un 85% del total de azúcares reductores son alcanzados a las 6 horas mientras que el 100% de estos son alcanzados a las 24 horas. En el caso E se tiene que el 68% de los azúcares son alcanzados a las 6 horas y un 100% de estos a las 24 horas. Con este resultado se puede concluir que no se necesita más tiempo que 24 horas para la hidrólisis enzimática.

Para todos los perfiles cinéticos anteriores se pueden explicar su comportamiento con dos hipótesis: la primera es que las enzimas quedan retenidas en la celulosa insoluble, no pudiendo continuar con la sacarificación de ella; la otra opción es que no existe más celulosa para sacarificar y por lo tanto se puede usar una carga de enzima menor y se obtendrá el mismo resultado. Para poder comprobar esa hipótesis se propone cuantificar la celulosa disponible posterior a la sacarificación mediante un método que sigue la Norma TAPPI 203 cm-99. El proceso consiste en la aplicación de soluciones acuosas de álcalis fuertes a una muestra de holocelulosa previamente preparada, estas soluciones disuelven las poliosas presentes, dejando el residuo de alfa-celulosa [56].

Por el contrario, el caso D (mejor caso encontrado) muestra algo distinto. En él, el 67% del total de azúcares son alcanzados a las 6 horas, 79% a las 24 horas y un 84% a las 48 horas. Esto puede ser explicado porque dado que es el mejor caso, la cinética de las enzimas celulasas no se vieron inhibidas por el producto obteniéndose una mayor cantidad de azúcares a las 72 horas.

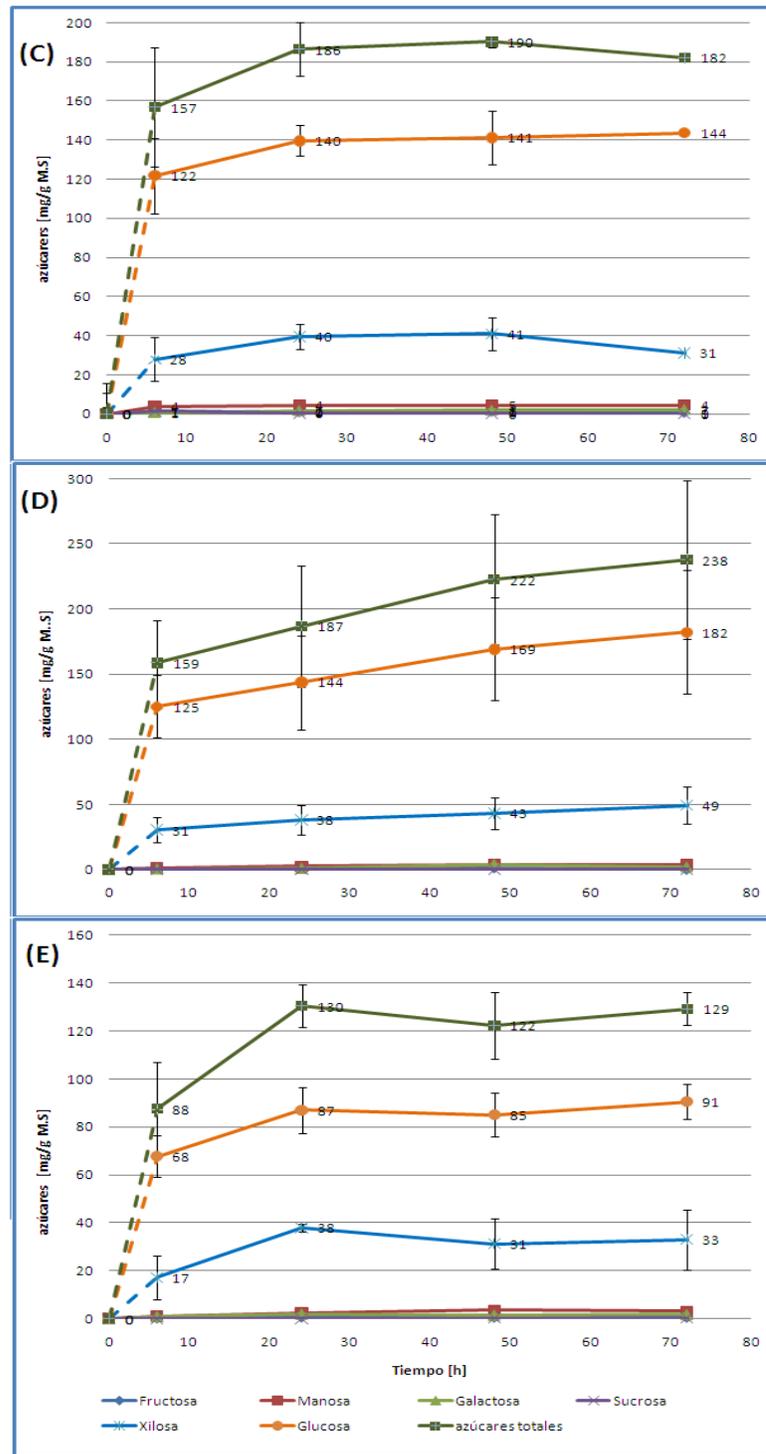
El comportamiento de la hidrólisis enzimática a través del tiempo en las maderas utilizadas se presenta a continuación, en primer lugar se muestran los resultados para Lenga y posteriormente los de Eucalipto.

Gráfico 8-2: Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática de LENGA pretratada con IL [emim][Cl]



Caso (A) Pretratamiento por 30 minutos, a una temperatura 150°C. Caso (B) Pretratamiento por 60 minutos a una temperatura de 150°C

Gráfico 8-3: Perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática de EUCALIPTO pretratado con [emim][Cl]



Caso (C) Pretratamiento a 150°C, por 30 minutos, Caso (D) Pretratamiento a 150°C por 60 minutos, Caso (E) Pretratamiento a 170°C, por 30 minutos.

### COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS

#### *9.1.1 Comparación de xilosa, glucosa y azúcares reductores en el pretratamiento y la posterior hidrólisis enzimática.*

Dado que para los tres pretratamientos seleccionados la relación xilosa/glucosa que se libera es similar (entre un 20-25% para xilosa y 75-80% para glucosa), se comparan los azúcares reductores totales liberados en los mejores casos encontrados. Estos se presentan en la Tabla 9-1 y Tabla 9-2 para Lengua y Eucalipto respectivamente. Si solo se consideran los azúcares provenientes del pretratamiento sin sacarificación, se tiene que el pretratamiento con líquidos iónicos no provee de azúcares reductores y el pretratamiento ácido y alcalino su conversión corresponde al 10% promedio para ambas materias primas.

Por otro lado, si se comparan solo los azúcares provenientes de la hidrólisis enzimática, que corresponden en su mayoría a glucosa, se tiene que el pretratamiento con líquidos iónicos es el más efectivo de todos los pretratamientos evaluados con un 40% y 29% de conversión para Lengua y Eucalipto, respectivamente.

En cambio, si se consideran todos los azúcares reductores del proceso, el pretratamiento que incluye una hidrólisis alcalina provee la mayor cantidad de azúcares reductores con un 49% y 45% para Lengua y Eucalipto respectivamente.

Si se comparan los resultados obtenidos en las materias primas se tiene que en todos los casos con Lengua se obtienen mejores resultados y solo al utilizar el pretratamiento alcalino los porcentajes de recuperación de azúcares reductores se acercan. Esto quiere decir que el tamaño de la muestra es preponderante en la hidrólisis ácida y el tratamiento con líquidos, no así en el pretratamiento alcalino.

Por último, al comparar los perfiles cinéticos obtenidos para todos los pretratamientos realizados, con el pretratamiento de hidrólisis alcalina y líquidos iónicos se puede realizar la sacarificación enzimática en un tiempo menor a las 72 horas. Este hecho es más pronunciado en el pretratamiento con líquidos ióni-

cos, donde a las 24 horas se obtiene casi la totalidad de los azúcares obtenidos a las 72 horas de operación.

**Tabla 9-1: Comparación de glucosa, xilosa y azúcares reductores en pretratamientos para Lengua**

LENGA Conversión Azúcares reductores				Pretratamiento			72 horas de hidrólisis enzimática <sup>13</sup>			Total		
Condiciones de Pretratamiento (temperatura [°C], tiempo [min] y agente)				Xil. [%]	Gluc. [%]	A.R. <sup>14</sup> [%]	Xil. [%]	Gluc. [%]	A.R. [%]	Xil. [%]	Gluc. [%]	A.R. [%]
(1)	T=121°C	t=30 min	1,00 % (v/v)H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	N.D. <sup>15</sup>	N.D.	12	14	23	18	---	---	30
(2)	T=121°C	t=60 min	0,75% (v/v)H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2%(v/v) NaOH	24	2	15	8	43	33	31	44	49
(3)	T= 150°C	t= 30 min	IL [emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	N.D.	N.D.	2	22	54	40	---	---	42

**Tabla 9-2: Comparación de glucosa, xilosa y azúcares reductores en pretratamientos para Eucalipto**

EUCALIPTO Conversión Azúcares reductores				Pretratamiento			72 horas de hidrólisis enzimática <sup>13</sup>			Total		
Condiciones de Pretratamiento (temperatura [°C], tiempo [min] y agente)				Xil. [%]	Gluc. [%]	A.R. [%]	Xil. [%]	Gluc. [%]	A.R. [%]	Xil. [%]	Gluc. [%]	A.R. [%]
(1)	T=121°C	t=30 min	1,00 % (v/v)H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	N.D.	N.D.	5	8	19	22	---	---	27
(2)	T=121°C	t=60 min	1,00% (v/v)H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2%(v/v) NaOH	19	1	10	11	58	35	30	59	45
(3)	T= 150°C	t= 60 min	IL [emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	N.D.	N.D.	2	13	44	29	---	---	31

<sup>13</sup> Para el pretratamiento que incluye una hidrólisis alcalina la hidrólisis enzimática se realizó por 48 horas

<sup>14</sup> Azúcares reductores

<sup>15</sup> Información no disponible

### 9.1.2 Comparación con la literatura.

Por otro lado, se realiza una comparación de los azúcares obtenidos con el método de la explosión a vapor<sup>16</sup>. Se elige este método porque es el pretratamiento más utilizado para maderas duras y por las plantas industriales existentes. Para realizar esta comparación se recurre a un trabajo sobre distintos métodos de detoxificación para una explosión a vapor en madera de Álamo realizado por Cantarella et al [57]. Los valores presentados en su trabajo son con respecto a los azúcares obtenidos en la hidrólisis enzimática a las 66 horas de operación. De ellos se observa que la selectividad de glucosa en la hidrólisis enzimática bordea el 80% en contraste con los resultados obtenidos donde el rendimiento máximo para los pretratamientos realizados es de un 58% para Eucalipto (hidrólisis alcalina) y un 54% para Lengua (líquidos iónicos). Cabe señalar que se están comparando maderas cuya composición química es distinta. Finalmente de esta misma tabla se observa que el porcentaje de sacarificación depende del tipo de detoxificación variando entre el 44% (valor similar a los obtenidos en este trabajo) y el 88% que comparado con el valor máximo obtenido en el proceso que incluye el pretratamiento y la sacarificación para lenga (49%) y eucalipto (45%), es un 30% mayor.

Tabla 9-3: Hidrólisis enzimática de explosión a vapor en madera de álamo (Obtenido de [57])

Detoxificación	Glucosa [mg/g]	Azúcares reductores [mg/g]	Selectividad glucosa [%]	Rendimiento en sacarificación [%]
Sin	376	466	80,7	72,0
Sistema agua-etil acetato	250	298	83,9	43,9
Ca(OH) <sub>2</sub>	494	570	86,7	88,4

Con ello se concluye que los pretratamientos realizados obtienen un rendimiento de azúcares promedio al comparar con el método más utilizado en la industria. Cabe señalar que se podrían obtener mejores conversiones de glucosa, mejorándose las sacarificaciones enzimáticas, a través de pruebas de cargas enzimáticas. Mejores conversiones de xilosa se pueden obtener al utilizar la fracción líquida del pretratamiento e intentando técnicas de separación de azúcares y líquido iónico.

