



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

EFFECTO DEL USO DE MEZCLAS DE LIGNOCELULOSAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
E INGENIERO CIVIL QUÍMICO

CRISTIAN EDUARDO RODRÍGUEZ DROGUETT

PROFESOR GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

PROFESOR CO-GUÍA:
ALEJANDRO GARCÍA MORA

PROFESOR INTEGRANTE:
FRANCISCO GRACIA CAROCA

PROFESOR INVITADO:
RENÉ CARMONA CERDA

ESTA MEMORIA HA SIDO FINANCIADA POR:
FONDECYT DE INICIACIÓN 11110368
&
PROGRAMA DOMEYKO ENERGÍA, VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO,
UNIVERSIDAD DE CHILE.

SANTIAGO DE CHILE
MAYO 2012

Resumen

El actual escenario energético del planeta, y la baja diversidad de la matriz energética de Chile, ha terminado por generar la necesidad de encontrar nuevas fuentes de combustibles. Combustibles que resulten menos contaminantes para el medio ambiente, y que permitan un desarrollo sustentable del país. Ante esta necesidad se alzan los biocombustibles.

Chile no posee las ventajas competitivas de EE.UU. y Brasil para la producción de biocombustibles de primera generación, por lo que debe concentrar sus esfuerzos en la producción de biocombustibles de segunda generación utilizando diversos residuos lignocelulósicos, la variabilidad de suelos, y los diferentes climas a lo largo de su territorio.

Es en esta situación que esta memoria se sitúa, como parte del proyecto FONDECYT de iniciación 11110368 y el programa Domeyko Energía. La memoria consistió en estudiar la fermentación de mezclas de medios de glucosa, derivados a partir de diferentes residuos lignocelulósicos, los cuales fueron pretratados previamente por hongos de pudrición blanca. Preguntas como la posible existencia de sinergias, inhibiciones, y cómo contribuyen estos residuos lignocelulósicos en el producto de bioetanol buscaron ser respondidas en este trabajo.

El desarrollo de experiencias se diseñó a partir de hidrólisis y fermentaciones separadas (HFS). Primero se seleccionaron los residuos lignocelulósicos (rastros de maíz, rastros de trigo, y residuos de eucalipto) pretratados por hongos de pudrición blanca (*Ganoderma applanatum*, *Lentinus edodes*, y *Stereum hirsutum*), los cuales pasaron a continuación por idénticos procesos de sacarificación utilizando hidrólisis enzimática (1 [g] peso seco de residuo lignocelulósico, 40 [CBU] de Novozyme[®] 188, 2,5 [FPU] de Celluclast[®] 1,5 L, 75 [μL] de Tween[®] 20, 29,8 [mL] de tampón Acetato de Sodio 0,05 M y pH:4,8, por 72 [hrs] a 50 [°C] y 200 RPM), siendo posteriormente diluidas las concentraciones obtenidas de glucosa a 2 [$\frac{g}{L}$] para su posterior fermentación. Dichas fermentaciones se efectuaron usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Ethanol Red[®] (Red Star), los medios fermentados correspondieron a caldos con la cantidad de glucosa total fijada en 2 [$\frac{g}{L}$], en forma de mezclas o individualmente (10 [mL] de fase líquida sacarificada diluida a 2 [$\frac{g}{L}$], 9 [mL] de medio nutritivo compuesto de extracto de levadura-Fosfato de Amonio-Sulfato de Magnesio, 1 [mL] de inóculo de levadura, por 72 [hrs] a 40 [°C] y 200 RPM). Las mediciones de bioetanol fueron efectuadas en un cromatógrafo de gases, y mediciones de abundancias naturales de isótopos estables de ¹³C en un espectrómetro de masas.

Para la determinación estadística de diferencias significativas entre resultados, se aplicaron los tests paramétricos: ANOVA, Tukey-Kramer, y los tests no-paramétricos: Kruskal-Wallis, Dunn-Sidak.

Los resultados obtenidos mostraron que la mezcla de medios con glucosa de distintos sustratos genera efectos inhibitorios y sinergias. Las sinergias ocurrieron a partir de todas las mezclas fermentadas de rastros de maíz y residuos de eucalipto (10,5% en promedio sobre lo esperable), y las inhibiciones se generaron a partir de todas las mezclas fermentadas de rastros de maíz y rastros de trigo (467,5% en promedio menos de lo esperable). Además, se determinó que la contribución al producto final de bioetanol por parte de rastros de trigo y residuos de

eucalipto es mayor (65,6% en promedio,) que la efectuada por los rastrojos de maíz (34,4% en promedio). En consecuencia, la glucosa con origen de plantas C3 generalmente tiene una mayor contribución que la glucosa con origen de plantas C4 en el producto de bioetanol.

Se concluyó a partir de los resultados obtenidos que el principal factor que posiblemente influyó en los rendimientos de bioetanol fue la concentración de ácidos hidroxicinámicos en el medio de fermentación, la cual estaría determinada mayormente por la estructura lignocelulósica de los residuos y el tipo de hongo de pudrición blanca. En relación a la contribución por parte de las plantas C3 y C4 al producto final de bioetanol, se concluyó que esta situación se debió a una preferencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Ethanol Red[®] (Red Star) por incorporar a sus productos de fermentación moléculas de glucosa isotópicamente más livianas, las cuales poseen velocidades de difusión y colisión más elevadas, además de tener energías de enlace menores.

Este último párrafo, permite asentar las bases para continuar la investigación de fermentaciones de medios de cultivo que contienen glucosa derivada de dos sustratos distintos (e.g. análisis de inhibidores), y como siguiente paso una optimización del proceso en post de encontrar las mejores alternativas de producción de bioetanol de segunda generación.

Agradecimientos

Una vez concluida esta trabajada y emocionante etapa de mi vida, quisiera partir agradeciendo a mis padres, quienes son los grandes apoyos detrás de mis logros. A mi padre Manuel, por enseñarme con tu ejemplo que el estudio te abre demasiadas puertas, y a mi madre Ximena, por jugársela en mi educación y haber tomado las mejores decisiones en los momentos claves de mi desarrollo académico. A ambos, les agradeceré por siempre todo lo que me dieron.

A mi hermana mayor, Bárbara, qué habría sido de mi vida o qué decisiones hubiese tomado sin tu guía y apoyo, eres uno de mis pilares. A mi hermano menor, Manuel Ignacio, cuantas jornadas de entretenimiento y risas hemos pasado, tenemos una década de diferencia pero compartimos muchas pasiones.

A mis abuelos, que son literalmente mis segundos padres, por haber influido en la mayoría de las aristas de mi vida. A mis padrinos, primos, tíos, por el apoyo, las conversaciones y la comprensión cuando no podía reunirme con ustedes por pega de la U.

A los amigos de primer año: Aldo, Sebyt, Chocolor, Jere, Jtom, Jacques, Franky, Bernuy, Pastero, Flanders, y Carlitos Toro. Cuantos Carretes, ¡cuantas historias!. Aún recuerdo las caras después de los primeros controles, Beauchef nos daba la bienvenida con cuática jaja. A mis amigos-compañeros de carrera, que estudiamos y trabajamos pasando de largo infinitas veces: Teté, Werner, Harris, French, Cristi, y Patigol. Miro para atrás y siento que valió la pena. Gracias por cada vez que me ayudaron, serán excelentes profesionales, no me cabe la menor duda.

A Alessandra Baldecchi. Gracias por el apoyo, las celebraciones por cada etapa cumplida, y tu disposición a auxiliarme cada vez que pudiste durante la memoria. Love you y besotes para ti.

A mis amigos de la vida, aquellos que ya no están, del Instituto Nacional, de Trabajos Voluntarios, del DIQBT, y a mis cabros de Diablos de Ingeniería Rugby Club, gracias por tantos recuerdos y enseñanzas.

A la gente que permitió el desarrollo de esta memoria: Rodrigo del Departamento de Ingeniería de la Madera, Nancy del CIBYB, gente del laboratorio de Catálisis, y personal de los laboratorios en la Universidad de Waterloo. En especial, agradezco a los profesores de la comisión por su tiempo y dedicación. Profesor Francisco y profesor René por sus consejos. A la profesora María Elena, le agradezco eternamente sus correcciones y su tremenda disposición a ayudarme, siempre dio una solución cuando surgía un problema. Por último, profesor Alejandro, le doy las gracias por todo, desde el primer momento que lo conocí se mostró como una persona leal y correcta, siempre resuelto por lo que pensaba y como llevar a cabo esta memoria. Usted me enseñó la clave en una investigación de este estilo, tranquilidad. Nunca se precipitó, y siempre demostró capacidad de liderazgo, un gusto haber trabajado con usted.

Adiós Beauchef, ya nos volveremos a encontrar... espero que no muy pronto eso si jajaja.

