



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA PARA LA PRODUCCIÓN
DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN, MEDIANTE
PRETRATAMIENTOS ALTERNATIVOS: LÍQUIDOS IÓNICOS RECICLADOS Y
HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

SEBASTIÁN ANDRÉS JURI AWAD

PROFESORA GUÍA:

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

FRANCISCO GRACIA CAROCA

BARBARA A. ANDREWS

SANTIAGO DE CHILE

ENERO DEL 2011

Resumen

El uso de los combustibles fósiles cada vez se hace más complejo, dándole un mayor espacio al uso de nuevas alternativas energéticas de carácter renovables y con menor impacto en el medio ambiente. Como alternativa y/o suplemento a la gasolina del transporte terrestre aparece el bioetanol, que tiene un mayor octanaje y permite una mejor combustión. En Chile aparece la inquietud de producir bioetanol de segunda generación debido al potencial biomásico que existe en el país y por ser una alternativa vigente para su desarrollo.

El presente trabajo de memoria consistió en estudiar la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) para residuos forestales (eucalipto y lenga) que fueron pretratados mediante estrategias alternativas: líquidos iónicos (LI) reciclados y hongos de pudrición blanca (HPB).

La primera parte del trabajo consistió en estudiar la factibilidad de utilizar el líquido iónico reciclado y luego ver los resultados en la sacarificación enzimática, compararlo con el pretratamiento de líquido iónico puro, con distintas cargas de material y líquido iónico (1:3, 1:5, 1:9, 1:10 p/p). Para eucalipto el mejor pretratamiento se logró con una carga de 1:3 p/p a 150°C por 30 minutos como condiciones de operación con un rendimiento de glucosa/celulosa del 67% respecto al líquido iónico puro (185,1 mg de glucosa por gramo de material). Para lenga el mejor resultado se dió con una carga 1:5 a 150°C por 15 minutos de pretratamiento, lográndose un 94% del rendimiento glucosa/celulosa respecto al líquido iónico puro (408,3 mg de glucosa por gramo de material). Esta diferencia se justifica principalmente en que el eucalipto tiene una mayor resistencia a la humectación por solventes que la lenga, debido a su densidad.

La segunda parte consistió en realizar la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea previo pretratamiento con líquido iónico reciclado para lenga con distintas concentraciones iniciales de inóculo (0,1; 0,5 y 1,0 [g.p.s./L]) y cargas enzimáticas (5, 15, 20 [FPU/g material]). Utilizando la mejor condición de pretratamiento para lenga, se siguió con la segunda parte de este trabajo, lográndose el mejor rendimiento del 23% sobre el máximo valor teórico del rendimiento etanol/glucosa total disponible con una concentración inicial de inóculo de 1,0 [g.p.s./L] y 5 [FPU/g material], con lo cual es posible obtener 19.290 m³ de bioetanol que representa el 29% y 12% de la demanda de bioetanol suponiendo un reemplazo de 2% y 5%, respectivamente.

La tercera parte consistió en realizar la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea sobre lenga y eucalipto pretratado con hongos de pudrición blanca a 30 y 45 días, utilizando una condición encontrada en la segunda parte (concentración inicial de inóculo =1,0 [g.p.s./L] y 20 [FPU/g material]), donde se obtuvo el rendimiento cuando se realizó un pretratamiento con *S. hirsutum* por 45 días con un rendimiento del 56% respecto al máximo teórico. Con este rendimiento hipotéticamente se podría producir 39.329 m³ de bioetanol abarcando el 60% y 24% de la demanda de bioetanol al 2% y 5% de mezcla en gasolina, respectivamente. Sin embargo a largo plazo se logra mejores niveles de

productividad para la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea si se aplica un pretratamiento con hongos de pudrición blanca a 30 días.

En conclusión, el uso de pretratamientos alternativos como líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca, son factibles para la producción de bioetanol de segunda generación, por lo tanto se debería continuar con la investigación.

Agradecimientos

Luego de terminar una etapa de mi vida, que me ha marcado mucho, no tengo más que agradecer a todas las personas que estuvieron involucradas en este proceso:

A mis padres, Víctor y Jacqueline, que gracias a su apoyo incondicional en las decisiones que he tomado durante estos lindos 7 años, no me queda más que agradecerles dicho apoyo y por la oportunidad que me dieron de poder entrar a la Universidad, porque gracias a su esfuerzo estoy aquí al final del camino. Quiero también hacer mención de mis hermanos Cristóbal y Gabriel, que siempre estuvieron conmigo dándome mucho apoyo y alegría en los momentos difíciles.

Agradecer a todos los profesores del Departamento de Química y Biotecnología, en especial a mi profesora guía, María Elena, por su gran apoyo durante el año 2010 recién pasado, por la buena voluntad de ayudarme siempre a conseguir materiales, los equipos, etc. y también toda esa buena vibra que siempre me dio confianza para preguntarle lo que fuera con mucha confianza...gracias por eso. Quiero agradecer también en forma particular a la profesora Oriana, Francisco y Alejandro, por la ayuda brindada en situaciones específicas que me permitieron terminar este trabajo, también por la “buena onda” y disposición a ayudarme.

Agradecer al Proyecto Finlandia CCF-05 y al Proyecto Domeyko-Energía, por la oportunidad de ser parte de este gran equipo de investigación. Agradezco todos los recursos brindados para poder realizar el trabajo, el apoyo económico, de instalaciones y de sabiduría en las personas que lo manejan. Al CIBYB por toda la simpatía de la gente, Nancy, Paty, Raul, Mencho...gracias por la buena voluntad.

Quiero saludar a mis amigos del departamento: Diego, Osvaldo, Felipe, Camila, Carlos, Daniela, Jorge; por los grandes momentos que pasamos juntos, todo el sufrimiento de los últimos años, pasaron mucho mejor gracias a su ayuda.

Y como olvidar a los que me vieron entrar a la Universidad, mis grandes amigos de primer año que han hecho de mi una mejor persona, conocedora y esforzada, tolerante y empática...les agradezco todos los buenos momentos que pasamos (y pasaremos) juntos.

Finalmente, agradecer a la Universidad por estos lindos y satisfactorios 7 años de mi vida.

Sebastián Andrés Juri Awad, Enero 2011.

Índice de capítulos

Índice de Tablas.....	vi
Índice de Ilustraciones	vii
Índice de Gráficos.....	viii
Nomenclatura y abreviaciones.....	ix
Capítulo I. Introducción, Marco Teórico, Antecedentes Bibliográficos y Objetivos.....	1
1.- Introducción y Motivación	1
1.2.- Visión Energética y Medioambiental del uso de combustibles	1
1.2.- Bietanol como alternativa.....	2
1.3.- Bioetanol a partir de cultivos de segunda generación.....	3
1.4.- Proyecciones en Chile para el bioetanol y material lignocelulósico	3
1.5.- Visión en la factibilidad técnico-económica en la producción de bioetanol de segunda generación.....	4
2.- Marco Teórico	6
2.1.- Material lignocelulósico	6
2.2.- Pretratamientos del material lignocelulósico	8
2.3.- Etapas de Sacarificación y Fermentación: Estrategia SSF para producción de bioetanol.....	10
3.- Antecedentes al trabajo a desarrollar.....	13
3.1.- Pretratamiento con Líquidos Iónicos puros e Hidrólisis Enzimática	13
3.2.- Pretratamientos con Hongos de Pudrición Blanca (HPB)	14
3.3.- Estrategia de Sacarificación y fermentación simultánea (SSF), previo pretratamiento con Ácido diluido y Líquidos iónicos.	16
4.- Objetivos	19
4.1.- Objetivo Principal.....	19
4.2.- Objetivos Específicos.....	19
Capítulo II. Materiales, Metodología y Procedimientos.	20
5.- Materiales y Metodologías.....	20
5.1.- Materiales	20
5.2.- Metodologías	21
6.- Procedimientos	24
6.1.- Estudio de pretratamiento con Líquido Iónico y Sacarificación.....	24
6.2.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) mediante un pretratamiento con Líquido Iónico reciclado	25

6.3.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) mediante un pretratamiento biológico	26
Capítulo III. Resultados y Discusión.....	28
7.- Resultados y Discusión	28
7.1.- Primera etapa: Estudio del efecto del uso de Líquido iónico reciclado, sobre la hidrólisis enzimática	28
7.2.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) previo pretratamiento con Líquido Iónico reciclado	33
7.3.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) previo pretratamiento biológico...40	
7.4.- Cálculo del potencial bioetanol obtenido a partir de la biomasa disponible	41
Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones.....	44
8.- Conclusiones.....	44
9.- Recomendaciones	46
Referencias.....	47
Anexos.....	51
Anexo A.- Título I: Introducción y Motivación, Marco Teórico, Antecedentes y Objetivos	51
Anexo A.1. Propiedades generales de los Líquidos Iónicos.	51
Anexo A.4. Pretratamientos alternativos.....	52
Anexo B.- Curvas de calibración, metodologías y procedimientos	53
B.1.- Curva de calibración de Biomasa vs Absorbancia a 600 nm.....	53
B.2.- Curva calibración Concentración de Azúcares vs Absorbancia a 540 nm.....	54
B.3.- Curva de Calibración Concentración de etanol versus Área de integración mediante Cromatografía Gaseosa.	55
B.4.- Aislamiento de colonias de levadura y obtención de inóculo.	56
B.5.- Otros resultados de pretratamiento fúngicos no considerados en el trabajo.....	56
Anexo C.- Diagrama de Decisiones para el procedimiento del trabajo de investigación.....	57
Anexo D.- Imágenes de los montajes y procedimientos realizados.	59
Anexo E.- Memoria de cálculo para el rendimiento de sacarificación total y de glucosa.....	61
Anexo F.- Resultados de los trabajos previos (Antecedentes bibliográficos).	63
Anexo G. Memoria de cálculo del potencial de bioetanol obtenido	65
G.1.- Cálculo general del bioetanol generado para suplir demanda en Chile.....	65
G.2.- Cálculo de la mejor opción para el pretratamiento biológico de 30 o 45 días.....	65
Anexo H. Curvas de Rendimiento vs C.I.I. para cargas enzimáticas constantes.....	66

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Composición de distintos residuos lignocelulósicos	5
Tabla 1.2. Comparación energética de distintos tipos de pretratamientos..	5
Tabla 2.1. Composición química de los residuos forestales en estudio.....	8
Tabla 2.2. Rango óptimo de operación de los parámetros más relevantes en la hidrólisis enzimática	11
Tabla 3.1. Resumen de los resultados obtenidos en la sacarificación enzimática para los tres distintos pretratamientos	14
Tabla 3.2. Resumen de los resultados de pérdida de peso y sacarificación total y de glucosa para los trabajos de pretratamiento con Hongos de Pudrición Blanca	16
Tabla 6.1. Mejores resultados de la Hidrólisis Enzimática de eucalipto y lenga pretratados con Hongos de Pudrición Blanca.....	26
Tabla 7.1. Resumen de los pretratamientos a utilizar para la Segunda Etapa del trabajo	33
Tabla 7.2. Resumen de la concentración final en [g/L] y rendimientos de etanol porcentuales de la estrategia SSF en lenga previo pretratamiento con LI reciclado.	36
Tabla 7.3. Cuadro comparativo de los resultados reportados en trabajos anteriores y el actual trabajo.	38
Tabla 7.4. Pérdida de peso, rendimiento de etanol y concentración final de bioetanol obtenidos de la estrategia SSF previo pretratamiento fúngico.	41
Tabla 7.5. Comparación del bioetanol generado para 3 meses de pretratamiento biológico en base a una tonelada de material.	42
Tabla 7.6. Porcentaje de demanda para los porcentajes de mezcla de etanol en bencina, a base de 245.000 toneladas de material lignocelulósico, considerando los criterios de rendimiento y tiempo de pretratamiento con HPB.	43
Tabla A.1. Propiedades fisicoquímicas de los Líquidos Iónicos clorados ([EMIM]Cl).....	51
Tabla A.2. Pretratamientos mayormente usados para material lignocelulósico y sus posibles efectos	52
Tabla B.1. Resultados de pretratamientos fúngicos a los 45 días.....	56
Tabla E.1. Composición química p/p para las maderas en estudio.....	61
Tabla E.2. Resumen de los Rendimientos (%) para cada tipo de residuo con cada pretratamiento.	61
Tabla E.3. Resumen de los Rendimientos de Sacarificación Azúcares Reductores Totales (%)/ Glucosa (%) respecto a LI puro.....	62

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1.1. Procesos involucrados en la transformación bioquímica del material lignocelulósico a.....	4
Ilustración 2.1. Diagrama de bloques del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación.....	6
Ilustración 2.2. Estructura de biomasa lignocelulósica	7
Ilustración 2.3. Esquema del cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento	8
Ilustración 2.4. Mecanismo de acción de los LI sobre las cadenas de celulosas como pretratamiento. Líquido Iónico utilizado en el esquema es el [C ₄ mim]Cl.	9
Ilustración 3.1. Resultados del trabajo de Niklitschek. "Comparación SHF vs SSF para sustrato pretratado con ASD y LI"	17
Ilustración 5.1. Diagrama de Bloques de las etapas relevantes y/o involucradas en el estudio para producir bioetanol a partir de residuos forestales	21
Ilustración 7.1. Hidrólisis enzimática para eucalipto durante de 72 horas con una carga enzimática de 37 FPU/g material a 50°C por 30 minutos.....	29
Ilustración 7.2. Cantidad de azúcares liberadas en eucalipto a las 72 horas y Selectividad de la sacarificación.....	30
Ilustración 7.3. Hidrólisis enzimática para lenga durante de 72 horas con una carga enzimática de 37 FPU/g material a 50°C por 15 minutos.....	31
Ilustración 7.4. Cantidad de azúcares liberadas en lenga a las 48 horas y Selectividad de la sacarificación.	32
Ilustración 7.5. . Perfiles cinéticos de fermentación, usando la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI reciclado, con una C.I.I.= 0,1 [g.p.s./L], a distintas cargas enzimáticas	34
Ilustración 7.6. Perfiles cinéticos de fermentación, usando la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI reciclado, con una C.I.I.= 0,5 [g.p.s./L], a distintas cargas enzimáticas	34
Ilustración 7.7. Perfiles cinéticos de fermentación, usando la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI reciclado, con una C.I.I.= 1,0 [g.p.s./L], a distintas cargas enzimáticas..	35
Ilustración 7.8. Perfiles cinéticos de la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI puro con una C.I.I. = 1,0 [g.p.s./L] y 20 [FPU/g material] como carga enzimática	37
Ilustración 7.9. Comportamiento de las Curvas "Rendimiento vs C.I.I." en función de la carga Enzimática utilizada.	39
Ilustración 7.10. Perfiles cinéticos de fermentación de la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con HPB, con una C.I.I.= 1,0 [g.p.s./L] y 20 [FPU/ g material] como carga enzimática.	40
Ilustración B.1. Ejemplo de "peak" de etanol puro en una cromatografía gaseosa	55
Ilustración C.1. Diagrama de Decisión del Trabajo de investigación	57
Ilustración C.2. Red de combinaciones para el Procedimiento del Estudio de una SSF con pretratamiento con líquido iónico reciclado.	58
Ilustración D.1. Recuperación de LI.....	59
Ilustración D.2. Material lignocelulósico, con distintos pretratamientos y granulometría utilizada.....	60
Ilustración F.1. Resultados de la Hidrólisis enzimática de azúcares reductores y glucosa luego del pretratamiento con HPB para lenga	64

Índice de Gráficos

Gráfico 1.1. Proyección de la utilización de energías utilizadas hasta el año 2100	2
Gráfico B.1. Curva de calibración de Biomasa a 600 nm.....	53
Gráfico B.2. Curva de calibración de Concentración de Azúcares reductores versus Absorbancia a 550 nm.	54
Gráfico B.3. Curva de calibración de Concentración de etanol versus Área de integración.....	55
Gráfico F.1. Promedio de la pérdida de peso observada en eucalipto sometido a pretratamientos con distintos HPB.	63
Gráfico F.2. Resultados de la Hidrólisis enzimática de azúcares reductores luego del pretratamiento con HPB para eucalipto.....	63
Gráfico F.3. Promedio de la pérdida de peso observada en lenga sometido a pretratamientos con distintos HPB	64
Gráfico H.1. Curvas de Rendimiento vs C.I.I. para cargas enzimáticas constantes.....	66

Nomenclatura y abreviaciones

- ASD: ácido sulfúrico diluido
- C.I.I.: concentración inicial de inóculo
- g.p.s./L: gramos peso seco por litro
- H₂SO₄: ácido sulfúrico
- LI: líquido iónico
- MO: microorganismos
- MM: millones
- RPM: revoluciones por minuto
- SHF: sacarificación y fermentación separadas
- SSF: sacarificación y fermentación simultánea
- %p/v: porcentaje peso – volumen
- %p/p: porcentaje peso – peso
- %v/v: porcentaje volumen – volumen
- [EMIM]Cl: Cloruro de 1 etil -3 metil imidazol

Capítulo I. Introducción, Marco Teórico, Antecedentes Bibliográficos y Objetivos.

1.- Introducción y Motivación

Este capítulo presenta la motivación para el desarrollo de la investigación para producir bioetanol de segunda generación a partir de residuos forestales (material lignocelulósico). Dicha motivación se basa principalmente en la existencia de un escenario favorable a la producción de bioetanol de segunda generación, debido a los problemas energéticos y medioambientales que existen por el consumo actual de combustibles fósiles, viéndose reflejado en un uso sostenible de residuos forestales y por las proyecciones de la cantidad de materia prima que se puede obtener en Chile con estos recursos renovables.

1.2.- Visión Energética y Medioambiental del uso de combustibles

Actualmente existe una disminución progresiva de las fuentes energéticas fósiles, principalmente porque no son renovables (petróleo). Además, el aumento en el consumo energético crece a pasos agigantados, esperándose que al año 2030, el consumo mundial de energía sea un 35% mayor que al año 2010 ^[1]. Debido a esto es de suma importancia buscar alternativas que permitan sustituir el uso de los combustibles fósiles, por otros de características renovables y menos contaminantes.

En la actualidad la biomasa surge como fuente de energía alternativa importante y renovable. Se puede producir a partir de diferentes sustratos o residuos como son los agrícolas, forestales, animales, agroindustriales, sólidos urbanos y cultivos energéticos ^[2], lo que permitiría obtener energía de manera diversificada sin afectar directamente otras necesidades importantes como la alimentación. En el Gráfico A.1 (ver Anexo A.1) se muestra la proyección de la utilización de energías a nivel global, siendo la biomasa la de mayor proyección y los combustibles fósiles (carbón y petróleo) los de menor proyección, llegando al año 2100 bajo un 10% de utilización ^[2].

En el Gráfico 1.1 se observa la dependencia porcentual de recursos desde el año 1830 hasta sus proyecciones del año 2100, donde es posible percibir el uso importante que tuvo en su comienzo el uso de carbón que posteriormente fue reemplazado por el uso del petróleo y otras alternativas de carácter fósiles, como el gas, sin embargo las proyecciones para los próximos años hablan de un recambio de las energías fósiles a energías renovables como solar, eólica, hidráulica y la con mayor proyección es el uso de biomasa como energía.

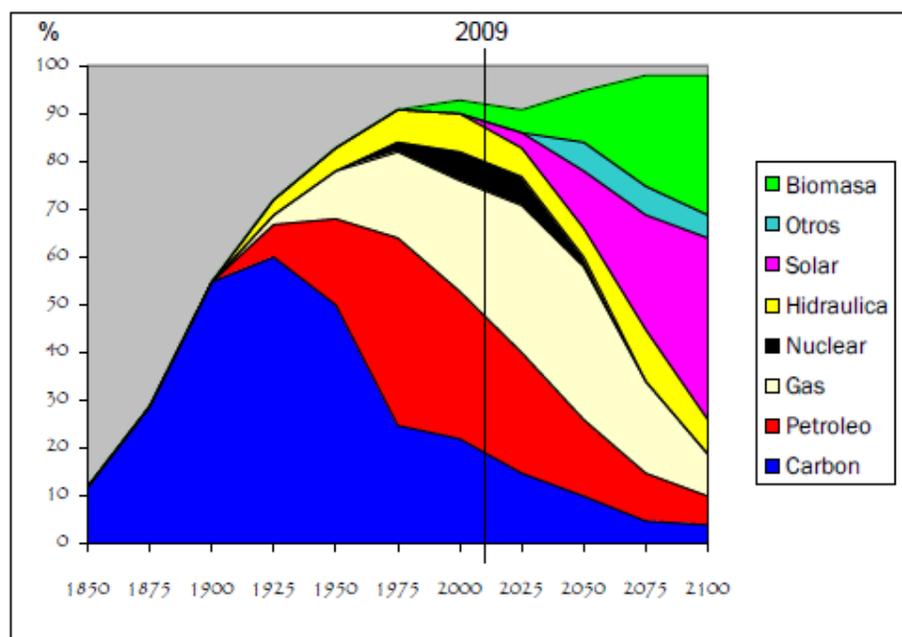


Gráfico 1.1. Proyección de la utilización de energías utilizadas hasta el año 2100 [1]

Además, es importante mencionar que el uso de biocombustibles produce gases de efecto invernadero, pero dichas emisiones de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el crecimiento de los cultivos y de otros materiales vegetales (proceso de fotosíntesis). Hay antecedentes que indican que una hectárea de cultivos ricos en energía usada para la producción de bioetanol y biodiesel pueden evitar la emisión de 0,2-2,0 toneladas de carbono a la atmósfera en comparación con el carbono liberado en el empleo de combustibles fósiles ^[3,4].

1.2.- Bioetanol como alternativa

El etanol puede ser utilizado como oxigenante de gasolina, elevando su contenido de O₂ permitiendo una mayor combustión de la misma y disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente, contiene un mayor octanaje y no es tóxico. Como aditivo oxigenante de la gasolina puede ser utilizado hasta 10% p/p ^[3] sin cambiar los motores convencionales. En países como Brasil y Estados Unidos ya existen políticas y tecnología sobre los motores de transportes (automóviles) que permiten utilizar un porcentaje mayor de etanol en los combustibles ^[5], lo que hace del bioetanol una alternativa real al consumo de combustibles fósiles.

Al año 2009, la producción de bioetanol fue de aproximadamente 90 millones de m³, siendo aproximadamente el 80% utilizado (73 millones de m³) como combustible y el otro 20% utilizado para usos domésticos o industriales, superando con creces la producción de biodiesel ^[6]. Los mayores productores de bioetanol son Estados Unidos y Brasil, con una producción de 40,6 millones de m³ y 23,9 millones de m³ respectivamente ^[6,7], sin embargo, la generación de estos combustibles proviene de la explotación de maíz y caña de azúcar, cultivos destinados para la alimentación humana lo que ha generado una gran controversia social, económica y política ^[6]. Como solución a este problema existe la posibilidad de utilizar bioetanol de segunda generación que se puede obtener a partir de fuentes no comestibles como desechos agrícolas y forestales (residuos lignocelulósicos).

1.3.- Bioetanol a partir de cultivos de segunda generación

El bioetanol se obtiene de la fermentación de azúcares, que provienen de fuentes directas que puedan proveer del sustrato fácilmente, por lo tanto la biomasa vegetal cumple con este requisito. Como principal fuente de almacenamiento de energía los vegetales tienen el almidón que es una cadena larga de glucosa presente principalmente en raíces, tubérculos, frutas y semillas; pero también como polisacárido de glucosa contiene la celulosa, que es parte del tejido de sostén de los vegetales difícilmente digerible ^[8].

El bioetanol de primera generación se obtiene de la fermentación de vegetales que contengan un alto porcentaje de almidón y/o azúcares, concentrado en vegetales comestibles. En cambio el bioetanol de segunda generación proviene de fuentes no comestibles que contienen un alto porcentaje de celulosa, por lo tanto no afecta mayormente otras áreas socio-económicas; contiene un gran potencial energético, debido a su alto contenido de azúcares de 5 y 6 carbonos, cercano al 66% de la masa total que eventualmente puede ser hidrolizado y fermentado para producir bioetanol ^[3].

Aproximadamente el material lignocelulósico corresponde al 50% de la biomasa total del planeta ^[3], lo que permite proyectar su uso a nivel industrial.

En particular en este trabajo se utilizará material lignocelulósico a partir de maderas duras *Nothofagus pomilio* (desde ahora lenga) y *Eucalyptus globulus Labell* (desde ahora eucalipto), las cuales se caracterizan porque su hoja es caduca¹. Además ambas son de carácter refractaria². No obstante, existe una diferencia en la densidad entre ellas, lo que hace a la lenga más susceptible que el eucalipto a la humectación (mojado) por un solvente líquido. A nivel molecular, ambas son latifoliadas y su composición es relativamente parecida ^[9].

1.4.- Proyecciones en Chile para el bioetanol y material lignocelulósico

El escenario para el 2011 proyecta una demanda de gasolina de 3,3 millones de m³, si se supone un mezclado de 2%, 5% y 10%, se tendría una demanda de 66, 165, 330 mil m³ de etanol respectivamente ^[10]. Ante esta opción, la Comisión Nacional de Energía propone aumentar la oferta de biocombustibles producidos en Chile con materia prima nacional, adicionando superficies para cultivos dendroenergéticos.

Para suplir esto, en Chile existen más de 13,4 millones (MM) de hectáreas (ha) de bosques nativos de los cuales 5 MM de ha pueden ser manejados, lo que generarían 7 MM de m³ de residuos lignocelulósicos por año. Existen 2,3 MM de ha de plantaciones industriales que producen una gran cantidad de residuos, donde el pino radiata genera 1,7 MM de m³. Además existen 3 MM de ha de suelos no utilizados que podrían ser utilizados como cultivos dendroenergéticos ^[11].

Específicamente las plantaciones de lenga cubren el 25,3% de la superficie del bosque nativo con una generación de 1,2 MM de m³ de residuos ^[11]. Sin embargo la lenga no es considerada en la industria

¹ Árboles que se caracterizan porque sus hojas se secan y caen en las estaciones frías (Otoño/Invierno)

² Impermeables a los líquidos polares (agua) [9]

maderera por ser mayormente árboles viejos con bajos rendimientos para la producción de madera industrial ^[11], por lo tanto sus residuos podrían ser utilizados exclusivamente para la producción de biocombustibles. Por otro lado tenemos el eucalipto, que compone parte de las plantaciones industriales con un 28% de la superficie total, después del pino radiata con un 64%, las cuales generan 37,5 MM de m³ de madera reutilizable y 500 mil m³ de desechos ^[12].