<sup>16</sup> Información sobre el método de Explosión a Vapor se encuentra en el Anexo C

## CONCLUSIONES

Después de realizar el trabajo de tesis en pretratamientos a residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Todos los pretratamientos, ácido diluido, alcalino diluido y líquidos iónicos, mejoran la eficiencia (en términos de rendimiento y tasas de reacción) de la hidrólisis enzimática en la obtención de azúcares reductores.
- Las condiciones óptimas encontradas en el pretratamiento ácido para Lenga son  $T=121^{\circ}\text{C}$ ,  $t=30\text{min}$ , 1,00% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y Eucalipto  $T=121^{\circ}\text{C}$ ,  $t=30\text{min}$ , 1,00% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El rendimiento obtenido fue de un 30% y 27% respectivamente. Se concluye que un pretratamiento ácido no es suficiente para la mejor obtención de azúcares reductores en el proceso de hidrólisis enzimática.
- Las condiciones óptimas encontradas para Lenga y Eucalipto utilizando un pretratamiento alcalino es una hidrólisis ácida a  $T=121^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60\text{min}$ , 0,75% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $T=121^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60\text{min}$ , 1,00% (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Considerando los azúcares obtenidos en el pretratamiento con ácido sulfúrico y la sacarificación el rendimiento obtenido para Lenga es un 49% y para Eucalipto un 45%. Con eso si **el objetivo de fermentación son las pentosas y hexosas se tiene que el pretratamiento alcalino es el más efectivo.**
- Las condiciones óptimas encontradas para el pretratamiento con líquidos iónicos en Lenga son  $T=150^{\circ}\text{C}$ ,  $t=30\text{min}$ , IL [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] y Eucalipto  $T=150^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60\text{min}$ , IL [emim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] con una conversión del 40% y 29% respectivamente. **Si el objetivo de fermentación es glucosa, el pretratamiento indicado es con líquidos iónicos** ya que este pretratamiento solo considera los azúcares generados en la sacarificación enzimática.
- La relación glucosa/xilosa liberada en el pretratamiento ácido corresponde al 7/93%, en cambio esta relación en la sacarificación enzimática en los tres pretratamientos estudiados es en promedio 75/25%
- Las condiciones más duras de trabajo (por ejemplo: mayor concentración de ácido sulfúrico, tiempo de exposición) no generan la mayor liberación de azúcares reductores en la sacarifica-

ción, ya que con ellas pudo existir en el pretratamiento una degradación de azúcares a otros productos.

- Al comparar los valores obtenidos para Lenga y Eucalipto en los tres pretratamientos seleccionados, con Lenga siempre se obtuvo una mayor liberación de azúcares. Este resultado es explicado por menor tamaño de partícula y un menor porcentaje de lignina en comparación con Eucalipto, por lo que estos factores son preponderantes en la liberación de azúcares en la hidrólisis enzimática.
- Con  $[A336^+][OH^-]$  se obtuvieron pobres resultados, donde la principal explicación viene dada por el anión de este líquido iónico. Es decir el anión cumple un papel transcendental para el éxito del pretratamiento.
- Los pretratamientos realizados obtuvieron un rendimiento promedio de azúcares al comparar con el método más utilizado en la industria, la explosión a vapor.
- Del estudio estadístico realizado se tiene que el factor más importante en el pretratamiento y la hidrólisis enzimática corresponde al tiempo de reacción.
- De los perfiles cinéticos de la hidrólisis enzimática se concluye que con pretratamiento alcalino (posterior a un pretratamiento ácido) y con líquidos iónicos se obtiene el máximo de los azúcares en un tiempo menor a las 24 horas por lo que estos pretratamientos son más eficientes ya que es posible obtener una mejor hidrólisis de la celulosa en ese periodo de tiempo.

Entre las recomendaciones para trabajos futuros se encuentran:

- Realizar un estudio sobre las concentraciones enzimáticas basándose en la cantidad de celulosa disponible en las muestras pretratadas.
- Para el pretratamiento ácido se recomienda realizar un estudio a temperaturas mayores a  $121^\circ\text{C}$  ya que en este trabajo por razones técnicas no fue posible ejecutar.
- Analizar Lenga con un tamaño de partícula mayor para comprobar la hipótesis del tamaño de partícula y la obtención de azúcares.
- Experimentar con otros líquidos iónicos que puedan aumentar aún más los azúcares obtenidos (en especial glucosa y xilosa) en la sacarificación enzimática.

- Si se quisieran recuperar los azúcares obtenidos en la fracción líquida obtenida post pretratamiento con líquidos iónicos se deben probar técnicas de separación ya que esta es una desventaja del pretratamiento.
- Continuar la investigación del pretratamiento con líquidos iónicos ya que es el más innovador y prometedor de los tres pretratamientos realizados.

# REFERENCIAS

---

- [1] **MILIARIUM, INGENIERIA CIVIL Y MEDIO AMBIENTE** (2009) *Energías renovables* [en línea] < [http://www.miliarium.com/Monografias/Energia/E\\_Renovables/Biomasa/Biomasa.asp](http://www.miliarium.com/Monografias/Energia/E_Renovables/Biomasa/Biomasa.asp) > [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [2] **ROGNER, H.** (2001) *World Energy Assessment, Capítulo 5, "Energy resources"* ISBN: 92-1-126126-0 United Nations Development Programme, World Energy Council
- [3] **INTERNATIONAL ENERGY AGENCY** (2004) *Biofuels for transport. An international perspective*, IEA Office of Energy Efficiency, Technology and R&D. París, Francia.
- [4] **RED MEXICANA DE BIOENERGÍA** (2009) *Preguntas frecuentes* [en línea] < <http://www.rembio.org/PreguntasFrecuentes> > [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [5] **VESSIA, Ø.** (2005) *Biofuels from lignocellulosic material. In the Norwegian context 2010, Technology, Potential and Cost*. Capítulo 2. Trondheim, Suecia.
- [6] **BERG C.** (1999) *World ethanol production and trade to 2000 and beyond* [en línea] <<http://www.distill.com/berg/>> [Consulta: 18 de Agosto 2009]
- [7] **PURWADI, R.** (2006) *Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy*. Chalmers University of Technology. Göteborg, Suecia.
- [8] **DEPARTAMENTO DE ENERGÍA DE LOS ESTADOS UNIDOS** [en línea] < <http://www.eere.energy.gov/> > [Consulta: 18 de Agosto 2009].
- [9] **FICHA TÉCNICA: VEHÍCULOS CON ETANOL** [en línea] < <http://www.conae.gob.mx/work/sites/CONAE/resources/LocalContent/466/1/images/vehiculoetanol.pdf> > [Consulta: 04 de Noviembre de 2009].
- [10] **SANCHEZ, O.; CARDONA, C.** (2005) *Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. INCI.* [En línea]. <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037818442005001100005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037818442005001100005&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0378-1844. Vol.30, No.11 [Consulta: 13 Julio 2009]
- [11] **LASER, M; SCHULMAN, D; ALLEN, SG; LICHWA, J; ANTAL, J; LYND, L** (2002) *A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol*. Bioresource Technology. 81 (1): 33-44.

- [12] **BiodiSol** (2009) *Mas energía mas producción* [en línea] < <http://www.biodisol.com/biocombustibles/sekab-presenta-el-primer-etanol-sostenible-verificado-del-mundo-que-reduce-las-emisiones-en-un-85-biocombustibles-bioetanol-medio-ambiente/> > [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [13] **CAVIERES, PATRICIO.** "Viabilidad de los biocombustibles" [en línea] <<http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/bioenergia/pdf/cavieres.pdf> > [Consulta: 04 de Noviembre de 2009].
- [14] **QUEVEDO, C.** (1998) *Análisis de mitigación de gases de efecto invernadero en la utilización de energía en ecuator- Sector Transporte-Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre gases de efecto invernadero.* [en línea] < <http://uneprisoe.org/EconomicsGHG/Conferences/quevedo.doc> > [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [15] **GARCIA, M.** [en línea] <[http://micromiatabajofinal.blogspot.com/2008/10/ventajas-y-desventajas-del-bioetanol\\_03.html](http://micromiatabajofinal.blogspot.com/2008/10/ventajas-y-desventajas-del-bioetanol_03.html)> [Consulta: 18 de Septiembre 2009].
- [16] **CORTINEZ, V.; MONTECINOS, C.; PEZOA, R.** (2007) Proyecto de diseño de una planta de producción de bio-combustible butanol. Curso Taller de Procesos. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Universidad de Chile. Chile
- [17] **BREÑA, J.** [en línea] <<http://knol.google.com/k/-/-/2ydkxmcacjfn6/52?version=52#>> [Consulta: 18 de Agosto 2009].
- [18] **LYND, L.** (1996) *Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy.* Annu. Rev. Energy Environment. 21: 403-465.
- [19] **TEXTOS CIENTÍFICOS** [en línea] <<http://www.textoscientificos.com/papel/estructura-madera>> [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [20] **SUN, Y; CHENG, J.** (2001) *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.* Bioresource Technology 83: 1-11
- [21] **CARBALLO, I.; ARTEAGA, Y.** [en línea] <<http://www.monografias.com/trabajos46/hemicelulosas-maderas/hemicelulosas-maderas2.shtml>> [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [22] **SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G.** (2003) *Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production.* Biomass and Bioenergy 24: 475-486
- [23] **CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J.; SÁEZ, F.; CASTRO, E.** (2008) *Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification.* Bioresource Technology 99:1869-1876.
- [24] **GUO, G.; CHEN, WEI-HSI.; CHEN, WEN-HENG; MEN, L.; HWANG, S.** (2008) *Characterization of dilute acid pre-treatment of silvergrass for ethanol production.* Bioresource Technology 99:6046-6053

- [25] **GUO, G.; HSU, D.; CHEN, W.; CHEN, WEI-HSI, HWANG, W.** (2009) *Characterization of enzymatic saccharification for acid- pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition*. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 80-87
- [26] **SUN, Y.; CHENG, J.** (2005) *Dilute acid pretreatment of rye Straw and bermudagrass for ethanol production*. *Bioresource Technology* 96: 1599-1606
- [27] **BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M.; OLIVA, J.; SÁEZ, F.** (2008) *Dilute-Sulfuric acid pretreatment of Cardoon for ethanol production*. *Biochemical Engineering Journal* 42:84-91
- [28] **IRANMAHBOOBA, J.; NADIMA, F.; MONEMIB, S.** (2002) *Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed Wood chips*. *Biomass and Bioenergy* 22: 401-404
- [29] **MUSATTO, S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.; ROBERTO, I.** (2008) *Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain*. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 124-129
- [30] **IBORRA, J.** (2004) *Biocatalizadores y solventes neotéricos*. Academia de las ciencias de la Región de Murcia. [en línea < [http://www.acc.org.es/docos/publicaciones/3\\_BiocatalizadoresySolventesNeotericos.pdf](http://www.acc.org.es/docos/publicaciones/3_BiocatalizadoresySolventesNeotericos.pdf)> [Consulta: 4 de Noviembre de 2009].
- [31] **ORGANIC CHEMISTRY PORTAL** [en línea] < <http://www.organic-chemistry.org/topics/ionic-liquids.shtm> > [Consulta: 30 de Junio 2009].
- [32] **FENG, L.; CHEN, Z.-L.** (2008). *Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids*. *Journal of Molecular Liquids*. 142: 1-5.
- [33] **CAOA, Y.; JINWUB; ZHANGB, J.; ZHANGA, Y.; HEB, J.** (2009) *Room temperature ionic liquids (RTILs): A new and versatile platform for cellulose processing and derivatization*. *Chemical Engineering Journal* 147: 13-21
- [34] **ZHU, S.; WU, Y.; CHEN, Q., YU, Z.; WANG, C.; JIN, S.; DING, Y.; WU, G.** (2006) *Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review*. < [www.rsc.org/greenchem](http://www.rsc.org/greenchem)>.
- [35] **ZHAO, H.; JONES, C.; BAKER, G.; XIA, S.; OLUBAJO, O.; PERSON, V.** (2008) *Regenerating Cellulose from Ionic Liquids for Accelerated Enzymatic Hydrolysis*. *Journal of Biotechnology*. 139:49-54
- [36] **VARANASI, S.; SCHALL, C.; DADI, A.** (2008). *Biomass Pretreatment*. Patente nº 112291. USA.
- [37] **KUO, C.; LEE, C.** (2008) *Enhancement of Enzymatic Saccharification of Cellulose by Cellulose Dissolution*. *Carbohydrate Polymers* 1:41-46.
- [38] **TURNER, M.; SPEAR, S., HUDDLESTON, J., HOLBREY, J.; ROGERS, D.** (2003) *Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from Trichoderma reesei*. *Green Chemistry* 5:443-447
- [39] **CARDONA, C.A.** (2005) *"Simulación de los Procesos de Obtención de Etanol a partir de Caña de Azúcar y Maíz"*. *Scientia et Técnica*. Año XI(28): 187-192

- [40] **LUO, C.; BRINK, D.; BLANCH, H.** (2002) *Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol*. *Biomass and Bioenergy* 22: 125–138
- [41] **TAHERZADEH, M.** (2000) *Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:701
- [42] **GHOSE, T.** (1997). *Measurement of cellulose activities*. *International union of pure and applied chemistry*. 259-260.
- [43] **BALLESTEROS, I; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M.; OLIVA, J.; SAEZ, F.I** (2008). *Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production*. *Biochemical Engineering Journal* 42:84-91
- [44] **SUN, Y; CHENG J.** (2005) *Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production* *Biore-source Technology* 96:1599-1606
- [45] **HODGE; D, KARIM; M. et al** (2008) *Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. *Bioresource Technology* 99: 8940-8948
- [46] **CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA J.; SÁEZ, F.** (2008) *Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification*. *Bioresource Technology* 99: 1869–1876
- [47] **TOMÁS-PEJÓ, E; OLIVA, J.; BALLESTEROS, M.** (2008) *Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 67:874-884
- [48] **NGUYEN, Q; TUCKER, M., BOYNTON, B; KELLER, F; SCHELL, D.** (1998) *Dilute acid pretreatment of softwoods* [en línea] <<http://www.p2pays.org/ref/38/37775.pdf>> [Consulta: 27 de Agosto 2009].
- [49] **TERAMOTO, Y.; LEE, S.; ENDO, T.** (2008) *Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking*. *Bioresource Technology* 99:8856-8863
- [50] **GUPTA, R.; SHARMA, K.; KUHAD, R.** (2009) *Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of Prosopis juliflora a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis- NCIM 3498*. *Bioresource Technology* 100:1214-1220
- [51] **FERRER, F; PÁEZ, G.** (2002) *Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar*. *Rev. Fac. Agron.* [en línea] <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182002000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182002000100003&script=sci_arttext)> [Consulta: 27 de Agosto 2009].
- [52] **SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R.; MATHEW, G.; PANDEY A.** (2009) *Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production*. *Journal Renewable Energy*. 34:421-424