Índice de contenidos

Resumen	i
Agradecimientos	iii
Índice de gráficos.....	vii
Índice de ilustraciones.....	viii
Índice de tablas	ix
Abreviaturas	x
Parte I.....	1
Capítulo I. Antecedentes generales y motivación	1
Capítulo II. Marco Teórico	4
2.1. Material lignocelulósico	4
2.2. Pretratamientos y hongos de pudrición blanca (HPB)	5
2.2.1. Hongos de pudrición blanca (HPB)	6
2.3. Sacarificación e hidrólisis enzimática	6
2.3.1. Hidrólisis enzimática.....	7
2.4. Fermentación alcohólica.....	8
2.5. Isótopos de carbono y su aplicación a lignocelulosas	9
Capítulo III. Objetivos y alcances	11
3.1. Objetivo General.....	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
Parte II.....	12
Capítulo IV. Materiales y metodología	12
4.1. Materiales	12
4.1.1. Residuos lignocelulósicos	12
4.1.2. Residuos lignocelulósicos pretratados con anterioridad	12
4.1.3. Hongos de pudrición blanca (HPB)	12
4.1.4. Enzimas	12
4.1.5. Microorganismo fermentador	13
4.1.6. Reactivos utilizados	13
4.1.7. Equipos y materiales de laboratorio.....	14
4.2. Metodología.....	15
4.2.1. Selección de residuos lignocelulósicos pretratados	15
4.2.2. Reducción de tamaño rastrojo de trigo	16
4.2.3. Pretratamiento de rastrojo trigo con hongos de pudrición blanca (HPB)	16
4.2.3.1. Inoculación de granos de trigo con hongo de pudrición blanca (HPB) de interés	16
4.2.3.2. Inoculación de matraces Erlenmeyer y período de pretratamiento con hongos de pudrición blanca (HPB)	17
4.2.4. Sacarificación de residuos lignocelulósicos	18
4.2.5. Medición de glucosa	19
4.2.6. Fermentaciones	19
4.2.7. Determinaciones de concentraciones de bioetanol	21
4.2.8. Determinaciones de abundancias relativas de isótopos estables de ¹³ C.....	21
4.2.8.1. Determinación de la contribución de cada residuo lignocelulósico	22
Parte III.....	23
Capítulo V. Resultados	23

5.1. Rendimientos de bioetanol	23
5.1.1. Resultados Análisis estadístico de rendimientos de bioetanol	24
5.2. Abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$).....	26
5.2.1. Análisis estadístico de datos de las abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$)	27
5.2.2. Contribución parcial lignocelulosas.....	28
5.2.3. Análisis estadístico de datos de porcentajes de contribuciones.....	29
Capítulo VI. Discusiones	30
6.1. Rendimientos de bioetanol	30
6.1.1. Hidrólisis enzimática.....	30
6.1.2. Estructura lignocelulósica	30
6.1.3. Metabolismo de los Hongos de pudrición blanca (HPB).....	31
6.1.4. Proceso de fermentación	32
6.1.4.1. Diluciones de medios obtenidos de la sacarificación	32
6.1.4.2. Cantidad de inóculo	34
6.1.4.3. Tipo de fermentación.....	34
6.1.4.4. Mediciones de bioetanol	34
6.2. Abundancia relativa de isótopos estables de ^{13}C	36
6.3. Contribución parcial de lignocelulosas	38
Capítulo VII. Conclusiones.....	40
Capítulo VIII. Recomendaciones	41
Referencias	42
Anexos.....	47
Anexo A. Antecedentes generales y motivación.....	47
Anexo A.1. Discusión energética de Chile y el mundo, Chile como productor de bioetanol.....	47
Anexo B. Metodología y procedimientos	50
Anexo B.1. Cálculo factor de humedad rastrojo de trigo.....	50
Anexo B.2. Determinación del contenido de humedad durante el período de incubación de rastrojo de trigo en matraces Erlenmeyer	50
Anexo B.3. Determinación del factor de humedad de muestras lignocelulósicas.....	52
Anexo B.4. Preparación de tampón Acetato de Sodio.....	53
Anexo B.5. Cantidades obtenidas de fase líquida luego de la sacarificación	53
Anexo B.6. Protocolo de uso del kit RANDOX GLUC-PAP.....	54
Anexo B.7. Concentraciones de glucosa obtenidas tras la sacarificación	57
Anexo B.8. Selección de fases líquidas para las fermentaciones	58
Anexo B.9. Cantidades de fase líquida obtenidas del proceso de fermentación	58
Anexo B.10. Curva de calibración para proceso de cuantificación de concentraciones de bioetanol en el cromatógrafo de gases	59
Anexo C. Resultados	60
Anexo C.1. Resultados test estadístico	60
Anexo D. Ilustraciones	61
Anexo D.1. Reducción de tamaño de partículas de rastrojo de trigo	61
Anexo D.2. Siembra de placas Petri e inoculación de tubos de ensayo con hongos de pudrición blanca (HPB)	61
Anexo D.3. Preparación de rastrojo de trigo, inoculación de matraces Erlenmeyer, pretratamiento y posterior almacenamiento	63
Anexo D.4. Proceso de sacarificación	65
Anexo D.5. Determinación de concentraciones de glucosa del proceso de sacarificación	66
Anexo D.6. Fermentaciones	66

Anexo D.7. Determinación de concentraciones de bioetanol del proceso de fermentación...	67
Anexo D.8. Envío de muestras al laboratorio de isótopos ambientales para determinación de $\delta^{13}\text{C}$ en la fracción de bioetanol	68

Índice de gráficos

Gráfico 1. Concentraciones de bioetanol obtenidas en los 14 tipos de fermentación	23
Gráfico 2. Abundancias naturales de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) obtenidas en los 14 tipos de fermentación	26
Gráfico 3. Contribución parcial de lignocelulosas a la fermentación de glucosa proveniente de dos sustratos distintos.....	28
Gráfico 4. Energía y desarrollo económico.....	47
Gráfico 5. Curva de calibración área, según porcentaje volumen-volumen de etanol en solución	59

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Esquema general de la producción de bioetanol de segunda generación	2
Ilustración 2. Vista macroscópica de la matriz lignocelulósica	4
Ilustración 3. Efecto del pretratamiento en materiales lignocelulósicos.....	5
Ilustración 4. Modelo de acción de la hidrólisis enzimática	7
Ilustración 5. Red metabólica de la fermentación producida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Ilustración 6. Resumen de la metodología utilizada en el desarrollo de la memoria	15
Ilustración 7. Posiciones de los carbonos en la molécula de glucosa y sus distribuciones en los productos de fermentación	37
Ilustración 8. Reducción de tamaño de partículas de rastrojos de trigo.....	61
Ilustración 9. Preparación de placas Petri para siembra con hongos de pudrición blanca (HPB)..	61
Ilustración 10. Preparación de tubos de ensayo para ser inoculados con hongos de pudrición blanca (HPB)	62
Ilustración 11. Proceso de preparación de rastrojo de trigo molido y matraces Erlenmeyer	63
Ilustración 12. Inoculación matraces Erlenmeyer con hongos de pudrición blanca (HPB).....	64
Ilustración 13. Proceso de sacarificación	65
Ilustración 14. Proceso de cuantificación de concentraciones de glucosa	66
Ilustración 15. Dilución fases líquidas de sacarificaciones.....	66
Ilustración 16. Preparación de fermentaciones.....	67
Ilustración 17. Determinación de concentraciones de bioetanol.....	67
Ilustración 18. Envío de muestras al Laboratorio de Isótopos Ambientales de la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá.....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentajes de celulosa, lignina y hemicelulosa en rastrojos de trigo-rastrojos de maíz-residuos de eucalipto.....	5
Tabla 2. Diversos métodos de pretratamiento de materiales lignocelulósicos.....	5
Tabla 3. Principales reactivos utilizados.....	13
Tabla 4. Principales equipos utilizados.....	14
Tabla 5. Principales materiales de laboratorio utilizados.....	14
Tabla 6. Lista de materiales lignocelulósicos pretratados utilizados en la memoria.....	15
Tabla 7. Fermentaciones llevadas a cabo.....	20
Tabla 8. Resultados test ANOVA en conjunto con Tukey-Kramer para los rendimientos obtenidos de bioetanol.....	25
Tabla 9. Resultados test Kruskal-Wallis en conjunto con Dunn-Sidak para los valores obtenidos de $\delta^{13}\text{C}$	27
Tabla 10. Resultados test Kruskal-Wallis en conjunto con Dunn-Sidak para los valores obtenidos de porcentajes de contribución de las lignocelulosas.....	29
Tabla 11. Comparación entre valores obtenidos de fermentaciones individuales, aquellos valores que se esperarían de la fermentación de mezclas, y los valores medidos finalmente.....	35
Tabla 12. Pérdida de humedad rastrojo de trigo.....	50
Tabla 13. Control de humedad durante proceso de incubación de rastrojos de trigo en matraces Erlenmeyer.....	51
Tabla 14. Proceso de secado de matraces Erlenmeyer post-período de incubación.....	52
Tabla 15. Factores de humedad de los residuos lignocelulósicos pretratados.....	52
Tabla 16. Cantidades obtenidas de fase líquida luego de la sacarificación.....	53
Tabla 17. Valores de absorbancia utilizados para la cuantificación de glucosa.....	55
Tabla 18. Valores de concentración de glucosa obtenidos tras la sacarificación.....	57
Tabla 19. Selección de fases líquidas para las fermentaciones.....	58
Tabla 20. Cantidades de fase líquida obtenidas del proceso de fermentación.....	58
Tabla 21. Diluciones hechas para la curva de calibración.....	59
Tabla 22. Valores p obtenidos del test de Shapiro-Wilk.....	60
Tabla 23. Resultados test ANOVA, rendimientos de bioetanol.....	60
Tabla 24. Resultados test Kruskal-Wallis, abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$).....	60
Tabla 25. Resultados test Kruskal-Wallis, contribución parcial de lignocelulosas.....	60