En consecuencia, el potencial de utilizar estas maderas como materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación es muy alto y dependería directamente de los rendimientos que se puedan obtener de los procesos que siguen río abajo del proceso de producción

1.5.- Visión en la factibilidad técnico-económica en la producción de bioetanol de segunda generación

Para la producción de bioetanol de segunda generación se debe analizar minuciosamente el proceso de producción. Como se observa en la Ilustración 1.1. la cantidad de etapas involucradas no es menor, por lo tanto es de suma importancia revisar las estrategias utilizadas, condiciones de operación aplicadas y rendimientos resultantes para considerar el proceso factible técnico-económicamente.

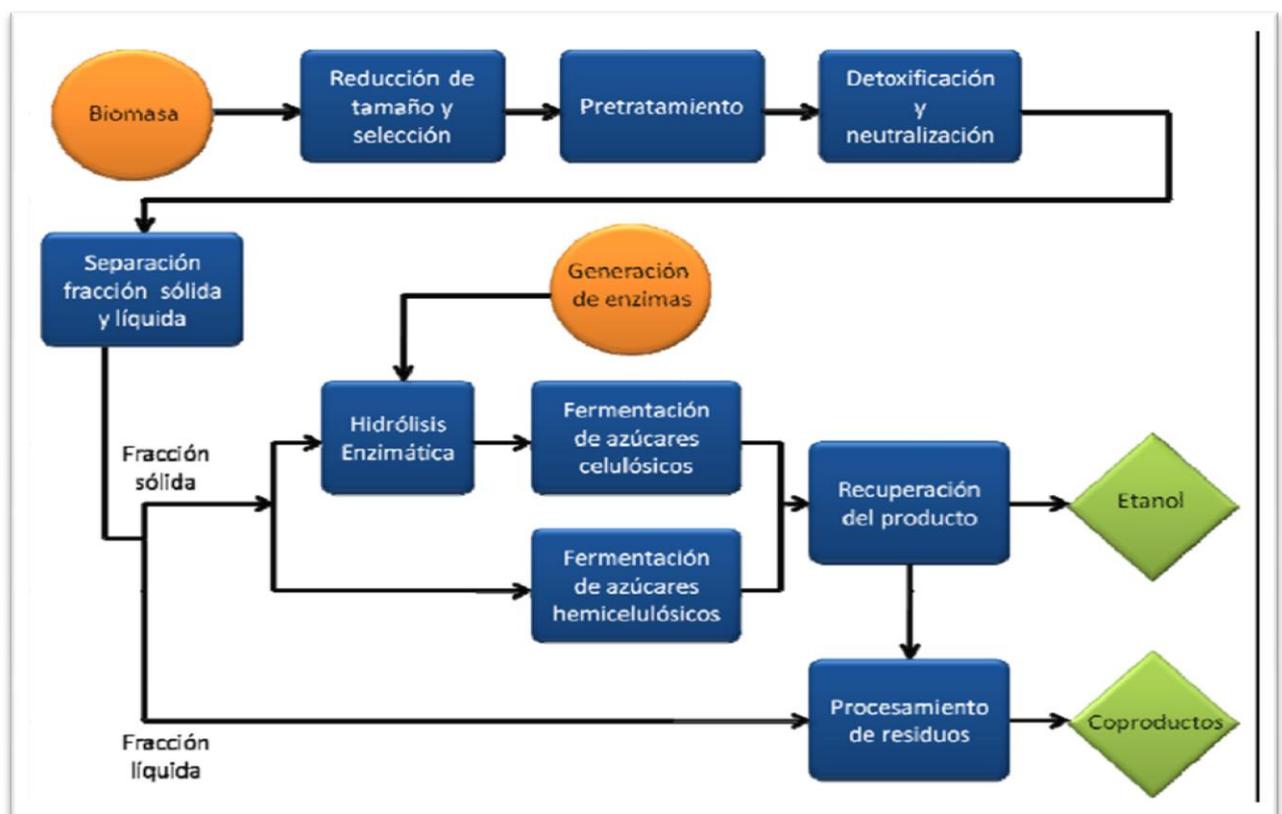


Ilustración 1.1. Procesos involucrados en la transformación bioquímica del material lignocelulósico a bioetanol [13]

Como primer factor importante está la utilización del material lignocelulósico adecuado, ya que las condiciones de operación varían según el sustrato, disponibilidad de azúcares fermentables y disponibilidad como materia prima, en la Tabla 1.1 se ilustran algunos ejemplos de composición lignocelulósica.

Tabla 1.1. Composición de distintos residuos lignocelulósicos (Adaptación [14])

Material Lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Residuos de maderas duras	40-55	24-40	18-25
Residuos de maderas blandas	45-50	25-35	25-35
Mazorca de maíz	45	35	15
Paja de arroz	32	24	18
Bagazo	33	30	19
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Pasto	45	31	12

Otro factor importante es el pretratamiento a elegir, ya que estos pueden variar en tiempo, costos y condiciones de operación según se estime, en la Tabla 1.2. es posible ejemplificar las diferencias entre algunos pretratamientos. La principal función que tiene esta etapa es aumentar la superficie de reacción donde puedan actuar las enzimas hidrolíticas³ de polisacáridos.

Tabla 1.2. Comparación energética de distintos tipos de pretratamientos. (1) [g de azúcar/100 g de base seca]. (2) [kJ/ton material]. (3) [10 g azúcar/J*min]. (Adaptación [15]).

Tipo Pretratamiento	Rendimiento ⁽¹⁾	Costo Energético ⁽²⁾	Productividad ⁽³⁾
Explosión de vapor	29	2,18	5,96
Hidrólisis ácido diluído	39	3,66	1,75
Hidrólisis alcalina	31	0,84	0,1
Biológico	23	0,003	0,2
<i>Hot compress water</i>	37	1,78	0,7

Por último, están las estrategias que involucran la sacarificación y fermentación a utilizar que es precisamente donde se produce el bioetanol por medio de la actividad de algún microorganismo (desde ahora MO).

En estudios exploratorios anteriores ^[16, 17] se estima que realizar una planta de bioetanol no es atractivo económicamente, por sus altos costos de operación, a menos que se considere el concepto de biorefinería que entrega co-productos al bioetanol de igual o mayor valor económico, que permitirían hacer rentable este tipo de proyectos. Entonces es de suma importancia hacer un estudio de factibilidad técnica sobre los parámetros relevantes que influyen directamente en los costos de operación como lo son los MO fermentadores, enzimas hidrolíticas, tipo de pretratamiento, estrategia de fermentación, procesos de destilación y deshidratación de bioetanol.

³ **Hidrólisis:** Descomposición de macromoléculas complejas a unidades más simples de azúcares mediante algún agente químico o biológico en presencia de agua.

2.- Marco Teórico

En el presente capítulo se busca ilustrar en detalle los mecanismos involucrados en la sacarificación y fermentación simultánea (desde ahora SSF) para la producción de bioetanol, desde la caracterización de la materia prima; el material lignocelulósico, los pretratamientos a utilizar y descripción de la estrategia SSF para producir bioetanol. Adicionalmente se detallarán los pretratamientos con líquidos iónicos y hongos de pudrición blanca, como principales pretratamientos a utilizar.

En la Ilustración 2.1. se puede observar el proceso estándar para la producción de bioetanol, comenzando por la selección de la biomasa lignocelulósica a utilizar, hasta la destilación y deshidratación. En el presente trabajo se abordarán todas las etapas, menos la etapa de Destilación y Deshidratación, por lo tanto no será descrita en la memoria

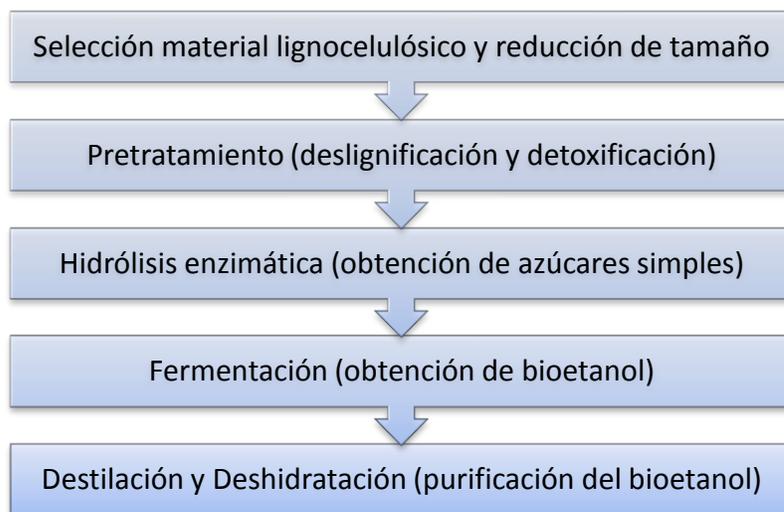


Ilustración 2.1. Diagrama de bloques del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación.

2.1.- Material lignocelulósico

El material lignocelulósico se compone principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. En la Ilustración 2.2 se muestra la estructura de biomasa lignocelulósica, donde es posible observar las microfibrillas compuestas por cadenas de hemicelulosa y lignina.

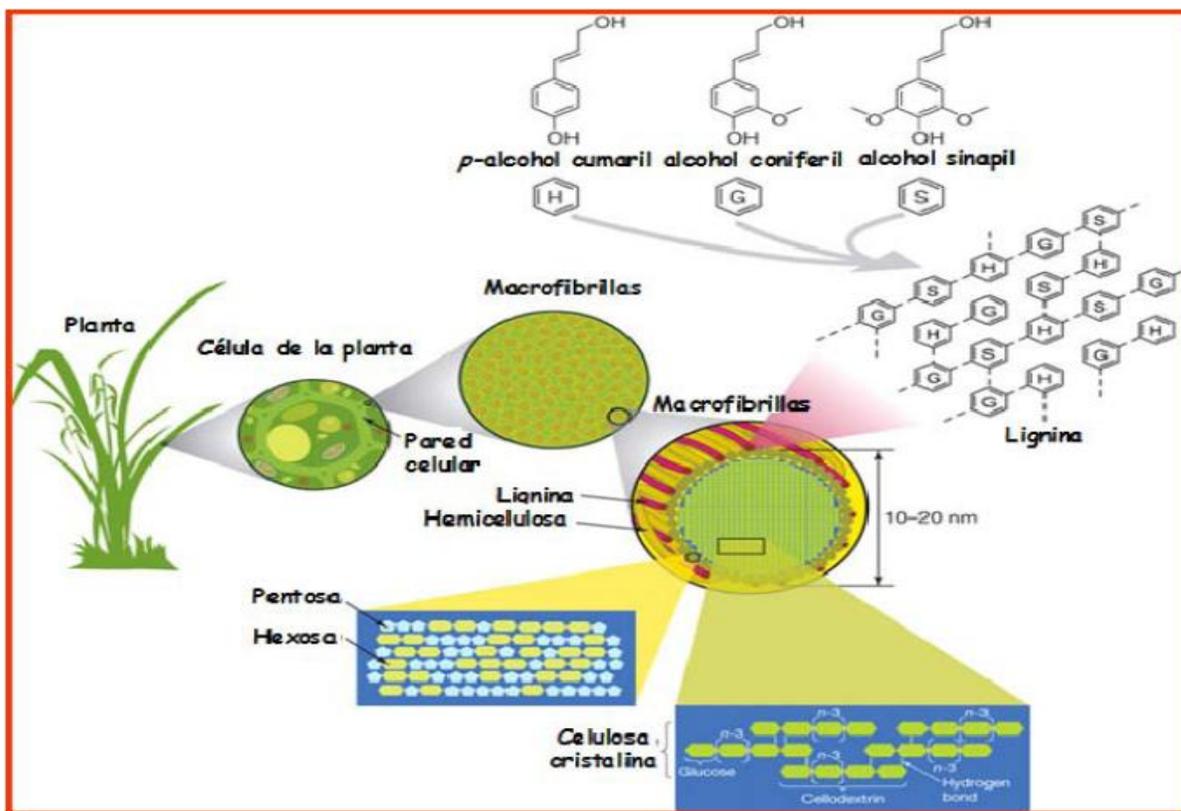


Ilustración 2.2. Estructura de biomasa lignocelulósica [7]

En el interior de las macrofibrillas es posible encontrar las cadenas lineales de celulosa formadas por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4. Estas cadenas lineales interactúan entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a microfibrillas que le dan el carácter de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático de las celulasas ^[18].

La hemicelulosa, por otro lado, es una cadena de azúcares de hexosas y pentosas de menor grado de polimerización (100 a 200 unidades) que la celulosa (10.000 a 40.000 unidades). Debido a que se componen principalmente por xilanos las principales enzimas encargadas de la hidrólisis de la hemicelulosa son las xilanasas. Por otra parte, la lignina es de naturaleza aromática, compuesta por 3 alcoholes cinamílicos hidroxilados, y las enzimas encargadas de hidrolizarla actúan sobre los anillos aromáticos, oxidándolos; estas son las lignina peroxidasa, hay otras que la degradan de manera indirecta, como la glioxal oxidasa y superóxido dismutasa ^[7].

El material lignocelulósico a utilizar son principalmente maderas duras (residuos forestales), los cuales tienen una composición entre 40 – 55% de celulosa y de 24 – 40% de hemicelulosa, con un porcentaje de lignina entre 18 y 25%, lo que hace de la madera dura una potencial materia prima para la producción de bioetanol. Específicamente las plantaciones de lenga abarcan aproximadamente el 25,3% del total de los bosques nativos, siendo solo entre un 10 – 30% material aserrable ^[13], lo que permitiría una gran volumen en términos de materia prima para fines energéticos. Existe un alto potencial para utilizar el eucalipto como materia prima, ya que podrían ser 1,2 millones de toneladas ^[11]. Por lo tanto, entre ambos tipos de árboles es posible obtener grandes cantidades de materia prima para ser utilizado en la producción de bioetanol. En la Tabla 2.1 se muestra la composición del material lignocelulósico para

lenga y eucalipto. Es de notar que la composición de celulosa y hemicelulosa aportan con más del 80% de la masa en ambos casos, por lo tanto este tipo de biomasa puede ser una fuente importante de azúcares para la producción de bioetanol.

Tabla 2.1. Composición química de los residuos forestales en estudio (Adaptación de [19])

Componente	Residuos de Eucalipto (%)	Residuos de Lengua (%)
Lignina	19	17
Celulosa	42	45
Hemicelulosa	39	38

2.2.- Pretratamientos del material lignocelulósico

Los pretratamientos permiten aumentar la tasa de producción, debido a que permiten la liberación de una mayor cantidad de azúcares para la etapa de hidrólisis^[20], incluso llegar a rendimientos superiores al 20%^[7] comparados a hidrólisis sin pretratamiento. El mecanismo de los pretratamientos es variado, pero su principal función es la de aumentar el área de contacto entre las enzimas celulolíticas y la celulosa, rompiendo la estructura cristalina de la celulosa, depolimerizándola parcialmente y solubilizando la lignina y/o hemicelulosa^[7] como se muestra en la Ilustración 2.3.

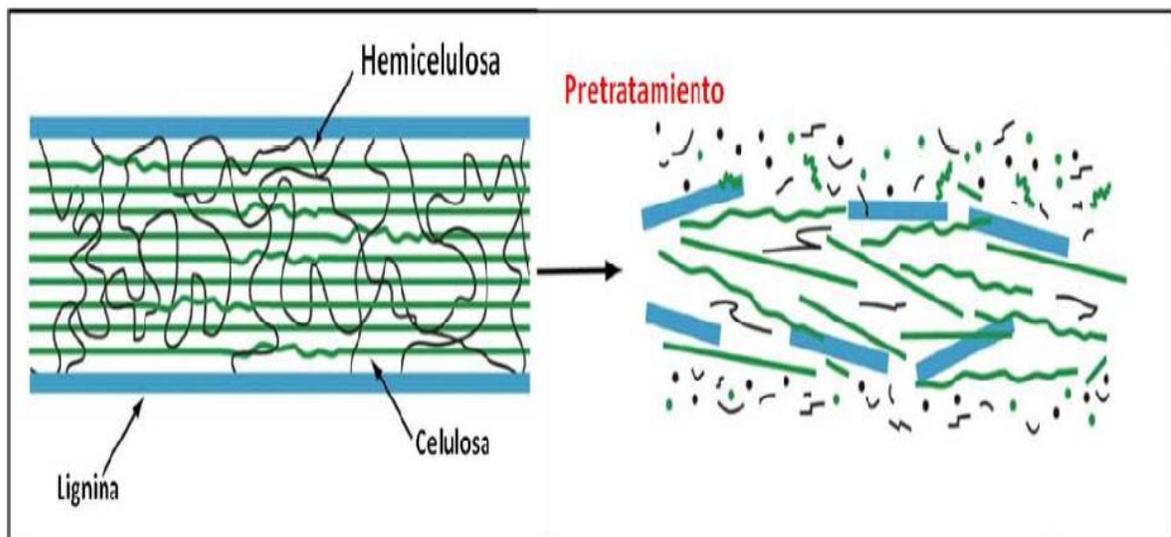


Ilustración 2.3. Esquema del cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento [13]

Existen variados pretratamientos utilizados: físicos (molienda), físico-químicos (SE, LWH y AFEX)⁴, químicos (Hidrólisis Ácida, Alcalinidad, Agentes oxidantes, oxidación húmeda, Ozonólisis, Líquido Iónico⁵) y biológicos (Uso de Hongos) ^[20]. Sin embargo para efectos del trabajo a realizar solo se darán en más detalle aquellos pretratamientos que se utilizarán durante el trabajo: Líquidos Iónicos y Biológico. El resto de los métodos de pretratamiento se detallarán en el Anexo A.

2.2.1.- Pretratamiento con Líquido Iónico

Los Líquidos Iónicos (desde ahora LI) son sales orgánicas que tienen un punto de fusión por debajo de los 100°C. Los LI son denominados “solventes verdes” debido a su alta estabilidad térmica, no inflamables y su baja volatilidad en condiciones normales. Debido a sus excelentes propiedades físicas, tienen la habilidad de disolver tanto compuestos orgánicos polares y no polares e inorgánicos, como compuestos poliméricos ^[19]. Son compuestos factibles de sintetizarlos aplicaciones particulares ^[21]. Las propiedades generales de los LI se adjuntan en el Anexo A.

Se ha comprobado en diversos estudios ^[19, 22, 23] que los LI tienen propiedades para disolver celulosa y que después de la disolución, la celulosa puede ser recuperada por adición de compuestos anti-solventes como agua o acetona ^[19, 22, 23]. En la Ilustración 2.4 se muestra cómo es el mecanismo de acción de los LI sobre la celulosa, donde se ataca directamente a los puentes de hidrógeno formado entre las cadenas de celulosa, el catión se une directamente al oxígeno y el anión se une iónicamente con el hidrógeno, disminuyendo fuertemente la unión del puente de hidrógeno que existía entre las cadenas de celulosa. El LI se mantiene ligado a la cadena de celulosa como un solvente, destruyendo así la estructura cristalina que mantenían las cadenas de celulosa.

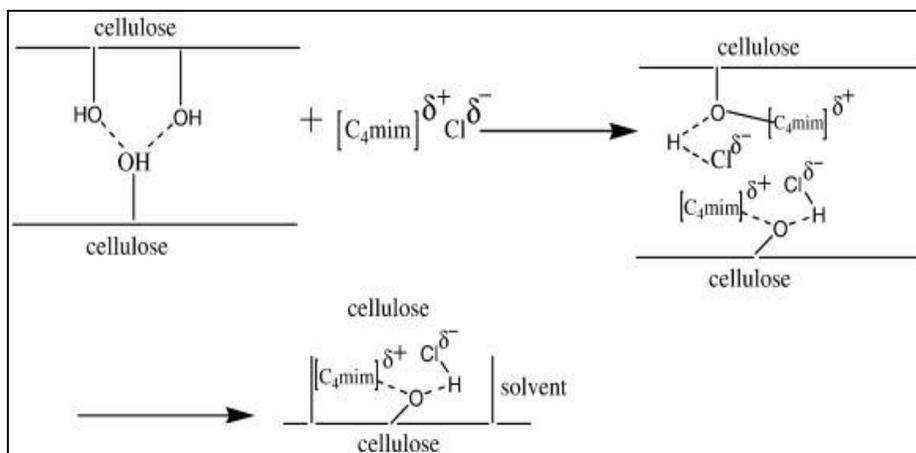


Ilustración 2.4. Mecanismo de acción de los LI sobre las cadenas de celulosas como pretratamiento. Líquido Iónico utilizado en el esquema es el [C₄mim]Cl [24].

Como pretratamiento se considera una buena alternativa ya que se ha logrado obtener rendimientos del 40% y 29% de liberación de azúcares respecto al total de azúcares presentes en el material para lenga y eucalipto, respectivamente ^[19].

⁴ SE: Steam Explotion; LHW: Liquid Hot Water; AFEX: Ammonia Fiber Explotion.

⁵ LI: Líquido Iónico

Debido a su potencial uso como solvente de la pared lignocelulósica se propone la alternativa de reutilizarlo, debido a sus altos costos económicos ^[25]. Para esto se considera la recuperación del líquido iónico por medio de una destilación, ya que su baja volatilidad ^[20] permitiría separar fácilmente el agua utilizada como antisolvente, técnica que se ha patentado ^[21] y que se utiliza como referencia en este trabajo.

2.2.2.- Pretratamiento Biológico

El tratamiento biológico consiste principalmente en la utilización de un hongo capaz de degradar la lignina, lo que se ha visto reflejado en un aumento de la digestibilidad de la lignocelulosa ^[26, 27]. Este factor se debe a la acción oxidativa de las enzimas anteriormente mencionadas sobre los anillos aromáticos de la lignina. Estas enzimas son producidas por un hongo específico que permite degradar los troncos de los árboles ^[26] y que está capacitado para crecer degradando la lignina selectivamente. Debido a esto último, el mecanismo debería impedir la reducción del rendimiento de la producción de bioetanol en etapas siguientes, causada por el consumo de la glucosa por el hongo.

El uso de este pretratamiento como alternativa a los pretratamientos químicos, tiene menor gasto energético, es operado en condiciones mucho más amigables e integra las actividades hidrolítica y depolimerizadora de la celulosa ^[20]. En otros estudios ^[21] se ha logrado observar una disminución de los agentes inhibidores (furfurales y lignina) y un aumento en el rendimiento de la producción de bioetanol.

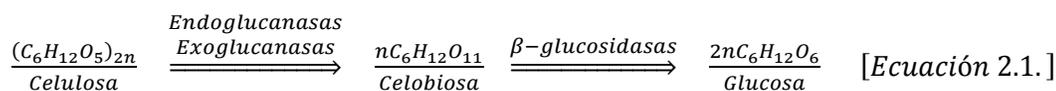
Trabajos con pretratamientos biológicos se han realizado con varios tipos de materias primas, obteniéndose resultados importantes ^[26, 27] que se mostrarán en el siguiente capítulo. Este pretratamiento se ha realizado abundantemente con eucalipto, una de las materias primas de interés en Chile, por lo tanto es de importancia llevar a las siguientes etapas, todos los beneficios que podría presentar la utilización del pretratamiento biológico.

2.3.- Etapas de Sacarificación y Fermentación: Estrategia SSF para producción de bioetanol

Según la Ilustración 2.1, la hidrólisis enzimática (sacarificación) y la fermentación, son etapas que ocurren en forma consecutiva, sin embargo con la estrategia SSF es posible realizar ambas etapas simultáneamente. Para entender mejor la estrategia, primero se darán a conocer las etapas por separado, para luego dar paso al reconocimiento de la estrategia SSF que, por el momento, ha mostrado mejorar el rendimiento en la producción de bioetanol ^[13].

2.3.1.- Sacarificación (Hidrólisis enzimática)

En esta etapa se produce la liberación de azúcares simples que provienen del material lignocelulósico degradado por enzimas específicas para este propósito. Las enzimas involucradas en este proceso son principalmente las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas ^[20], que trabajan sinérgicamente en la liberación de glucosa. Las endoglucanasas atacan sitios internos de las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa para transformarla en cadenas de extremos libres. Las exoglucanasas atacan los extremos libres, removiendo unidades de moléculas de celobiosa, las cuales son transformadas en glucosa por la acción de las β -glucosidasas. La Ecuación 2.1 ilustra el mecanismo utilizado para la transformación de celulosa a simples unidades de glucosa.



Según algunos estudios ^[20, 27], la hidrólisis enzimática sufre de inhibición por sustrato y por producto final, lo que puede afectar importantemente la liberación de glucosa y lógicamente en el rendimiento de producción de bioetanol. En la Tabla 2.2 se encuentran los parámetros de operación más relevantes a los que se trabaja para la hidrólisis enzimática en condiciones óptimas, lo que permite obtener altos rendimientos de glucosa.

Tabla 2.2. Rango óptimo de operación de los parámetros más relevantes en la hidrólisis enzimática (Adaptación [20])

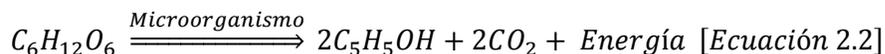
Parámetro	Rango óptimo de operación
Temperatura	45 -55°C
pH	4 - 5
Dosis de Celulasa	10 – 30 [FPU/g material lignocelulósico]
Tiempo de acción	48 -72 horas

Es posible que en muchos casos exista un decaimiento en la actividad enzimática de las celulasas por la disminución irreversible en la capacidad de adsorción de la celulosa, por lo tanto para disminuir este efecto se utilizan surfactantes que modifican la forma natural de la celulosa, aumentando la superficie de contacto, previniendo la denaturación de las enzimas, lo que se traduce significativamente en un aumento del rendimiento de glucosa. El surfactante que ha mostrado mejores resultados, siendo también el más efectivo, es el Tween 20 ^[20].

Junto con la liberación de azúcares de 6 carbonos, también el pretratamiento influye sobre la estabilidad de la hemicelulosa, lo que permitiría liberar azúcares de 5 carbonos, como xilosas ^[7], por lo tanto si se conjugasen las celulasas con otras enzimas hemicelulolíticas sería posible obtener rendimientos mucho mayores.

2.3.2.- Fermentación

La fermentación es un proceso biológico de oxidación incompleta realizada por MO's los cuales obtienen energía a partir de una fuente de carbono ^[13]. Existen diversas fermentaciones, pero la que interesa en este trabajo es la fermentación alcohólica, donde un MO en ausencia de oxígeno transforma la glucosa en etanol y CO₂, obteniendo energía para llevar a cabo el metabolismo. La Ecuación 2.2 representa la estequiometría de la fermentación alcohólica.