- [53] **GUSAKOV, A.; SINITSYN, A.; GERASIMAS, V.; SAVITSKENE, R.; STEPONAVICHUS, Y.** (1985). *A product inhibition study of cellulases from Trichoderma longibrachiatum using dyed cellulose*. J Biotechnol. 3:167–74.
- [54] **SAHA, B.; ITEN, L.; COTTA, M.; WU, Y.** (2005). *Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat Straw to ethanol*. Process Biochemistry 40:3693-3700.
- [55] **CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.; CASTRO, E.** (2006) *Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree Wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification*. Process Biochemistry 41: 423-429
- [56] **TAPPI** [en línea] [http://www.tappi.org/s\\_tappi/doc\\_bookstore.asp?CID=7370&DID=519867](http://www.tappi.org/s_tappi/doc_bookstore.asp?CID=7370&DID=519867) [Consulta: 22 de Septiembre 2009].
- [57] **CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A., ALFANI, F.** (2004) *Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF*. Process Biochemistry 39: 1533-1542
- [58] **VERGAGNI, G.** “*La Industria del Etanol a partir del Maíz ¿Es Factible su Desarrollo en Argentina?*”. [en línea] < <http://www.maizar.org.ar/documentos/etanol%20i%5B1%5D.factibilidad%20verpublica.pdf>.> [Consulta: 27 de Julio 2007] Buenos Aires, Argentina.
- [59] **CORTINEZ, V.; MONTECINOS, C.; PEZOA, R.** (2008) *Plan de negocios para la instalación de de una planta de bio-butanol en Chile*. Curso Taller de Proyectos. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Universidad de Chile. Chile
- [60] **EMPRESA NACIONAL DEL PETRÓLEO ENAP** [en línea] < <http://enap.cl>> [Consulta: 13 de Julio 2009].
- [61] **MOVIMIENTO POR LA RECUPERACION DE LA ENERGIA NACIONAL ORIENTADORA** [en línea] < <http://www.info-moreno.com.ar/notas/noticias/chile.html> > [Consulta: 27 de Abril 2008].
- [62] **FEDNA.** “*Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal*”. [en línea] ≤[http://www.etsia.upm.es/fedna/subp\\_cereales/ddgs\\_maiz.htm](http://www.etsia.upm.es/fedna/subp_cereales/ddgs_maiz.htm).> [Consulta: 29 de Noviembre de 2007] Buenos Aires, Argentina.
- [63] **SANCHEZ, G** (2004). *Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian Straw material Paja Brava*. Biore-source Technology 93:249-256.

# ANEXO A

---

## Mercado del Bioetanol [59]

### A.1 Demanda los Mercados Internacionales

Según datos proporcionados por la ENAP [60], a partir del 24 de abril de 2008 los precios de las gasolinas (promedio 93, 95, 97 octanos) sufrieron una variación al alza de un 1,2%, alcanzó así el precio WTI Nymex de US\$116,06 el barril. Entre las causas que explican el persistente ascenso del precio del crudo, se mantienen la firme demanda a nivel mundial y la depreciación del dólar que marcó el 22 de abril un mínimo histórico a 1,6 dólares por euro, a lo que sumó el efecto de atentados con explosivos a oleoductos operados por la petrolera internacional Shell en Nigeria. Con la crisis mundial iniciada el noviembre del 2008, la caída estrepitosa del dólar y la recesión iniciada el primer semestre del 2009 ocasionan que el día lunes, 13 de julio de 2009 el precio de las gasolinas WTI Nymex alcance el valor de US\$59,81 el barril.

De lo anterior se puede concluir que el precio del crudo es una variable altamente inestable. Considerando esto y la creciente preocupación por el medio ambiente, sale a la palestra el desarrollar alternativas energéticas al petróleo. Un medio es a través de los biocombustibles.

Por otro lado la producción mundial de bioetanol ha aumentado, en Europa, USA y Brasil. En la Figura A-1 se muestra este hecho, donde se observa que la producción el año 2005 fue 12.000 millones de galones. Además se desprende que la demanda mundial de bioetanol va en aumento, ya que fue triplicada en los últimos cinco años.

Este aumento en la producción va de la mano de las constantes políticas gubernamentales de apoyo a la producción de biocombustibles.

En la Figura A-1 se observa la producción mundial de etanol separada por los principales productores. De ésta se desprende que Brasil es el principal productor seguido por Estados Unidos.

Este incremento va asociado al aumento en los precios del petróleo, mostrada claramente en la Figura A-1. Con esto se concluye que el mercado de los biocombustibles se encuentra en un constante aumento.

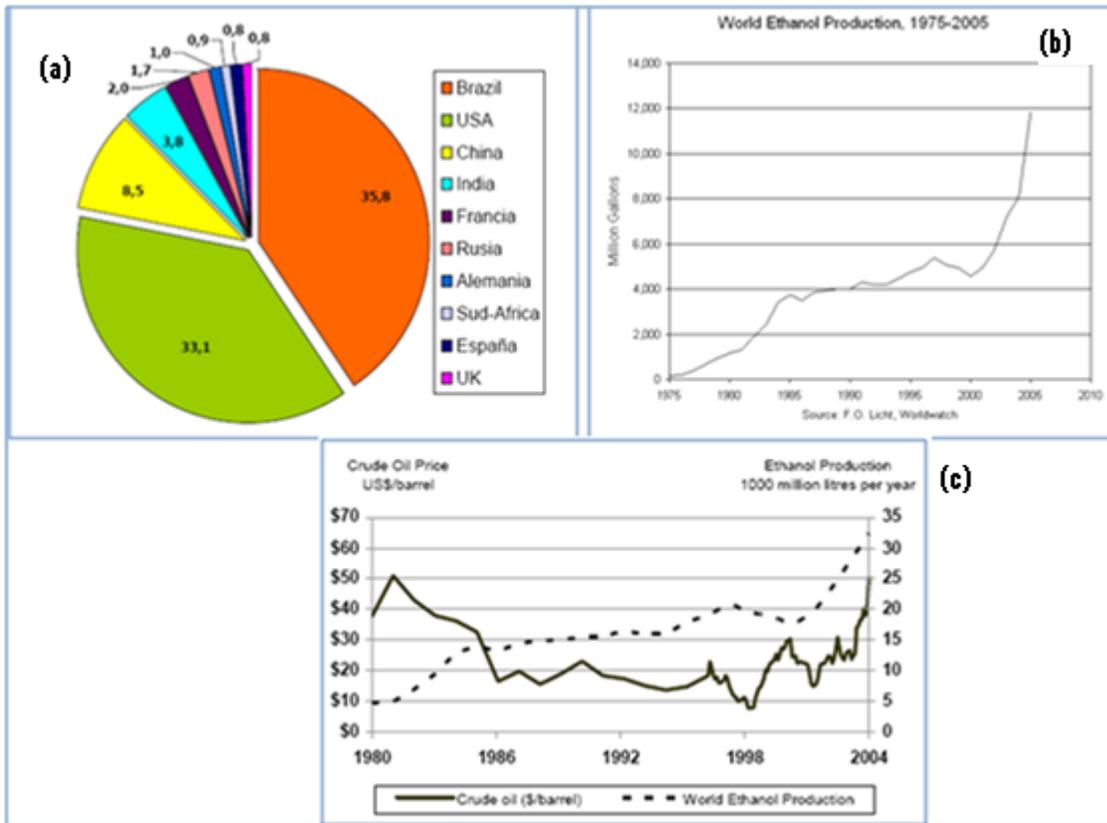


Figura A-1: (a) Evolución de la producción mundial de etanol. (b) Producción mundial de etanol separada por los principales productores, en el año 2005. (c) Evolución del precio y producción del crudo y el etanol

## A.2 Demanda del Mercado Chileno

En base a datos del documento "Balance Nacional de Energía 2002", publicado por la Comisión Nacional de Energía (CNE) en agosto de 2003, el consumo nacional chileno por fuentes de energía primaria se configura de la siguiente manera: 40% petróleo, 26% gas natural, 10% carbón mineral, 8% hidroenergía y 16% restante leña, biomasa, eólica, etc. Es decir, Chile es un país altamente dependiente de hidrocarburos, ya que sus necesidades energéticas y eléctricas están cubiertas en un 76% y 58%, respectivamente, por estos recursos naturales no renovables. Por otra parte, cabe señalar que la oferta de energía chilena depende en un 63% de recursos energéticos importados, dejando a este país en una situación de vulnerabilidad estructural [61].

En la Figura A-2 se muestra la evolución de las importaciones, producción y consumo de petróleo en Chile. Se observa que las importaciones y el consumo han aumentado en forma notable, mientras que la producción es casi nula.

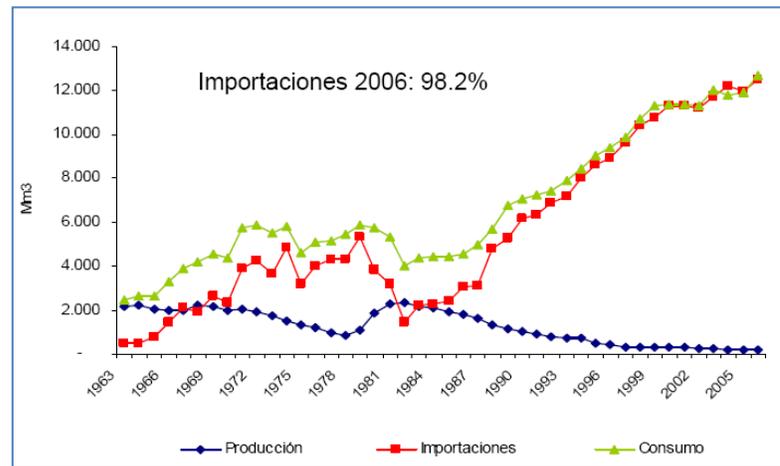


Figura A-2: Evolución del mercado del petróleo en Chile.

Del petróleo importado un 54% es utilizado en el sector del transporte. Por otro lado de acuerdo a las estimaciones efectuadas por la CNE, el consumo de gasolina al año 2010 alcanzaría cerca de 3,3 millones de m<sup>3</sup> (Tabla A-1)

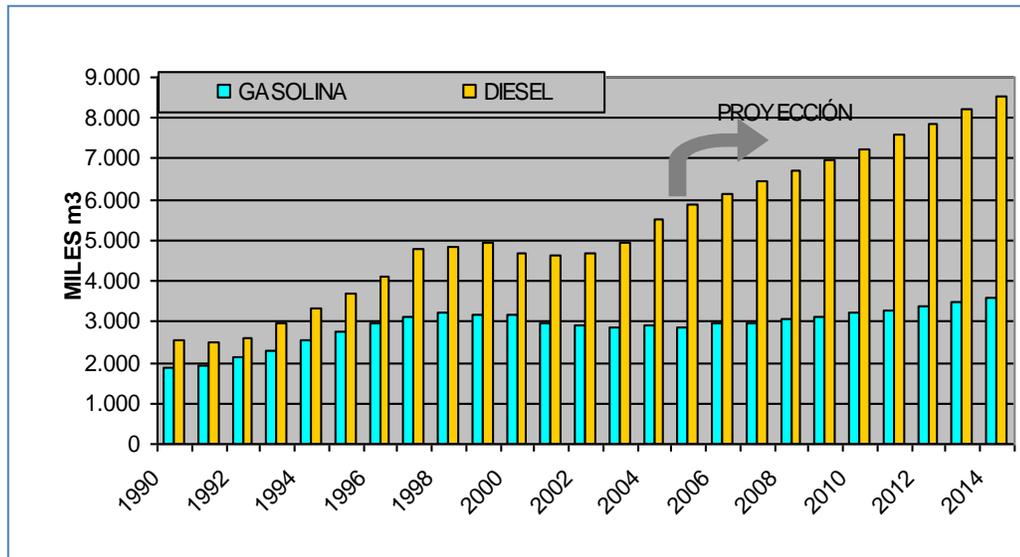
Tabla A-1: Mercado nacional y sus proyecciones al 2010 miles de m<sup>3</sup>

Ventas ENAP 2005	Gasolina	Diesel
Producción nacional	3.545	4.943
Importaciones	422	1.280
Exportaciones	-1.026	-162
Consumo nacional	2.941	6.061
Tasa anual de crecimiento [%]	2,5	4,7
Consumo estimado al 2010	3.326	7.626

Fuente: CNE.