Abreviaturas

AEM.....	Agar extracto de malta.
CIBYB.....	Centro de Excelencia Académica en Ingeniería Bioquímica y Biotecnología.
CNE.....	Comisión Nacional de Energía.
CONAMA	Comisión Nacional del Medio Ambiente.
CORFO	Corporación de Fomento de la Producción.
ENRC	Energías Renovables No Convencionales.
GEI.....	Gases de efecto invernadero.
HPB.....	Hongos de pudrición blanca.
MATLAB®	Laboratorio de matrices.
OECD.....	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.
SERNAGEOMIN	Servicio Nacional de Geología y Minería.
HFS	Hidrólisis y fermentación separadas.
SFS	Sacarificación y fermentación simultáneas.
¹² C.....	Isótopo estable Carbono 12.
¹³ C.....	Isótopo estable Carbono 13.
¹⁴ C.....	Isótopo estable Carbono 14.
¹³ CO ₂	Molécula de Dióxido de Carbono con isótopo Carbono 13.
δ ¹³ C.....	Expresión del contenido relativo de ¹³ C de una muestra.
x(%)..	Fracción de bioetanol con origen de una de las fuentes de glucosa en el medio de fermentación.
δ _S	Valor de δ ¹³ C de la muestra.
δ _{C4}	Valores de δ ¹³ C de bioetanol producidos durante fermentaciones de medios de origen C4.
δ _{C3}	Valores de δ ¹³ C de bioetanol producidos durante fermentaciones de medios de origen C3.

Parte I

Capítulo I. Antecedentes generales y motivación

El actual escenario energético del planeta no se presenta de manera favorable. Frente a la necesidad de países de lograr un crecimiento vertiginoso hacia el desarrollo, y la mantención de potencias en su estatus económico, el hombre ha terminado abusando del consumo de fuentes de energía no renovable, así por ejemplo, en el año 2008 la fuente primaria de energía estuvo asociada al consumo de fuentes fósiles en un 81% a nivel mundial [1].

La consecuencia de estos actos se ha traducido en una mayor liberación de gases que contribuyen a acentuar el efecto invernadero. Chile lamentablemente no ha estado exento de esto último y se ha convertido en uno de los países occidentales con mayores emanaciones de gases durante la pasada década [2]. Datos indican que el crecimiento experimentado por el país, expresado como el producto interno bruto, ha estado asociado a un gran consumo energético, lo que se traduce en un grave problema cuando no existe una diversificación de la matriz energética. Hacia el año 2010, más del 60% de generación de energía proviene de la mano de combustibles de origen fósil (ver anexo A.1.) [3].

La contaminación, el consumo indiscriminado de combustibles fósiles y la necesidad de diversificar la matriz energética llevan a plantearse nuevas formas de generar combustibles que sean más inocuos con el medio ambiente y permitan un desarrollo de las naciones de manera sustentable. Es en este punto que los biocombustibles se vuelven determinantes.

Los biocombustibles se definen como cualquier combustible que derive de organismos recientemente vivos o de sus desechos metabólicos, y que puedan sustituir parte del consumo de combustibles fósiles tradicionales en forma sustentable [4]. Se destacan el biodiesel, el biogás, y el bioetanol, los cuales sustituyen al diesel, gas y gasolinas, respectivamente.

Dentro de los tipos de producción de bioetanol se distinguen dos ramas, la producción de bioetanol de primera y de segunda generación. El bioetanol de primera generación corresponde a la utilización directa de cosechas de maíz y caña de azúcar para la generación del biocombustible. Brasil y Estados Unidos son líderes en esta materia con producciones a nivel mundial de 23,9 millones de [m³] y 40,6 millones de [m³] respectivamente en el año 2009 [5]. Su mayor fortaleza como países productores recae en la amplia superficie que poseen para su cultivo y las condiciones naturales de rendimiento que presentan el maíz y la caña de azúcar [6]. Países que no posean esta ventaja competitiva, tales como Chile, se ven en dificultades por lo que deben buscar nuevas alternativas de producción. Debido a la carencia de esta ventaja, surge la disputa por la utilización de suelos para la producción de biocombustibles o producción de alimentos, siendo insostenible al momento de abastecer una demanda de combustibles ya sea a nivel nacional o internacional [6].

Se alzan como respuesta a la disyuntiva planteada los biocombustibles de segunda generación. La principal característica de este tipo de biocombustible recae en la utilización de residuos de las industrias agrícolas y forestales. Trabajar con residuos hace posible que no se entre en conflicto con las fuentes destinadas a la alimentación [7]. Además, se disminuye la generación de gases de efecto invernadero por la quema de estos residuos [1].

Otro nombre que reciben estos residuos agrícolas y forestales corresponde a la denominación de fuentes lignocelulósicas [7]. Estas fuentes, como describe su nombre, son sustratos compuestos principalmente por lignina, hemicelulosa y celulosa. Las tres representan a grandes polímeros, destacándose principalmente la celulosa debido a la presencia de monómeros de glucosa.

Para poder utilizar estos residuos lignocelulósicos es necesario someter el material a un pretratamiento debido a que los microorganismos que producen bioetanol a través de fermentaciones requieren de la disponibilidad de glucosa en el medio de cultivo [5]. Es por esto último que se deben desorganizar la estructura de lignina y la hemicelulosa para poder acceder a la celulosa, y a partir de ahí, degradarla hasta obtener los monómeros de glucosa.

Existen muchos pretratamientos para poder lograr el acceso a la celulosa, se destacan los procedimientos físicos, químicos, físico-químicos, y biológicos. Cada uno con sus ventajas y desventajas, las cuales se resumen principalmente en el tiempo que requieren para su acción efectiva y los costos energéticos involucrados [5], [7]. Ejemplos: Físicos: destrucción mecánica, pirólisis; Físico-Químico: explosiones a vapor, explosión con Dióxido de Carbono (CO₂); Biológicos: uso de hongos de pudrición blanca (HPB); Químicos: utilización de ácidos concentrados y diluidos. El principal objetivo de todos estos métodos es aumentar el área de contacto entre las enzimas celulolíticas y la celulosa para descomponer la estructura del polímero [5].

Posterior a la obtención de la celulosa, es necesario que su estructura sea degradada para que el microorganismo en cuestión logre acceder a la glucosa. En este punto intervienen las enzimas celulolíticas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática. Tres tipos de enzimas se requieren, endonucleasas, exonucleasas y β -glucosidasas [5], [7].

Concluida la última etapa, es posible pensar en la generación de bioetanol utilizando un microorganismo fermentador. En general, se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que posee la virtud de hacer un proceso biológico de oxidación incompleta en el cual fuentes de carbono, como la glucosa, son transformados principalmente en bioetanol y energía. Para esto último se requiere de un ambiente en ausencia de oxígeno [5].

Se puede sintetizar todo en el siguiente esquema general:

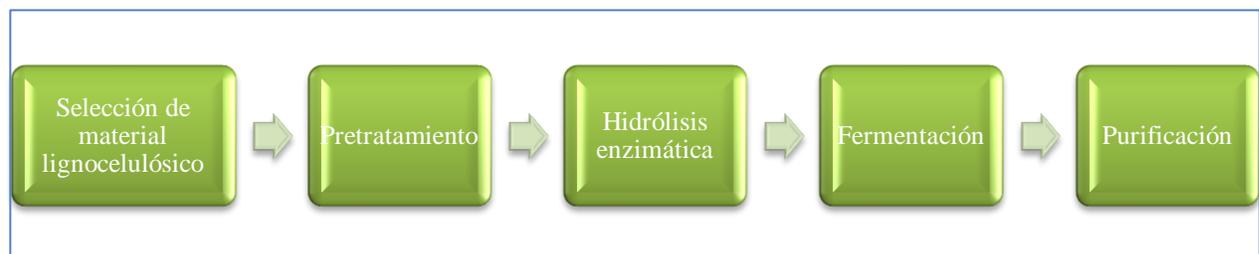


Ilustración 1. Esquema general de la producción de bioetanol de segunda generación.

El proceso de obtención de bioetanol es conocido y ya ha sido aplicado en estudios anteriores [5, 7, 8]. La interrogante que aparece en esta etapa nueva es con respecto a la mezcla de residuos lignocelulósicos y la posible existencia de sinergias, competencias, interferencias, inhibiciones, etc. Si bien no se han encontrado estudios concluyentes del tema, se hace necesario indagar con respecto a esta materia debido a las posibilidades de aumentar las fuentes

productoras de bioetanol (Apuntar hacia la diversificación). Tomando en cuenta a Chile, con mayor razón esta posibilidad debe ser explorada, sobre todo considerando la diversidad climática y los distintos residuos obtenidos de la industria agrícola-forestal [9].

Lo anterior por sí solo puede ser de gran utilidad desde una perspectiva de rendimientos en la producción de bioetanol a partir de las mezclas, pero no lo sería si se quisiera averiguar la ponderación de cada sustrato en la elaboración. En otras palabras, de qué manera aporta cada material lignocelulósico al rendimiento global. Ante esta necesidad, se plantea la utilización de isótopos estables de carbono como herramienta de análisis.