Para un proceso fermentativo que tiene como finalidad un proceso industrial productivo es de suma importancia contar con algún microorganismo que entregue un alto rendimiento de bioetanol, alta productividad y que sea capaz de tolerar altas concentraciones de bioetanol ^[20, 29]. En adición a lo anterior, para un proceso de SSF, es necesario un MO capaz de soportar altas temperaturas (45°C) y bajo pH cercano a 3, por lo tanto MO's con estas cualidades han sido tremendamente estudiados y usados

^[29], es una levadura utilizada en diversos procesos productivos, en especial para la producción de vinos, esta levadura es la *Saccharomyces cerevisiae* con rendimientos superiores a $0,43 \left[\frac{g \text{ etanol}}{g \text{ glucosa}} \right]$ en condiciones óptimas y una productividad volumétrica de bioetanol de $0,7 \left[\frac{g}{L-h} \right]$ en las primeras 5 horas ^[28]. En el actual proyecto se utilizará una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* RED STAR® donación de la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS que resiste concentraciones superiores a 12 [g/L] de etanol ^[30].

Dentro de las desventajas que presenta la especie nativa de *Saccharomyces cerevisiae* es la imposibilidad de utilizar xilosas para producir etanol ^[20]. Otros MO si tienen la capacidad de oxidar xilosas en bioetanol, pero son de baja tolerancia y en muchas ocasiones tienden a reasimilar el bioetanol ^[20]. En diversos estudios ^[20, 28, 29] se han modificado genéticamente algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para que puedan fermentar xilosas y por ende aumentar los rendimientos. Sin embargo en el presente trabajo solo se utilizará la cepa *Saccharomyces cerevisiae* RED STAR® sin modificaciones que permitan transformar pentosas en etanol, por lo tanto serán relevantes los rendimientos que esta cepa pueda tener sobre la fermentación con glucosa y otros azúcares de 6 carbonos.

2.3.3.- Estrategia SSF

La estrategia SSF se caracteriza principalmente por realizar las etapas de sacarificación y fermentación en forma simultánea (como lo dice su nombre). La ventaja de esta estrategia es que los rendimientos son mayores que los logrados por la técnica más cercana ^[13], la SHF (sacarificación y fermentación separadas) que era mayormente usada ^[28]. Este aumento se debe principalmente a que la glucosa es transformada en bioetanol rápidamente, evitando su efecto inhibitorio sobre las enzimas hidrolíticas, lo que hace que el rendimiento de glucosa aumente y en consecuencia que haya mayor disponibilidad de sustrato para la fermentación alcohólica. En términos productivos, el tiempo de operación es mucho menor (50% menos) que la SHF, ya que la etapa de hidrólisis y de fermentación toman, por separado, 6 días, lo que se reduce a 3 días, en el caso de la SSF. Las altas concentraciones de bioetanol que pueden estar presentes en el medio, evitan la presencia de otros MO contaminantes ^[28], lo que contribuye al rendimiento final de bioetanol.

Sin embargo esta estrategia tiene algunas desventajas, la primera y más evidente, es que las condiciones de operación deben realizarse a una temperatura y pH intermedios (37-40°C y pH igual a 4-5), ya que las condiciones de operación óptimas para las enzimas hidrolíticas y el MO a utilizar son distintas, lo que eventualmente puede disminuir el rendimiento de alguna de las dos etapas y obviamente el rendimiento final ^[28].

3.- Antecedentes al trabajo a desarrollar

En el presente capítulo se mostrará los trabajos realizados con anterioridad, que son parte del trabajo de investigación global que se ha hecho y que dan pie a la continuación del trabajo. Dado los tópicos que se quiere investigar, se hará referencia a los trabajos realizados con líquidos iónicos puros, Hongos de pudrición blanca y la estrategia SSF luego de pretratamientos para lenga y eucalipto con líquidos iónicos, materiales de interés en este trabajo.

3.1.- Pretratamiento con Líquidos Iónicos puros e Hidrólisis Enzimática

Cortinez ^[19] en su trabajo de tesis, estudió los efectos de tres pretratamientos distintos aplicados sobre lenga y eucalipto: ácido diluido, alcalino diluido y líquidos iónicos. Al igual que el trabajo actual la elección de dichos materiales lignocelulósicos fue por su abundancia que existe en las regiones del sur de Chile y por su gran potencial en la utilización de sus residuos para la producción de bioetanol. Lenga y Eucalipto fueron pretratados con los tres métodos anteriormente nombrados, posteriormente se realizó la sacarificación enzimática del material sólido resultante, para luego analizar la liberación de azúcares reductores y glucosa en el medio.

Para el pretratamiento ácido se utilizó ácido sulfúrico con una razón 1:10 en peso 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 usó NaOH al 2% v/v a una razón 1:20 en peso⁶ por 60 minutos a una temperatura de 121°C. En el pretratamiento con líquidos iónicos se utilizó [Emim]Cl y [A336]OH a una razón 1:20 en peso 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 a una temperatura promedio de 48°C durante 72 horas.

Los resultados obtenidos indican que todos los pretratamientos realizados aumentan el rendimiento de la sacarificación respecto al material sin pretratar. En la Tabla 3.1 se resume las mejores condiciones encontradas para los distintos pretratamientos y sus resultados en la sacarificación enzimática.

Es posible concluir que el mejor resultado se obtiene con un pretratamiento alcalino diluido que entrega el mejor rendimiento para lenga y eucalipto, sin embargo con LI los rendimientos para lenga son similares, no así para eucalipto. De todas maneras es de considerar que los LI tienen un efecto positivo sobre la sacarificación del material lignocelulósico, aumentando el rendimiento obtenido con ácido diluido o sin pretratamiento, lo que permite considerar esta alternativa de pretratamiento para el trabajo a realizar.

⁶ Razón Peso material de biomasa : Peso de solvente

Tabla 3.1. Resumen de los resultados obtenidos en la sacarificación enzimática para los tres distintos pretratamientos. Carga Enzimática: 102 FPU/g material. Tiempo reacción: 72 horas. Temperatura: 48°C promedio.

Pretratamiento	Material lignocelulósico	Mejores condiciones de operación	Rendimiento (%) *	Relación glucosa/xilosa (%/%) **
Ácido diluido	Lenga	T = 121°C t = 30 min 1,00% v/v H ₂ SO ₄	30	7/93
	Eucalipto	T = 121°C t = 30 min 1,00% v/v H ₂ SO ₄	27	
Alcalino diluido	Lenga	T = 121°C t = 60 min 0,75% v/v H ₂ SO ₄	49	75/25
	Eucalipto	T = 121°C t = 60 min 1,00% v/v H ₂ SO ₄	45	
Líquidos iónicos	Lenga	T = 150°C t = 30 min [Emim]Cl 1:20 ρ/ρ ***	40	75/25
	Eucalipto	T = 150°C t = 60 min [Emim]Cl 1:20 ρ/ρ ***	29	

*Cantidad de azúcares reductores liberados respecto al contenido teórico en el material lignocelulósico

**Promedio del porcentaje respecto a la cantidad de Glucosa + Xilosa liberadas por los tres pretratamientos

***Razón: Material lignocelulósico/Líquido iónico utilizado

3.2.- Pretratamientos con Hongos de Pudrición Blanca (HPB)

Trabajos anteriores de Carmona y colaboradores ^[26] y Fritz ^[32], realizaron pretratamientos con Hongos de Pudrición Blanca sobre eucalipto y lenga, respectivamente. El objetivo principal era observar los efectos del pretratamiento sobre la sacarificación enzimática utilizando distintos tipos de hongos de pudrición blanca.

El primer trabajo, realizado por Carmona y colaboradores ^[26] se enfocó en observar el comportamiento del pretratamiento biológico con Hongos de pudrición blanca (HPB) sobre *Eucalyptus globulus Labill* (eucalipto) y de sus efectos sobre la sacarificación enzimática. El material lignocelulósico fue sometido al ataque fúngico de cinco especies distintas: *Coriolus versicolor*, *Peniophora gigantea*, *Lentinus edodes*, *Stereum hirsutum* y *Pleurotus ostreatus*; por periodos de incubación de 30, 45 y 60 días, dando 15 combinaciones posibles de pretratamiento.

El complejo de celulasas utilizado fue el mismo que en el trabajo realizado por Cortinez ^[19] (Celluclast® 1.5 L) sin embargo la carga enzimática utilizada fue distinta, ya que se utilizó una carga enzimática de 38 [FPU/g material] a 37°C durante 48 horas. Cabe mencionar que en este trabajo no se utilizó la enzima

celobiasa, ya que sólo se buscaba observar el comportamiento del ataque directo de las celulasas y sus efectos directos sobre la hidrólisis enzimática.

Como principales resultados se observa que la mayor pérdida de peso del material lignocelulósico se observó utilizando las cepas *Stereum hirsutum* y *Lentinus edodes* para todos los tiempos de incubación, alcanzando pérdidas de peso de 27,2% y 25,8% a los 60 días respectivamente. La menor pérdida de peso se observa con *P. ostreatus* y *C. versicolor*, llegando a 9,1% y 6,0% a los 60 días de incubación. Los resultados de todos los pretratamientos pueden observarse en el Gráfico F.1 (ver Anexo F).

Además para todos los pretratamientos fúngicos fue posible observar en la sacarificación un aumento considerable sobre el material sin pretratamiento (Gráfico F.2), siendo el mejor caso con *S. hirsutum*, lográndose una concentración molar de azúcares reductores de 143,6 mM; 148,4 mM y 153,9 mM para los 30, 45 y 60 días, respectivamente. La conversión de celulosa⁷ a glucosa liberada se estima de 16,1% para *S. hirsutum* como el mejor resultado, lo siguen *L. edodes* y *P. ostreatus* con 13,5% y 10,3%, respectivamente.

Los autores destacan el pretratamiento con *S. hirsutum*, y que a mayor tiempo de pretratamiento existe un aumento en la liberación de azúcares, pero destacan también que el aumento no es considerable, por lo tanto estiman al pretratamiento con *S. hirsutum* en un periodo de incubación de 30 días como la mejor alternativa.

Los resultados que se obtuvieron para *Nothofagus pumilio* provienen del trabajo de Fritz^[32]. En este trabajo solo se realizó pretratamiento con tres especies fúngicas distintas: *Stereum hirsutum*, *ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus* y durante los mismos tres tiempos de pretratamiento: 30, 45, 60 días. Se evaluó la pérdida de peso causada por los hongos y la cantidad de azúcares reductores y glucosa obtenidos luego de la hidrólisis enzimática.

En la etapa de hidrólisis o sacarificación enzimática se utilizan enzimas comerciales correspondientes a Celluclast® 1,5L y Novozyme® 188. Esta etapa se realizó en un agitador orbital a 250 rpm durante 48 horas, aplicando una carga enzimática de 25 FPU/g seco de residuos de lenga, con una concentración del sustrato de 10% (p/v), en buffer acetato y pH 5, similares condiciones utilizadas en los trabajos anteriormente mencionados.

En general, los resultados obtenidos indican que a mayor tiempo de ataque del hongo mayor es la pérdida de peso y mayor es la concentración obtenida de azúcares reductores y glucosa, comparados con residuos de lenga que no fueron pretratados. Sin embargo, una mayor pérdida de peso no involucra necesariamente una mayor liberación de azúcares.

El tratamiento que permite obtener la mayor cantidad de glucosa corresponde al pretratar los residuos de lenga con el hongo *G. applanatum* durante 60 días, obteniéndose un 12% de rendimiento de glucosa, con una pérdida de peso de 28,18%. Los resultados de todas las combinaciones de pretratamientos se presentan en el Gráfico F.3 y Gráfico F.4.

⁷ Conversión celulosa a glucosa = $\frac{\text{mg glucosa liberada en el medio}}{\text{mg celulosa total teórica del material utilizado}} * 100$

Todos los resultados obtenidos con pretratamientos con Hongos de pudrición blanca se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resumen de los resultados de pérdida de peso y sacarificación total y de glucosa para los trabajos de pretratamiento con Hongos de Pudrición Blanca. S/P (sin pretratamiento). Todos los resultados se llevaron a [g/L], por lo tanto el trabajo de Carmona y colaboradores se asumió que todos los azúcares reductores observados tienen el mismo peso molecular de la glucosa. Se destacan los mejores resultados para eucalipto y lenga.

Material Lignocelulósico	Tipo de Hongo	Pérdida de peso (%)			Sacarificación total [g/L]			Glucosa [g/L]		
		30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días
Eucalipto	S/P	0	0	0	0	0	0	---	---	---
	<i>P. gigantea</i>	13	15,5	20	2,3	2,8	3,6	---	---	---
	<i>P. ostreatus</i>	5	7,5	9,1	0,9	1,4	1,6	---	---	---
	<i>S. hirsutum</i>	15,8	22	27,2	2,8	4	4,9	---	---	---
	<i>L. edodes</i>	11,1	20	25,8	2	3,6	4,6	---	---	---
	<i>C. versicolor</i>	3	5	6	0,5	0,9	1,1	---	---	---
Lenga	S/P	0	0	0	5,2	6	4,4	2,1	1,9	1,4
	<i>S. hirsutum</i>	3	4,4	10,1	6,4	6,9	12,9	1,4	2,5	5,9
	<i>G. applanatum</i>	12,6	16,4	28,2	20,7	23,3	24,9	6,7	8,7	11,8
	<i>A. albidus</i>	2,9	3,7	5	13,1	12,2	14,3	4	4,3	6,9

3.3.- Estrategia de Sacarificación y fermentación simultánea (SSF), previo pretratamiento con Ácido diluido y Líquidos iónicos.

Niklitschek ^[13] realizó su trabajo de memoria de título en estudiar la estrategia SSF como principal estrategia de fermentación sobre los residuos de lenga, ya que permite aumentar considerablemente el rendimiento respecto a otras estrategias como la SHF (50% más).

El estudio comprendió una primera etapa en donde se identificaron los parámetros críticos que afectan el rendimiento de etanol al utilizar la estrategia SSF. En una segunda etapa, se realizó un trabajo experimental sobre éstas y se determinaron las mejores condiciones de operación. El factor que mostró tener un efecto más significativo en el rendimiento de etanol correspondió al tipo de pretratamiento utilizado: ácido sulfúrico diluido (ASD 0,75%) versus LI ([EMIM]Cl).

Dentro de las metodologías utilizadas en la primera etapa se destaca el uso de distintas cargas de sustrato (5; 7,5; 9 y 10% p/v); cargas enzimáticas (7, 13, 20 y 37 [FPU/g de material]), tipo de MO fermentador y concentración de inóculo inicial (0; 0,1; 10 [g.p.s/l]).

Los resultados obtenidos mostraron que la mayor concentración de etanol; 10,4 g/l; fue alcanzada usando una fracción sólida al 9% p/v del material pretratado con el líquido iónico [EMIM]Cl (razón 1:3 g material/ g de LI). Se utilizó la levadura *S. cerevisiae* cepa Red Star como MO fermentador, una concentración inicial de inóculo de 10 [g.p.s./l], una carga enzimática de 37 [FPU/g de material], 40°C como la temperatura de fermentación, 72 horas como el tiempo de reacción, 300 rpm como la velocidad de agitación y el surfactante Tween 20 como modificador de la actividad enzimática. Para el mejor caso

se obtuvo un rendimiento de etanol de 0,12 g/g de material pretratado y una productividad volumétrica de etanol de 1,2 [g/l-h] para las primeras 6 horas.

Al comparar los dos tipos de pretratamiento, se obtuvo que utilizar el LI se logró un valor de rendimiento de fermentación del orden de un 47% respecto del valor teórico máximo; mientras que para el pretratamiento con Ácido Sulfúrico diluido (ASD) sólo se logró un valor del 23%. Además, se observó que un aumento en la masa a pretratar implicaría una disminución de los azúcares fermentables disponibles en la etapa de sacarificación y una consecuente disminución en el rendimiento final de etanol. Por otro lado, se comparó la estrategia SSF con la estrategia Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF). Se obtuvieron valores de 146 y 72 litros de etanol por tonelada de material pretratado con LI [EMIM]Cl, respectivamente, destacándose un incremento del 103% en la producción de etanol por la tecnología SSF respecto de la estrategia SHF. En la ilustración 3.1 se puede observar el resultado principal del trabajo realizado.

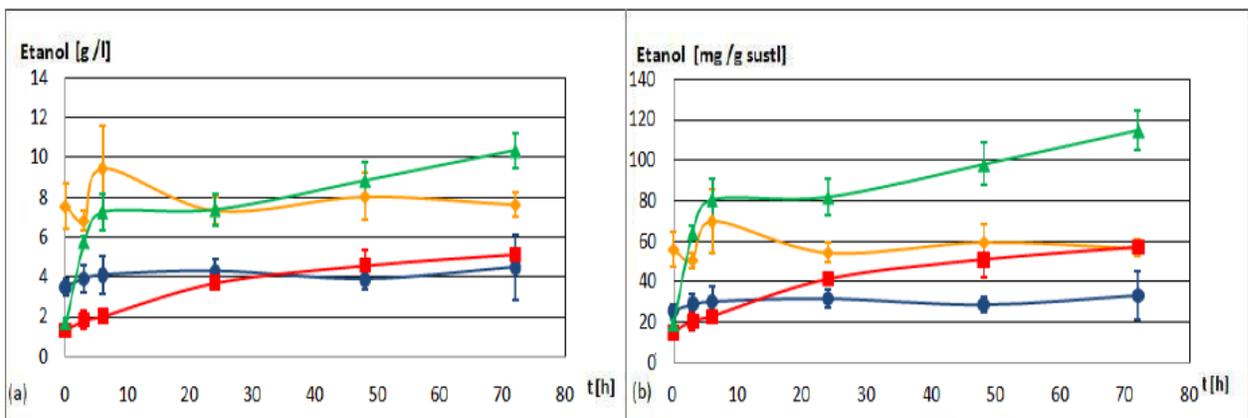


Ilustración 3.1. Resultados del trabajo de Niklitschek. "Comparación SHF vs SSF para sustrato pretratado con ASD y LI". En azul: SHF c/ pretratamiento con ASD. En rojo: SSF c/ pretratamiento con ASD. En amarillo: SHF c/ pretratamiento con LI. En verde: SSF c/ pretratamiento con LI.

Considerando una masa potencial de 254 mil toneladas anuales de residuos de lenga, se estimó una producción de 32 mil m³ de bioetanol, que corresponderían al 50 y 20% de la demanda nacional del biocombustible necesario para utilizarse en las mezclas normadas de 2 y 5% etanol-gasolina.

Dentro de las principales recomendaciones que se presentan al terminar este trabajo son los motivos que permiten desarrollar el trabajo que se presentará a continuación. Estos son:

- Realizar un estudio del efecto de la concentración inicial del MO para un rango de menor valor, entre 0,1 – 5 [g.p.s/L].
- Aumentar el tiempo de reacción de la estrategia SSF para ver su efecto sobre el rendimiento.

- Realizar un estudio de diferentes metodologías que permitan recuperar el líquido iónico utilizado y realizar experimentos con el químico reciclado, con el objetivo de determinar si hay un compromiso en sus propiedades como solvente.
- Realizar las experiencia con cargas enzimáticas más bajas dado el alto valor económico que tienen en las estrategias de fermentación que permitan obtener rendimientos similares o mejores.

Debido a esta revisión, se consideran los pretratamientos con LI, Hongos de pudrición blanca y las recomendaciones entregadas por Niklitschek ^[13] en la estrategia SSF con pretratamientos con LI, como punto de partida para construir los objetivos principales del trabajo a desarrollarse en la presente memoria.

4.- Objetivos

4.1.- Objetivo Principal

Estudiar la estrategia de Sacarificación y Fermentación simultánea (SSF) para la producción de bioetanol sobre lenga y eucalipto, utilizando como alternativas de pretratamiento L.I. reciclado y Hongos de pudrición blanca (HPB).

4.2.- Objetivos Específicos

- Estudiar la factibilidad de los pretratamientos con L.I. reciclado y sus efectos sobre la sacarificación enzimática de los materiales lignocelulósicos lenga y eucalipto
- Analizar la factibilidad del pretratamiento con L.I. reciclado en la estrategia SSF para los materiales lignocelulósicos lenga y eucalipto
- Validar la factibilidad del pretratamiento con HPB en la estrategia SSF, para los materiales lignocelulósicos lenga y eucalipto.

Capítulo II. Materiales, Metodología y Procedimientos.

5.- *Materiales y Metodologías*

5.1.- Materiales

5.1.1.- *Enzima*

Las enzimas empleadas se adquirieron al Laboratorio SIGMA - ALDRICH®, las celulasas provienen del hongo *Trichoderma reesei* (ATCC 26921) y su nombre comercial es Celluclast® 1,5L (Cat C2730), mientras que la celobiasa provienen del hongo *Aspergillus niger* y su nombre comercial es Novozyme® 188 (CatC6105).

5.1.2.- *Material Lignocelulósico (Madera)*

Como material lignocelulósico se utilizó *Nothofagus pumilio* (lenga) y *Eucalyptus Globulus Labell* (eucalipto), el primero obtenido de los recursos existentes en el CIBYB de la Universidad de Chile, mientras que el segundo fue proveído cordialmente por el Departamento de Ingeniería de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile. Ambos materiales fueron entregados ya tamizados en el tamaño “pin-chip” adecuado, correspondiente a 0,5-1 mm de espesor, 0,5-1 mm de ancho y 0,5-10 mm de largo, con excepción del largo promedio entregado por los “pin-chips” de eucalipto que se encontraron entre 10-20 mm. Como característica granulométrica general, ambos materiales son retenidos por la malla n°40 (0,425 mm). La edad de eucalipto y lenga son de 15 y 60 años, información obtenida por los estudios realizados previamente ^[17].

5.1.3.- *Material Lignocelulósico pretratado biológicamente*

El material lignocelulósico pretratado biológicamente fue proveído por el Departamento de Ingeniería de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile. El material utilizado corresponde a las dos especies lignocelulósicas anteriormente mencionadas, con características físicas distintas al material anterior, el tamaño “pin-chip” utilizado corresponde a 0,5-1 mm de espesor; 0,4-2,5 mm de largo y 0,5-1 mm de ancho. El detalle de tipo de hongo y tiempo de incubación del pretratamiento se encuentra en el capítulo de Procedimientos, en la Tabla 6.1.

5.1.3.- *Microorganismo Fermentador*

Para el estudio de las distintas fermentaciones se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Ethanol Red® (RED STAR), donada por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS.

5.1.4.- Líquido Iónico Puro

El líquido iónico empleado correspondió al 1 etil-3 metil imidazol cloro ([EMIM]Cl), el cual fue adquirido por la empresa MERCK código EQ412754 (MERCK KGA, Alemania).

5.1.5.- Líquido Iónico reciclado

El líquido iónico a reciclar se obtuvo del stock mantenido en el CIBYB por los trabajos realizados anteriormente y bajo un proceso de destilación que se menciona en las Metodologías Generales.

5.2.- Metodologías

Antes de profundizar en detalle cada metodología y procedimiento, en la Ilustración 5.1 se presenta un diagrama de bloques que indica todas las etapas relevantes y/o involucradas en el actual estudio para producir bioetanol a partir de residuos forestales.

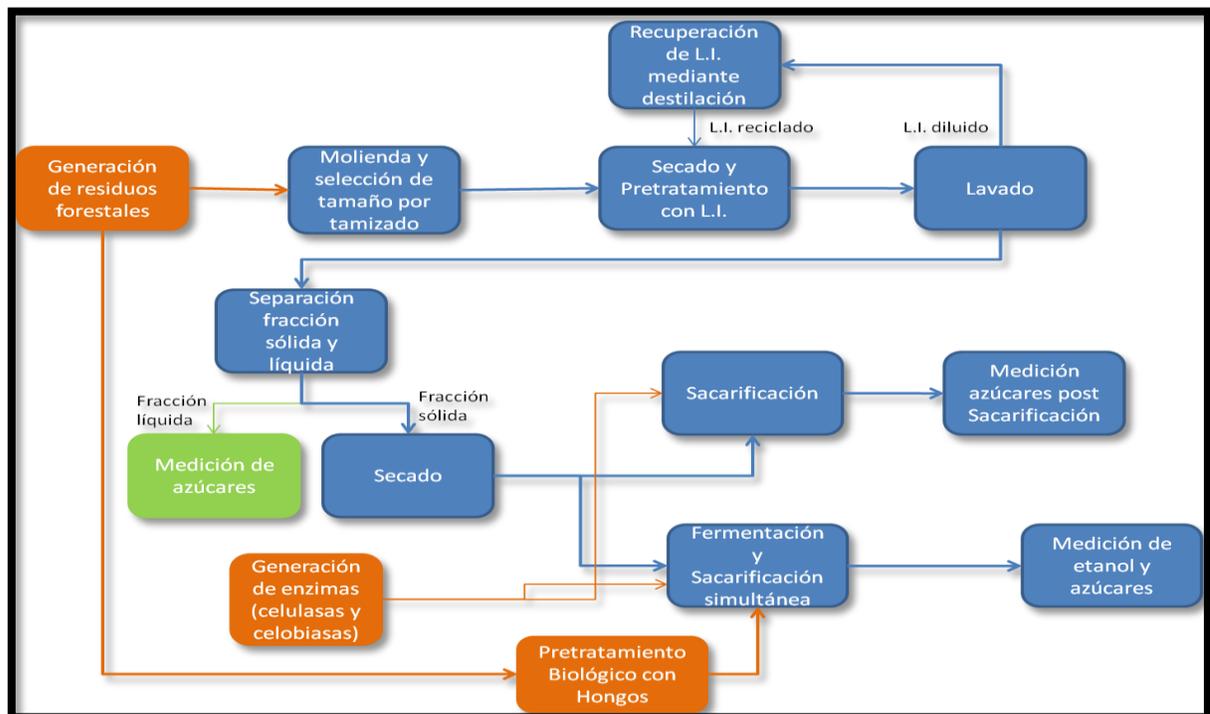


Ilustración 5.1. Diagrama de Bloques de las etapas relevantes y/o involucradas en el estudio para producir bioetanol a partir de residuos forestales. Los bloques de color azul corresponden a las etapas contempladas en el trabajo; en naranja, etapas no realizadas en el trabajo realizado y en verde las etapas realizadas en el trabajo como ensayos de control, pero no reportadas en los resultados.