El consumo chileno de gasolinas ha crecido fuertemente en el transporte. Este incremento se debe principalmente al crecimiento del PIB, que ha traído consigo un aumento en las necesidades de movilización por parte de los ciudadanos. Se espera que el consumo de este sector aumente en los próximos años, ya que en el periodo 2001-2005 aumentó un 15,1% según datos del INE. Con esto la producción de bioetanol como combustible permitiría disminuir la alta dependencia de la gasolina por parte de los automovi-

listas. Además sería la base para el desarrollo de las energías renovables y permitiría diversificar la matriz energética. A continuación, en la Figura A-3 se presentan las proyecciones del consumo de diesel y gasolina para Chile. Esta estimación ha sido realizada en base a datos del gobierno y presentada a la opinión pública durante el año 2006.



**Figura A-3 : Evolución del Consumo chileno de Gasolina y Diesel. Fuente: Presentación ministra de Minería y Energía Karen Poniachik, julio del 2006 “Biocombustibles, un aporte para la seguridad energética”**

Con los datos recopilados, y al realizar una mezcla de un 5% de bioetanol en mezclas con la gasolina, se permitiría disminuir las importaciones de gasolina en un 39% en el año 2010 (160 mil m<sup>3</sup> de bioetanol sobre 3.326 mil m<sup>3</sup> de gasolina).

Por estas razones, Chile debe realizar una serie de reformas, tanto políticas como administrativas y sociales, que posibiliten materializar la producción de bioetanol en el mediano plazo. Entre ellos se debe considerar:

- Aunar esfuerzos entre diferentes sectores y actores nacionales interesados en desarrollar biocombustibles.
- Impulsar trabajo conjunto público-privado para la evaluación y desarrollo de los biocombustibles.

- Definir prontamente estándares de calidad y especificación técnica de los biocombustibles a ser comercializados en el país.
- Analizar las potencialidades del país y su competitividad para una política de desarrollo.
- Impulsar las medidas para el adecuado manejo, seguridad y fiscalización de los biocombustibles.

# ANEXO B

## Aldopentosas y Aldohexosas

- **Aldopentosas**

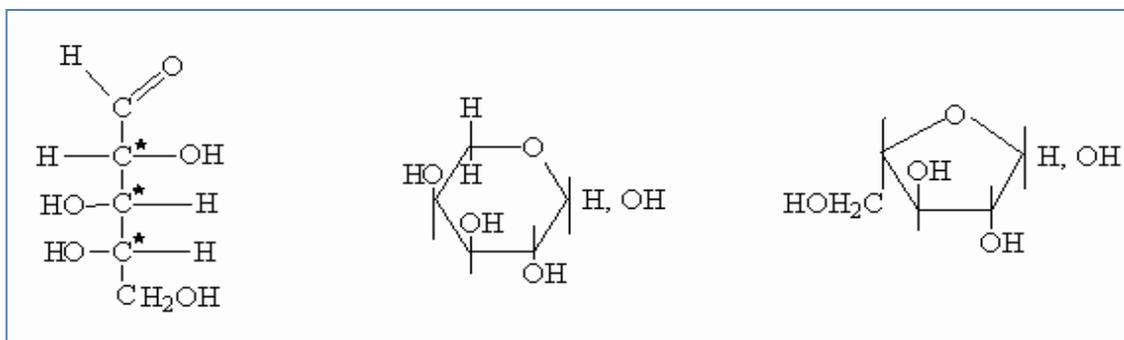


Figura B-1: *L - arabinosa L -arabinopiranososa L -arabinofuranosa* (Obtenido de [21])

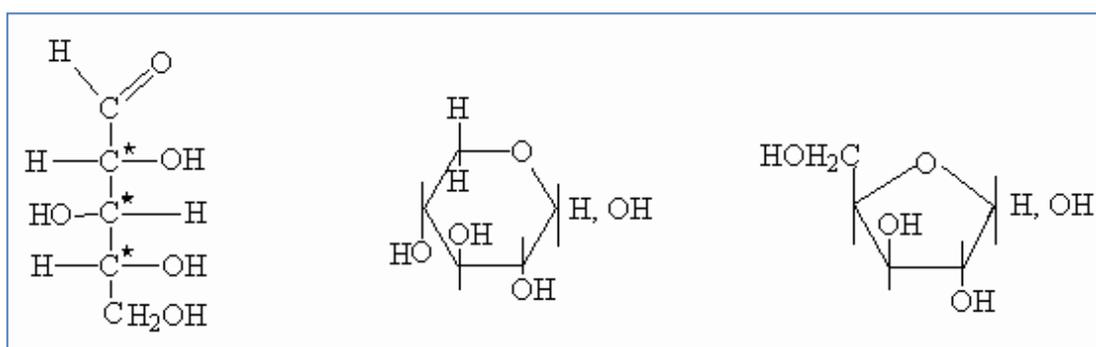


Figura B-2: *D - xilosa D - xilopiranososa D - xilofuranosa* (Obtenido de [21])

- **Aldohexosas**

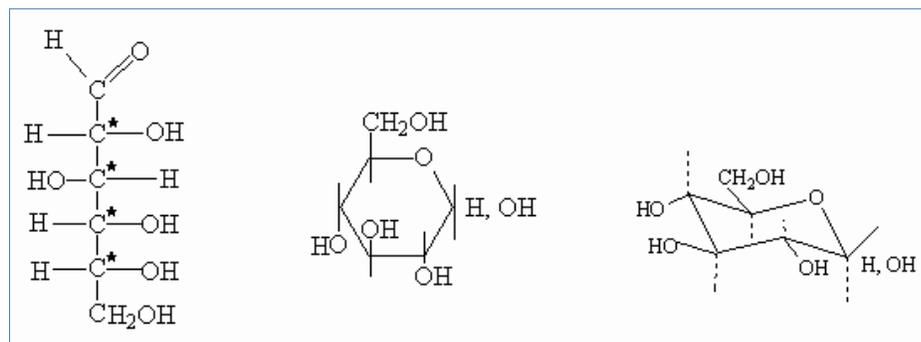


Figura B-3: *D -(+) - glucosa D -(+) - glucopiranososa D(+) glucopiranososa* (Obtenido de [21])

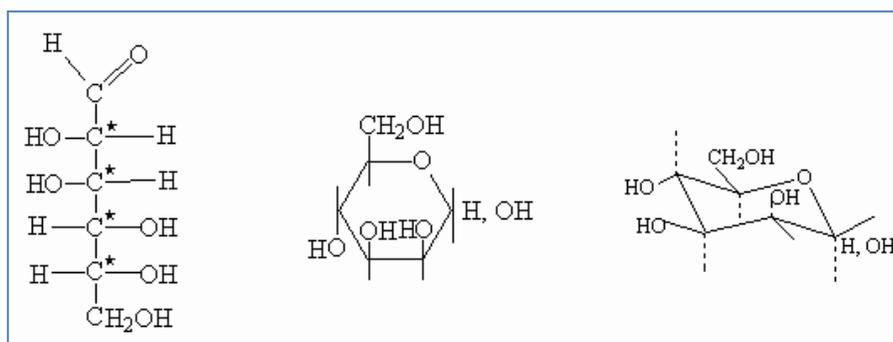


Figura B-4: *D(+)* manosa *D(+)* manopiranososa *D(+)* manopiranososa (C1) (Obtenido de [21])

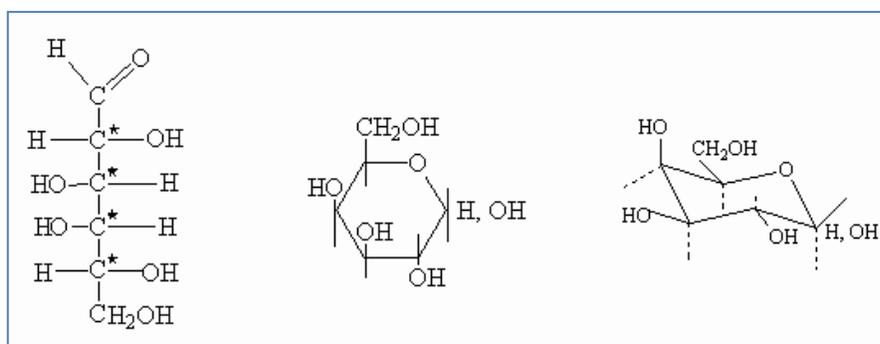


Figura B-5: *D(+)* galactosa *D(+)* galactopiranososa *D(+)* galactopiranososa (C1) (Obtenido de [21])

# ANEXO C

---

## Pretratamientos a la biomasa lignocelulósica

### C.1 Pretratamiento Físico [20]<sup>17</sup>

#### *C.1.1 Pulverizado mecánico*

El fin de este procedimiento es reducir el tamaño de las astillas triturando o moliendo a través de un molino de bolas cuyo tamaño final alcanza valores entre 0,2-2 mm o con un molino de cuchillas o martillo (tamaño final 3-6 mm). Este método ha sido utilizado en residuos de madera y forestales (paja, madera dura) y desechos de maíz, bagazo de caña y alfalfa.

#### *10.1.1 C.1.2 Pirolisis*

Este procedimiento utiliza altas temperaturas (mayores a 300°C), cuyo fin es descomponer la celulosa. Este proceso forma productos volátiles y de carbón. Los residuos de la pirolisis pueden someterse a hidrólisis suave (condiciones: 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; T=97°C; 2,5h) para producir valores mayores de recuperación de glucosa.

La pirolisis puede realizarse al vacío, ya que así se alcanzan mayores temperaturas por un menor tiempo (condiciones: 400°C; p=1mmHg; 20 min).

### C.2 Pretratamiento fisicoquímico [20]

#### *C.2.1 Explosión a vapor (autohidrólisis)*

La explosión a vapor es el método más utilizado en el pretratamiento de material lignocelulósico ya que este es reconocido como el pretratamiento más costo efectivo para maderas duras y residuos agrícolas. En este método, biomasa en tamaño de chip es tratado a altas presiones de vapor saturado y luego la presión es reducida lentamente lo que hace que el material sea sometido a una descompresión explosi-

---

<sup>17</sup> Para la recopilación de información de todos los pretratamientos se utilizó el Review de Sun y Cheng.

va. La explosión a vapor es típicamente iniciada a temperaturas entre 160-260°C (correspondiente a presiones entre 0,69-4,83 MPa) por unos pocos minutos, posterior a esto el material es expuesto a presión atmosférica. El proceso causa la degradación de la hemicelulosa y la lignina, por lo que aumenta el potencial de hidrolizar la celulosa. Se han reportado cerca del 90% de eficiencia en la hidrólisis enzimática a las 24 horas en maderas no tratadas de chip de álamo.

Los principales factores que afectan el pretratamiento de explosión a vapor son: el tiempo de residencia, la temperatura, el tamaño del chip y el contenido de humedad.

Estudios indican que una menor temperatura de operación y un mayor tiempo de residencia son favorables para este pretratamiento (190°C; 10 min)

Al combinarse con  $H_2SO_4$ ,  $SO_2$  o  $CO_2$  se mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática disminuyendo la formación de inhibidores y promoviendo la completa remoción de la hemicelulosa.

Entre las ventajas de este método incluyen el bajo requerimiento de energía en comparación al pulverizado mecánico (un método mecánico requiere un 70% más energía que la explosión a vapor para la misma reducción) y no conlleva costos medioambientales.

Entre las desventajas o limitaciones de este pretratamiento se incluyen la destrucción de una fracción de la xilosa obtenida, la disrupción o rompimiento incompleto de la matriz de lignina- carbohidrato y la generación de compuestos inhibidores para los microorganismos aguas abajo en el proceso. Por esta última razón se debe realizar un lavado de la biomasa con agua para remover material inhibidor, lo que disminuye los rendimientos en la sacarificación.

### ***C.2.2 Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)***

AFEX es un pretratamiento que expone al material lignocelulósico a altas temperaturas y presiones con amoníaco líquido por un periodo de tiempo, y posteriormente se reduce la presión. El concepto de AFEX es similar a la explosión a vapor. Las condiciones del proceso son: 1-2kg de amoníaco/kg de biomasa seca; 90°C y 30 minutos.

Se reporta que este método se ha utilizado en materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascarilla), desechos de maíz, y de pasto, residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa y bagazo.

Entre las ventajas de este pretratamiento se tiene una conversión alta (90%) en la hidrólisis enzimática de la celulosa para bagazo y hierba (los cuales poseen un bajo contenido de lignina), no necesita un tamaño de partícula pequeño para ser eficaz, el proceso no produce inhibidores (por lo que no se debe lavar con agua) y la posible recuperación del amoníaco que reduce costos de producción. Las desventajas del método se encuentra que para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión <50%); que es el caso de la madera dura y blanda utilizada en el trabajo de tesis, y que ocurre una cierta despolimerización de la celulosa.

### **C.2.3 Explosión con CO<sub>2</sub>**

Muy similar a la explosión de vapor y amoníaco la explosión con CO<sub>2</sub>. Estudios reportan que CO<sub>2</sub> puede formar ácido carbónico e incrementar las tasas de hidrólisis.