Estudios basados en el uso de isótopos estables son aplicables a procesos como la fermentación alcohólica, dada las diferencias en las razones de isótopos estables de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de las distintas lignocelulosas potencialmente utilizables. Estas diferencias son dependientes de la abundancia relativa de ^{12}C y ^{13}C en la naturaleza, denominada “abundancia natural” y ocurren como resultado de la discriminación diferida en contra de ^{13}C en los diferentes pasos de las vías metabólicas, respondiendo a la naturaleza conservativa del carbono en la medida que es incorporado en la cadena trófica [10].

El origen de contrastes en los contenidos de ^{13}C de las lignocelulosas de diversa naturaleza se remonta a la existencia de diferencias en las abundancias naturales de ^{13}C en las plantas que le dieron origen, las cuales presentan distintos tipos de metabolismo (C3 o C4). Esto se debe al hecho que las plantas C3 (ciclo de Calvin, ejemplo: trigo, eucalipto), a diferencia de las plantas C4 (Ciclo de Hatch-Slack, ejemplo: maíz), presentan una discriminación isotópica más fuerte contra $^{13}\text{CO}_2$ presente en la atmósfera durante la etapa de carboxilación de la fotosíntesis, determinando un empobrecimiento en el contenido de ^{13}C en los tejidos de las plantas C3 con respecto a las plantas del tipo C4. La consecuencia de este evento es que las composiciones isotópicas de los tejidos de plantas C3 o C4 y por tanto los residuos lignocelulósicos derivados de su cultivo, difieren y por tanto es posible utilizar un marcaje natural, para determinar el destino de una determinada fuente de materia orgánica en un sistema [9].

Existen diversos estudios en los que se han hecho experiencias con determinación de abundancias relativas de isótopos estables de ^{13}C . Entre los más representativos y que han podido desplegar mejor la capacidad de la técnica de abundancia natural de isótopos se destacan: El estudio de J. Freitas, et al. [11] que presenta una evaluación del uso de isótopos estables de carbono para distinguir el metano originado entre gasolina y biodegradación de etanol. En otras palabras buscar que agente, gasolina o la biodegradación de etanol aportaba más en la generación de metano en espacios confinados [11]. Y el estudio de D. Weber, et al. [12] que presenta la obtención de correlaciones para determinar la posible contaminación de vinos con ingredientes ajenos a su producción y rastrear que componentes se están utilizando para adulterarlos [12]. En ambos estudios se está haciendo una analogía de la experiencia propuesta.

Con estos antecedentes, el bioetanol podría ser estudiado para determinar las contribuciones de distintos residuos lignocelulósicos.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Material lignocelulósico

La madera y otros materiales lignocelulósicos están formados principalmente por 3 estructuras poliméricas: celulosa, lignina y hemicelulosa [13]. La celulosa es un polímero lineal y altamente ordenado de celobiosas (D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranososa i.e. 2 glucosas unidas) que representa aproximadamente sobre el 50% del peso de la madera. La lignina por el contrario asemeja una red tridimensional constituida en base a alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico), es altamente resistente a la degradación biológica-química, y confiere resistencia mecánica a la madera [14]. La mayor concentración de este polímero inflexible se encuentra en la lamela media donde actúa como un cemento entre fibras, pero también está presente en las capas de la pared celular (especialmente de la pared celular secundaria) formando junto con hemicelulosas una matriz amorfa en la que las fibrillas de celulosa están incrustadas y protegidas contra la biodegradación. El tercer y último componente principal, hemicelulosa, tiene un grado intermedio de complejidad y se compone de diferentes residuos de pentosas y hexosas, los cuales están a menudo acetilados y en general formando cadenas ramificadas [14]. La ilustración 2 presenta una vista general de los 3 polímeros y su ordenamiento en los residuos lignocelulósicos.

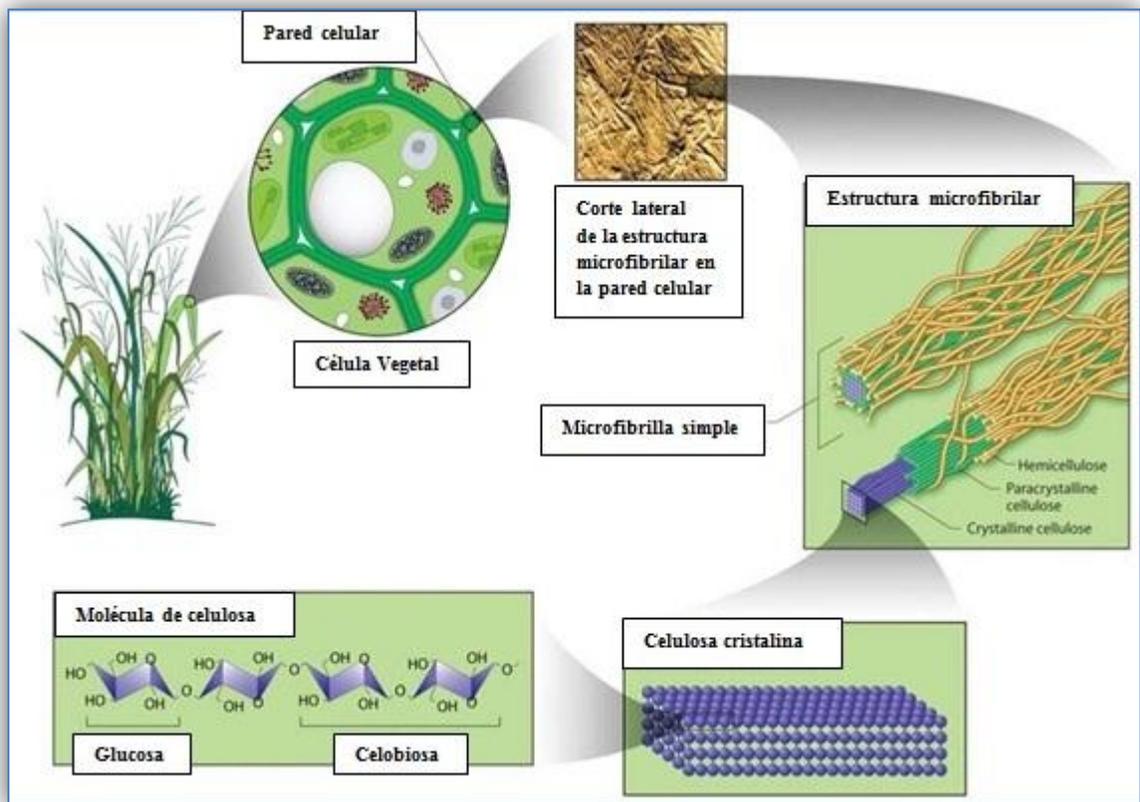


Ilustración 2. Vista macroscópica de la matriz lignocelulósica [15]. Se aprecia la estructura cristalina de celulosa incrustada entre la matriz hemicelulosa-lignina y como se distribuye en la planta.

Dependiendo del tipo de material lignocelulósico, estos se pueden componer de diversos porcentajes de celulosa, lignina, y hemicelulosa. La tabla 1 resume sus porcentajes en relación al rastrojo de trigo, rastrojo de maíz, y residuos de eucalipto:

Tabla 1. Porcentajes de celulosa, lignina y hemicelulosa en rastrojos de trigo-rastrojos de maíz-residuos de eucalipto, % peso seco [16], [17].

Lignocelulosa	% de celulosa	% de lignina	% de hemicelulosa
Rastrojo de trigo	30	15	25
Rastrojo de maíz	45	15	35
Residuo de eucalipto	45	31,3	19,2

2.2. Pretratamientos y hongos de pudrición blanca (HPB)

Superar la recalcitrancia (resistencia a la descomposición de la pared celular) de los materiales lignocelulósicos es una de las claves en la producción de biocombustibles. Esta característica se debe a la estructura cristalina de celulosa que se encuentra incrustada en la matriz de polímeros de lignina y hemicelulosa. El objetivo principal del pretratamiento de materiales lignocelulósicos (ilustración 3) es eliminar esta recalcitrancia para separar la celulosa de la matriz de polímeros y hacer que esté más accesible para una posterior hidrólisis enzimática. Estudios hechos con anterioridad demuestran que el pretratamiento puede aumentar el rendimiento de obtención de azúcares por sobre un 90% de la cantidad teórica [18].