5.2.1.-Secado de Material

Las muestras de madera son llevadas a secado por 24 horas a una estufa Gallenkamp a 60°C, asegurando que no exista una carbonización de material. La pérdida de masa se estima midiendo el porcentaje de humedad hasta que se mantenga constante el peso del material. La Ecuación 1 indica la fórmula de porcentaje de humedad utilizado.

$$\%Humedad = \frac{Masa\ Inicial - Masa\ Final}{Masa\ Inicial} \text{ [Ecuación 5.1]}$$

5.2.2.- Recuperación de Líquido Iónico

Para recuperar el líquido iónico se realiza una destilación en dos etapas. La primera etapa se realiza en un Rotovapor Stuart mediante un baño de glicerol a 110°C con una rotación de 30 RPM, el cual permite eliminar el 90% del agua de lavado. Como segunda etapa de destilación se utiliza el equipo MERCK HEIDOLPH MR Hei-Standard con un baño de glicerol a 150°C el cual provoca la ebullición del resto de agua presente en la mezcla, con lo que disminuye al mínimo la cantidad de agua retenida en la mezcla (bajo el 5%), sin embargo no fue posible determinar la humedad exacta del líquido iónico debido a su propiedad hidroscópica al agua, que evita disminuir aún más la humedad, sin importar el método de secado utilizado.

Desde la segunda recuperación en adelante, previamente a la destilación, se realiza un proceso de filtrado con papel filtro con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de sólidos en suspensión y azúcares disueltas en la solución "Agua-L.I."

5.2.3.- Aislamiento de colonias de levadura y obtención de inóculo

La metodología utilizada para el aislamiento de colonias de levadura y obtención de inóculo son los mismos realizados en el estudio de Niklitschek^[13]

5.2.4.- Determinación actividad de celulasas

La actividad para las celulasa Celluclast® 1,5L empleada en el presente estudio fue de 87 FPU/ml. El procedimiento para estimar dicho valor corresponde al método clásico utilizado en previos estudios^[17, 20]. En el estudio de Niklitschek^[13] se utilizó celulasa Celluclast® 1,5L con una actividad nominal promedio de 70 FPU/ml.

5.2.5.- Determinación actividad de celobiasas

La actividad para las celobiasa Novozyme® 188 empleada en el presente estudio fue de 650 CBU/ml. El procedimiento para estimar dicho valor corresponde al método clásico utilizado en previos estudios^[19, 22].

5.2.6.- Medición de Glucosa

Para estimar la concentración de glucosa se utiliza un kit comercial de ensayo Gluco-Pap marca Randox (GL2623). El procedimiento usado para determinar dichos valores fue el método clásico utilizado en previos estudios ^[19, 22].

5.2.7.- Medición de azúcares reductores

Para estimar la concentración de los azúcares reductores se utiliza el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), en donde el estándar corresponde a glucosa. El procedimiento usado para determinar dichos valores fue el método clásico utilizado por estudios anteriores ^[13, 19, 22]. La curva de calibración de Concentración de Azúcar vs Absorbancia a 540 nm, con un ajuste $R^2 = 0,9975$, se puede observar en el Anexo B.

5.2.8.- Medición de etanol mediante Cromatografía Gaseosa (GC)

Para disminuir el ruido provocado por la presencia de compuestos orgánicos no deseados en las muestras obtenidas de la fermentación, las muestras son filtradas utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μm de poro y 13 mm de diámetro Advantec MFS. Inc. El cromatógrafo gaseoso utilizado es de marca PerkinElmer modelo Clarus 500 con un detector de llama ionizante FID que se encuentra a 250°C para gasificar las muestras en estado líquido, se utiliza una columna capilar Supelco Nukol de sílica con medidas de 15 m X 0,53 mm X 0,5 μm (catálogo #25326). El gas “carrier” (fase móvil) es helio y los estándares son de etanol diluido.

El software integrado *Total Chrome* proporciona la interfaz computador-cromatógrafo. El método utilizado fue el siguiente: Inicialmente el horno se mantiene a 50°C por 2 minutos y luego, mediante una rampa de 20°C/min, se alcanza la temperatura de 150°C manteniéndola por 5 minutos.

Se utiliza una microjeringa para inyectar 5 μl de muestra, lo que se traduce en un pico de banda de etanol con un área asociada proporcional a la concentración de etanol presente en la muestra. Se realizan dos mediciones por muestra y se estima la concentración de etanol mediante las curvas de calibración, que se realizan cada vez que se hacen las mediciones. Un ejemplo de curva de calibración se puede observar en el Anexo B.

6.- Procedimientos

El procedimiento del trabajo a realizar consta de tres etapas. La **Primera Etapa** consiste en la realización de un estudio de pretratamientos con líquidos iónicos reciclados (desde ahora L.I. rec.) con distintas cargas de L.I. realizadas paralelamente a *Nothofagus pumilio* (lenga) y *Eucalyptus globulus* Labell (eucalipto), para luego ver sus efectos en la hidrólisis enzimática (desde ahora H.E.).

La **Segunda Etapa** es una continuación del estudio anterior donde se busca realizar Fermentaciones y Sacarificaciones simultáneas (SSF's) con variaciones en parámetros recomendados que permitan obtener el mejor rendimiento posible, todo esto utilizando un pretratamiento con L.I. rec. conforme a los resultados de la primera etapa. Los parámetros que se variarán se consideraron respecto a las recomendaciones de estudios anteriores^[13], éstos se mencionan a continuación:

- Carga Enzimática entre 5-20 [FPU/g material]
- Concentración inicial de inóculo entre 0,1 -1,0 [g.p.s./L]
- Aumento del tiempo de Fermentación a 96 [horas]

La **Tercera Etapa** es realizar una SSF con material pretratado biológicamente recomendado por estudios anteriores^[31] utilizando las condiciones de la segunda parte que entreguen el mayor rendimiento posible, tanto para lenga como para eucalipto. En el Anexo C se entrega un Diagrama de Decisiones que ilustra cómo se seguirá el trabajo a realizar.

6.1.- Estudio de pretratamiento con Líquido Iónico y Sacarificación

6.1.1- Pretratamiento con Líquido Iónico (L.I)

El pretratamiento con LI puro, utilizado como control, fue realizado bajo las mejores condiciones de operación encontradas en trabajos anteriores^[13] el cual considera una proporción de material lignocelulósico / L.I. de 1:3 p/p, con una base de 0,5 gr. de material por tipo de residuo (lenga o eucalipto). El pretratamiento se realizó en un equipo MERCK HEIDOLPH MR Hei-Standard con un baño de glicerol a 150°C controlados por una termocupla. Las muestras de lenga y de eucalipto se incubaron por 15 y 30 minutos respectivamente.

El pretratamiento con LI reciclado se realizó con las proporciones 1:3, 1:5, 1:9 y 1:10 basándose en estudios anteriores^[13, 19] en base a un uso de 0,5 gr. de material por tipo de residuo (lenga o eucalipto). El pretratamiento se realizó bajo las mismas condiciones que con LI puro.

Posterior a los pretratamientos las muestras son llevadas a un recipiente con hielo, la fracción sólida de las muestras fue lavada con 200 ml de agua destilada y filtrada con papel filtro. Las muestras son llevadas al proceso de secado de material. Del agua de lavado se toman 50 µl para la posterior medición de azúcares reductores y glucosa. El resto del volumen de agua utilizada para el lavado se recupera en una botella para una nueva destilación y recuperación de L.I.

El cálculo de la pérdida de peso no se consideró un factor relevante para determinar la factibilidad de los pretratamientos con LI reciclado, por lo tanto no serán reportados. Sin embargo el rango estimado para las muestras de lenga fue entre 10 – 15% en base seca y entre un 5 – 8% en base seca, para eucalipto.

6.1.2.- Sacarificación (Hidrólisis Enzimática)

La sacarificación fue realizada bajo las mejores condiciones encontradas en estudios previos ^[13], el cual considera una carga de sustrato 5% p/v, en base a 0,1 gramos de material por muestra. La carga enzimática de celulasas fue de 37 [FPU/gr. material] y la adición de celobiasas se mide según la relación celulasas/celobiasas (v/v) de 7,5:1.

Definido los volúmenes de enzimas se completan los 2 ml del volumen de trabajo con tampón acetato de sodio (50 mM; pH 4,8) y Tween 20 (2,5 g/l) y se deja incubando en un agitador rotatorio (ZHCHENG modelo ZHWY-100B) a 200 rpm por 72 horas a 50°C. Se toman muestras de 40 µl a las 0, 24, 48 y 72 horas. Las muestras son centrifugadas en un equipo Eppendorff Centrifuge 5403 a 12.857g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacena a 4°C para la posterior determinación de glucosa y azúcares reductores. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y los valores promedios (con su debida desviación estándar) fueron reportados.

6.2.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) mediante un pretratamiento con Líquido Iónico reciclado

6.2.1.- Pretratamiento con Líquido Iónico puro (Control)

El material utilizado fue sometido a un pretratamiento con líquido iónico puro. Según los resultados reportados en estudios anteriores ^[13] se estimó la carga de material de 1:3 para lenga . Para lenga el pretratamiento se realizó en un baño de glicerol a 150°C controlados por 15 minutos y para eucalipto, a un baño de glicerol a 150°C controlados por 30 minutos. Todo esto se realizó en el equipo MERCK HEIDOLPH MR Hei-Standard, luego el material fue lavado con agua destilada y posteriormente llevado a secado en una estufa Gallenkamp a 60°C.

Solo se realizó un experimento control sobre lenga, ya que existen referencias y resultados ^[13] que permiten comparar los resultados.

6.2.2.- Pretratamiento con Líquido Iónico reciclado

El material utilizado fue sometido a un pretratamiento con líquido iónico reciclado. Según los resultados de la parte anterior. Para lenga, se cargó el material en una proporción 1:5 (g material/g LI reciclado) en un baño de glicerol a 150°C controlados por 15 minutos. Todo esto se realizó en el equipo MERCK HEIDOLPH MR Hei-Standard, luego el material fue lavado con agua destilada y posteriormente llevado a secado en una estufa Gallenkamp a 60°C.

6.2.3.- Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF)

De la fracción sólida (secada) post pretratamiento, se pesa el material lignocelulósico y se carga en una razón 10% p/v, considerando un volumen de trabajo de 40 ml en matraces Erlenmeyer-modificados. La suspensión en donde se realizan las reacciones está constituida por un medio base-enzima que se detalla a continuación.

Para lenga, la carga enzimática a utilizar fue de 5, 15, 20 [FPU/g material]. El medio tiene como base el tampón Acetato de Sodio (50 mM; pH 4,8), 5 [g/l] de extracto de levadura; 0,5 [g/l] de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,025 [g/l] de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2,5 [g/l] de Tween 20. La cantidad del medio base a utilizar se estima según el volumen de enzimas e inóculo aplicados. Las concentraciones iniciales de inóculo fueron 0,1; 0,5 y 1 [g.p.s/l], para lenga. Las condiciones de incubación son a 37°C a una agitación de 200 RPM durante 96 horas. Todas las incubaciones son realizadas en un incubador rotatorio marca Innova modelo 4300 o en un agitador rotatorio (ZHCHENG modelo ZHWY-100B).

Durante el proceso de SSF, se tomaron muestras de 300 μl con una jeringa estéril de 3 ml de capacidad a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras se centrifugan (Eppendorff Centrifuge 5403) 12.857g por 5 minutos a 4°C, 40 μl se almacenan a 4°C para el posterior análisis de azúcares reductores y glucosa, realizando el mismo procedimiento que en el Estudio de Pretratamiento con Líquido Iónico y Sacarificación. El volumen restante del sobrenadante se almacena, en tubos eppendorff de 1,5 ml a 4°C, para el posterior análisis de etanol, siguiendo la metodología detallada anteriormente. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado y se reportan los valores promedios y su error de medición⁸.

6.3.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) mediante un pretratamiento biológico

6.3.1.- Pretratamiento con Hongos de Pudrición Blanca

El pretratamiento con Hongos de Pudrición Blanca (HPB) se realizó paralelamente al trabajo realizado y dada las recomendaciones de los resultados obtenidos anteriormente ^[24, 29, 30], se entrega la tabla 6.7 que indica las condiciones de operación del pretratamiento y resultados obtenidos (razón glucosa/azúcares reductores).

Tabla 6.1. Mejores resultados de la Hidrólisis Enzimática de eucalipto y lenga pretratados con Hongos de Pudrición Blanca. A.R.: Azúcares Reductores. Adaptación [32].

Parámetro	Lenga	Eucalipto
Cepa fúngica	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	<i>Stereum hirsutum</i>
Tiempo de incubación (días)	45	45
Temperatura (°C)	25	25
Razón Glucosa/A.R.	0,79	0,91
Pérdida de peso (%)	12,5	14

⁸ $Error = \frac{|Muestra\ 1 - Muestra\ 2|}{2}$

En la Tabla B.1 del Anexo B.5 se muestran los resultados obtenidos de pretratamientos sobre lenga y eucalipto con otras especies fúngicas que no fueron consideradas en el trabajo.

6.3.2.- Sacarificación y Fermentación simultánea (SSF)

El material pretratado con HPB, ya seco, se tamizó para separar la mayor cantidad de fragmentos de hongos presentes en las muestras. De acuerdo a la Tabla 6.1 se consideró también realizar la estrategia SSF con un material pretratado a 30 días de manera de observar el comportamiento y diferencias. Se estima que a 60 días la pérdida de peso del material es alta ^[26, 32], por lo tanto se descartó de los experimentos.

El volumen de trabajo a utilizar fue el mismo que el utilizado en el subcapítulo 6.2.3, al igual que la preparación del medio de cultivo y condiciones de operación utilizadas. La toma de muestras sigue el mismo procedimiento que el subcapítulo 6.2.3.

Capítulo III. Resultados y Discusión.

7.- Resultados y Discusión

La presentación de los resultados seguirá el orden acordado en el Capítulo VI de Procedimientos del trabajo de investigación. Como recordatorio se tiene que la primera parte consta de un estudio de pretratamientos con LI reciclados a distintas cargas para eucalipto y lenga, usando proporciones de material lignocelulósico y LI de 1:3, 1:5, 1:9, 1:10 para observar su factibilidad. La segunda parte corresponde a la estrategia SSF previo pretratamiento con LI reciclados con variaciones en los parámetros: Concentración inicial de inóculo (0,1; 0,5; 1,0 [g.p.s./L]) y carga enzimática (5, 15, 20 [FPU/g material]). La tercera parte consta de la realización de la estrategia SSF previo pretratamiento con hongos de pudrición blanca, utilizando los mejores parámetros encontrados. (Ver Anexo C)

A continuación se presentarán las discusiones independientes de las etapas del trabajo, las conclusiones finales y finalmente se darán las recomendaciones que permitan continuar con el trabajo en la producción de bioetanol a partir de residuos forestales, mediante pretratamientos alternativos.

7.1.- Primera etapa: Estudio del efecto del uso de Líquido iónico reciclado, sobre la hidrólisis enzimática

En esta Primera Etapa se observarán los resultados obtenidos en las sacarificaciones posteriores a la realización de pretratamientos con líquidos iónicos reciclados con distintas cargas o proporciones (material/ LI) para lenga y eucalipto.

La etapa de reciclo del LI consta principalmente de 3 etapas importantes:

1. Obtención del LI utilizado: una vez que el LI es utilizado, después del lavado se acumula en recipientes. La característica principal de esta solución es que contiene azúcares y otros compuestos inhibitorios como furfurales y lignina^[17], los cuales se van acumulando a medida que aumenta la cantidad de veces que se recicla.
2. Filtración: en esta etapa se busca eliminar la mayor cantidad de sólidos en suspensión y en lo posible, compuestos no deseados que interfieran en la actividad del LI.
3. Destilación: realizada principalmente en un rotovapor que eliminaría gran cantidad del agua utilizada para el lavado del material, además se recomienda utilizar LI reciclado con menos de un 5% p/p de agua^[38], por lo tanto se realiza otra etapa de destilación a mayor temperatura para asegurarse de eliminar casi en su totalidad el agua de lavado.

En la Ilustración D.1 (ver Anexo D) se muestra una imagen del proceso de obtención del LI reciclado.

7.1.1.- Resultados para Eucalipto

En la Ilustración 7.1, que corresponde a la Hidrólisis enzimática realizada a eucalipto, se observa una sacarificación en todos los casos superior al caso sin pretratamiento (destacado con color azul), lo cual

era de esperarse debido a los antecedentes obtenidos ^[19]. Se puede apreciar que a las 72 horas no es concluyente la aparición de un valor máximo en la sacarificación, esto se explica porque la concentración de azúcares y glucosa en particular no son lo suficientemente alta para producir la inhibición por producto final de las enzimas hidrolíticas ^[34].

La sacarificación con LI reciclado (LI rec.) es factible para todos los casos lográndose obtener aproximadamente 200 mg de azúcares reductores por gramo de material cuando se utiliza una carga 1:3. Sin embargo el mejor caso se reporta cuando se utiliza LI puro, obteniéndose a las 72 horas sobre 250 mg de azúcares reductores por gramo de material.

Algo similar se obtiene para la glucosa, siendo el mejor caso nuevamente el pretratamiento con LI puro. Para los pretratamientos con LI rec. se obtiene un mejor resultado con LI rec. con una carga peso material lignocelulósicos/LI reciclado de 1:9, lográndose 150 mg de glucosa por gramo de material. Estos resultados tienen un comportamiento similar a las obtenidos en trabajos anteriores ^[19], ya que las conversiones y rendimientos para eucalipto son bajos en comparación a otros materiales lignocelulósicos como lenga, maíz o trigo ^[13, 19, 22]. Esto tiene una explicación ya que la densidad del eucalipto es mucho mayor que el resto de los otros materiales lignocelulósicos mencionados ^[9], por lo tanto tiene una resistencia mayor a la humectación por solventes y por ende una resistencia a la exposición de la celulosa para la sacarificación. Es por esto además que el pretratamiento realizado debió ser por mayor tiempo (30 minutos), de la misma forma que en estudios previos ^[19].

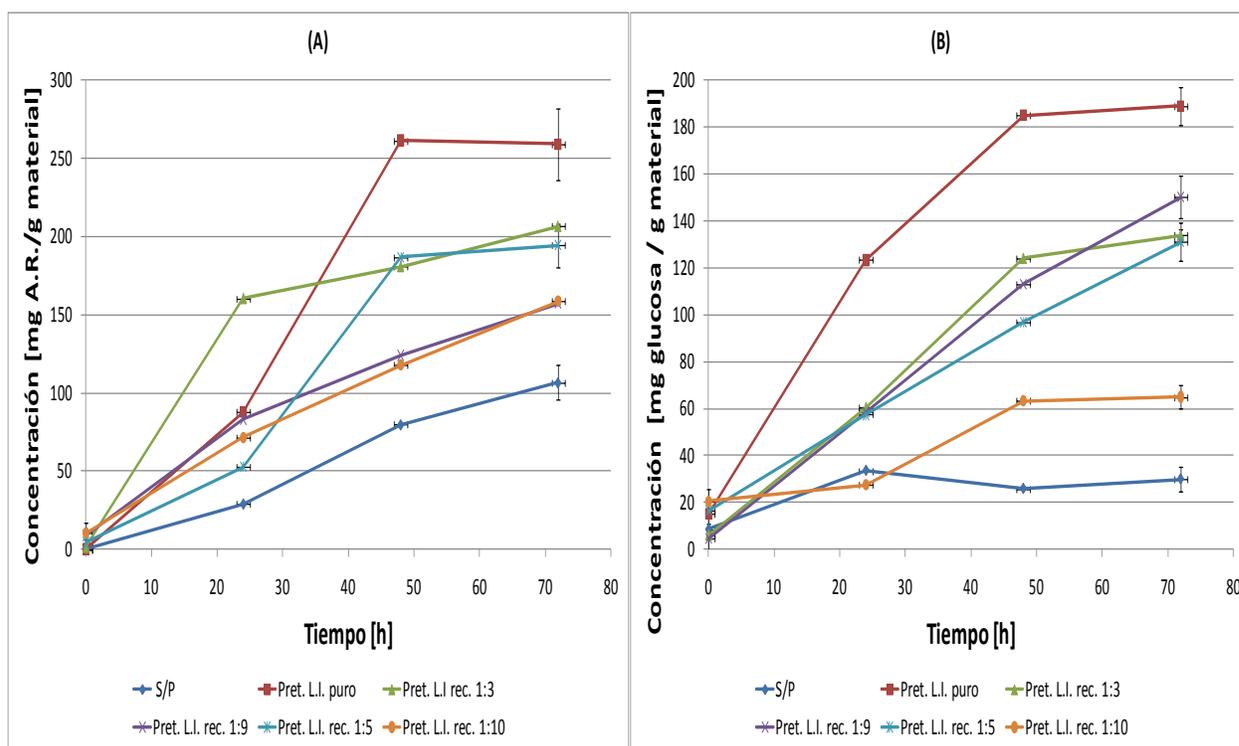


Ilustración 7.1. Hidrólisis enzimática para eucalipto durante de 72 horas con una carga enzimática de 37 FPU/g material a 50°C por 30 minutos. La carga de L.I. puro fue de 1:3 (p/p), las cargas de LI reciclado fueron: 1:3, 1:5, 1:9 y 1:10. S/P indica Sin Pretratamiento. (A) Perfil de azúcares reductores totales. (B) Perfil de glucosa.

Para el eucalipto se aprecia la Ilustración 7.2, que consecuentemente indica que el mejor caso es con LI puro con una selectividad⁹ del 70% obteniéndose así un 44% de rendimiento¹⁰ (261,59 [mg A.R./g de eucalipto] y 185,05 [mg glucosa/g de eucalipto]), luego lo sigue el pretratamiento con LI reciclado 1:3 con un rendimiento del 69%/67%¹¹ respecto al teórico. Entonces como decisión final se puede optar por utilizar LI puro como el mejor caso, pero dada una visión económica a la problemática ante el valor del LI, es posible decidir a favor del pretratamiento con LI reciclado con una carga 1:3.

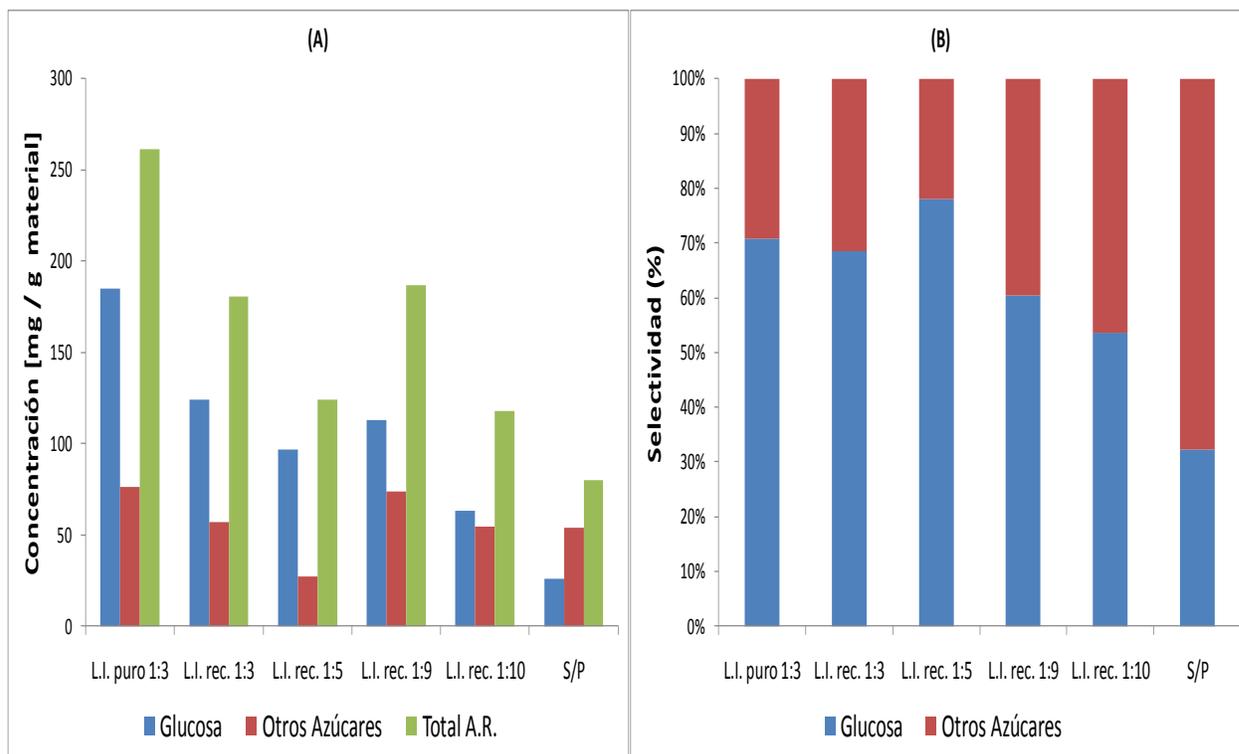


Ilustración 7.2. Cantidad de azúcares liberadas en eucalipto a las 72 horas y Selectividad de la sacarificación. A.R. (azúcares reductores). La carga de L.I. puro fue de 1:3 (p/p), las cargas de LI reciclado fueron: 1:3, 1:5, 1:9 y 1:10. S/P indica Sin Pretratamiento (A) Cantidad de azúcares liberadas a las 72 horas. (B) Selectividad del pretratamiento entre glucosa y otros azúcares

7.1.2.- Resultados para lenga

En la Ilustración 7.3 se observan los resultados para lenga. Aquí los pretratamientos con LI rec. tienen un comportamiento muy similar a lo que ocurre con el LI puro, obteniéndose cantidades similares de azúcares reductores totales y de glucosa. Además es posible notar que la sacarificación llega a un plató a las 48 horas, esto puede deberse a que la concentración de azúcares, sobre 30 [g/L], liberadas provocan la inhibición por producto (celobiasa y glucosa) de la celulasa, lo cual es similar a lo observado con

⁹ $Selectividad (\%) = \frac{mg \text{ glucosa liberada}}{mg \text{ de total A.R.}} * 100$

¹⁰ Ver Anexo E

¹¹ Ver Anexo E

estudios que caracterizan estas enzimas, en que sobre los 35 [g/L] existe el problema de la inhibición ^[33]. Esto se puede reflejar en los mejores casos de pretratamiento, no así en los casos de carga 1:3 y 1:10 donde la liberación de azúcares no es suficiente para interpretar que se alcanzó un valor máximo de la concentración de azúcares reductores en el medio.

Los mejores casos se observan con cargas 1:5 y 1:10, con una cantidad aproximada de 600 mg de azúcares reductores por gramo de material y de 400 mg de glucosa por gramo de material, similar a lo esperado para la sacarificación para lenga ^[13]. Por lo tanto existe una gran factibilidad de utilizar LI reciclado para los pretratamientos de lenga.