Este método ha sido utilizado en alfalfa (bajo contenido de lignina). Las condiciones de operación son (dosis de 4kg CO<sub>2</sub>/kg de fibra; P=5,62MPa) obteniéndose cerca del 75% de los azúcares teóricos durante 24h de hidrólisis enzimática. Estos rendimientos son menores a los de AFEX y explosión a vapor. El proceso no forma compuestos inhibidores.

## **C.3 Pretratamiento químico [20]**

### **C.3.1 Ozonólisis**

El ozono ha sido usado para degradar la lignina y hemicelulosa en materiales lignocelulósicos como paja de trigo, bagazo, heno verde, pino, paja de algodón y aserrín de álamo. La degradación es principalmente lignina y poca hemicelulosa. Las condiciones de uso son ozono, temperatura y presión ambientales. En la literatura se reporta una conversión de hidrólisis del 57% en aserrín.

El pretratamiento de ozonólisis presenta como ventaja (1) remueve efectivamente la lignina, (2) no produce residuos tóxicos aguas abajo, (3) la reacción puede ser llevada a presión y temperatura ambiente. Cabe decir que el proceso necesita una gran cantidad de ozono lo que hace aumentar los costos al proceso.

### **C.3.2 Deslignificación oxidativa**

La deslignificación oxidativa biodegrada la lignina en presencia de peroxidasa y  $H_2O_2$  al 2%, una temperatura de 20°C por 8 horas. Estas condiciones degradan el 50% de la lignina y mayor parte de la hemicelulosa es solubilizada en bagazo de caña. La hidrólisis enzimática convierte el 85% de la celulosa en glucosa en estas condiciones.

### **C.3.3 Proceso organosolv**

En el proceso organosolv, un solvente orgánico es mezclado con ácidos inorgánicos (HCl o  $H_2SO_4$ ) usado para romper la pared de lignina y los enlaces de hemicelulosa. Los solventes orgánicos utilizados incluyen metanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol y alcohol tetrahidrofurfuril.

A altas temperaturas (sobre 185°C) la adición de un catalizador no es necesaria para la deslignificación. Usualmente pueden ser obtenidos altos rendimientos de xilosa con la adición de ácido. Para reducir costos se sugiere reciclar, condensar o evaporar los solventes usados. Remover los solventes es necesario, puesto que ellos pueden ser inhibidores del crecimiento de microorganismos en la hidrólisis enzimática y la fermentación. Este proceso ha sido reportado en madera de álamo.

### **C.3.4 Hidrólisis con ácido concentrado**

La hidrólisis con ácido concentrado usa  $H_2SO_4$  o HCl al 10-30% y una temperatura entre 170-190°C. Cabe señalar que los poderosos agentes de la hidrólisis provocan que el proceso sea tóxico, corrosivo y peligroso, por lo que se requiere de reactores que resistan la corrosión. Además el ácido debe ser recuperado para hacer el proceso económicamente factible. Este método ha sido probado en bagazo de caña y aserrín de madera dura.

## **C.4 Pretratamiento biológico [20]**

El pretratamiento biológico utiliza hongos de pudrición blanca y parda, que producen celulasa, hemicelulasa y enzimas degradadoras de lignina, por fermentación del sustrato sólido. Según la literatura, hongos de pudrición blanca (*Pleurotus ostreatus*) utilizados en paja de trigo convierten el 35% a azúcares reductores teóricos en 5 semanas. El pretratamiento ha sido utilizado en paja de trigo y desechos de maíz.

Las principales ventajas de utilizar este método son la baja energía requerida y las condiciones ambientales amigables. De todas maneras, la velocidad de la hidrólisis en el tratamiento biológico es lenta.

Como resumen se puede decir que el método biológico o de hongos posee un alto tiempo de residencia de 10-14 días; el tratamiento biológico, que son energéticamente demandantes, caros y no remueven la lignina; el tratamiento químico, que son costosos pero utilizados para productos del papel; y el tratamiento físicoquímico, que contiene métodos promisorios, pero requiere de altas temperaturas/presiones y utiliza catalizadores. Con esto la estrategia de pretratamiento debe ser costo efectiva para la producción de etanol celulósico.

## ANEXO D

---

### Fotografías de metodología experimental.

Las siguientes figuras son parte de los equipos utilizados en el trabajo de laboratorio y evolución de las muestras en los distintos pretratamientos.

#### D.1 Pretratamiento de Hidrólisis ácida y alcalina.



Figura D-1: (1) Muestras en triplicado de Lengua, antes de agregar ácido diluido. (2) Montaje utilizado en el pretratamiento ácido y alcalino. Se observa la autoclave y el mechero encendido. (3) Etapa de enfriamiento de olla a presión. (4) Muestras dentro de olla a presión posterior a tratamiento y enfriamiento de autoclave. Se observa que no existe color en el agua destilada utilizada, por lo que el experimento puede ser considera satisfactorio.

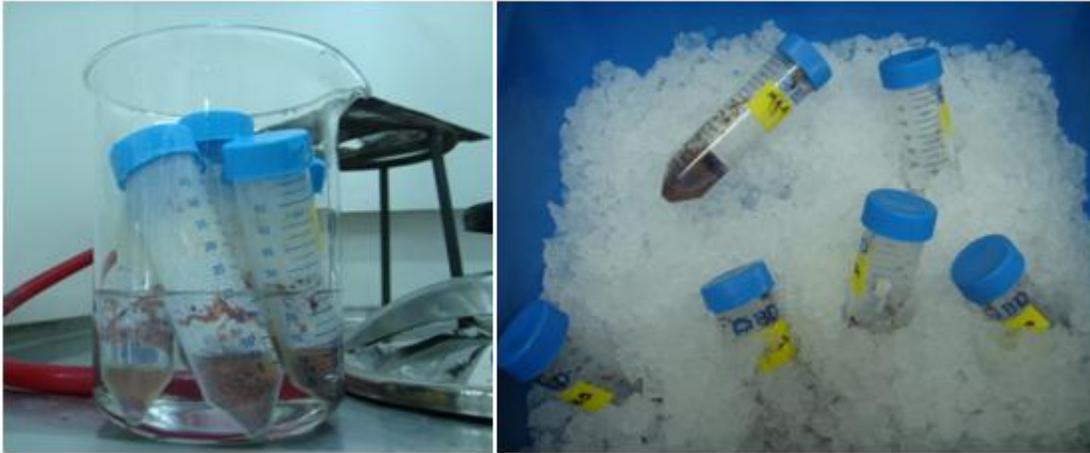


Figura D-2: Muestras post tratamiento ácido y proceso de enfriamiento con hielo.



Figura D-3: A la derecha: Neutralización de material sólido y sobrenadante. Se observa muestra y peachímetro. A la izquierda: La figura muestra la diferencia de color entre una muestra antes y después de la neutralización con NaOH 2M.



Figura D-4: (1) La figura muestra el montaje utilizado en el filtrado de muestras. Se observa el matraz de aforo, un vaso precipitado, la placa petri, los filtros de fibra de vidrio, la varilla agitadora, el equipo de filtrado y por último la bomba de vacío. (2) Calentador utilizado en el método DNS. (3) Placa utilizada en el método DNS para la medición de azúcares reductores. El color indica el nivel de absorbancia de la muestra. A un color más oscuro se tiene una mayor absorbancia y por ende una mayor concentración de azúcares reductores.

## D.2 Pretratamiento con líquidos iónicos



Figura D-5: (1) Liofilizador utilizado en el secado de muestras. Laboratorio del Papel, Åbo Akademi University. (2) La figura representa el montaje experimental con líquidos iónicos. Se observa la termocupla, el baño de aceite, el calentador, los tubos de ensayo y la campana extractora de gases. Laboratorio de Química Técnica, Åbo Akademi University

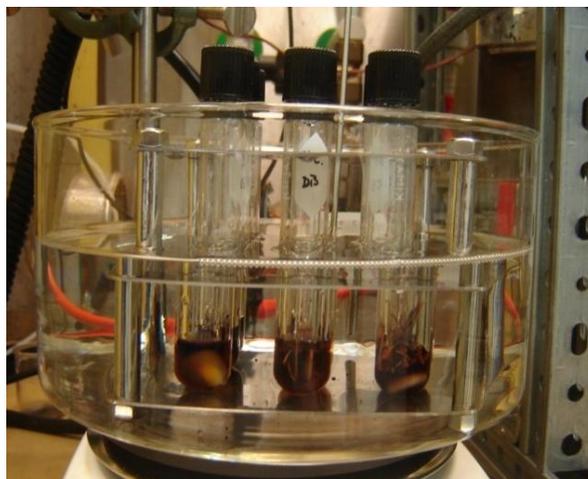


Figura D-6: En esta figura se observan las muestras con líquido iónico y los agitadores magnéticos. Laboratorio de Química Técnica, Åbo Akademi University



Figura D-7: La figura muestra el lavado y la regeneración del material lignocelulósico. Se observa el equipo de filtrado al vacío y la varilla de agitación. Laboratorio de Química Técnica, Åbo Akademi University.

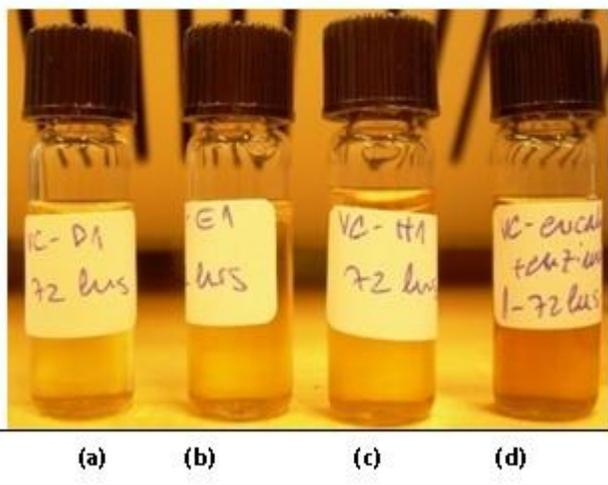
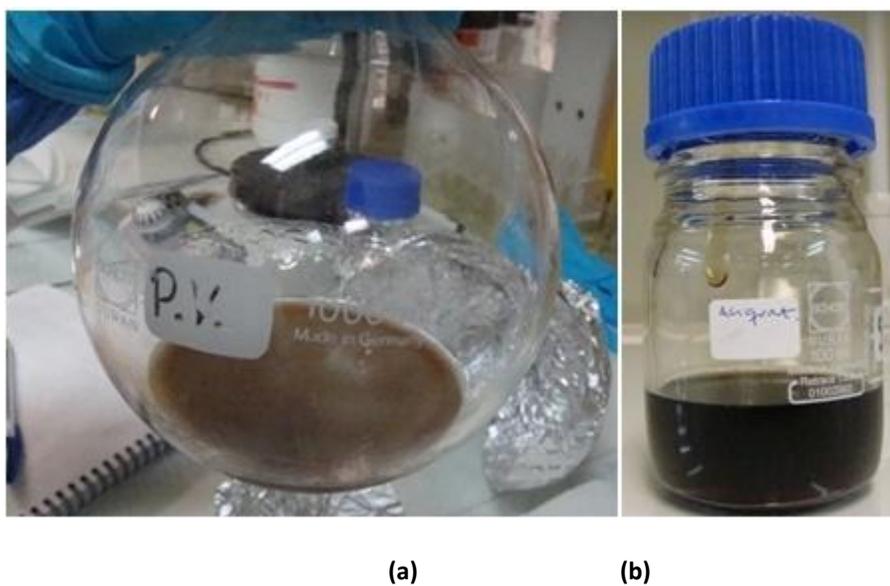


Figura D-8: La figura muestra la hidrólisis enzimática de eucaliptus con líquido iónico [emim][Cl] pretratado por 1 hora a diferentes temperaturas. De izquierda a derecha 80°C (a), 121 °C (b), 150°C (c) y el blanco sin pretratamiento (d)



Figura D-9: La figura representan las muestras en triplicado para el caso de Leng a 121°C, por 60 minutos pretratados con [emim][Cl].



(a)

(b)

Figura D-10: (a) Preparación de [A336][OH], el matraz contiene cristales de cloro que debieron ser filtrados. (b) líquido iónico [A336][OH] sin cristales de cloro y en condiciones de ser utilizado.