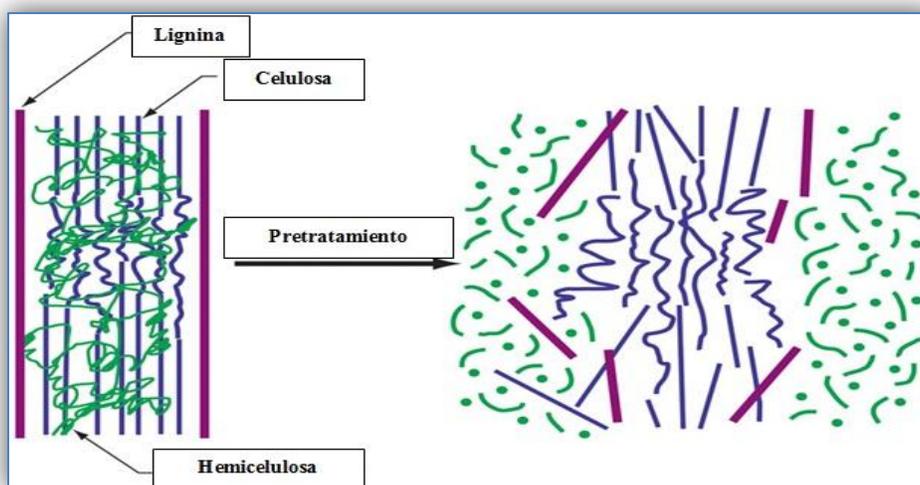


Ilustración 3. Efecto del pretratamiento en materiales lignocelulósicos [19]. La matriz de hemicelulosa y lignina es destruida para exponer la celulosa.

Las opciones de pretratamientos son variados, teniendo sus características a favor y en contra:

Tabla 2. Diversos métodos de pretratamiento de materiales lignocelulósicos, pros y contras [5], [7].

Método	Ejemplos	Característica a favor	Característica en contra
Físico	Destrucción mecánica, Pirólisis	Destruyen estructuras poliméricas que rodean a la celulosa	Requieren muchas repeticiones para ser óptimo y consumo energético elevado

Método	Ejemplos	Característica a favor	Característica en contra
Físico-Químicos	Explosiones a vapor, explosión con CO ₂	Gran nivel de fraccionamiento	Temperaturas elevadas (160-260 [°C]) y presiones de 0,69 – 4,83 [MPa]
Químicos	Organosolv	Gran nivel de fraccionamiento	Temperaturas y presiones inferiores a 200 [°C] y 0,2 [MPa]. Gran consumo de energía
Biológicos	Hongos de pudrición blanca	Baja cantidad de energía requerida	Largo tiempo de incubación

2.2.1. Hongos de pudrición blanca (HPB)

Los Basidiomycota, uno de los dos grandes Phylum (el otro corresponde a los Ascomycota), son los principales descomponedores de madera debido a su habilidad para degradar o modificar lignina mediante un proceso enzimático, se clasifican principalmente por aspectos macroscópicos en los tipos de pudrición blanca y pudrición café. Pueden superar las dificultades de la descomposición de la madera, incluyendo los bajos contenidos de nitrógeno y la presencia de compuestos tóxicos o antibióticos [14].

Las enzimas oxidativas extracelulares (oxidorreductasas) secretadas por estos hongos están involucradas en la degradación de los componentes de la pared celular. Los Basidiomycota de pudrición blanca (organismos que pudren madera con mayor frecuencia) se destacan por su habilidad para degradar selectivamente o simultáneamente lignina, hemicelulosa y celulosa, entregando como producto un material blanco enriquecido con unidades de celulosa [14]. Como ejemplos de Basidiomycota de pudrición blanca se pueden citar: *Ganoderma applanatum* [20], *Lentinus edodes* [21], *Stereum hirsutum* [22].

2.3. Sacarificación e hidrólisis enzimática

La sacarificación es el término que se le da a la etapa en la cual las moléculas de celulosa son desarticuladas en sus unidades básicas de glucosa. Para realizar este proceso se puede aplicar la hidrólisis ácida o la hidrólisis enzimática [23].

En la hidrólisis ácida se utilizan diversas clases de ácidos (concentrados/diluidos), incluyendo los tipos sulfuroso, sulfúrico, clorhídrico, fluorhídrico, fosfórico, nítrico y fórmico [24].

Procesos que involucran la utilización de ácidos concentrados operan a bajas temperaturas y tienen rendimientos elevados (e.g. 90% del rendimiento teórico de obtención de glucosa), pero presentan inconvenientes por los problemas causados debido a la corrosión de equipos y por la utilización de energía en la recuperación de ácidos [24]. Al contrario de lo que ocurre con los ácidos concentrados, los ácidos diluidos poseen a su haber el bajo consumo durante la operación de sacarificación. Sin embargo, requieren de temperaturas elevadas para lograr rendimientos aceptables de conversión de celulosa en glucosa lo que trae como costo una corrosión de los equipos [24]. Tanto el proceso de hidrólisis con ácido diluido como concentrado no requieren de una etapa de pretratamiento.

Por último, la hidrólisis enzimática es una reacción que se lleva a cabo utilizando enzimas como catalizadores para romper los enlaces glucosídicos de la celulosa. Presentan la ventaja de requerir temperaturas muchos menores lo que hace menos costosa la etapa [23]. Como inconveniente exhiben la necesidad de ser antecidos por una etapa de pretratamiento para lograr rendimientos aceptables de glucosa [24].

2.3.1. Hidrólisis enzimática

El sistema consiste de 3 enzimas que actúan sinérgicamente: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Las endoglucanasas actúan sobre la celulosa causando cortes al azar, liberando glucosas y xilo-oligosacáridos; las exoglucanasas actúan sobre celulosa microcristalina, impartiendo un ataque en el extremo no-reducido de la celulosa, liberando celobiosas. Finalmente las celobiosas son hidrolizadas por las β -glucosidasas a monómeros de glucosa. En la ilustración 4 se presenta un esquema de acción del conjunto de enzimas [25].

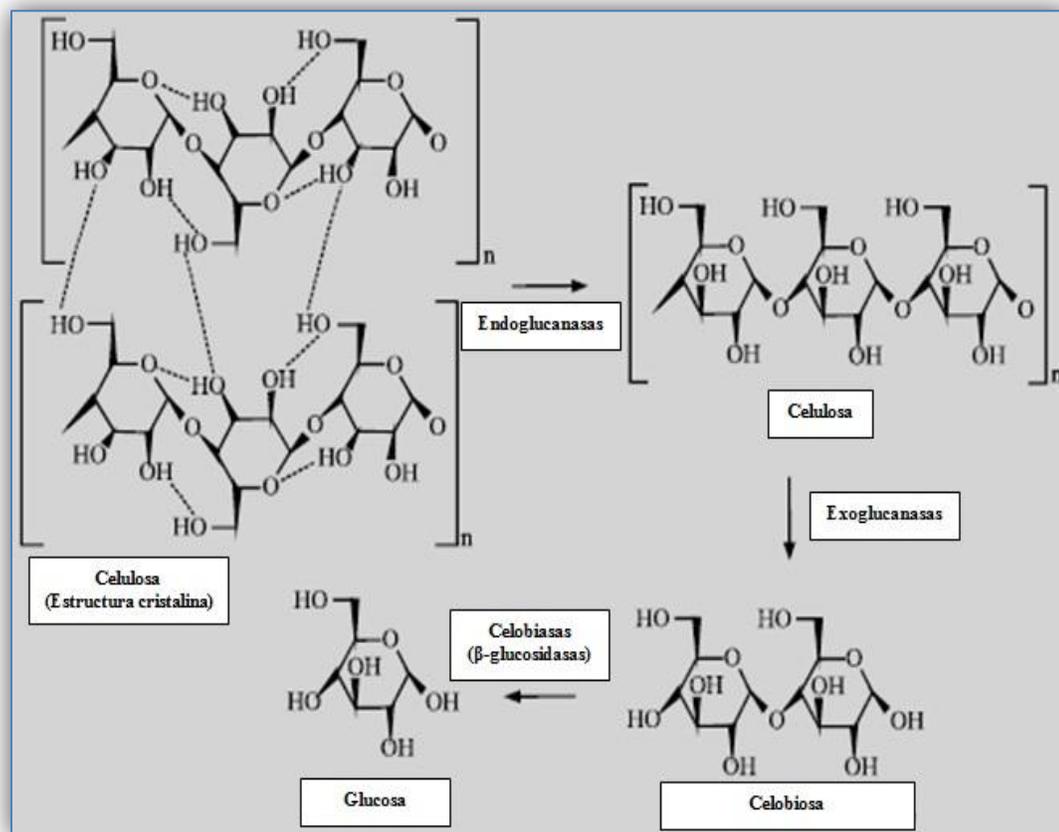


Ilustración 4. Modelo de acción de la hidrólisis enzimática. La estructura cristalina de celulosa es reducida por las endoglucanasas para dar origen a cadenas menores de celulosa las cuales serán desarticuladas a unidades de celobiosas por la acción de exoglucanasas, finalmente celobiosas (β -glucosidasas) hidrolizan celobiosas para dar como producto final glucosa [26].

2.4. Fermentación alcohólica

El término “fermentación” alude una forma de producción de energía a nivel de metabolismo microbiano, en el cual un sustrato orgánico se oxida de forma incompleta e hidratos de carbono actúan como aceptores de electrones [27].

La fermentación alcohólica es llevada a cabo por levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y algunos tipos de bacterias en condiciones anaeróbicas. Estos microorganismos convierten azúcares (e.g. glucosa) principalmente en bioetanol y CO₂. El proceso comienza una vez que la glucosa hace ingreso a la célula, luego es transformada en ácido pirúvico, el cual es convertido posteriormente en CO₂, bioetanol y energía (ATP) para la célula [28].