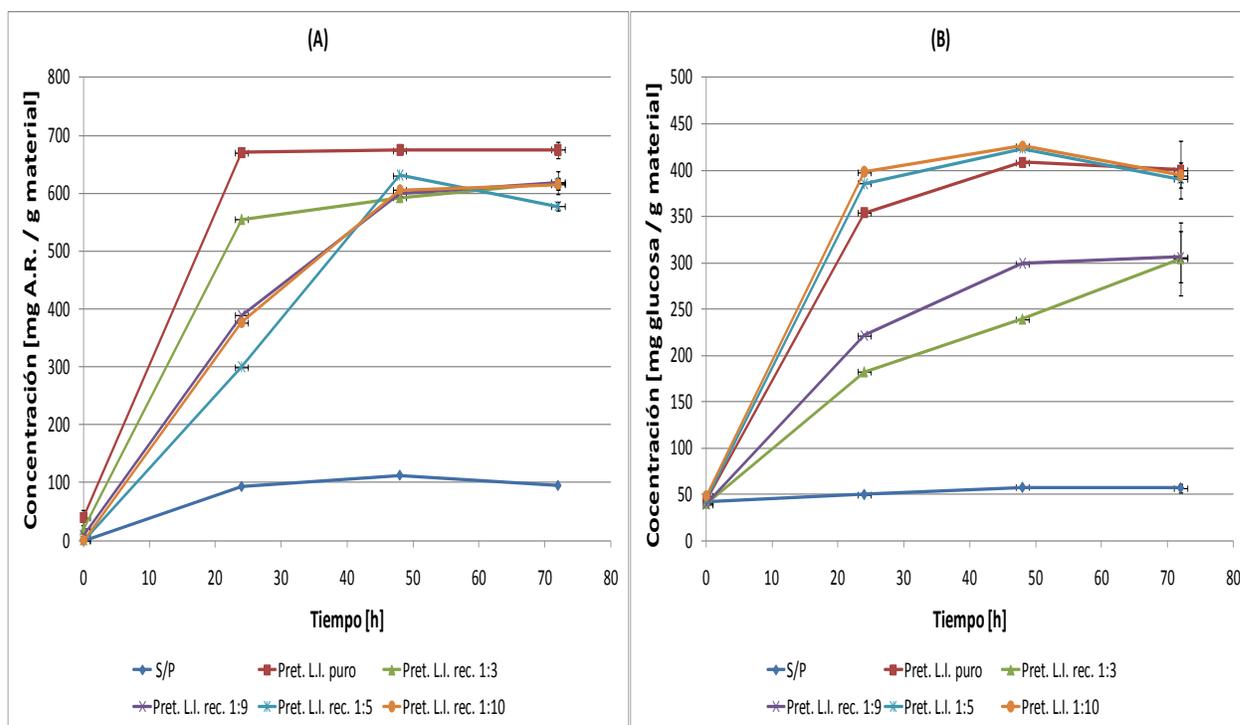


Ilustración 7.3. Hidrólisis enzimática para lenga durante de 72 horas con una carga enzimática de 37 FPU/g material a 50°C por 15 minutos. La carga de L.I. puro fue de 1:3 (p/p), las cargas de LI reciclado fueron: 1:3, 1:5, 1:9 y 1:10. S/P indica Sin Pretratamiento. (A) Perfil de azúcares reductores totales. (B) Perfil de glucosa.

Dado que la sacarificación llega a un valor constante a las 48 horas en la mayoría de los casos y luego ocurren anomalías, tales como la reducción de la cantidad de azúcares a las 72, en algunos casos se prefirió tomar como referencia la sacarificación hasta las 48 horas. Siguiendo el mismo razonamiento que para eucalipto, el resultado con LI puro entrega un rendimiento de sacarificación del 91% con una selectividad del 70% (674,7 [mg A.R./g de lenga] / 408,3 [mg glucosa /g de lenga]). Los pretratamientos con LI rec. 1:5 y LI rec. 1:10 entregan un total de glucosa y A.R. liberadas respecto al obtenido con LI puro de 94%/104% y 90%/104%, respectivamente. Entonces como mejor opción tecno-económica se tiene el pretratamiento con LI reciclado 1:5.

Cabe mencionar que el efecto de lograrse sobre el 100% de la sacarificación de celulosa, se puede deber principalmente al arrastre de A.R. que el LI reciclado contiene, debido principalmente al lavado de éste cuando se utiliza para pretratamientos y que al momento de reutilizarlo en el pretratamiento puede existir una adhesión de los azúcares al material que no se retira al momento de ser lavado y que termina

aportando a los valores encontrados de glucosa, efecto que se ha reportado en estudios anteriores [17, 20]. Sin embargo no se estimó el aporte del efecto. Algo que sí se podría realizar para observar dicho aporte es observar el material pretratado con LI reciclado en un medio adecuado sin enzimas hidrolíticas y observar si existe un aumento considerable de los azúcares totales en el medio por efectos difusivos y convectivos de la agitación misma, que liberen los azúcares adheridos. Por lo tanto para evitar este efecto que puede conducir a confusión, solo se utiliza LI reciclado que fue recuperado máximo dos veces para evitar una acumulación de azúcares y la acumulación de compuestos tóxicos o inhibitorios para los procesos fermentativos, como furfurales. En todo caso este efecto a nivel industrial no debiese ser negativo, ya que se logra con esto poder recuperar gradualmente los azúcares reductores que se pierden con el solvente.

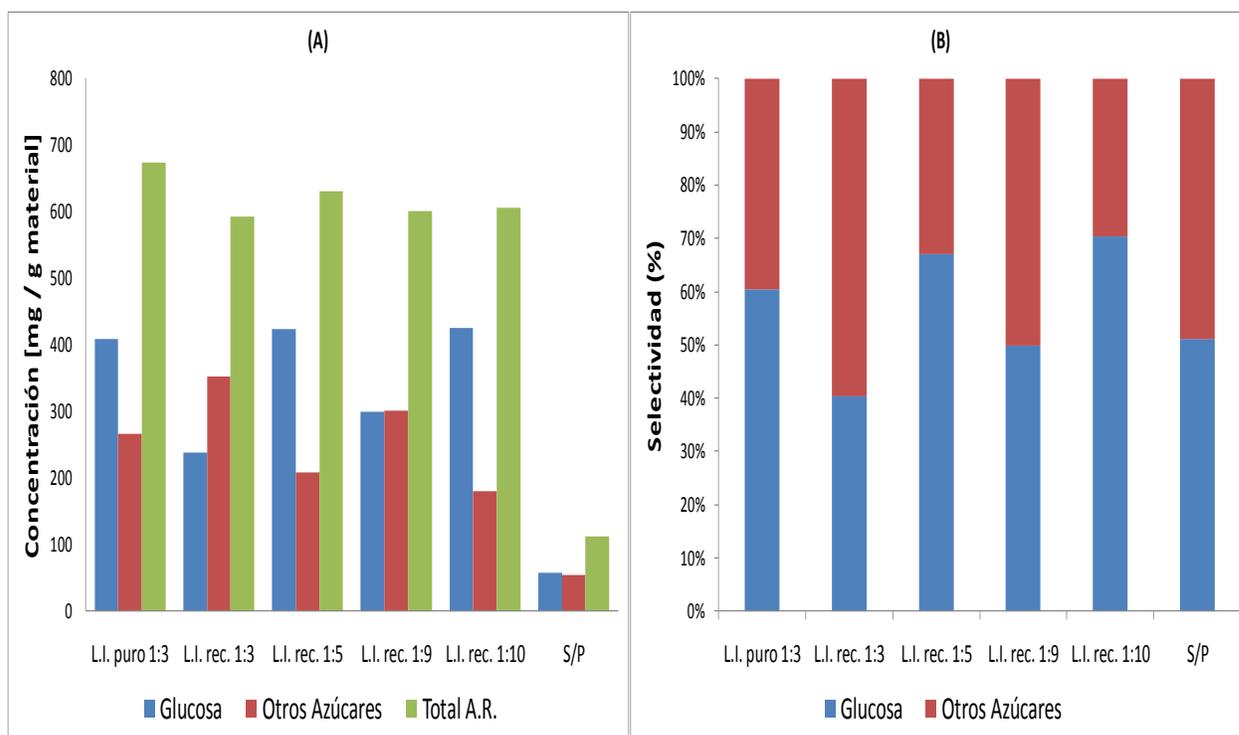


Ilustración 7.4. Cantidad de azúcares liberadas en lenga a las 48 horas y Selectividad de la sacarificación. A.R. (azúcares reductores). (A) Cantidad de azúcares liberadas a las 48 horas. (B) Selectividad del pretratamiento entre glucosa y otros azúcares

Comparando los resultados de sacarificación, previo pretratamiento con LI reciclados aplicados a eucalipto y lenga, es posible indicar que el pretratamiento para lenga es mucho mejor que para eucalipto y esto puede explicarse por las diferencias de densidad que tienen ambas especies, siendo la lenga mucho más susceptible a la humectación por algún solvente [9]. Además es posible observar estas diferencias en los rendimientos en trabajos anteriormente realizados [17]. Otro factor no menor es que la granulometría de ambas especies no era exactamente la misma. A pesar de que en ambos casos las partículas de madera se retenían por el mismo número de malla, existió una pequeña diferencia de tamaño (largo específicamente) lo que podría afectar directamente en la superficie de reacción enzimática por gramo de material. El material lignocelulósico utilizado y sus diferencias se pueden ver en la Ilustración D.2 del Anexo D.

Para efectos del trabajo, las condiciones de pretratamiento escogidas para la siguiente etapa se resume en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Resumen de los pretratamientos a utilizar para la Segunda Etapa del trabajo

Material lignocelulósico	Condiciones de pretratamiento	Concentración de A.R. [mg/g material]	Razón Glucosa/A.R.
Lenga	L.I. reciclado con carga 1:5 a 150°C por 15 minutos	578	0,68
Eucalipto	L.I. puro 1:3 con carga 1:3 a 150°C por 30 minutos	207	0,65

7.2.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) previo pretratamiento con Líquido Iónico reciclado

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Parte I y por lo que indica el Diagrama de Decisiones (Ilustración C.1), en esta sección se presentarán todos los resultados respecto a la estrategia SSF previo pretratamiento con LI reciclado, bajo las condiciones que se indicaron en la Tabla 7.1. Los resultados se presentarán en miligramos (mg) por gramo de material lignocelulósico, lo que permite representar de mejor manera los resultados.

En la Ilustración 7.5, se observa el comportamiento de la estrategia SSF en lenga con la menor Concentración Inicial de Inóculo (C.I.I.) utilizada, que fue de 0,1 [g.p.s./L]. Como es posible analizar en la Ilustración 7.5A a medida que transcurre el tiempo de la fermentación, mayor es la cantidad de bioetanol presente, lo que era de esperarse. Para determinar que sí existe una sacarificación conjunta y no solo hubo un consumo de los nutrientes presentes en el medio como extracto de levadura ^[13], la Ilustración 7.5B muestra que la cantidad de azúcares reductores aumenta en el transcurso del tiempo, pero la concentración de glucosa se mantiene prácticamente nula, lo que permite inferir que sí existe una sacarificación de la madera y también un consumo de la glucosa para producir bioetanol.

Para las C.I.I. de 0,5 y 1,0 [g.p.s./L] los resultados tiene un comportamiento similar que se presentan en las Ilustraciones 7.6 y 7.7 lo que permite deducir que el comportamiento general de la estrategia SSF es similar independiente de la C.I.I., pero donde existen diferencias es en los rendimientos que se presentan en la Tabla 7.2.

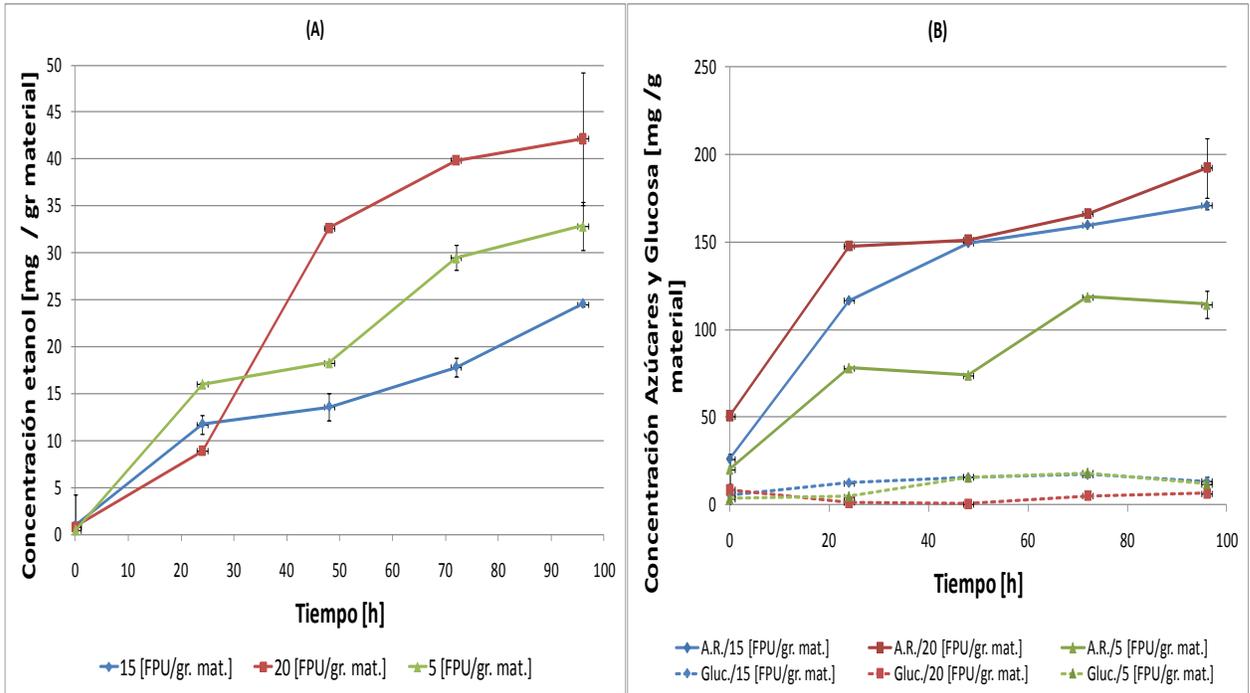


Ilustración 7.5. . Perfiles cinéticos de fermentación, usando la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI reciclado, con una C.I.I.= 0,1 [g.p.s./L], a distintas cargas enzimáticas. En azul 15 [FPU/g material], en rojo 20 [FPU/g material] y en verde 5 [FPU/g material]. (A) Perfil cinético de la generación de bioetanol. (B) Perfil cinético Producción de Azúcares Reductores totales y Glucosa.

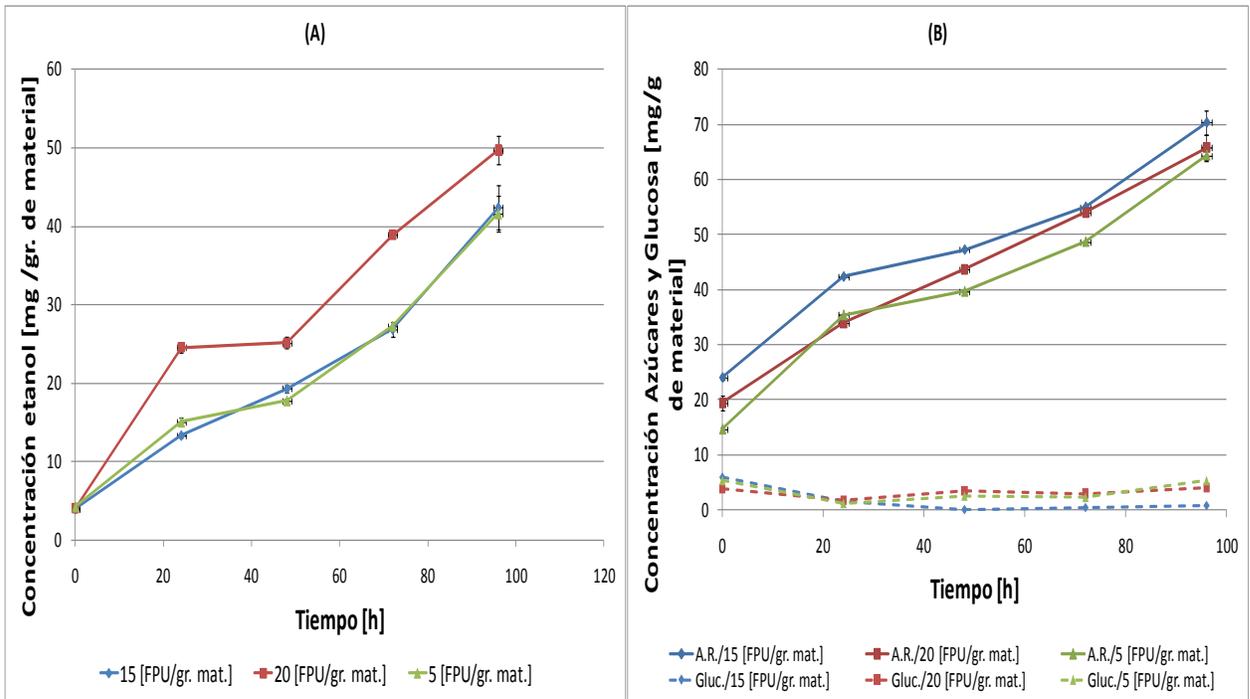


Ilustración 7.6. Perfiles cinéticos de fermentación, usando la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI reciclado, con una C.I.I.= 0,5 [g.p.s./L], a distintas cargas enzimáticas. En azul 15 [FPU/g material], en rojo 20 [FPU/g material] y en verde 5 [FPU/g material]. (A) Perfil cinético de la generación de bioetanol. (B) Perfil cinético de Producción de Azúcares Reductores totales y Glucosa.

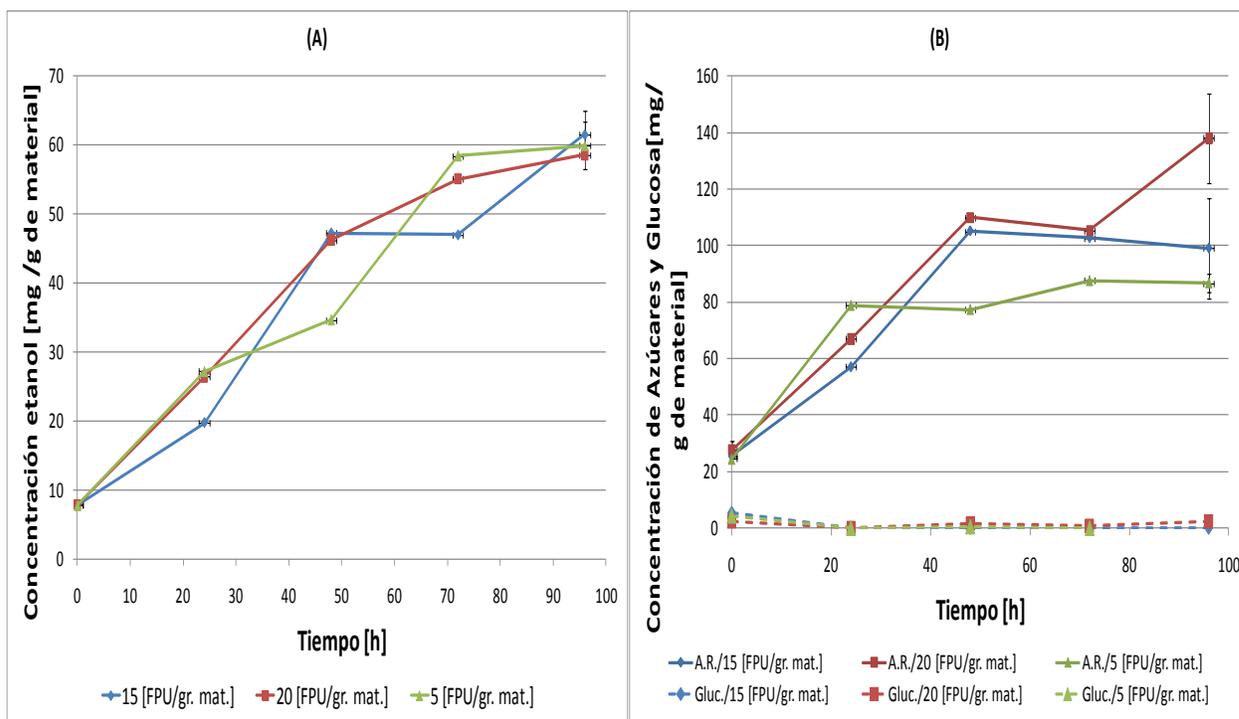


Ilustración 7.7. Perfiles cinéticos de fermentación, usando la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI reciclado, con una C.I.I.= 1,0 [g.p.s./L], a distintas cargas enzimáticas. En azul 15 [FPU/g material], en rojo 20 [FPU/g material] y en verde 5 [FPU/g material]. (A) Perfil cinético de la generación de bioetanol. (B) Perfil cinético de Producción de Azúcares Reductores totales y Glucosa.

Un comportamiento a considerar es la velocidad de generación continua de azúcares reductores para todos los casos, esto tiene una explicación que se basa en que el MO utilizado solo puede consumir glucosa, por lo tanto es esperable que no exista una acumulación de glucosa, pero no consume azúcares de cinco carbonos, los que se van acumulando. La estrategia SSF disminuye la inhibición por producto de las enzimas hidrolíticas, por lo tanto es posible que la actividad de dichas enzimas se mantenga y siga liberando azúcares no fermentables durante toda la fermentación. Este efecto es el que diferencia las estrategias SHF de la SSF ^[28].

Los resultados de la Tabla 7.2. muestran el rendimiento de etanol¹² calculado para cada combinación de C.I.I. y carga enzimática, con el fin de establecer si existe alguna correlación entre ambos parámetros en estudio y su incidencia en el rendimiento de etanol de la fermentación.

$$^{12} \text{Rendimiento}(\%) = \frac{[mg \text{ etanol final} - mg \text{ etanol inicial}]}{\frac{[mg \text{ glucosa inicial} - mg \text{ glucosa final}]}{0,51 \left[\frac{g}{g} \right]}} * 100$$

Tabla 7.2, Resumen de la concentración final en [g/L] y rendimientos de etanol porcentuales de la estrategia SSF en lenga previo pretratamiento con LI reciclado. Rendimiento máximo teórico 0,51 [g etanol/g glucosa]. Se consideran los carbohidratos aportados por el extracto de levadura, para que sea un rendimiento absoluto, procedimiento similar al utilizado anteriormente ^[13].

Concentración de Etanol final [g/L]				
		Carga Enzimática [FPU/g material]		
		5	15	20
Concentración Inicial de Inóculo [g.p.s./L]	0,1	3,3	2,5	4,2
	0,5	4,2	4,2	5
	1	6	6,2	5,9
Rendimiento (%)				
		Carga Enzimática [FPU/g material]		
		5	15	20
Concentración Inicial de Inóculo [g.p.s./L]	0,1	14	11	18
	0,5	16	17	20
	1	23	23	22

- $$Rendimiento = \frac{Conc.final\ etanol - Conc.inicial\ etanol}{Conc.inicial\ glucosa - Conc.final\ glucosa}$$

De la Tabla 7.2. es posible destacar que a mayor concentración inicial de inóculo, mayores son los rendimientos encontrados, y en el caso de la C.I.I. de 1,0 [g.p.s./L] resulta ser independiente de la carga enzimática utilizada, esto puede deberse principalmente a que a menores C.I.I. el consumo de glucosa para crecimiento es mayor. Resultados similares se encontraron en estudio previos donde a mayor concentración inicial de inóculo los rendimientos son mucho mayores ^[13]. Sin embargo, no existe una relación determinante en los rendimientos cuando se estudia el efecto de la carga enzimática, como se aprecia en la Tabla 7.2.

Comparando estos resultados con los estudios previos, se puede percibir que los rendimientos son entre el 50 – 60% respecto a los reportados en la literatura ^[13]. Esto se puede deber principalmente a que el pretratamiento con LI reciclado puede contener compuestos tóxicos (furanos) que afectan directamente en las fermentaciones ^[36], ya que podría permitir la adherencia de estos compuestos en el material lignocelulósico y provocar la disminución en el rendimiento de las levaduras. Esto no ocurre con el LI puro, porque los compuestos tóxicos, como furfurales y lignina, se eliminan cuando el material lignocelulósico es lavado por un antisolvente como agua ^[39].

Para ilustrar de mejor forma las diferencias entre los resultados con LI puro y reciclado, se realizó un experimento control de SSF con un pretratamiento de LI puro sobre lenga. La Ilustración 7.8, muestra el comportamiento en la generación de bioetanol que llega a una concentración de 79 [mg/ g material] (7,93 [g/L]) a las 96 horas con un rendimiento del 33% del valor máximo teórico, lo que indica que hay un aumento sustancial sobre el LI reciclado, donde el mejor caso se mostró con un 23% de rendimiento bajo las mismas condiciones de operación que el experimento control.

La generación de azúcares y glucosa tuvo un comportamiento particular respecto a las otras SSF con LI reciclado, ya que en este caso existe una acumulación importante de glucosa, efecto que no se había observado anteriormente, pero que se ha registrado como un comportamiento natural en otros estudios [36, 37] y que la liberación de azúcares totales tiene un máximo a las 24 horas, luego disminuye su concentración, efecto que se ha observado en los estudios previos [13]. Estos efectos, permiten señalar que el LI puro tiene un efecto distinto al reciclado, a pesar de que la liberación de azúcares totales es similar a las anteriores SSF (cerca de 150 [mg/g material]) el aprovechamiento para generar etanol es mucho mejor en este caso. Lo que permitiría deducir que sí existen efectos negativos del LI reciclado sobre los microorganismos fermentadores, principalmente por la acumulación de compuestos inhibidores y contaminantes (furfurales y lignina) en las etapas de recuperación del LI. Entonces es imprescindible, si se continúa el uso de LI reciclados, realizar análisis que permitan observar su composición y realizar etapas de purificación, para eliminar todo tipo de inhibidores y contaminantes no deseados.