# ANEXO E

---

## Protocolos de medición de azúcares

### Método de estimación de azúcares reductores por ácido dinitrosalicílico (DNS)

#### Reactivo DNS

##### Mezclar

- Agua destilada: 1416 ml
- 3,5- ácido dinitrosalicílico 10,6 g
- NaOH 19,8 g

##### Disolver lo anterior, y luego agregar

- Sal de Rochelle (Na-K Tartarate) 306 g
- Fenol (derretir a 50°C) 7,6 ml
- Na metabisulfito 8,3 g

Valorar 3 ml de muestra con fenolftaleína con 0,1 N de HCl. Se deben tomar 5-6 ml de HCl. Agregar NaOH si se requiere (2 g= 1 ml 0,1 N HCl)

**Estándar de glucosa:** 0,2-5,0 mg de glucosa por ml o por 0,5 ml es apropiado.

**Procedimiento:** Colocar 1-2 ml de muestra en un tubo de ensayo y añadir 3 ml de reactivo de DNS. Coloque en agua hirviendo durante 5 minutos (100°C). Enfriar a temperatura ambiente. Diluir las muestras en caso de ser necesario con el fin de que la transmisión de la luz en el colorímetro sea entre 20% y el 80%. Incluir estándar compuesto de glucosa y diluido como muestras. Incluir una muestra de estándar de glucosa y diluir. Leer el % de transmitancia a 540 nm contra un blanco de agua por 100%T. Graficar el estándar en papel semilog (log % T versus concentración). Este debería interceptar la abscisa a 0,04 mg de glucosa. Los 0,04 mg de representan la pérdida de glucosa por oxidación. Para una determinación más exacta a bajas concentraciones de glucosa agregar 0,1 mg de glucosa a cada muestra. 3 ml de reactivo DNS pueden reacción con 10 mg de glucosa. Por lo tanto, las soluciones concentradas de azúcar deben diluirse de forma que las muestras contengan 5mg o menos de azúcares reductores.

**Comentarios:** el color solo se desarrolla bajo condiciones alcalinas, por lo que muestras ácidas deben ser neutralizadas. Este método es no-específico a un azúcar reductor. Si glucosa es usada como estándar, los valores de celobiosa serán 15% más bajos, y los valores de xilosa 15% más altos en peso base. Las muestras hervidas pueden ser dejadas un tiempo razonable antes de ser leídas. Las muestras no hervidas se deterioran gradualmente.

# ANEXO F

---

## Análisis estadístico

### Descripción de análisis estadísticos realizados

- Procedimiento ANOVA

Este procedimiento realiza un análisis multifactorial de la varianza. Teniendo datos suficientes, también analiza las interacciones significativas entre los factores. Los F-tests en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significantes. Para cada factor significativo, los Tests de Rangos múltiples le indicarán qué medias son significativamente diferentes de otras.

- Tablas de medias

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

- Análisis de probabilidad

La tabla de probabilidad indica el mínimo valor estimado de azúcares reductores que se puede obtener con una probabilidad fija (en casi todos los casos bordea el 99%) suponiendo que los datos siguen una función de probabilidad normal.

## 1. Hidrólisis ácida en Lengua

Tabla F-1: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis ácida de LENGUA. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes- F están basados en el error cuadrático medio residual)

	Fuente	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales	A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	312,78	0,0000
	B: tiempo	525,22	0,0000
Interacciones	AB	12,09	0,0002

Tabla F-2: Contraste múltiple de rangos analizados con ANOVA simple, media, desviación estándar y probabilidad acumulada a un valor estimado de azúcares reductores para hidrólisis ácida en LENGUA.

Los grupos homogéneos son representados con una X en el mismo casillero-columna (por ejemplo, C1 es homogéneo estadísticamente con D1)

El valor estimado de azúcares reductores representa el valor mínimo que se puede alcanzar con la probabilidad acumulada que se muestra en la columna de la derecha

Nivel	Grupos homogéneos					Media de Azúcares red. [mg/g]	$\sigma$	Valor mínimo estimado Azúcares red. [mg/g]	Prob. fija
A1	X					27,6	1,2	24	99,90%
B1		X				60,7	3,6	52	99,23%
C1			X			100,8	6,9	84	99,00%
D1				X		104,7	5,9	90	99,36%
A2		X				65,1	4,0	56	98,75%
B2				X		126,7	4,7	115	99,36%
C2					X	152,7	7,7	134	99,25%
D2					X	139,6	3,8	130	99,47%

## 1. Hidrólisis ácida de Eucalipto

Tabla F-3: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis ácida de EUCALIPTO. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes- F están basados en el error cuadrático medio residual)

	Fuente	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales	A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	31,48	0,0000
	B: tiempo	48,64	0,0000
Interacciones	AB	0,64	0,5988

Tabla F-4: Contraste múltiple de rangos analizados con ANOVA simple, media, desviación estándar y probabilidad acumulada a un valor estimado de azúcares reductores para hidrólisis ácida en EUCALIPTO.

Nivel	Grupos homogéneos					Media de Azúcares red. [mg/g]	$\sigma$	Valor mínimo estimado Azúcares red. [mg/g]	Prob. fija
A1	X					12,4	0,8	10	99,92%
B1		X				46,3	4,8	35	99,09%
C1			X			41,5	3,9	32	99,27%
D1				X		72,0	3,5	63	99,44%
A2		X				37,5	0,5	36	99,83%

B2			X		76,0	13,4	44	99,17%
C2			X	X	83,7	16,0	46	99,08%
D2				X	102,0	22,6	50	98,93%

## 2. Hidrólisis enzimática de Lengua

Tabla F-5: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis enzimática precedida de una hidrólisis ácida de LENGUA. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes-F están basados en el error cuadrático medio residual)

	Fuente	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales	A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,02	0,1549
	B: tiempo	28,27	0,0001
Interacciones	AB	4,78	0,0156

Tabla F-6: Contraste múltiple de rangos analizados con ANOVA simple, media, desviación estándar y probabilidad acumulada a un valor estimado de azúcares reductores para hidrólisis enzimática precedida de una hidrólisis ácida en LENGUA

Nivel	Grupos Homogéneos				Media de Azúcares red. [mg/g]	$\sigma$	Valor mínimo estimado Azúcares red. [mg/g]	Prob. fija
A1				X	188,5	43,3	88	98,99%
B1	X	X			115,5	11,7	89	98,86%
C1		X	X		145,7	12,2	118	98,86%
D1			X	X	161,3	16,9	123	98,85%
A2	X				87,4	6,0	74	98,74%
B2	X				104,4	15,3	69	98,96%
C2	X	X	X		124,6	38,0	38	98,87%
D2	X				101,9	16,4	64	98,95%

## 3. Hidrólisis enzimática de Eucalipto

Tabla F-7: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis enzimática precedente a una hidrólisis ácida de EUCALIPTO. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes- F están basados en el error cuadrático medio residual)

	Fuente	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales	A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,45	0,0120
	B: tiempo	24,61	0,0003
Interacciones	AB	8,79	0,0019

**Tabla F-8: Contraste múltiple de rangos analizados con ANOVA simple, media, desviación estándar y probabilidad acumulada a un valor estimado de azúcares reductores para una hidrólisis enzimática precedente a una hidrólisis ácida en EUCALIPTO.**

Nivel	Grupos homogéneos			Media de Azúcares red. [mg/g]	$\sigma$	Valor mínimo estimado Azúcares red. [mg/g]	Prob. fija
A1	X	X		124,9	47,4	16	98,92%
B1	X			95,7	3,5	87	99,35%
C1		X		177,4	9,1	156	99,08%
D1			X	238,7	55,0	110	99,04%
A2	X			79,2	9,0	58	99,12%
B2	X	X		126,4	17,7	85	99,05%
C2	X			97,55	15,6	61	99,04%
D2	X			90,9	21,7	40	99,05%

#### 4. Hidrólisis alcalina

**Tabla F-9: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis alcalina precedente a una hidrólisis ácida de LENGA. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes- F están basados en el error cuadrático medio residual)**

Fuente	Lenga		Eucalipto	
	Cociente - F	P-Valor	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales				
A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,19	0,0279	12,17	0,0024
B: tiempo	39,78	0,0002	1,5	0,2557
Interacciones				
AB	4,92	0,0319	2,73	0,1137

#### 5. Hidrólisis enzimática desde alcalina de Lenga

**Tabla F-10: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis enzimática precedente a una hidrólisis alcalina y una hidrólisis ácida de LENGA. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes- F están basados en el error cuadrático medio residual)**

Fuente	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales		
A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	31,54	0,0001
B: tiempo	45,24	0,0001
Interacciones		
AB	90,07	0,0001

**Tabla F-11: Contraste múltiple de rangos analizados con ANOVA simple, media, desviación estándar y probabilidad acumulada a un valor estimado de azúcares reductores para una hidrólisis enzimática precedente a una hidrólisis alcalina y una hidrólisis ácida en LENGA.**

Nivel	Grupos homogéneos				Media de Azúcares red. [mg/g]	$\sigma$	Valor mínimo estimado Azúcares red. [mg/g]	Prob. fija
A1				X	329,9	18,6	286	99,10%
B1			X		271,2	10,1	247	99,17%
C1	X				206,6	6,3	191	99,30%
D1		X			246,1	2,8	239	99,46%
A2	X				186,9	4,3	177	99,01%
B2			X		276,9	1,0	274	99,91%
C2		X			232,6	3,8	223	99,49%
D2		X			247,1	3,0	240	99,14%

## 6. Hidrólisis enzimática de alcalina para Eucalipto

**Tabla F-12: ANOVA factorial, análisis de varianza para hidrólisis enzimática precedente a una hidrólisis alcalina y a hidrólisis ácida de EUCALIPTO. Sumas de Cuadrados de Tipo III (Los cocientes- F están basados en el error cuadrático medio residual)**

	Fuente	Cociente - F	P-Valor
Efectos principales	A: concentración H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,02	0,0513
	B: tiempo	2,35	0,1638
Interacciones	AB	2,49	0,1346

**Tabla F-13: Contraste múltiple de rangos analizados con ANOVA simple, media, desviación estándar y probabilidad acumulada a un valor estimado de azúcares reductores para una hidrólisis enzimática precedente a una hidrólisis alcalina y una hidrólisis ácida en EUCALIPTO.**

Nivel	Grupos homogéneos		Media de Azúcares red. [mg/g]	$\sigma$	Valor mínimo estimado Azúcares red. [mg/g]	Prob. fija
A1		X	341,8	34,4	261	99,06%
B1	X		255,3	0,5	254	99,72%
C1	X		264,5	50,6	145	99,09%
D1	X		257,1	14,7	222	99,14%
A2	X		267,2	15,3	231	99,11%
B2	X		258,0	27,6	193	99,08%
C2	X		280,0	12,0	252	99,00%
D2	X		236,1	2,3	230	99,59%

# ANEXO G

## Comparación de protocolos de medición de azúcares

En este capítulo anexo se muestra una comparación métodos de medición de azúcares.

En primer lugar se presenta la comparación entre el método de cromatografía de gases y el método DNS

**Tabla G-1: Comparación azúcares reductores DNS v/s GC**

Serie	GC	DNS	GC	DNS	error	Gráfico azúcares reductores DNS v/s GC
Pretratamiento con IL	Azúcares reductores [mg/g Ms]		$\sigma$			
N	21	28	4	2	36%	<p> <math>y = 0,9885x + 10,904</math>  <math>R^2 = 0,993</math> </p>
BE	29	39	4	0	35%	
BL	55	81	5	9	49%	
C	234	236	4	16	1%	
D	237	238	60	34	0%	
B	269	269	16	14	0%	
O	333	357	29	76	7%	
R	129	129	7	8	0%	
M	40	51	10	8,8	28%	

**Tabla G-2: Comparación glucosa GC v/s kit**

Serie	Kit	GC	error	Gráfico glucosa GC v/s kit
Pretratamiento con IL	Glucosa [mg/g MS]			
BL 1	38	39	1%	<p> <math>y = 1,1384x + 5,8282</math>  <math>R^2 = 0,9854</math> </p>
BL 2	37	37	2%	
C1	180	206	12%	
C2	168	202	17%	
C3	198	227	13%	
R1	60	91	34%	
R2	66	85	22%	
R3	77	99	22%	

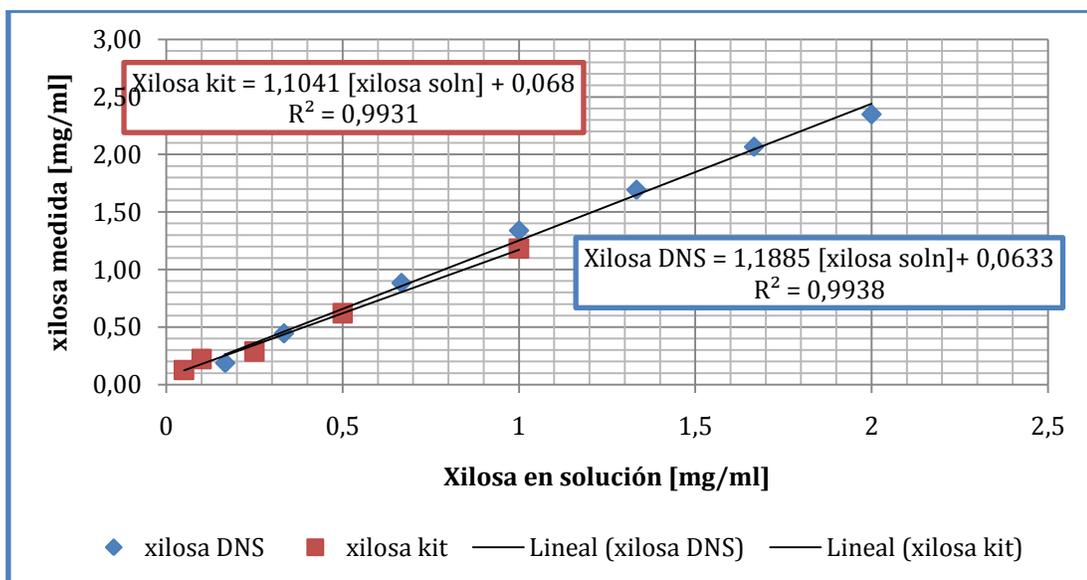


Figura G-1: Calibración de xilosa de kit y xilosa en DNS versus xilosa en solución