El proceso ha sido modelado y llevado a una representación gráfica como la mostrada a continuación por la ilustración 5 [29]:

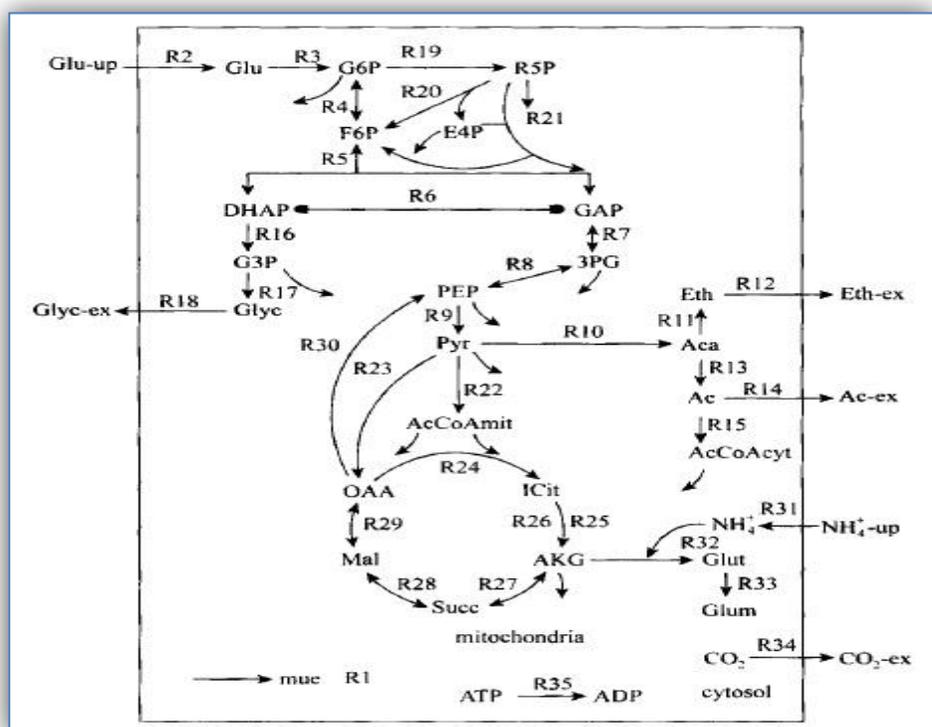
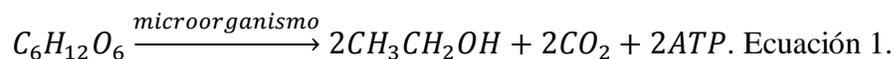


Ilustración 5. Red metabólica de la fermentación producida por *Saccharomyces cerevisiae*. La red se compone de 35 reacciones diferentes, las cuales pertenecen a la glicólisis, ruta de la pentosa fosfato, ciclo del ácido cítrico, y la ruta de asimilación de amonio. Las reacciones ocurren en las mitocondrias, citosol y el espacio extracelular. Se destacan los principales productos como el etanol y el dióxido de carbono [29].

La reacción química está dada por la siguiente ecuación [30]:



El proceso de fermentación se puede llevar a cabo junto con la sacarificación de forma separada (HFS) o simultáneamente (SFS). La ventaja de HFS es la posibilidad de realizar cada una de las etapas bajo condiciones óptimas, pero posee el inconveniente que los azúcares liberados durante el proceso de sacarificación inhiben a las enzimas hidrolíticas. Lo anterior no ocurre durante el proceso de SFS ya que la glucosa producida es consumida inmediatamente por el microorganismo fermentador (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*), lo que no inhibe a las β -glucosidasas. Como desventaja presenta que los elementos no pueden ser reciclados (las levaduras no podrán ser reutilizadas debido a que están mezcladas con residuos de lignina), y las condiciones no son las óptimas que se utilizarían para HFS [24].

La elección de uno u otro procedimiento va en función de los requerimientos de producción de bioetanol.

2.5. Isótopos de carbono y su aplicación a lignocelulosas

Los isótopos han jugado un rol histórico como herramientas de diagnóstico en experimentos realizados por el hombre. Desde el año 1960 muchas disciplinas han desarrollado instrumentos los cuales han ido madurando y se han vuelto cada vez más sofisticados en relación al uso de los isótopos estables [31].

$\delta^{13}\text{C}$ representa el valor obtenido de la razón de isótopos estables de una muestra determinada a la cual se le resta la razón de isótopos de un estándar internacional (Belemnita de Viena Pee-Dee (V-PDB), que tiene una razón de $\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$ equivalente a $1,1237 \cdot 10^{-2}$) [10]. Su cálculo se realiza según la siguiente ecuación:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left(\frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}_{\text{muestra}}} - \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}_{\text{estándar internacional}}}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}_{\text{estándar internacional}}}} \right) * 10^3. \text{ Ecuación 2.}$$

Cuando el valor de $\delta^{13}\text{C}$ es mayor a 0, la muestra contiene más isótopos pesados que la referencia y si $\delta^{13}\text{C}$ es menor a 0 hay menos isótopos pesados en la muestra en comparación con la referencia [9].

El rango de isótopos de carbono de la mayoría de los materiales de interés biológico va de un 0 a -100‰ (‰ = partes por mil, i.e. una fracción de mil) versus el estándar internacional. Esta variación es consecuencia de un fraccionamiento isotópico durante procesos físicos, químicos, y biológicos. El carbono inorgánico en agua de mar, agua dulce, y carbonatos está enriquecido en ^{13}C , y la composición isotópica de estos materiales está influida en gran manera por el intercambio de isótopos entre la atmósfera y la hidrosfera. En forma contraria, el carbono orgánico presenta bajas cantidades de ^{13}C como producto de un fraccionamiento isotópico biológico, el cual ocurre principalmente durante el proceso de fotosíntesis [31].

Las proporciones de isótopos de carbono ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C , que difieren en distintos materiales, pueden ser usadas para rastrear el carbono en el medio ambiente con el uso de la “abundancia natural” o de metodologías de marcaje [10]. Las técnicas de abundancia natural se basan en el hecho de que diferentes focos de carbono (yendo desde niveles moleculares a organismos y más allá) en el medio ambiente pueden tener diferentes razones de isótopos de

carbono [10]. Por ejemplo, el $\delta^{13}\text{C}$ (expresión del contenido de ^{13}C de una muestra con respecto a un estándar de referencia) de plantas C3 (e.g. trigo, eucalipto) posee rangos de -40‰ a -20‰, mientras que las plantas C4 (e.g. maíz) poseen rangos de -17‰ a -9‰. Estas diferencias se deben a la discriminación del ^{13}C en las distintas rutas metabólicas [10]. En plantas C3, durante la fotosíntesis el CO_2 es inicialmente fijado en un compuesto de tres carbonos llamado ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) en una reacción catalizada por la enzima RuBisCo, la mayoría de las plantas caen en esta clasificación. En plantas C4 durante el mismo proceso el CO_2 es fijado en un compuesto de cuatro carbonos (ácidos aspártico o málico) en una reacción catalizada por la PEP carboxilasa. Sólo un 1% de las plantas caen en esta clasificación, pero incluyen una cantidad importante de especies como el maíz y la caña de azúcar [10].

Aprovechando la inherente naturaleza conservativa del carbono como una señal a través de la cadena alimenticia, las diferencias de $\delta^{13}\text{C}$ pueden usarse para distinguir el origen del carbono en otra muestra. Es más, la mayor ventaja que presenta esta metodología corresponde a la posibilidad de realizar estudios con muestras recolectadas desde un sitio experimental. Sin embargo, para que sea exitoso el método se requiere que haya una diferencia significativa y consistente entre las muestras a medir (e.g. diferencias de rangos apreciables $\delta^{13}\text{C}$ de al menos 5‰) [10].

La segunda técnica, correspondiente al marcaje, permite la introducción de compuestos de carbono enriquecidos o empobrecidos de isótopos poco comunes (generalmente se usa ^{13}C o ^{14}C). El camino que recorre el compuesto, puede ser rastreado completamente, y analizado [10].

Ante las características de cada metodología, la segunda se ve superior que la primera debido a la especificidad que posee al momento de realizar ensayos. Pero se requiere de un equipamiento y recursos de mayor envergadura, se tienen que crear los compuestos de interés y a partir de ahí rastrearlos a medida que van avanzando en la cadena de eventos. En cambio, la primera tecnología posee la gran característica de poder analizar distintas muestras recolectadas de diferentes sitios (e.g. bioetanol de distintas fermentaciones), requiriendo una diferencia apreciable de valores de $\delta^{13}\text{C}$ que lignocelulosas como trigo, eucalipto y maíz cumplen. Esto último permite trazar una metodología para analizar las contribuciones de cada uno de los sustratos en la producción de bioetanol.

Capítulo III. Objetivos y alcances

3.1. Objetivo General

- Comparar los rendimientos de bioetanol y aportes parciales de distintos residuos lignocelulósicos (rastros de maíz, rastros de trigo y residuos de eucalipto) durante la fermentación de sus mezclas respectivas.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el rendimiento en bioetanol de los distintos residuos lignocelulósicos considerados (rastros de maíz, rastros de trigo y residuos de eucalipto) al ser fermentados en forma individual y en mezclas.
- Determinar el aporte de los distintos tipos de materiales presentes en la mezclas sobre el rendimiento de bioetanol mediante análisis de la abundancia relativa de isótopos estables de carbono en el producto final.