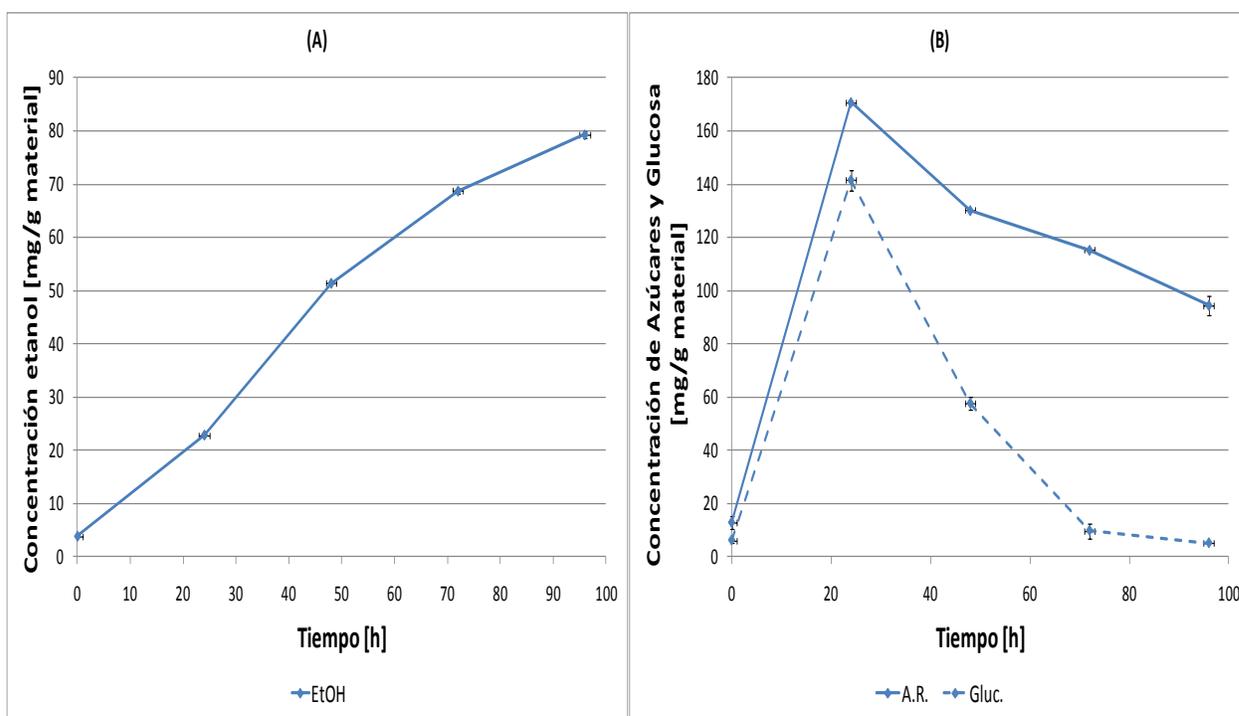


Ilustración 7.8. Perfiles cinéticos de la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con LI puro con una C.I.I. = 1,0 [g.p.s./L] y 20 [FPU/g material] como carga enzimática. (A) Perfil cinético de la generación de bioetanol. (B) Perfil cinético de producción de Azúcares Reductores totales y Glucosa.

En la Tabla 7.3 se muestra un cuadro comparativo para los resultados encontrados en los estudios anteriores [13] y los reportados en el actual trabajo. Es posible observar, que la C.I.I. sí afecta directamente en el rendimiento, siendo el mejor caso con una C.I.I. de 10 [g.p.s./L], trabajo realizado por NiKlitschek [13] y no necesariamente tan influyente en las diferencias la carga enzimática. Además, es posible notar que la estrategia SHF es una técnica que se ve sobrepasada por la estrategia SSF, esto se percibe principalmente porque el mejor resultados obtenido con la primera, no supera la estrategia SSF con un pretratamiento con LI reciclado, a pesar de todos los factores negativos que esta ha presentado.

Tabla 7.3. Cuadro comparativo de los resultados reportados en trabajos anteriores y el actual trabajo.

Estrategia	Tipo Pretratamiento	Carga Enzimática [FPU/g material]	Concentración inicial de inóculo [g.p.s./L]	Rendimiento respecto al máximo teórico (%)
SHF*	LI puro, carga 1:3 p/p a 150°C por 15 minutos	37	10	23
SSF*	LI puro, carga 1:3 p/p a 150°C por 15 minutos	37	10	47
SSF**	LI puro, carga 1:3 p/p a 150°C por 15 minutos	20	1,0	33
SSF**	LI reciclado, carga 1:5 p/p a 150°C por 15 minutos	20	1,0	23

*Resultados reportados por Niklitschek^[13]

**Resultados reportados en el actual trabajo

7.2.1.- Relación matemática del Rendimiento vs Carga Enzimática y Concentración inicial de inóculo (Primera aproximación)

De los resultados obtenidos con LI reciclado, es posible apreciar que la diferencia porcentual de los rendimientos para las distintas cargas enzimáticas disminuye a medida que aumenta la C.I.I., siendo casi nula cuando la C.I.I. es de 1,0 [g.p.s./L], por lo tanto podría existir una correlación importante de los rendimientos encontrados con la C.I.I. y carga enzimática. Es decir, si se busca disminuir la carga enzimática por algún motivo técnico o económico, se podría resolver aumentando la C.I.I.

En la Ilustración 7.9 se muestra la relación que existe entre la Pendiente del Rendimiento vs la C.I.I. cuando se mantiene constante la Carga enzimática (ver Anexo H) a distintas cargas enzimáticas dándose una situación esperable según los datos obtenidos, ya que a medida que se aumenta la C.I.I. la pendiente tiende a disminuir, es decir, el rendimiento se vuelve independiente de la carga enzimática utilizada y sólo dependiente de la C.I.I., donde a mayor sea esta última, mayores son los rendimientos.

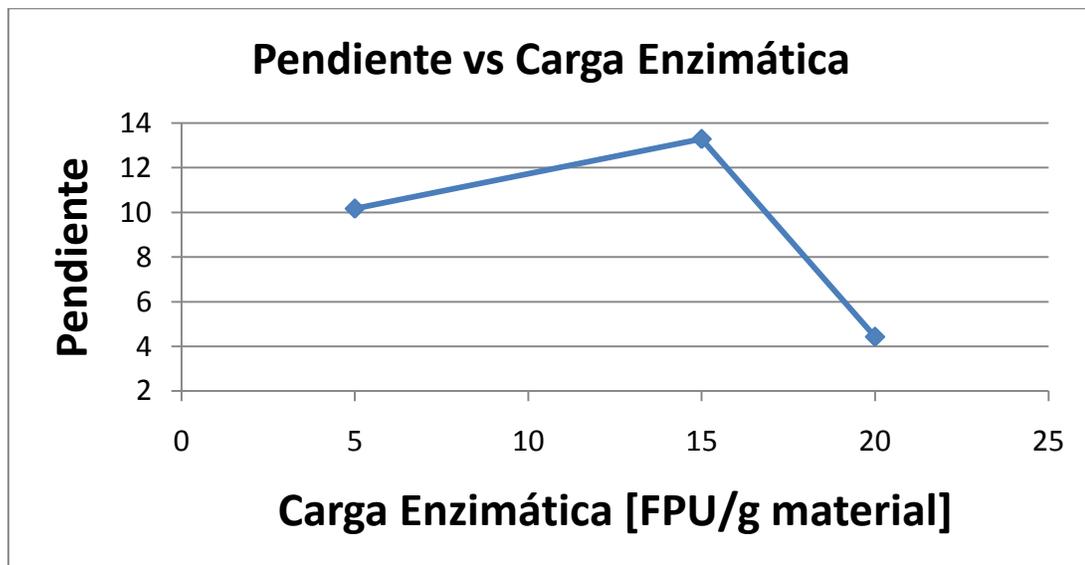


Ilustración 7.9. Comportamiento de las Curvas “Rendimiento vs C.I.I.” en función de la carga Enzimática utilizada.

Lógicamente, si no se quisiese sacrificar ninguna de las dos, es posible buscar una condición intermedia que no perjudique totalmente ninguno de los dos parámetros y que permita tener rendimientos aceptables.

No hay que olvidar que estos resultados pueden ser considerados para un pretratamiento de lenga con LI reciclado, entonces es posible estimar ciertas soluciones técnicas que tienen incidencia en lo económico:

- Es aceptable el uso de LI reciclados para pretratar lenga y someterlo a una estrategia SSF.
- Bajo este pretratamiento existe una correlación significativa de la C.I.I. y la carga enzimática con el rendimiento final de la estrategia SSF, lo que puede resolver ciertos problemas operacionales. Sin embargo, hay que considerar que el rango utilizado es pequeño, por lo tanto es importante reajustar la correlación una vez que se utilice un rango más amplios.

Entonces con estos resultados, para continuar con el trabajo, se estima que las mejores condiciones operacionales que entreguen el mejor rendimiento es un pretratamiento con LI reciclado con carga 1:5 y una estrategia SSF con una C.I.I. de 1,0 [g.p.s./L] y 5 [FPU/g material]. Sin embargo, para la Tercera parte de este trabajo se utilizará la C.I.I. recomendada, pero una carga enzimática de 20 [FPU/ g material], simplemente porque la correlación que existe entre ambos parámetros con el rendimiento es un supuesto y para las tres situaciones de C.I.I. el mejor rendimiento se encontró para dicha carga. Por lo tanto es la elegida para realizar la estrategia SSF previo pretratamiento biológico

7.3.- Estudio de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) previo pretratamiento biológico

Los pretratamientos realizados se presentaron en el capítulo VI en la Tabla 6.1. donde se obtuvieron los mejores resultados de sacarificación previo pretratamiento con una cepa fúngica específica y tiempo de incubación determinado.

En la Ilustración 7.10, se muestran los resultados de la estrategia SSF previo pretratamiento con Hongos de Pudrición Blanca.

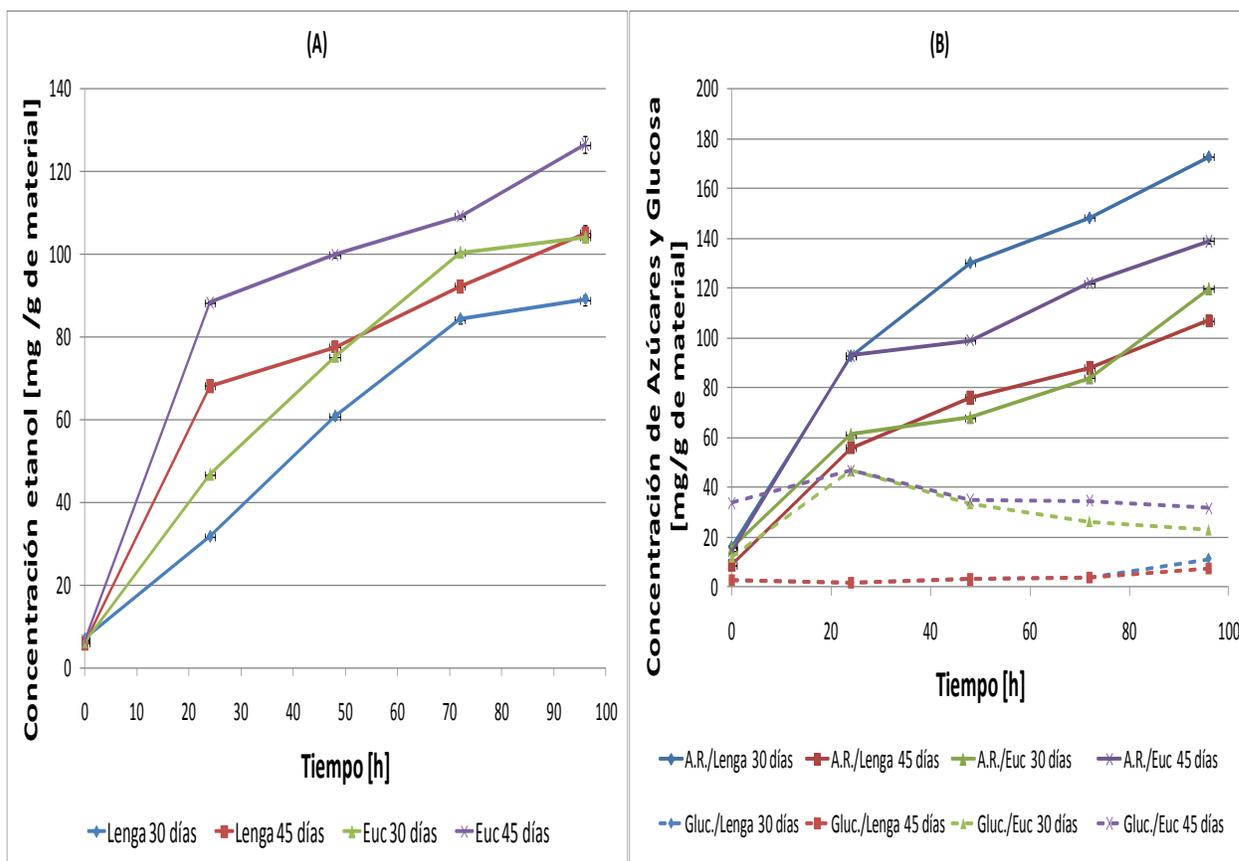


Ilustración 7.10. Perfiles cinéticos de fermentación de la estrategia SSF para lenga previo pretratamiento con HPB, con una C.I.I.= 1,0 [g.p.s./L] y 20 [FPU/ g material] como carga enzimática. (A) Perfil cinético de la generación de bioetanol. (B) Perfil cinético de Producción de Azúcares Reductores totales y Glucosa.

Como se aprecia, todos los resultados obtenidos son mucho mayores que los obtenidos con LI reciclado, siendo el peor caso 13 puntos porcentuales mayor y el mejor, de 33 puntos porcentuales. El mejor caso se encontró cuando se realizó un pretratamiento biológico (hongo *S. hirsutum*) por 45 días a eucalipto. El efecto de la estrategia SSF es similar al obtenido previo pretratamiento con LI reciclado, donde es posible observar un aumento continuo de producción de bioetanol y de la liberación de azúcares totales al medio; sin embargo existe un fenómeno que no se había registrado anteriormente en esta memoria, que es el aumento de glucosa en las primeras horas (en Eucalipto 30 y 45 días); sin embargo este es un comportamiento normal y estudiado en otros trabajos^[36, 37] que ocurre en la estrategia SSF, y que se debe a la acumulación de glucosa antes de ser consumida por el MO para transformarla en etanol.

Como se muestra en la Tabla 6.1, también se caracterizó la cantidad de glucosa liberada por gramo de azúcares totales, siendo mayor en el caso del eucalipto. Esto es consistente con los resultados mostrados en la Ilustración 7.8, en que se observa la liberación de glucosa cuando se pretrató eucalipto con el hongo *S. hirsutum* y se tradujo también en un aumento del etanol generado. Otra característica importante es que en ambos casos, para lenga y eucalipto, los pretratamientos de 45 días dieron mejores resultados que los pretratamientos a 30 días. Se supone que a mayor tiempo de incubación existe una mayor liberación de azúcares y por ende de glucosa ^[33, 27], por lo tanto es posible obtener mejores rendimientos de etanol. En resumen el rendimiento de etanol en la SSF de eucalipto pretratado con *S. hirsutum* fue mejor que el pretratamiento de *C. subvermispota* sobre lenga, para 30 y 45 días, lo cual era de esperarse según los resultados mostrados en la Tabla 6.1, donde la liberación de glucosa es mayor con el hongo *S. hirsutum* sobre eucalipto.

La Tabla 7.4 indica los rendimientos absolutos de etanol obtenidos de la estrategia SSF previo pretratamiento fúngico.

Tabla 7.4. Pérdida de peso, rendimiento de etanol y concentración final de bioetanol obtenidos de la estrategia SSF previo pretratamiento fúngico. Comparado con el rendimiento máximo teórico.

Pretratamiento	Pérdida De peso (%)	Rendimiento de etanol (%)	Conc. Final de bioetanol [g/L]
Lenga 30 días (hongo <i>C. subvermispota</i>)	10,4	36	8,9
Lenga 45 días (hongo <i>C. subvermispota</i>)	12,5	43	10,5
Eucalipto 30 días (hongo <i>S. hirsutum</i>)	9	46	10,4
Eucalipto 45 días (hongo <i>S. hirsutum</i>)	14	56	12,7

***Rendimiento máximo teórico: 0,51 [g etanol/g glucosa]**

La pérdida de peso de los materiales pretratados biológicamente tiene una cierta correlación, donde a mayor pérdida de peso, mayor es el rendimiento, este comportamiento se observa separadamente en lenga y eucalipto. Si se busca determinar una correlación entre pérdida de peso y rendimiento, se podría considerar que a mayor pérdida de peso, mayor es el rendimiento. Para el ajuste no se considerará el dato obtenido del pretratamiento de 30 días sobre eucalipto, ya que se considerará una excepción. Por lo tanto, el ajuste se puede observar en la Ecuación 7.1, con un $R^2 = 0,94$, lo que indica un ajuste bastante bueno que puede servir como primera aproximación para predecir el rendimiento en función de la pérdida de peso.

$$\text{Rendimiento} = 0,17 * \text{Pérdida de Peso}(\%) + 4,63 \quad [\text{Ecuación 7.1}]$$

7.4.- Cálculo del potencial bioetanol obtenido a partir de la biomasa disponible

Al comparar todos los rendimientos de etanol obtenidos no sería correcto, ya que los pretratamientos con Hongos demoran bastante en comparación a los pretratamientos con LI. Además el tamaño de “pin-chip” en ambos casos tampoco es comparable, porque para este último estudio el tamaño era considerablemente más pequeño. Por lo tanto los resultados deben analizarse independientemente. Lo que sí es considerable comparar es la producción de bioetanol según el material lignocelulósico a utilizar,

principalmente por la diferencia en el manejo operacional y disponibilidad como materia prima, que afectan directamente en los resultados.

En efecto, el mejor resultado para lenga previo pretratamiento con LI reciclado se dió con un rendimiento del 23% que se refleja en una cantidad promedio de 60 mg de etanol por gramo de lenga a las 96 horas, por lo tanto a partir de 254 mil toneladas de lenga ^[13] se estima una producción de 19,3 miles de m³ de bioetanol, lo que abarcaría aproximadamente el 29% y 12% del bioetanol necesario al año para satisfacer la demanda de mezcla de etanol en la bencina al 2% y 5%, respectivamente.

Para los pretratamientos biológicos el mejor resultado se obtuvo para eucalipto con un pretratamiento de 45 días con el hongo *S. hirsutum* con un rendimiento del 56%, equivalente a 127 mg de etanol por gramo de material a las 96 horas. Si se considera una masa total de eucalipto igual a la masa de residuos de lenga, que podría provenir de los cultivos dendroenergéticos, se podrían generar aproximadamente 39,3 miles de m³ de bioetanol, lo que podría representar el 60% y 24% de la demanda anual de bioetanol en Chile al 2% y 5% respectivamente. Lo que sería un aumento significativo con respecto al mejor resultado obtenido en estudios previos ^[13].

Otro aspecto que vale la pena comentar es la diferencia porcentual de los rendimientos obtenidos después de los pretratamiento biológico, 30 y 45 días. Vale la pena preguntarse si es mejor realizar una mayor cantidad de pretratamientos de menor tiempo (30 días) o mantener la opción que da el mayor rendimiento. Si consideramos 3 meses de operación (en el cual se puede completar 3 pretratamientos de 30 días y 2 de 45 días) para lenga y eucalipto independientemente tenemos los resultados¹³ representados en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5. Comparación del bioetanol generado para 3 meses de pretratamiento biológico en base a una tonelada de material.

Pretratamiento realizado	Rendimiento (%)	Concentración de bioetanol generado [mg/g material]	Total de bioetanol en m ³ a los 3 meses	Rendimiento Mensual [m ³ bioetanol / mes]
Lenga 30 días	36	89	339	113
Lenga 45 días	43	105	266	89
Eucalipto 30 días	46	104	396	132
Eucalipto 45 días	56	126	321	107

En base a los resultados de la tabla anterior se tiene que: para eucalipto el mejor resultado se obtiene para el pretratamiento con *S. hirsutum* a los 30 días y no a los 45 días como lo sugieren los resultados si solo se considera el rendimiento como criterio de evaluación, lo mismo ocurre para lenga, donde es mejor el pretratamiento a 30 días con la cepa *C. subvermisporea*. Por lo tanto, si se ve en términos tecnológicos el rendimiento mensual de bioetanol generado es mejor a los 30 días, para lenga y eucalipto. Y como era de esperarse, se estima una mayor generación de bioetanol utilizando eucalipto

¹³ Ver Anexo G

que lenga, claramente definido por los rendimientos encontrados. Entonces la demanda que podría satisfacerse anualmente para los porcentajes de mezcla de etanol en bencina al 2% y 5%, considerando ambos criterios (rendimiento de etanol y tiempo de pretratamiento) se muestran en la Tabla 7.6, siendo el mejor caso el pretratamiento de 30 días sobre eucalipto con un 50% y 20% de satisfacción de demanda a 2% y 5% de mezcla, respectivamente. El pretratamiento con HPB sobre eucalipto por 45 días, ya no es el mejor caso e incluso es sobrepasado por el pretratamiento con HPB por 30 días sobre lenga, lo que sugiere considerar ambos criterios y no solo el de mayor rendimiento.

Tabla 7.6. Porcentaje de demanda para los porcentajes de mezcla de etanol en bencina, a base de 245.000 toneladas de material lignocelulósico, considerando los criterios de rendimiento y tiempo de pretratamiento con HPB.

Pretratamiento realizado	Rendimiento (%)	Concentración de bioetanol generado [mg/g material]	Porcentaje de Demanda al 2% de mezcla*	Porcentaje de Demanda al 5% de mezcla**
Lenga 30 días	36	89	42	17
Lenga 45 días	43	105	33	13
Eucalipto 30 días	46	104	50	20
Eucalipto 45 días	56	126	40	16

*66.000 m³ de etanol **165.000 m³ de etanol

Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones

8.- Conclusiones

La tendencia mundial hará que el uso de combustibles fósiles sea menos frecuente, principalmente por que es un recurso no renovable, por lo tanto se está optando por alternativas mucho más limpias y de carácter renovable. Una alternativa al uso de los combustibles fósiles del transporte terrestre (gasolina) es el uso de bioetanol de segunda generación, proveniente de residuos lignocelulósicos. En Chile las proyecciones al uso de este biocombustible tiene un gran potencial debido a las grandes masas de residuos lignocelulósicos provocadas por la industria maderera y la muerte natural de bosques nativos, superando más de los 9 millones de m³ de residuos por año, lo que se podría traducir en las materias primas esenciales para la producción del bioetanol.

De acuerdo a esto es importante analizar alternativas al proceso de producción de bioetanol de segunda generación, principalmente en la etapa crítica que son los pretratamientos, por lo tanto se necesita analizar la factibilidad técnica de los nuevos métodos utilizados en esta memoria.

Del trabajo realizado se desprenden las siguientes conclusiones:

Se logró realizar pretratamientos con LI reciclado para lenga, obteniéndose rendimientos satisfactorios respecto al pretratamiento con LI puro. El mejor caso se obtuvo con LI reciclado en proporción 1:5, con rendimientos de azúcares reductores totales y glucosa del 94% y 104% respecto a L.I. puro, respectivamente. El pretratamiento con LI puro tuvo una sacarificación de 674,7 mg azúcar reductores por gramo de material y de 408,3 mg de glucosa por gramo de material.

Para eucalipto los resultados fueron menos alentadores, aunque significativos, siendo el mejor caso de LI reciclado 1:3 con rendimientos de azúcares reductores totales y glucosa de 69% y 67% respectivamente, respecto a LI puro. Este último logró sacarificaciones de 261,6 mg de azúcares reductores por gramo de material y 185,1 mg de glucosa por gramo de material.

Una vez realizada la estrategia SSF, para el caso de lenga se logró generar etanol con C.I.I. bajas (0,1; 0,5 y 1,0 [g.p.s./l]) y con bajas cargas enzimáticas (5, 15 y 20 [FPU/g material]) mediante un pretratamiento con LI reciclado, pero no mejores que los rendimientos obtenidos con LI puro. Se concluye además que a mayor C.I.I. existe un mayor rendimiento en la estrategia SSF, pero sin una clara relación con la variación de la carga enzimática, o sea, en el rango estudiado el aumento de la carga enzimática no mejora el rendimiento. El mejor caso se encontró con una combinación de C.I.I. de 1,0 [g.p.s./l] y carga enzimática de 5 FPU por gramo de material con un rendimiento del 23% respecto al rendimiento teórico.

Sin embargo, el pretratamiento con LI puro, permitió obtener un aumento de 10 puntos porcentuales sobre el rendimiento de bioetanol, lo que permitió alcanzar un 33% del teórico bajo las mismas

condiciones de operación, de lo que se concluye que sí existen efectos negativos cuando se realizan pretratamientos con LI reciclados, principalmente por la presencia de compuestos inhibidores y/o contaminantes.

Adicionalmente, se valida el uso de Hongos de pudrición blanca como pretratamiento de residuos forestales, ya que se logró obtener bioetanol para todos los casos planteados y con mejores rendimientos que con LI reciclado. En el peor caso se logró con un pretratamiento de 30 días sobre lenga con la cepa *C. subvermispora* con un rendimiento del 36% respecto al teórico y el mejor caso se obtuvo con un pretratamiento de 45 días sobre eucalipto con la cepa *Stereum hirsutum* con un rendimiento del 56% respecto al teórico.

En conclusión el uso de HPB como pretratamiento de material lignocelulósico para producir bioetanol es una alternativa técnicamente viable y a priori, mejor que los LI reciclados. Otra buena alternativa es seguir con los pretratamientos con LI puro, ya que los resultados obtenidos son considerablemente superiores a los pretratamiento con LI reciclado.

De los mejores resultados obtenidos del pretratamiento con LI reciclado 1:5 (C.I.I.= 1,0 [g.p.s./L] y carga enzimática de 5 [FPU/g material]) se lograrían 19.000 m³ de bioetanol (en base a 245 mil toneladas de lenga) que correspondería al 29% y 12% de la demanda al 2% y 5% de bioetanol en Chile, respectivamente. Y si se asumiera la misma cantidad másica de madera de eucalipto, según el pretratamiento con hongos de pudrición blanca para eucalipto (45 días con la cepa *S. hirsutum*), se podría obtener 39.000 m³ de bioetanol que representaría el 60% y 24% de bioetanol necesario en Chile al 2% y 5% respectivamente, solo considerando el rendimiento de etanol como criterio.

Sin embargo, los pretratamientos con hongos de pudrición blanca, en términos industriales dan una mayor productividad con pretratamientos de 30 días que con pretratamientos de 45 días, por lo tanto son una opción con mejores rendimientos a largo plazo.

En conclusión, los pretratamientos alternativos, como los LI reciclados y hongos de pudrición blanca pueden ser una solución a la hora de reducir costos operacionales, pero se requiere de un detalle económico mayor ya que existen diferencias importantes entre ambos pretratamientos (recursos y tiempo de operación principalmente), por lo tanto se recomienda seguir con estudios de nuevas estrategias para los pretratamientos y producción de bioetanol, como de la factibilidad técnico-económica.