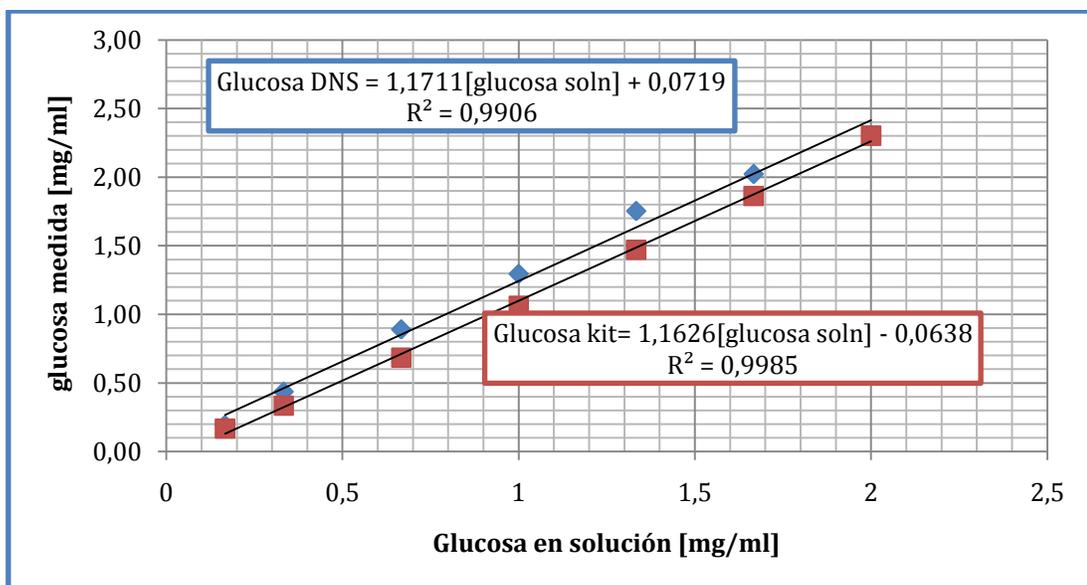


Figura G-2: Calibración glucosa medida en DNS y en kit versus glucosa en solución.

A través de un manejo algebraico se tiene que

$$\text{Glucosa DNS} = 1,007[\text{Glucosa Kit}] + 0,1378$$

$$\text{Xilosa DNS} = 1,063[\text{Xilosa Kit}] - 0,0062$$

# ANEXO H

## Modelamiento de los perfiles cinéticos en la hidrólisis enzimática

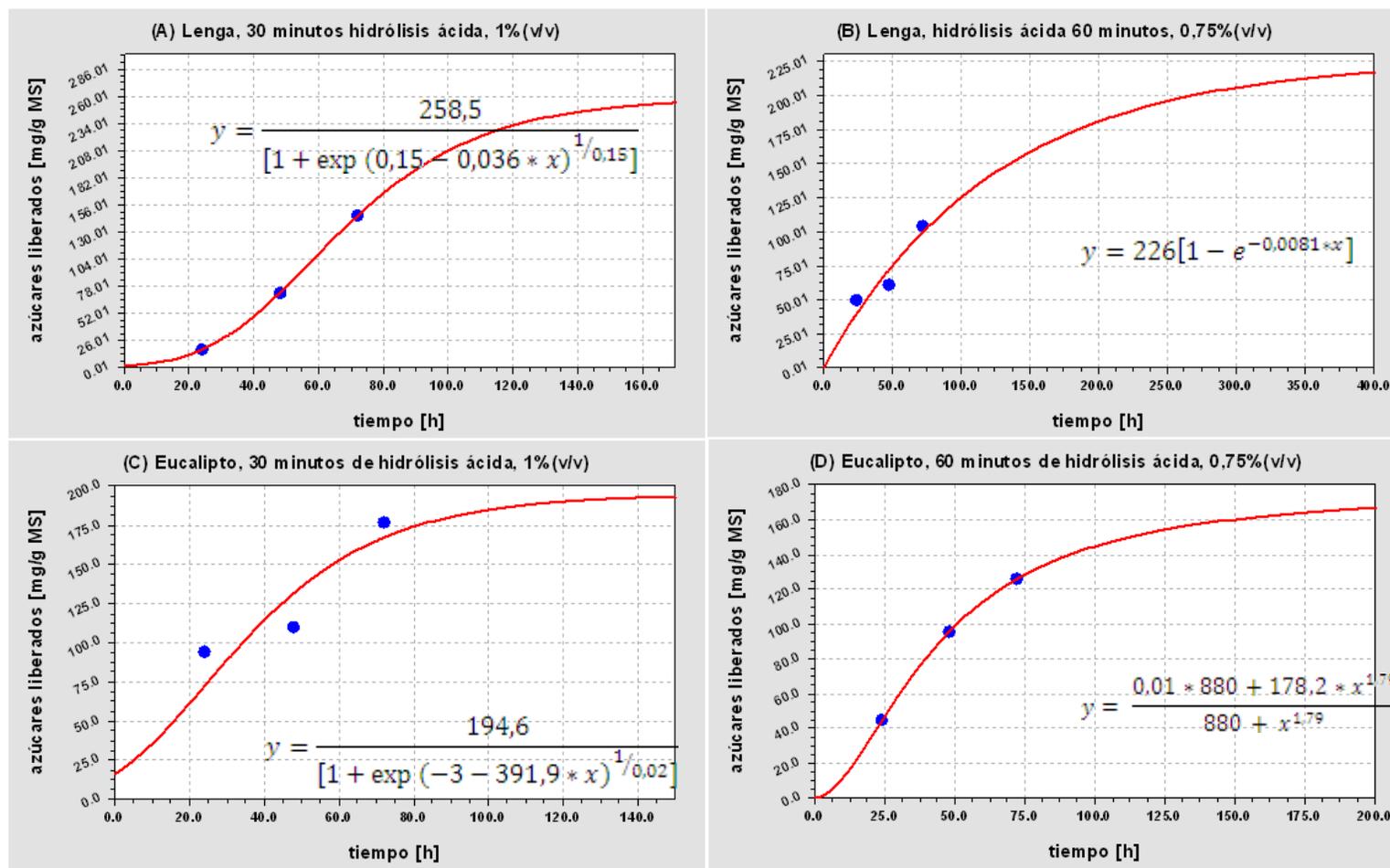


Figura H-1:

Perfiles cinéticos de los azúcares totales de la hidrólisis enzimática para Lenga y Eucalipto pretratada con hidrólisis ácida. Caso A y C se rigen por el Modelo de Richard, caso B se rige por Asociación exponencial y caso D por Modelo MMF.

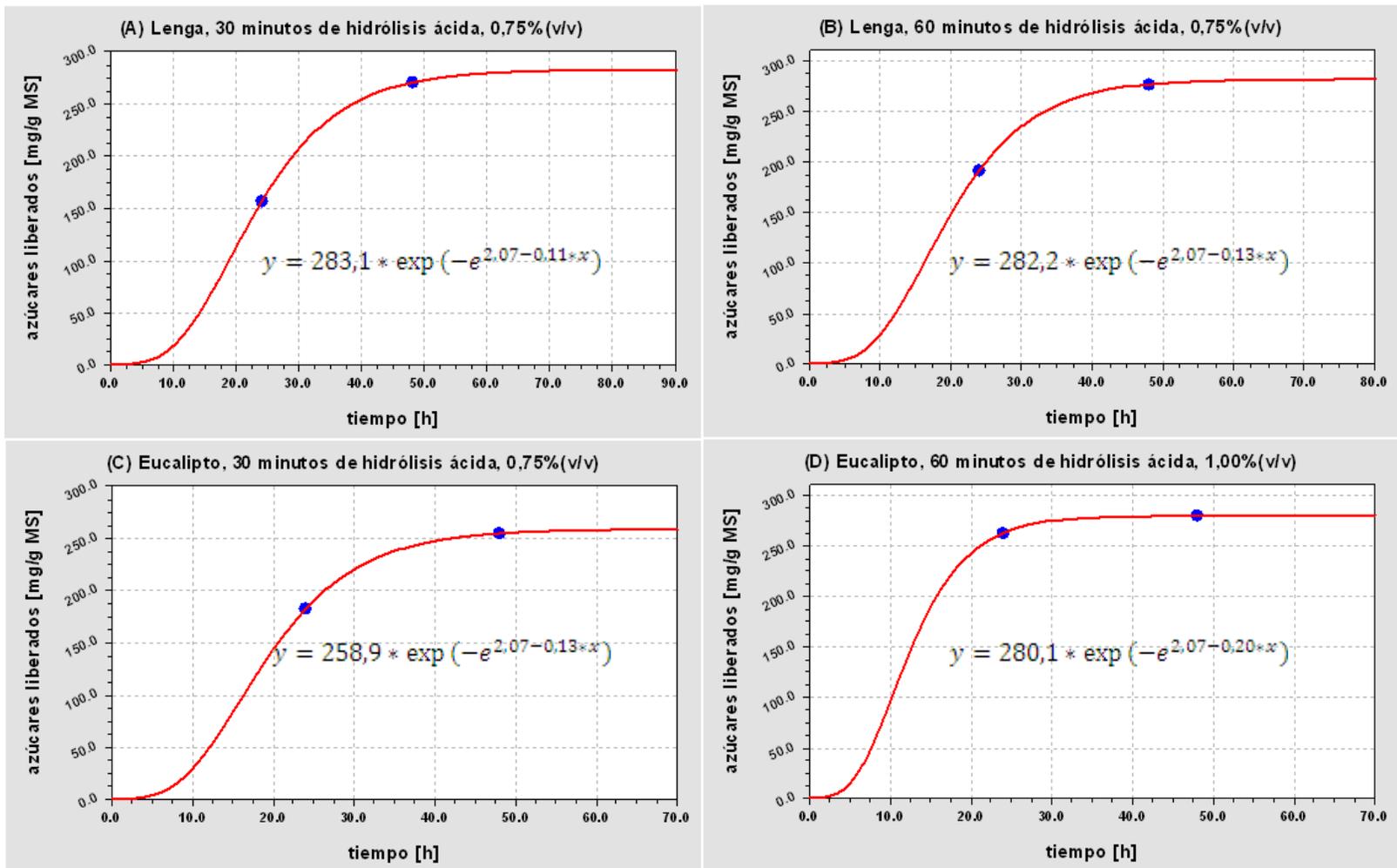


Figura H-2: Perfiles cinéticos de los azúcares totales de la hidrólisis enzimática para Lenga y Eucalipto pretratada con hidrólisis ácida y hidrólisis alcalina. Todos los casos se rigen por la Relación de Gompertz

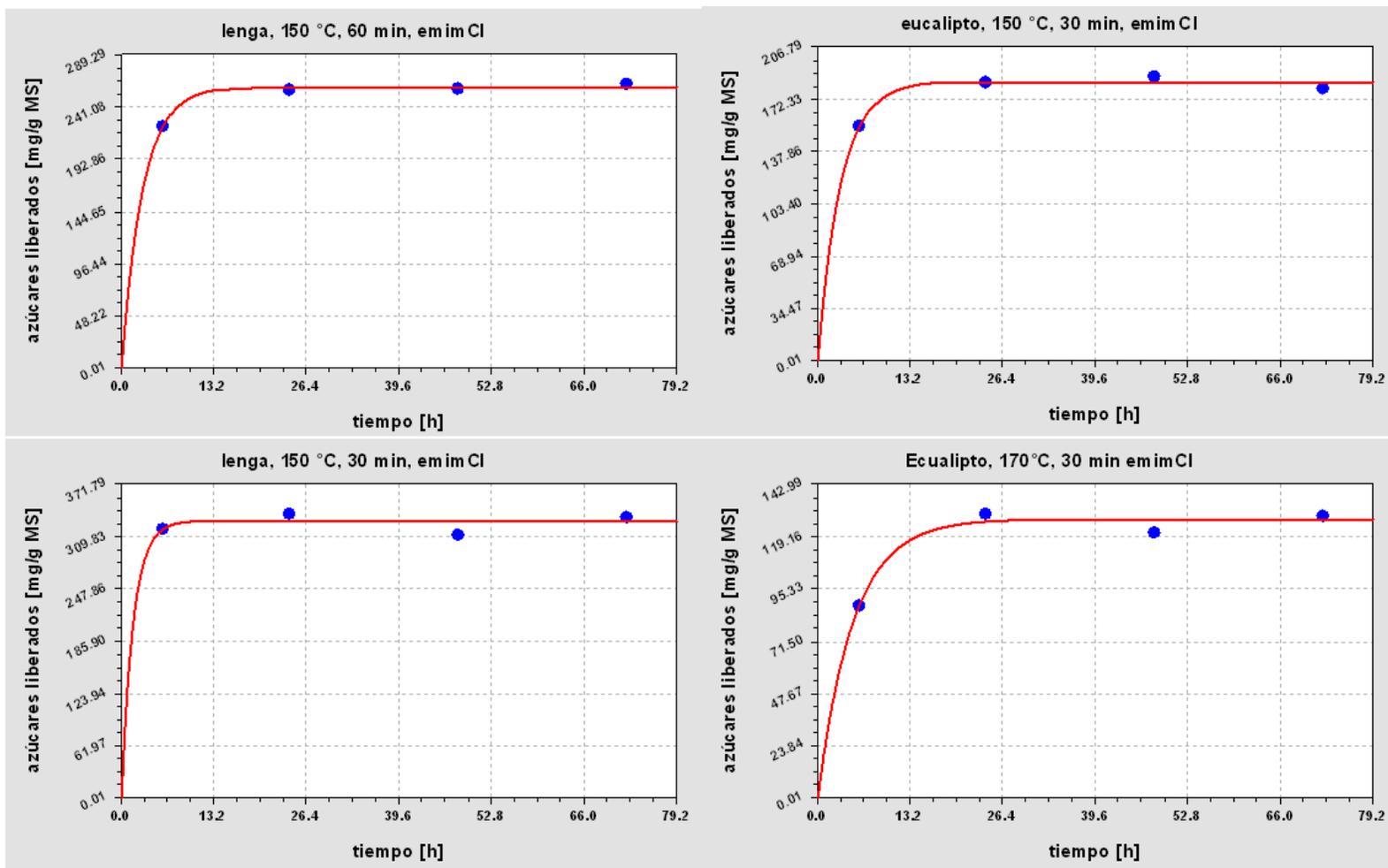


Figura H-3: Perfiles cinéticos de los azúcares totales de la hidrólisis enzimática para Lengua y Eucalipto pretratada con líquido iónico. Todas las curvas se rigen por la asociación exponencial