Parte II

Capítulo IV. Materiales y metodología

4.1. Materiales

4.1.1. Residuos lignocelulósicos

De los 3 residuos lignocelulósicos empleados en la memoria, el rastrojo de trigo era el único que no se encontraba pretratado. Su procedencia corresponde a ensayos de labranza de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

4.1.2. Residuos lignocelulósicos pretratados con anterioridad

Los rastrojos de maíz y residuos de eucalipto (pretratados previamente por hongos de pudrición blanca) fueron adquiridos a través de reservas pretratadas con anterioridad por la Ingeniera de la Madera Consuelo Fritz Fuentes. Estos residuos pertenecen al Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile.

4.1.3. Hongos de pudrición blanca (HPB)

Los hongos de pudrición blanca utilizados durante el proceso de pretratamiento correspondieron a aislados de las especies: *Ganoderma applanatum* (código: 117), *Lentinus edodes* (código: 147), y *Stereum hirsutum* (código: 168). Los cuales estaban disponibles en la micoteca perteneciente al Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile.

4.1.4. Enzimas

Las enzimas utilizadas en el proceso de sacarificación correspondieron a:

- Celulasas provenientes del hongo *Trichoderma reesei* (ATCC 26921), venta bajo nombre comercial Celluclast[®] 1,5L (C2730). $70 \left[\frac{FPU}{ml} \right]$ de actividad enzimática.
- Celobiasas provenientes del hongo *Aspergillus niger*, venta bajo nombre comercial Novozyme[®] 188 (C6105). $800 \left[\frac{CBU}{ml} \right]$ de actividad enzimática.

Ambas enzimas se obtuvieron del Laboratorio SIGMA-ALDRICH[®] a través del Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

4.1.5. Microorganismo fermentador

Para la fase de fermentación de azúcares se hizo uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Ethanol Red[®] (Red Star). Donación hecha por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS.

4.1.6. Reactivos utilizados

El siguiente recuadro presenta los principales reactivos utilizados durante el transcurso de la memoria y su influencia en determinados procedimientos.

Tabla 3. Principales reactivos utilizados*.

Reactivo	Marca	Procedimiento
Agar	Winkler	Siembra de hongos de pudrición blanca
Extracto de malta	BD	Siembra de hongos de pudrición blanca
CH ₃ COONa (Acetato de Sodio)	Winkler	Preparación de tampón 0,05 M y pH: 4,8
Tween [®] 20	Winkler	Sacarificación
Kit RANDOX GLUC-PAP	Randox	Medición de glucosa
Extracto de levadura	BD	Fermentación
NH ₄ H ₂ PO ₄ (Fosfato de Amonio)	Winkler	Fermentación
MgSO ₄ x7H ₂ O (Sulfato de Magnesio)	Winkler	Fermentación
Cloruro de Sodio (NaCl)	BD	Dilución levaduras
Etanol para análisis	Merck	Medición de bioetanol

* Se indica además en qué procedimientos intervinieron.

4.1.7. Equipos y materiales de laboratorio

A continuación se listan los principales equipos e instrumentos utilizados durante el transcurso de la fase experimental de la memoria.

Tabla 4. Principales equipos utilizados.

Equipo	Especificación
Maquina chipeadora	Marca: LASKI Spol. S.S.O, Modelo: KDO 90/12
Cámara de flujo	Marca: Bioair, Modelo: Aura Mini
Centrífuga	Marca: Eppendorf, Modelo: 5804 R
Cromatógrafo de gases	Marca: Perkin Elmer, Modelo: Clarus 500
Molino de cuchillas	Marca: Wiley Mill, Modelo: Model. #2, Arthur H. Thomas Co.
Homogenizador de chuchillas	Marca: Moulinex, Modelo: AR68
Espectrofotómetro de placas	Marca: Biochrom Asys, Modelo: UVM340
pH-metro	Marca: SCHOTT, Modelo: CG 843P
Balanza digital	Marca: Citizen, Modelo:MP-300G
Agitador orbital	Marca: Labtech, Modelo: LS1-3016 A
Estufa de secado	Marca: Heraeus
Autoclave	Marca: All American, Modelo: 25X-2
Refrigerador	Marca: Fensa, Modelo: NF 241 litros Advantage 7205 inox
Evaporador rotatorio	Marca: Büchi, Modelo: B-480 Waterbath
Cámara de incubación	Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270
Espectrómetro de masas	Marca: Thermo Finnigan MAT, Modelo: Deltaplus XL

Tabla 5. Principales materiales de laboratorio utilizados.

Materiales	Especificación
Placas Petri	Estándar
Sacabocado	Estándar
Tubos de ensayo	Estándar
Espátula	Estándar
Asa	Estándar
Probetas	0,2; 1 [L]
Jeringa Hamilton Gastight	10 [µL]
Vasos precipitados	0,1;0,25;1 [L]
Tubos Eppendorf	1,5; 2 [mL]
Tubos Falcon	15; 50 [mL]
Matraces Erlenmeyer	0,1; 0,25; 1 [L]
Pipetas de vidrio	5; 10; 20 [mL]
Micropipetas	20; 200; 1000, 5000 [µL]
Bureta	100 [mL]

4.2. Metodología

Previo a la explicación en detalle de la metodología aplicada en la memoria, se presenta una ilustración que resume de manera general los procedimientos.



Ilustración 6. Resumen de la metodología utilizada en el desarrollo de la memoria. Primero vino la elección de sustratos según los mejores pretratamientos en función de combinaciones hongo-tiempo, para luego sacarificarlos, y posteriormente fermentarlos (HFS) de manera individual o en forma de mezclas. Finalmente se hizo medición de la cantidad de bioetanol obtenida y la determinación de abundancia relativa de isótopos estables de ^{13}C en la fracción de bioetanol presente.

4.2.1. Selección de residuos lignocelulósicos pretratados

La primera acción correspondió a hacer una selección de los materiales lignocelulósicos pretratados por hongos de pudrición blanca (HPB) a utilizar. El criterio de elección fue en función del tipo de HPB que los hubiese pretratado y al tiempo de incubación que tuvieron que ser sometidos los residuos lignocelulósicos para lograr mayores rendimientos de azúcares [32]. La lista de materiales seleccionados se expone en la tabla 6.

Tabla 6. Lista de materiales lignocelulósicos pretratados utilizados en la memoria. Seleccionados según hongo de pudrición blanca (HPB) y el tiempo de incubación [33].

Material lignocelulósico	Hongo que lo pretrató	Período de incubación (días)
Rastrojo de trigo	<i>Ganoderma applanatum</i>	25
Rastrojo de trigo	<i>Lentinus edodes</i>	25
Rastrojo de maíz	<i>Ganoderma applanatum</i>	25

Material lignocelulósico	Hongo que lo pretrató	Período de incubación (días)
Rastrojo de maíz	<i>Lentinus edodes</i>	18
Residuo de eucalipto	<i>Ganoderma applanatum</i>	45
Residuo de eucalipto	<i>Stereum hirsutum</i>	60

De la lista exhibida solamente el rastrojo de trigo no se encontraba disponible, por lo que se hizo un pretratamiento utilizando *Ganoderma applanatum*, *Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum* durante un lapso de 25 días.

4.2.2. Reducción de tamaño rastrojo de trigo

Esta etapa fue realizada en el Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales, y en el Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Se hizo uso de una máquina chipeadora (Marca: LASKI Spol. S.S.O, Modelo: KDO 90/12) y posteriormente un molino de cuchillas (Marca: Wiley Mill, Modelo: Model. #2, Arthur H. Thomas Co.). Las partículas pasaron a través de tamices con un número de malla entre 2,5 y 3,5. El tamaño de partículas finalmente fue de 1 [mm] de espesor, 1 a 3 [mm] de ancho y 5 [mm] de largo [34]. En el Anexo D.1. se adjuntan imágenes del proceso.

4.2.3. Pretratamiento de rastrojo trigo con hongos de pudrición blanca (HPB)

El pretratamiento se dividió en dos etapas correspondientes a la inoculación de granos de trigo con HPB, y la posterior utilización de estos granos de trigo como vehículos de transporte de los HPB para ser introducidos en matraces Erlenmeyer con rastrojo molido de trigo en su interior e incubar por 25 días. Esta etapa fue realizada completamente en el Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

4.2.3.1. Inoculación de granos de trigo con hongo de pudrición blanca (HPB) de interés

El medio de cultivo Agar extracto de malta (AEM) se hizo con 2% p/v de agar y 2% p/v de extracto de malta. Primero se agregaron los 4 [g] de agar y los 200 [mL] de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 [mL], posteriormente se colocó la disolución en un evaporador rotatorio (Marca: Büchi, Modelo: B-480 Waterbath) para calentar a baño María. Una vez transparente se agregaron los 4 [g] de extracto de malta. El matraz se tapó y envolvió en papel aluminio para ser autoclavado (Marca: All American, Modelo: 25X-2) a 15 [psi] por 15 [min] [35].