9.- *Recomendaciones*

Con el propósito de poder mejorar el trabajo realizado se recomienda lo siguiente:

- Investiga nuevos métodos de recuperación de líquidos iónicos que permitan obtener un producto mucho más puro, minimizando el contenido de posibles inhibidores y agua. Ésto en conjunto de realizar análisis de actividad del líquido iónico y observar cómo varía su actividad.
- En base a utilizar nuevas estrategias de pretratamiento se recomienda investigar nuevas técnicas como la utilización de microondas y LI sobre el material lignocelulósico, que permitiría acelerar el proceso de solubilización de la celulosa ^[38].
- Estudiar un rango más amplio de concentraciones iniciales de inóculo para observar si realmente puede existir una correlación entre los rendimientos y la concentración inicial de inóculo.
- Abarcar un rango más amplio de los parámetros, como carga enzimática y concentración inicial de inóculo, para pretratamientos con hongos de pudrición blanca.
- Utilizar granulometrías del material lignocelulósico que permitan acercarse más a la escala industrial.
- Realizar un estudio químico de posibles inhibidores presentes en la etapa de fermentación y proponer métodos de detoxificación del material.
- Realizar un estudio detallado de la estrategia SSF sobre eucalipto, principalmente con LI puro a distintas condiciones de operación.
- Se recomienda, como parte de la Metodología que los análisis de etanol se realicen no más allá de las 3 semanas de obtenidas las muestras. Las muestras se deben mantener congeladas y una vez que se quieran analizar dejar hasta que se descongelen a 4°C.

Referencias

- [1] ENERGÍA Y SOSTENIBILIDAD. La energía y el medio ambiente en la Unión Europea. Madrid, Endesa, Directorio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. 18p. Noviembre 2006.
- [2] O. AVELLA. Etanol celulósico a partir de residuos agrícolas. Universidad Distrital, Lima, Perú. 2009.
- [3] O. SÁNCHEZ Y C. CARDONA. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, vol. 30, 671-678.
- [4] J. MELERO. Energía de las praderas. [En línea]. *Madrimasd*. 30 de Enero 2007. <<http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2007/01/30/58378>>. [Consulta: 01/12/2010].
- [5] PETROBRAS. Fuentes de energía: Biocombustibles. [En línea]. <http://www.petrobras.com/ptcm/appmanager/ptcm/dptcm?_nfpb=true&_pageLabel=petr_com_area_detalhe&idConteudoPrincipal=area_detalhe_00004>. {Consulta: 01/12/2010}.
- [6] CROPENERGIES AG. Dynamic growth – Bioethanol as a growth market. [En línea]. <http://www.cropenergies.com/en/Bioethanol/Markt/Dynamisches_Wachstum/> [Consulta: 08/07/2010].
- [7] C. CASTRO, M. VALVERDE, O. PAREDES. 2004. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *CONCYTEG*, Año 4, Núm. 54, 1246-1269.
- [8] M.A. GÓMEZ. El rincón de la Ciencia: ¿Qué es el almidón?. [En línea]. <<http://centros5.pntic.mec.es/ies.victoria.kent/Rincon-C/Curiosid/Rc-58.htm>>. [Consulta: 01/12/2010].
- [9] R. CARMONA. Comunicación personal: Duda sobre composición del eucalipto. [Consulta: 01/12/2010].
- [10] R. RUIZ. ODEPA. Presentación: Agricultura y Biocombustibles. Oficina de Estudios y Políticas agrarias, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile. 2006.
- [11] A. GARCÍA. 2010. Introduction. PROYECTO CC05: Optimal treatment processes for second generation bioethanol. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Programa de Investigación Domeyko y CONICYT. Noviembre 2010
- [12] PAPELNET. El árbol: Plantaciones forestales. [En línea]. <http://www.papelnet.cl/elarbol/10_plantaciones_forestales.html>. [Consulta: 01/12/2010].

- [13]T. NIKLITSCHK. 2010 Selección de Condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol. Memoria (Ing. Civil en Biotecnología). Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [14]N. PEREIRA. 2008. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Río de Janeiro: Escuela de Química/UFRJ.
- [15]M. LIENQUEO, W. ARACENA. Criterios preliminares entre pretratamientos biológicos y químicos para la producción de etanol de segundo generación. PROYECTO CC05: Optimal treatment processes for second generation bioethanol. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Programa de Investigación Domeyko y CONICYT. Agosto 2010.
- [16]R. SOTOMAYOR. 2010. Estudio exploratorio de producción de bioetanol y coproductos de biorefinería a partir de residuos de eucalipto. Memoria (Ing. Civil Industrial y Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [17]D. SCHNEUER. 2009. Estudio exploratorio de producción de bioetanol y coproduots de biorefinería a partir de rastrojos de maíz. Memoria (Ing. Civil Industrial y Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [18]T. MEJÍA, F. MUJICA , A. GONZÁLEZ, J. ORTEGA. 2002. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. Avance y Perspectiva, vol. 21, XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería.
- [19]V. CORTINEZ. 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Memoria (Magíster en Ingeniería Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [20]F. TALEBNIA, D. KARAKASHEV, I. ANGELIDAKI. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresource Technology, 101: 4744 – 4753.
- [21]S. VARANASI. 2008. Biomass Pretreatment. PCT/US. C12P 19/20 (2006.01). PCT/US2008/003357. 13.
- [22]R. PEZOA. 2010. Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Memoria (Magíster en Ingeniería Química). Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [23]I. SAMAYAM, C. SCHALL. 2010. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixture. Bioresource Technology, 101: 3561 – 3566.

- [24]L. FENG Y Z. CHENG. 2008. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*. 142: 1-5.
- [25]MERCK CHILE. Cotización de líquido iónico [EMIM]Cl a Departamento de Ing. Química y Biotecnología. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Abril 2010.
- [26]J. SEOP BAK, M. KIM, I. CHOI, K. KIM. 2010. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. *New Biotechnology*, 00, 00.
- [27]R. CARMONA, M. LIENQUEO, O. SALAZAR, A. GARCÍA. 2009. Bionergy II: Biological pretreatment with fungi as a tool for improvement of the enzymatic saccharification of *Eucalyptus globules Labill* to obtain bioethanol. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, vol. 7, Art. A77.
- [28]M. PEJÓ, J. M. OLIVA, M. BALLESTEROS, L. OLSSON . 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 100, Artículo N° 6.
- [29]K. OLOFSSON, M. BERTILSSON, G. LIDÉN. 2008. A short review of SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, 1:7.
- [30]M. PEJÓ. 2010 Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso. Memoria (Doctorado). Madrid, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas.
- [31]C. PEÑA, R. ARANGO, L. RESTREPO. 2010. Efecto de adición de iones fierro y zinc sobre la producción de etanol de dos cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Medellín, Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol XII N° 1. 158-168.
- [32]R. CARMONA. Seminario Internacional: Clausura de Proyecto. PROYECTO CC05: Optimal treatment processes for second generation bioethanol. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Programa de Investigación Domeyko y CONICYT. Noviembre 2010.
- [33]C. FRITZ. 2009. Rendimiento de azúcares reductores a partir de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser sometido a un pretratamiento biológico para la producción de etanol. Memoria (Ingeniería en Madera). Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza.
- [34]Y. HAN, H. CHEN. 2008. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* 99, 6081-6087.

- [35]MERCK. Líquidos Iónicos – Propiedades. [En línea]. < http://www.merck-chemicals.cl/pharmaceutical-ingredients/propiedades/c_t9Sb.s1Oya8AAAEdZZEMDpX8?PortalCatalogID=merck4pharma&CountryName=Chile > . [Consulta: 8/12/2010].
- [36]M. CANTARELLA, L. CANTARELLA, A. GALLIFUOCO, A. SPERA, F. ALFANI. 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.
- [37]H. CASTAÑO, C. MEJÍA G. Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso Sacarificación-Fermentación simultáneas (SSF). *Vitae*, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. ISSN 0121-4004 Volumen 15 n° 2, 251-258. 2008
- [38]S. RAYNE, G. MAZZA. 2007. Rapid dissolution of lignocellulosic plant material in an ionic liquid. Programa Nacional de bioproductos y bioprocesos, Centro de Investigación de Agro y alimentos del Pacífico, Summerland, British Columbia, Canada.
- [39] DONGBAO FU, G. MAZZA, Y. TAMAKI. 2010. Lignin extraction from straw by ionic liquids and enzymatic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2915-1922.

Anexos

Anexo A.- Título I: Introducción y Motivación, Marco Teórico, Antecedentes y Objetivos

Anexo A.1. Propiedades generales de los Líquidos Iónicos.

Tabla A.1. Propiedades fisicoquímicas de los Líquidos Iónicos clorados ([EMIM]Cl). Adaptación [35]

Propiedad	Descripción
Presión de vapor	Insignificante
Punto de fusión	Bajo los 100°C
Solvente	Buena disolución de materiales orgánicos, inorgánicos y biomasa
Volatilidad	Nula
Flamabilidad	Nula (no es explosivo)
Miscibilidad	Agua y Solventes orgánicos

Anexo A.2. Pretratamientos alternativos

Tabla A.2. Pretratamientos mayormente usados para material lignocelulósico y sus posibles efectos (Adaptación [18])

Clasificación del pretratamiento	Tipo de pretratamiento	Efecto general sobre el material lignocelulósico
Físico	<ul style="list-style-type: none"> • Tamizado • Molienda • Chipeado 	<p>Aumento en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Superficie específica • Tamaño de poros <p>Disminución en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cristalinidad • Grado de polimerización
Físico-químico	<p>Hidrotermales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • LHW • Explosión de vapor <p>Con químicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • H₂SO₄ • AFEX 	<p>Aumento en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Superficie específica • Tamaño de poros <p>Degradación parcial de hemicelulosa</p> <p>Transformación de la lignina</p>
Químico	<p>Ácidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diluído • Concentrado <p>Alcalinos</p> <ul style="list-style-type: none"> • NaOH • Lima (0,1 g/g materia seca) <p>Agentes oxidantes</p> <ul style="list-style-type: none"> • H₂O₂ • Oxidación húmeda (12 bar O₂) • Ozonólisis 	<p>Aumento en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Porosidad • Superficie interna debido a la humectación <p>Disminución en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grado de polimerización • Cristalinidad <p>Degradación de hemicelulosa</p> <p>Remoción de lignina</p>

Anexo B.- Curvas de calibración, metodologías y procedimientos

B.1.- Curva de calibración de Biomasa vs Absorbancia a 600 nm.

En un matraz erlenmeyer de 800 ml se prepara un medio YEPD, con un medio de trabajo de 250 ml el cual se inocula con el medio de stock que se tiene a 4°C. Luego se mantiene en agitación por 24 horas a 200 RPM a 37°C en un incubador rotatorio marca Innova modelo 4300.

Luego de las 24 horas se preparan distintas diluciones (100, 50, 20, 10, 5, 2,5% v/v) en tubos Falcon de 15 ml con muestras de 10 ml. Se extrae 1 ml para medir la absorbancia a 600 nm y el resto de la muestra (9 ml) son filtradas con un filtro de tamaño de poro de 47 µm. Los filtros son pesados y luego son secados en una estufa Gallenkamp a 60°C hasta que el peso de los filtros con las células retenidas sea constante.

La curva final se puede observar en el Gráfico B.1. Los puntos en rojo permiten calcular la curva de calibración por su tendencia lineal, fuera de ese rango no se utilizaron los puntos ya que el comportamiento deja de ser lineal y no sería representativo de los valores a utilizar.

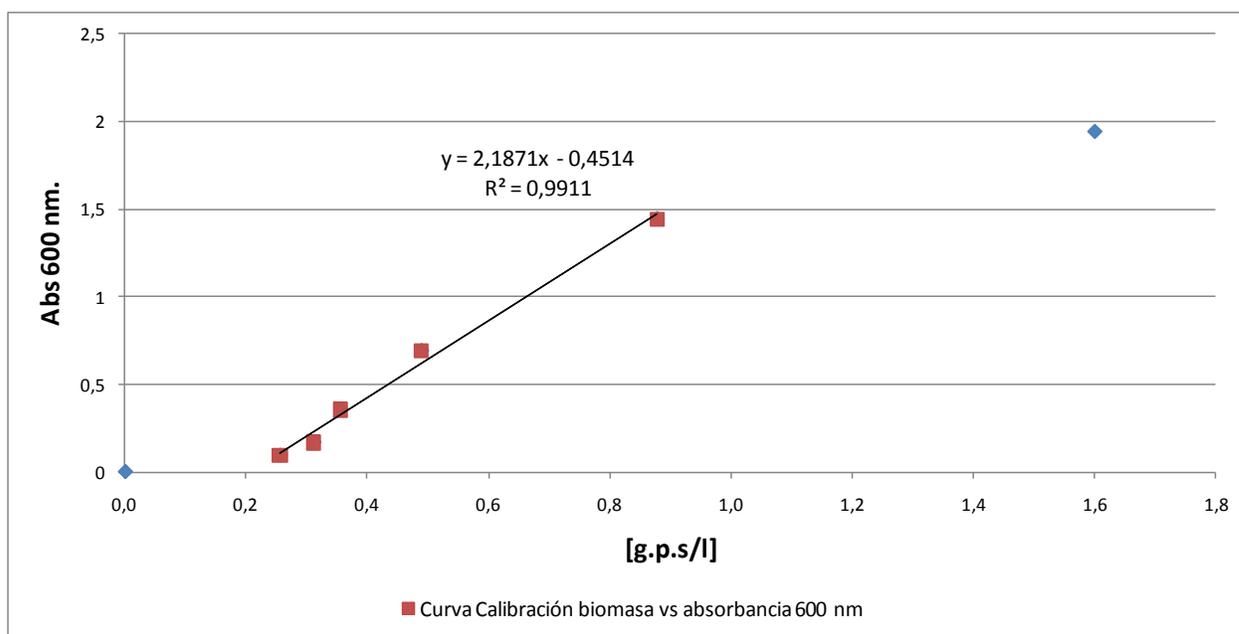


Gráfico B.1. Curva de calibración de Biomasa a 600 nm.

B.2.- Curva calibración Concentración de Azúcares vs Absorbancia a 540 nm.

El reactivo DNS se preparó según [20], luego fue guardado en un lugar oscuro y en un frasco forrado con papel aluminio para evitar la degradación del mismo y pérdida de capacidad de desarrollo de color en la reacción con azúcares reductores. Por esto mismo se realizaron varias curvas de calibración, pero solo se mostrará una de las utilizadas, ya que el procedimiento es el mismo en todos los casos.

Con una concentración estándar de glucosa de 1,5 [g/L], se realizaron distintas diluciones (0, 25, 50, 75, 100% v/v). Luego se muestran 60 μ l de muestra y 60 μ l de reactivo DNS, se llevan a un calefactor a 100°C por 10 minutos, luego las muestras se llevan a hielo para detener la reacción. Muestras de 100 μ l son llevadas a lectura en un espectrofotómetro a 540 nm, dando como resultados el gráfico B.2.

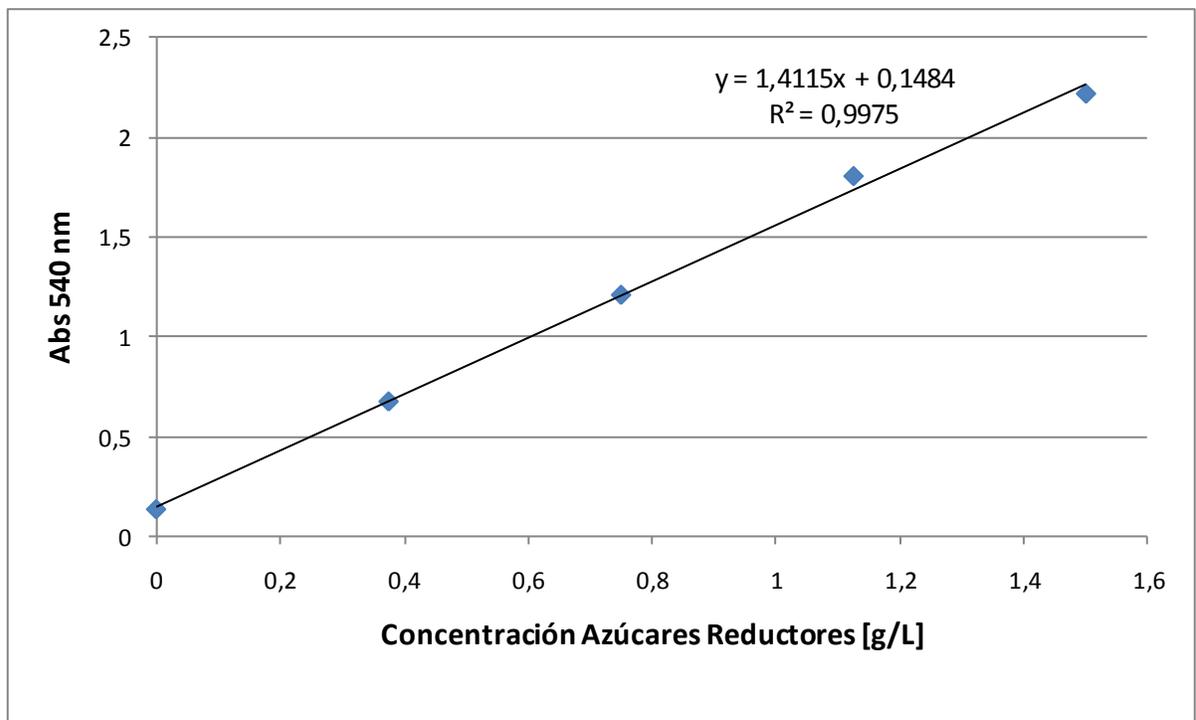


Gráfico B.2. Curva de calibración de Concentración de Azúcares reductores versus Absorbancia a 550 nm.

B.3.- Curva de Calibración Concentración de etanol versus Área de integración mediante Cromatografía Gaseosa.

Al igual que el resto de las curvas de calibración se realizan distintas diluciones (100, 80, 50, 30, 20 ,10, 5% v/v) a partir de un estándar de etanol con concentración de 7,9 [g/L]. El resultado de la curva se observa a continuación en el gráfico B.3.

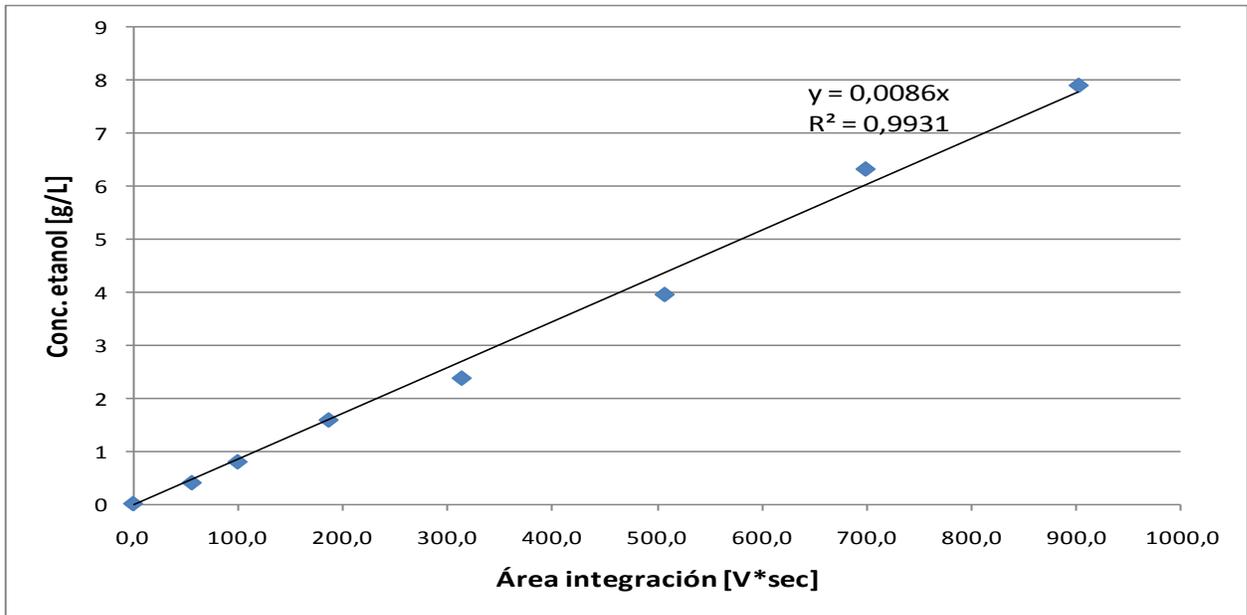


Gráfico B.3. Curva de calibración de Concentración de etanol versus Área de integración.

Para ilustrar de mejor manera los resultados se adjunta una cromatograma de un “peak” de etanol puro.

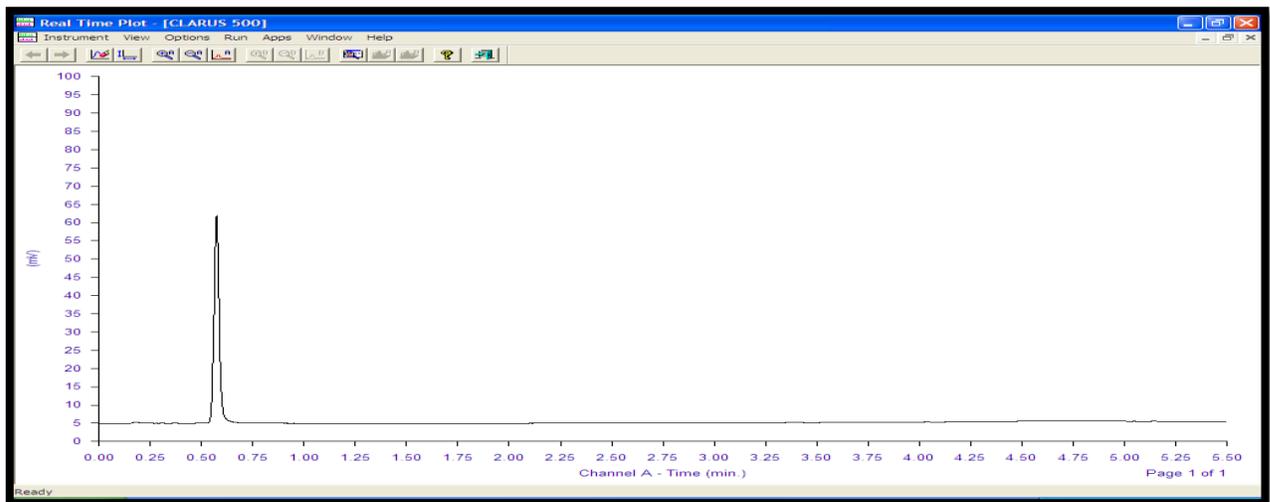


Ilustración B.1. Ejemplo de “peak” de etanol puro en una cromatografía gaseosa en la interfaz del programa Clarus 500. Tiempo de observación “peak” 0,56-0,57 minutos.

B.4.- Aislamiento de colonias de levadura y obtención de inóculo.

B.4.1.- Aislamiento de colonias de levadura

Un gramo de levadura seca “Fermentis Ethanol Red” (cepa RED STAR) se rehidrata en 5 ml. de medio YEPD (1% Extracto de levadura, 2% Peptona razón, 2% Glucosa p/v)^[28] a 37°C por 30 minutos. Luego, 50 µl de la suspensión son depositados en una Placa Petri con medio Agar-YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 1,6% agar Bacto razón p/v)^[28] y mediante un haza metálica estéril se dispersa el volumen agregado, utilizando la técnica clásica de aislamiento por estrías utilizada en estudios previos^[13]. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estériles.

B.4.2.- Obtención del Inóculo

A partir de una colonia aislada de la cepa de levadura Red Star, se inoculan 2 tubos de ensayo con 5 ml. de medio YEPD y posteriormente se incuban en un agitador rotatorio marca ZHCHENG modelo ZHWY-100B a 40°C y 200 rpm por 8 horas. Luego, un matraz Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 200 ml de medio YEPD se inocula con un 2% v/v proveniente de uno de los tubos de ensayo. Las condiciones de incubación son 40°C y 200 rpm por 20 horas. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estériles.

Luego de la propagación se mide absorbancia a 600 nm hasta obtener la cantidad de biomasa necesaria según la curva de Concentración de biomasa vs Absorbancia a 600 nm que se encuentra en el Anexo B.

B.5.- Otros resultados de pretratamiento fúngicos no considerados en el trabajo.

Tabla B.1. Resultados de pretratamientos fúngicos a los 45 días. Adaptación [32].