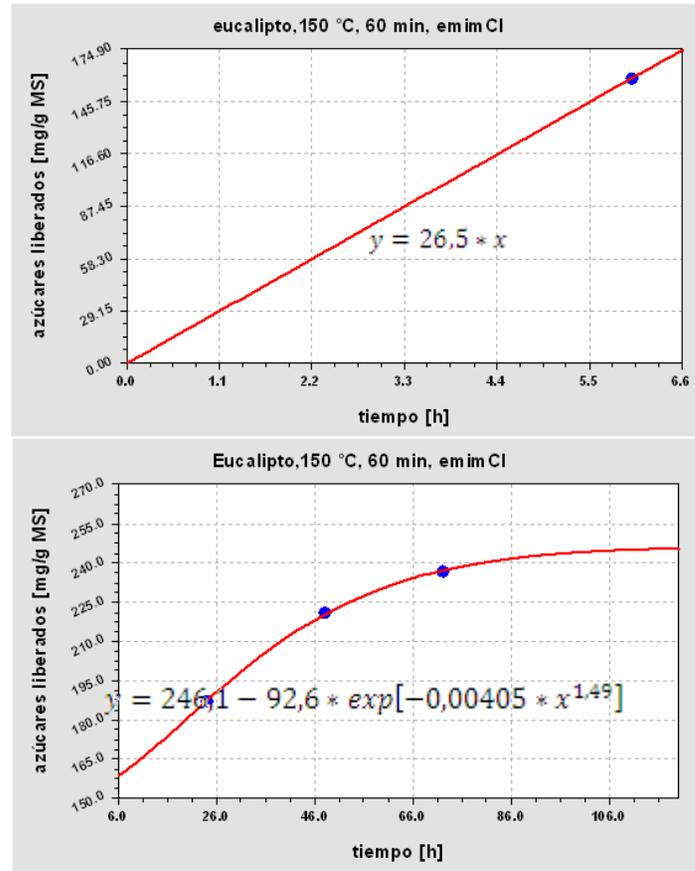


Figura H-4: Perfiles cinéticos de los azúcares totales de la hidrólisis enzimática para Eucalipto pretratada con líquido iónico. La curva es un modelo lineal de [0..6 horas] y [6..∞] corresponde al Modelo de Weibull

# ANEXO I

## Comparación de protocolos de medición de azúcares

La siguiente tabla se refiere a las condiciones usadas en las distintas experiencias de pretratamiento con líquidos iónicos. Además se muestran los pesos post secado de las muestras y el porcentaje de pérdida de éstas.

**Tabla I-1: Condiciones usadas en las distintas experiencias de pretratamiento con líquidos iónicos.**

Serie	Materia prima	T [°C]	t [min]	IL	Peso MP [g]	IL a pesar [g]	IL pesado [g]	Razón IL/MP	Peso post secado [g]	Pérdida [%]
A1	LENGA	80	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1101	2,0919	2,0884	19	0,11	0,09%
A2	LENGA	80	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1087	2,0653	2,0729	19	0,0948	12,79%
A3	LENGA	80	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1002	1,9038	1,9094	19	0,091	9,18%
B1	LENGA	121	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1073	2,0387	2,0486	19	0,1007	6,15%
B2	LENGA	121	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1083	2,0577	2,0645	19	0,1038	4,16%
B3	LENGA	121	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1007	1,9133	1,919	19	0,0902	10,43%
C1	LENGA	150	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,0995	1,8905	1,8962	19	0,0581	<b>41,61%</b>
C2	LENGA	150	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,0998	1,8962	1,9033	19	0,0582	<b>41,68%</b>
C3	LENGA	150	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1008	1,9152	1,9111	19	0,0581	<b>42,36%</b>
D1	EUCALIP.	150	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1002	1,9038	1,9095	19	0,0861	14,07%
D2	EUCALIP.	150	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1005	1,9095	1,9108	19	0,0921	8,36%
D3	EUCALIP.	150	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,102	1,938	1,9497	19 1/9	0,1056	-3,53%
E1	EUCALIP.	121	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1012	1,9228	1,9282	19	0,1166	-15,22%
E2	EUCALIP.	121	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1013	1,9247	1,9224	19	0,1366	-34,85%
E3	EUCALIP.	121	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1015	1,9285	1,9305	19	0,1154	-13,69%
H1	EUCALIP.	80	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1009	1,9171	1,9242	19	0,103	-2,08%
H2	EUCALIP.	80	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1006	1,9114	1,92	19	0,1072	-6,56%

H3	EUCALIP.	80	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1012	1,9228	1,9291	19	0,1057	-4,45%
O1	LENGA	150	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1002	1,9038	1,9048	19	0,0833	16,87%
O2	LENGA	150	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1001	1,9019	1,9085	19	0,0761	23,98%
O3	LENGA	150	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1005	1,9095	1,9047	19	0,0750	25,37%
P1	EUCALIP.	150	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1	1,9	1,9019	19	0,1005	-0,50%
P2	EUCALIP.	150	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1002	1,9038	1,9031	19	0,108	-7,78%
P3	EUCALIP.	150	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1004	1,9076	1,9177	19 1/9	0,1002	0,20%
R1	EUCALIP.	170	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1016	1,9304	1,972	19 2/5	0,0874	14%
R2	EUCALIP.	170	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1004	1,9076	1,9106	19	0,0637	37%
R3	EUCALIP.	170	30	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	0,1007	1,9133	1,9165	19	0,0825	18%
M1	LENGA	150	60	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0,0998	1,8962	2,1216	21 ¼	0,0958	4%
M2	LENGA	150	60	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0,1004	1,9076	2,21	22	0,082	18%
M3	LENGA	150	60	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0,1009	1,9171	2,0332	20 1/7	0,1131	-12%
N1	EUCALIP.	150	60	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0,1006	1,9114	2,1216	21	0,1175	-17%
N2	EUCALIP.	150	60	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0,1004	1,9076	2,0332	20 ¼	0,1356	-35%
N3	EUCALIP.	150	60	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0,1005	1,9095	2,0332	20 ¼	0,1322	-32%
Q1	EUCALIP.	170	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]					0	
Q2	EUCALIP.	170	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]					7,8584	
Q3	EUCALIP.	170	60	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]					7,7524	

## FE DE ERRATAS

- Capítulo 2, Sección 2.1, página 10.

Para la Tabla 2-2 Lignina, Celulosa y Hemicelulosa corresponden al 95% del porcentaje total disponible en un gramo de materia prima, considerando que el 5% restante corresponde a la suma de las sustancias extraíbles y cenizas. Con esto, el porcentaje real de cada componente es:

Componente	Residuos de Eucalipto [%]	Residuos de Lengua [%]
Lignina	18	16
Celulosa	40	43
Hemicelulosa	37	36
Sustancias extraíbles	5	4
Cenizas	0,2	0,8

- Capítulo 7, Sección 7.2.3, página 47.

Considerando el cambio producido en la Tabla 2-2 los nuevos valores de conversiones del pretratamiento ácido en Lengua y Eucalipto son los siguientes (Tabla 7-4):

Experimento	Hidrólisis ácida		Hidrólisis enzimática		Total proceso	
	Conversión [%]	$\sigma$ [%]	Conversión [%]	$\sigma$ [%]	Conversión [%]	$\sigma$ [%]
<b>LENGA</b>						
A1	4	0,1	24	5,2	28	4,6
B1	8	0,1	15	1,4	22	1,1
C1	13	0,4	19	1,4	31	1,2
D1	13	0,6	20	2	34	1,6
A2	8	0,5	11	0,7	19	0,6
B2	16	0,6	13	0,6	29	1,1
C2	19	0,9	16	4,6	35	2,5
D2	18	0,5	13	1,9	31	1,1
<b>EUCALIPTO</b>						
A1	2	0,1	16	5,8	18	5,3
B1	6	0,6	12	0,4	18	0,5
C1	5	0,5	23	1,1	28	1

<b>D1</b>	9	0,4	31	6,8	40	5,3
<b>A2</b>	5	0,1	10	1,1	15	0,7
<b>B2</b>	<b>10</b>	1,6	16	2,2	26	2
<b>C2</b>	11	2	13	2	24	2
<b>D2</b>	13	2,8	12	2,7	25	2,7

- Capítulo 7, Sección 7.4.3, página 58.

Considerando el cambio producido en la Tabla 2-2 los nuevos valores de conversiones del pretratamiento alcalino en Lengua y Eucalipto son los siguientes (Tabla 7-8):

	Hidrólisis ácida		Hidrólisis enzimática		Total del proceso	
<b>LENGA</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>
A1	4	0,1	42	2,3	45	2
B1	8	0,1	34	1,2	42	1,1
C1	13	0,4	26	0,7	39	0,8
D1	13	0,6	31	0,4	45	0,5
A2	8	0,5	24	0,5	32	0,5
B2	16	0,6	<b>35</b>	<b>0,1</b>	<b>51</b>	<b>0,2</b>
C2	<b>19</b>	<b>0,9</b>	30	0,5	49	0,6
D2	18	0,5	31	0,4	49	0,4
<b>EUCALIPTO</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>	<b>Conversión [%]</b>	<b><math>\sigma</math> [%]</b>
A1	2	0,1	44	4,2	46	4,1
B1	6	0,6	33	0	39	0,1
C1	5	0,5	34	6,3	40	5,4
D1	9	0,4	33	1,9	43	1,5
A2	5	0,1	35	1,9	40	1,6
B2	<b>10</b>	<b>1,6</b>	34	3,5	43	3
C2	11	2	<b>36</b>	<b>1,5</b>	<b>47</b>	<b>1,6</b>
D2	13	2,8	31	0,2	44	1

- Capítulo 8, Sección 8.1.2, página 66.

Considerando el cambio producido en la Tabla 2-2 los nuevos valores de conversiones en la hidrólisis enzimática para el pretratamiento con líquidos iónicos en Lengua son los siguientes (Tabla 8-2):

LENGA				Conversión de 72 horas de hidrólisis enzimática		
Condiciones de Pretratamiento (temperatura, tiempo y tipo de líquido iónico)				Xilosa	Glucosa	Azúcares Reductores
(1)	Blanco sin pretratamiento			2%	9%	7%
(2)	T= 80°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	5%	16%	11%
(3)	T= 121°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	20%	41%	33%
(4)	T= 150°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	14%	43%	30%
(5)	T= 150°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	23%	57%	42%
(6)	T= 150°C	t= 60 min	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	2%	7%	5%

- Capítulo 8, Sección 8.1.2, página 67.

Considerando el cambio producido en la Tabla 2-2 los nuevos valores de conversiones en la hidrólisis enzimática para el pretratamiento con líquidos iónicos en Eucalipto son los siguientes (Tabla 8-3):

EUCALIPTO				72 horas de conversión de hidrólisis enzimática		
Condiciones de Pretratamiento (temperatura, tiempo y tipo de líquido iónico)				Xilosa	Glucosa	Azúcares reductores
(1)	Blanco sin pretratamiento			0,5%	5%	4%
(2)	T= 80°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	1%	5%	3%
(3)	T= 121°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	2%	10%	7%
(4)	T= 150°C	t= 60 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	13%	46%	31%
(5)	T= 150°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	8%	36%	24%
(6)	T= 170°C	t= 30 min	[emim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	9%	23%	17%
(7)	T= 150°C	t= 60 min	[A336 <sup>+</sup> ][OH <sup>-</sup> ]	0%	4%	3%