Material Lignocelulósico	Especie fúngica	Pérdida de peso (%) a los 45 días	Gramo de azúcar por Kg de biomasa	Razón Glucosa/A.R.
Lenga	<i>Ganoderma applanatum</i>	19,6	110	0,36
	<i>Stereum hirsutum</i>	---	200	0,35
	<i>Lentinus edodes</i>	9,4	---	---
Eucalipto	<i>Ganoderma applanatum</i>	19,6	190	0,53
	<i>Cerrioporopsis subvermispora</i>	11,1	---	---
	<i>Lentinus edodes</i>	11,8	---	---

Anexo C.- Diagrama de Decisiones para el procedimiento del trabajo de investigación

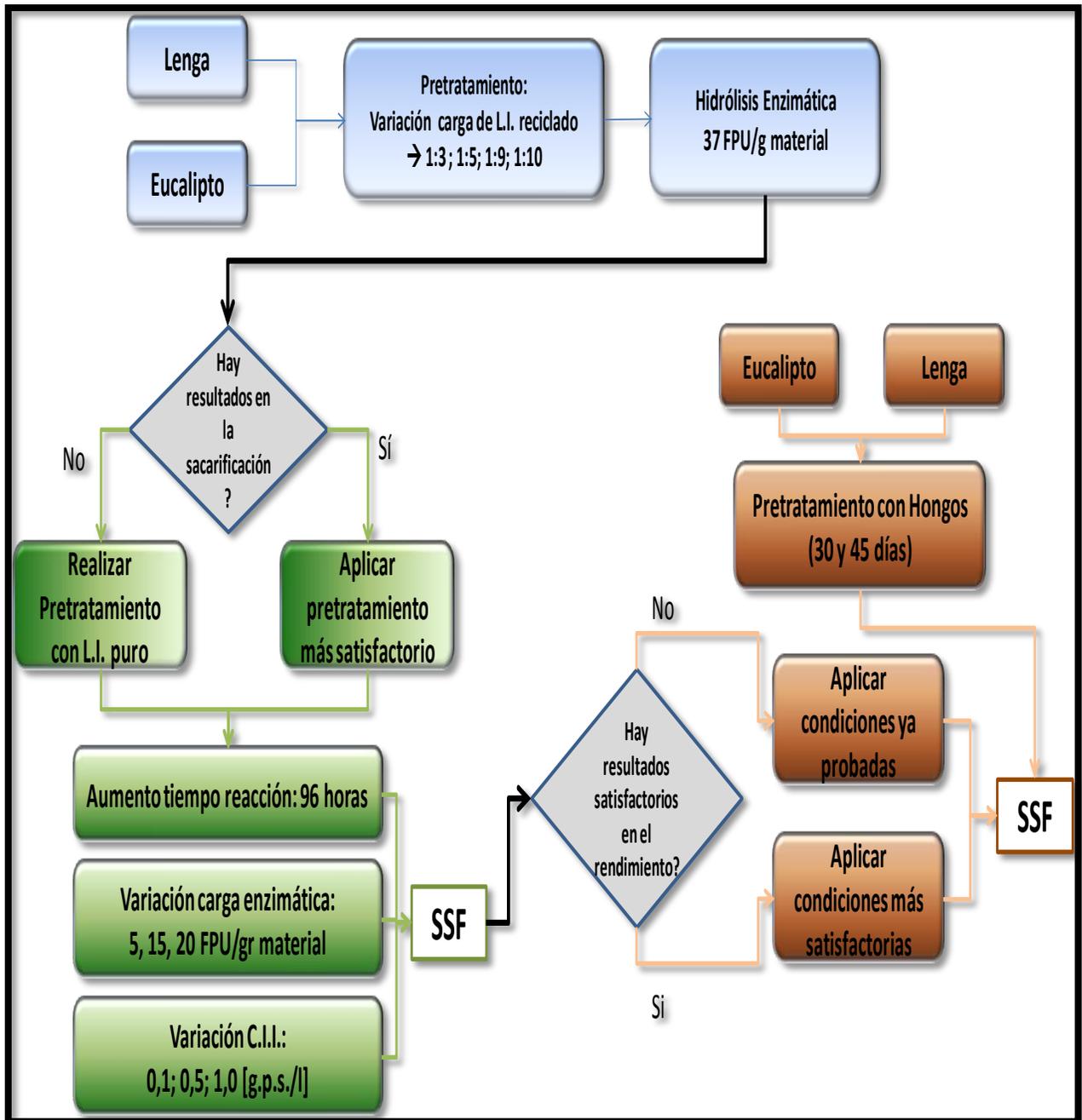


Ilustración C.1. Diagrama de Decisión del Trabajo de investigación. Se integran las tres etapas que completan el estudio actual. En azul la Primera Etapa; en verde, la Segunda Etapa y en café, la Tercera Etapa.

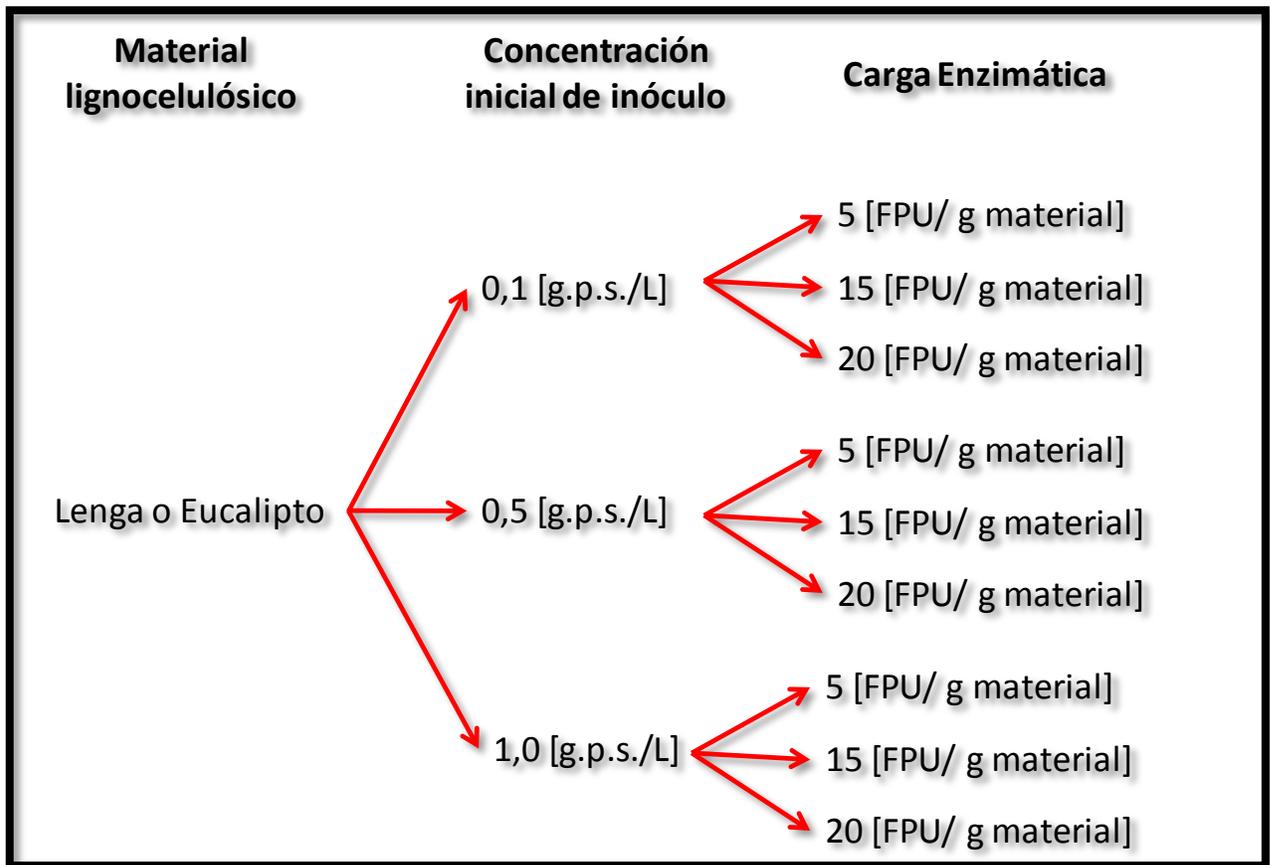


Ilustración C.2. Red de combinaciones para el Procedimiento del Estudio de una SSF con pretratamiento con líquido iónico reciclado. Se fija el tipo de material lignocelulósico y se fija la concentración inicial de inóculo, luego se varía la carga enzimática para concentración de inóculo. Posteriormente se cambia la concentración inicial de inóculo y se realizan las tres variaciones de carga enzimática, hasta completar toda la red.

Anexo D.-Imágenes de los montajes y procedimientos realizados.



Ilustración D.1. Recuperación de LI. (A) A la izquierda se observa la solución “L.I.-Agua” luego del lavado de material lignocelulósico y a la derecha, luego de ser filtrado. (B) Solución en el proceso de filtrado con papel filtro. (C) Rotovapor para primera etapa de destilación. (D) Baño de glicerol a 150°C con una solución “L.I.-Agua” filtrada. (E) Baño en aceite siliconado para segunda etapa de destilación. (F) A la izquierda Líquido iónico puro (sales blancas) y a la derecha, L.I. reciclado (licor negro).



Ilustración D.2. Material lignocelulósico, con distintos pretratamientos y granulometría utilizada. Fila superior, de izquierda a derecha: Eucalipto sin pretratar, eucalipto pretratado con LI reciclado, eucalipto pretratado con HPB eucalipto pretratado con LI puro. Fila inferior, de izquierda a derecha: Lenga sin pretratar, lenga pretratado con LI reciclado, lenga pretratado con HPB. El material pretratado con LI tiene una granulometría de 0,5-1 mm espesor, 0,5-1 mm de ancho y 0,5-10 mm de largo. El material pretratado con HPB tiene una granulometría de 0,5-1 mm de espesor, 0,5-1 mm de ancho y 0,4-2,5 mm de largo.

Anexo E.- Memoria de cálculo para el rendimiento de sacarificación total y de glucosa.

En la siguiente tabla se observa la composición química de las maderas en estudio, Lengua y Eucalipto.

Tabla E.1. Composición química p/p para las maderas en estudio (Adaptación [17])

Compuesto	Residuos de Lengua (%)	Residuos de Eucalipto (%)
Lignina	17%	19%
Celulosa	45%	42%
Hemicelulosa	38%	39%

Como principal supuesto es que toda la celulosa disponible se libera como potencial glucosa, por lo tanto, como ejemplo de cálculo se tiene para lenga luego del proceso de sacarificación para L.I. puro.

$$\text{Glucosa máxima disponible (gr)} = 0,45 * 0,1 \text{ gr. de muestra de lenga} = 0,045 \text{ gr. de glucosa}$$

$$\begin{aligned} \text{Glucosa total liberada (gr)} &= \frac{\text{gr. de Glucosa}}{\text{gr. de material de muestra}} * \text{gr. de muestra de lenga} \\ &= 0,4083 \frac{\text{gr glucosa}}{\text{gr lenga}} * 0,1 \text{ gr lenga} = 0,04083 \text{ gr. de glucosa} \end{aligned}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{0,04083}{0,045} * 100 = 91\%$$

En la Tabla F.2, se resume los valores del rendimiento para todos los pretratamientos y en la Tabla E.3, se resume los rendimientos porcentuales respecto al LI puro.

Tabla E.2. Resumen de los Rendimientos (%) para cada tipo de residuo con cada pretratamiento. S/P (sin pretratamiento). L.I. rec. (Líquido iónico reciclado).

Tipo Residuo	Tipo de Pretratamiento (%)					
	S/P	L.I. puro 1:3	L.I. rec. 1:3	L.I. rec. 1:5	L.I. rec. 1:9	L.I.rec. 1:10
Lengua	13	91	53	94	67	95
Eucalipto	6	44	30	23	27	15

Tabla E.3. Resumen de los Rendimientos de Sacarificación Azúcares Reductores Totales (%)/ Glucosa (%) respecto a LI puro.

Tipo de Residuo	Tipo de pretratamiento				
	S/P	LI rec. 1:3	LI rec. 1:5	LI rec. 1:9	LI rec. 1:10
Eucalipto (1)	31/14	69/67	47/52	71/61	45/34
Lenga (2)	17/14	88/59	94/104	89/73	90/104

* Sacarificación A.R. totales/ glucosa con LI puro: (1) 261,59 [mg/gr. de euc] / 185,05 [mg/gr. de euc] (2) 674,7 [mg/gr. de lenga] / 408,3 [mg/gr. de lenga].

Anexo F.- Resultados de los trabajos previos (Antecedentes bibliográficos).

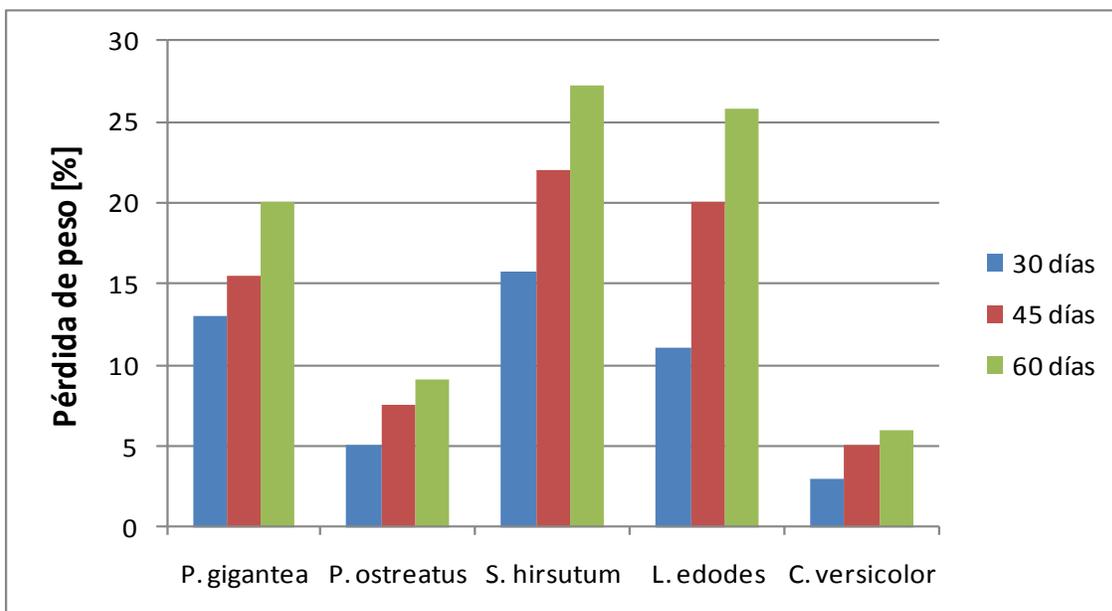


Gráfico F.1. Promedio de la pérdida de peso observada en eucalipto sometido a pretratamientos con distintos HPB.

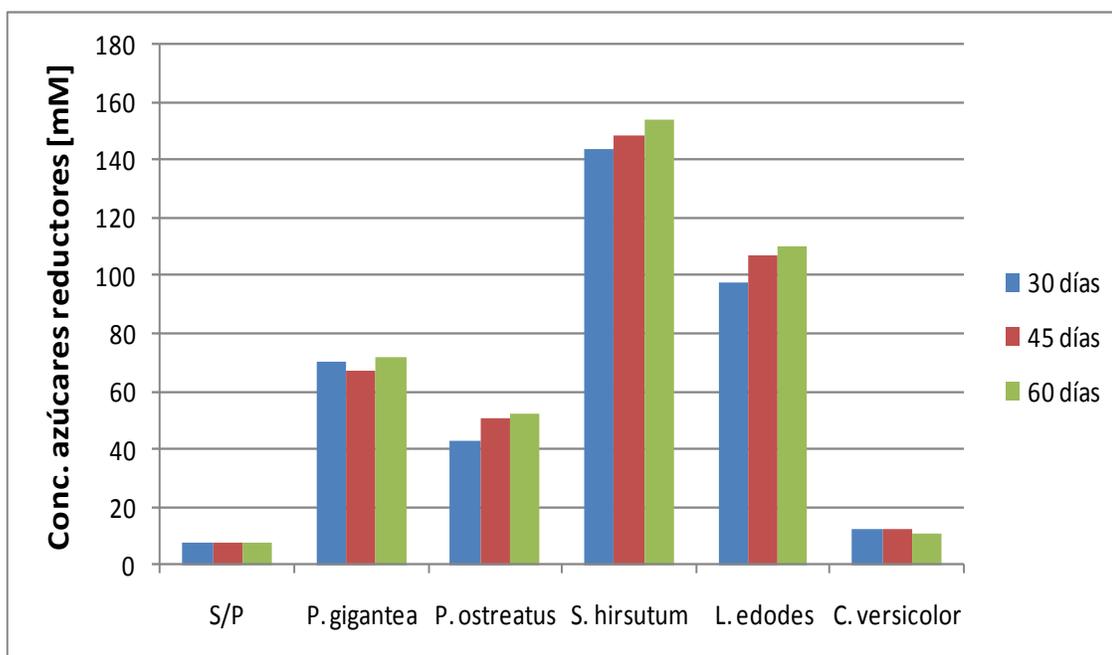


Gráfico F.2. Resultados de la Hidrólisis enzimática de azúcares reductores luego del pretratamiento con HPB para eucalipto. S/P (sin pretratamiento). Adaptación [24].

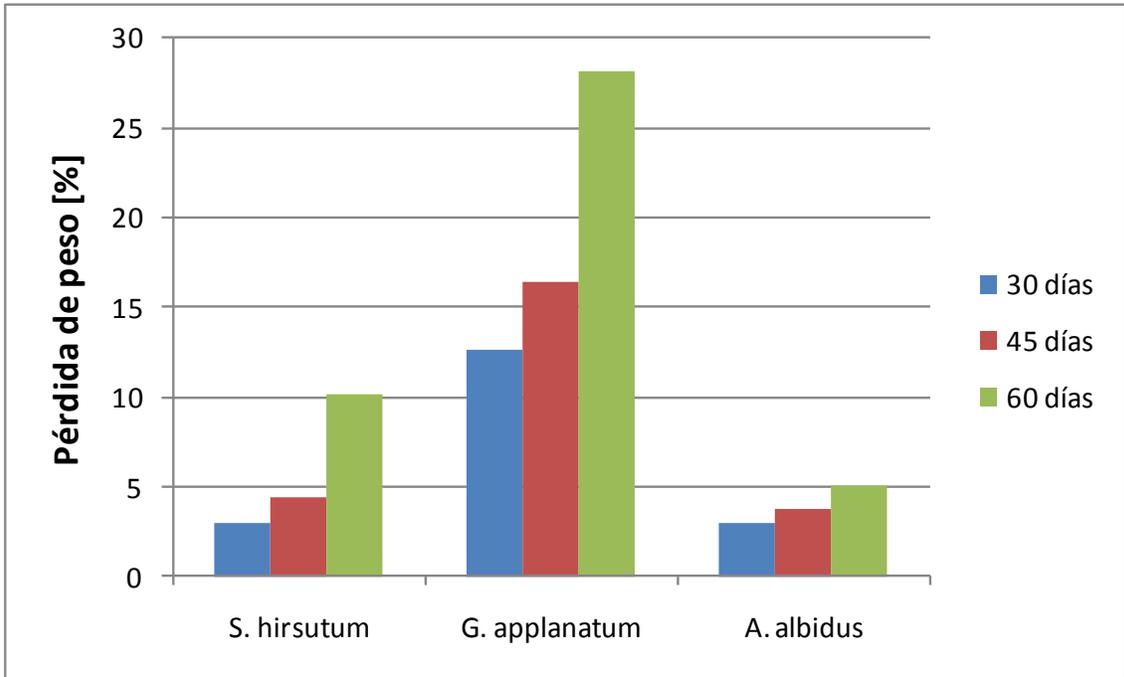


Gráfico F.3. Promedio de la pérdida de peso observada en lengua sometido a pretratamientos con distintos HPB

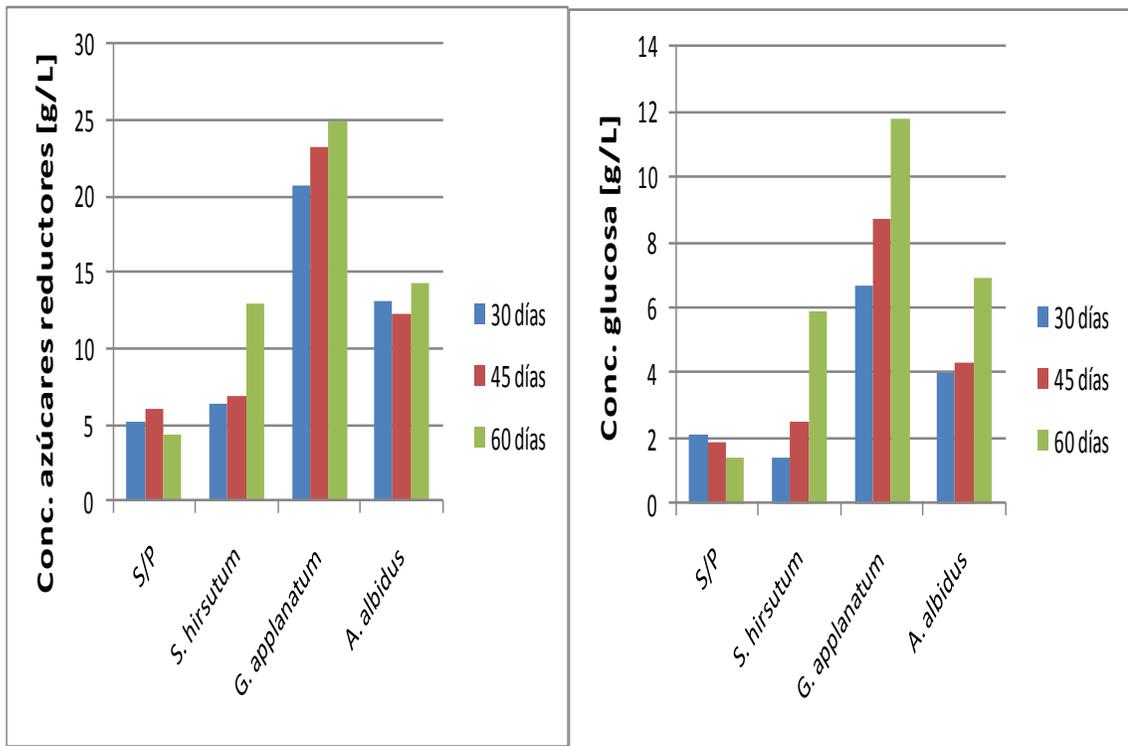


Ilustración F.1. Resultados de la Hidrólisis enzimática de azúcares reductores y glucosa luego del pretratamiento con HPB para lengua. S/P (sin pretratamiento). Adaptación [30].

Anexo G. Memoria de cálculo del potencial de bioetanol obtenido

G.1.- Cálculo general del bioetanol generado para suplir demanda en Chile

Como ejemplo utilizaremos el mejor resultado obtenido para lenga con LI reciclado (carga 1:5) con un rendimiento del 23% reflejado en 60 mg de etanol por gramo de material.

Si utilizamos 245 mil toneladas de lenga se obtendría:

$$(1) 0,06 \left[\frac{g \text{ etanol}}{g \text{ lenga}} \right] * 2,54 * 10^{11} [g \text{ lenga}] = 15.220.479 [kg \text{ etanol}]$$

$$(2) \frac{(Masa \text{ etanol})}{(Densidad \text{ etanol})} = 15.220.479 \frac{[kg \text{ etanol}]}{789 \left[\frac{kg}{m^3} \right]} = \mathbf{19.290 m^3 \text{ etanol}}$$

Si la demanda es de 66.000 y 165.000 m³ de etanol al 2% y 5% entonces se puede cubrir el 12% y 29% respectivamente.

G.2.- Cálculo de la mejor opción para el pretratamiento biológico de 30 o 45 días

Suponemos un total de 3 meses, por lo tanto cuadran 3 pretratamientos de 30 días y 2 de 45 días. Si se hace en base a 1 tonelada de eucalipto o lenga se tiene lo siguiente.

Como ejemplo se realizará el cálculo para lenga. Para el pretratamiento con *C. subvermispora* se tiene una generación de 89 y 105 mg de etanol por gramo de lenga para 30 y 45 días respectivamente.

Realizando el mismo cálculo que en G.1. se obtienen **339 y 266 m³** de bioetanol para 30 y 45 días.

Para eucalipto los resultados dan **396 y 321 m³** de bioetanol para 30 y 45 días.

Anexo H. Curvas de Rendimiento vs C.I.I. para cargas enzimáticas constantes.

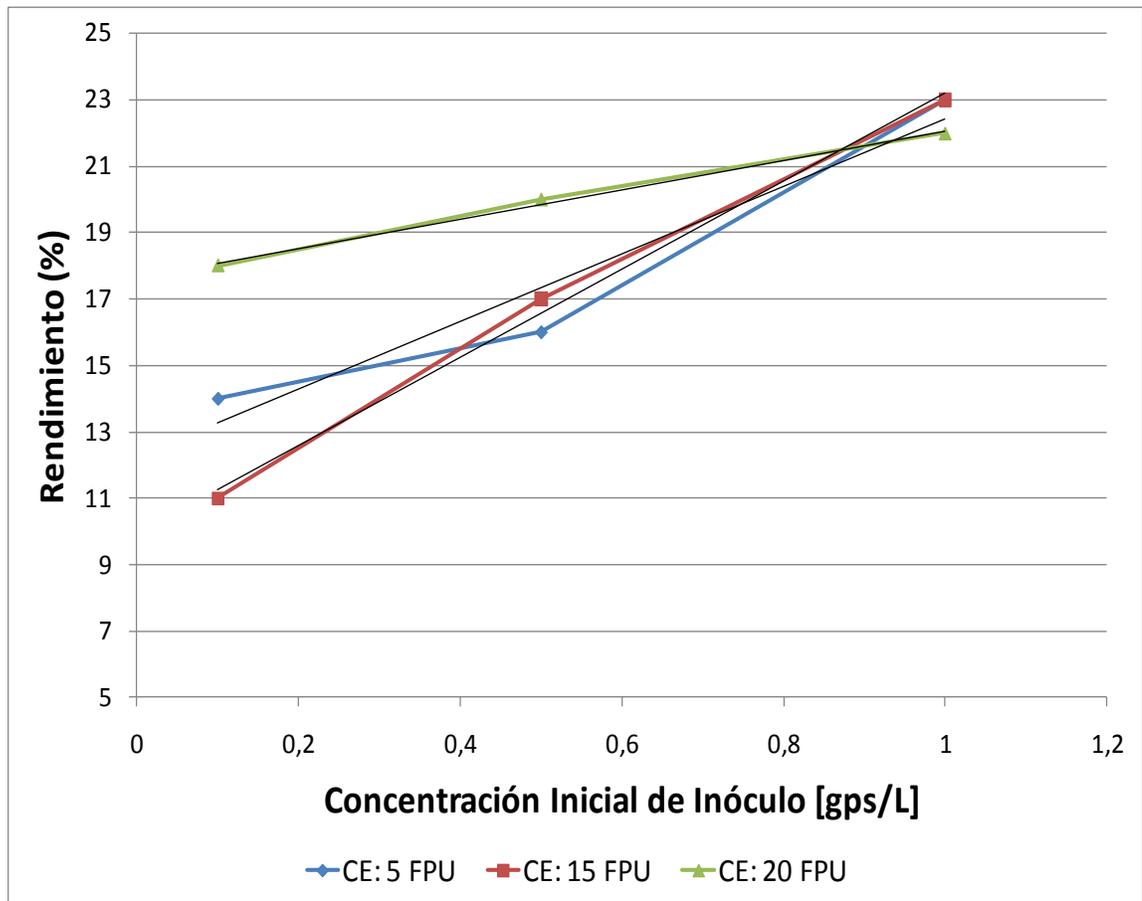


Gráfico H.1. Curvas de Rendimiento vs C.I.I. para cargas enzimáticas constantes.

La ecuación H.1, indica la curva para una carga enzimática de 5 [FPU/g material]; la H.2, para 15 y H.3 para 20 [FPU/ g material].

- $Rendimiento = 10,164 * C.I.I + 12,246$, $R^2 = 0,9405$ [Ecuación H. 1]
- $Rendimiento = 13,279 * C.I.I. + 9,918$, $R^2 = 0,9959$ [Ecuación H. 2]
- $Rendimiento = 4,4262 * C.I.I. + 17,639$, $R^2 = 0,9959$ [Ecuación H. 3]