Trabajando en la cámara de flujo (Marca: Bioair, Modelo: Aura Mini), placas Petri que fueron autoclavadas (Marca: All American, Modelo: 25X-2) a 15 [psi] por 15 [min] se les vertió el contenido del matraz con medio de cultivo AEM estéril mientras estaba caliente. Un total de 10 placas Petri fueron cargadas con medio AEM (3 para cada hongo, y una en caso de posible contaminación). Seguidamente se colocaron bajo luz ultravioleta por 10 [min] y se dejó solidificar el contenido.

El proceso de sembrado de placas Petri se ejecutó también bajo la cámara de flujo (Marca: Bioair, Modelo: Aura Mini) apoyándose en lo siguiente: se calentó un sacabocado, después que se enfrió se extrajo un bocado de una placa con el hongo de interés (*Ganoderma applanatum*, *Lentinus edodes*, *Stereum hirsutum*), a continuación con un asa se tomó el bocado y se colocó en una de las placas Petri con medio AEM. En total 3 placas por cada tipo de hongo fueron sembradas. Las placas se colocaron en la cámara de incubación (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270) a 25 [°C] durante 5 días.

Simultáneamente, un conjunto de granos de trigo se secaron en una estufa (Marca: Heraeus) a 105 [°C] por 24 [hrs]. Se obtuvo el factor de humedad de la muestra que correspondió a 1 [g] de grano de trigo peso seco equivalente a 1,11 [g] de muestra húmeda [35].

Luego, otro conjunto de granos de trigo estuvieron 24 [hrs] sumergidos en agua y pasaron por un proceso de secado a 105 [°C] por 24 [hrs]. Concluido este tiempo se molieron en un homogenizador de cuchillas (Marca: Moulinex, Modelo: AR68) para tener una mayor cantidad de área superficial expuesta cuando se inocularan los HPB.

En tubos de ensayo se agregaron 1,11 [g] de granos de trigo húmedo molido y 0,3 [mL] de agua destilada por la eventual pérdida de humedad durante el autoclavado. Se taparon los tubos de ensayo con algodón hidrofóbico y luego se colocaron en el autoclave (Marca: All American, Modelo: 25X-2) a 15 [psi] por 15 [min]. En total fueron 20 tubos de ensayo, 6 para cada tipo de hongo y 2 por medidas de contaminación [35].

Una vez terminado el proceso de autoclavado, se inocularon los tubos de ensayo con los HPB que se habían sembrado en placas Petri utilizando el sacabocado y el asa. A continuación se colocaron los tubos de ensayo en la cámara incubadora (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270) por el período de una semana a 25 [°C] (hasta que se detectó crecimiento de micelios). 6 tubos de ensayo fueron inoculados por cada tipo de hongo, y los otros 2 restantes siguieron siendo observados por posibles contaminaciones [35]. Imágenes de esta sección se pueden apreciar en el Anexo D.2.

4.2.3.2. Inoculación de matraces Erlenmeyer y período de pretratamiento con hongos de pudrición blanca (HPB)

En paralelo al proceso anterior, se hicieron pruebas de humedad al material lignocelulósico a pretratar (rastros de trigo). Se aplicó un tratamiento de secado en la estufa (Marca: Heraeus) por 24 [hrs] a 105 [°C] para obtener el factor de humedad de la muestra. Una vez calculado este factor de humedad, se colocaron 50 [g] de rastrojo de trigo base seca (55 [g] de rastrojo húmedo de trigo en este caso) en matraces Erlenmeyer de 1 [L] de capacidad, y el contenido de humedad se ajustó a un 85% base seca (se agregaron 42,5 [g] de agua destilada) [35]. Consultar Anexo B.1. para el ejemplo de cálculo.

Posteriormente los matraces Erlenmeyer se autoclavaron (Marca: All American, Modelo: 25X-2) a 15 [psi] por 20 [min]. En total fueron 9 matraces, 3 por cada tipo de hongo.

A continuación los matraces fueron inoculados con el contenido de los tubos de ensayo, y se colocaron en la cámara incubadora (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270) a 25 [°C] en completa oscuridad por 25 días [35]. La cantidad de agua fue controlada periódicamente, y la

pérdida de humedad se reponía con agua destilada autoclavada a través del uso de pipetas de vidrio estériles con algodón en la parte superior para evitar contaminación durante la toma de alícuotas de agua.

Una vez concluido el período de incubación, se subió la temperatura de la cámara a 45 [°C] (temperatura no óptima de pretratamiento) para detener el proceso y hacer un secado suave sin generar cambios químicos. Finalizada esta etapa, los contenidos de los matraces Erlenmeyer se vertieron en bolsas de papel y fueron almacenados.

En el Anexo B.2. se presentan seguimientos fecha a fecha de los matraces Erlenmeyer inoculados y su contenido de humedad durante el proceso de incubación. En el Anexo D.3. se adjuntan imágenes.

4.2.4. Sacarificación de residuos lignocelulósicos

Esta etapa fue realizada completamente en el Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile. Se dió comienzo con las mediciones de los factores de humedad de los residuos lignocelulósicos seleccionados (sección 4.2.1). Un gramo de cada tipo de residuo fue colocado en una placa Petri que luego se depositó en la estufa de secado (Marca: Heraeus) a 105 [°C] por 24 [hrs] (resultados en Anexo B.3.). A continuación se prepararon 38 tubos Falcon (50 [mL]) con el siguiente propósito de sacarificación:

- 7 tubos Falcon para rastrojo de maíz pretratado con *Ganoderma applanatum*.
- 7 tubos Falcon para rastrojo de trigo pretratado con *Ganoderma applanatum*.
- 7 tubos Falcon para residuo de eucalipto pretratado con *Ganoderma applanatum*.
- 7 tubos Falcon para rastrojo de maíz pretratado con *Lentinus edodes*.
- 5 tubos Falcon para rastrojo de trigo pretratado con *Lentinus edodes*.
- 5 tubos Falcon para residuo de eucalipto pretratado con *Stereum hirsutum*.

Cada uno de estos tubos Falcon contenía lo siguiente:

- 1 [g] peso seco de material lignocelulósico a sacarificar (utilizando el factor de humedad antes calculado).
- 29,8 [mL] de tampón Acetato de Sodio 0,05 M y pH: 4,8 (método de preparación en Anexo B.4.).
- 50 [μL] de Novozyme[®] 188, equivalentes a 40 [CBU] de carga enzimática.
- 36 [μL] de Celluclast[®] 1,5 L, equivalentes a 2,5 [FPU] de carga enzimática.

- 75 [μL] de Tween[®] 20.

En total 30 [mL] de solución por cada tubo Falcon. Para llevar a cabo la sacarificación, los 38 tubos Falcon se colocaron en un agitador orbital (Marca: Labtech, Modelo: LS1-3016 A) a 50 [°C] y 200 RPM por un período de 72 [hrs]. Se adjuntan imágenes del proceso en Anexo D.4.

4.2.5. Medición de glucosa

Etapa fue realizada en el Centro de Excelencia Académica en Ingeniería Bioquímica y Biotecnología (CIBYB) de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Concluido el proceso de sacarificación, los tubos Falcon fueron centrifugados bajo un régimen de 8228 g durante 5 [min] (Marca: Eppendorf, Modelo: 5804 R). La fase líquida se traspasó a un nuevo tubo Falcon de 50 [mL] y la fase sólida fue descartada. Cantidades obtenidas de fase líquida son descritas en el Anexo B.5.

Para la medición de glucosa se tomaron alícuotas de 50 [μL] por cada tubo Falcon con fase líquida y se trasladaron a tubos Eppendorf de 1,5 [mL] (38 tubos en total), seguidamente se completaron con 950 [μL] de agua destilada (1 [mL] de solución). Esto último correspondió a hacer diluciones de 20 veces con el propósito de obtener un valor cuantificable de absorbancia (por debajo de 1).

Una vez preparadas las diluciones se procedió a trabajar bajo el uso del kit RANDOX GLUC-PAP [34]. El Protocolo puede ser consultado en el Anexo B.6. y en Anexo D.5. las imágenes del proceso.

4.2.6. Fermentaciones

Esta etapa fue realizada completamente en el Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Una vez determinadas todas las concentraciones de glucosa se procedió a la fase de fermentación. En esta etapa se fermentaron las fases líquidas de la sacarificación en forma de mezclas o individualmente. El requisito correspondió a que todos los medios de fermentación debían presentar la misma concentración de glucosa inicialmente. Para esta memoria el valor de concentración de glucosa se fijó arbitrariamente en 2 [$\frac{g}{L}$] por cada medio, en consecuencia fueron seleccionadas las fases líquidas que presentaron concentraciones mayores o iguales para su posterior dilución y ajuste. En el Anexo B.8. Se presentan los tubos Falcon escogidos.

En la siguiente tabla se presentan los 14 tipos de fermentación que se hicieron. Los primeros 6 correspondieron a fermentaciones individuales de los medios sacarificados, los siguientes 8 a mezclas de medios sacarificados. En ambos casos las concentraciones de glucosa inicial corresponden a 2 [$\frac{g}{L}$]. Se hicieron 3 repeticiones de cada tipo de fermentación, dando un total de 42 unidades experimentales.

Tabla 7. Fermentaciones llevadas a cabo. Las primeras 6 correspondieron a fermentaciones individuales de los medios sacarificados, las siguientes 8 a mezclas de fases líquidas de sacarificaciones.

Fermentación	Sustrato	Hongo que lo pretrató	Sustrato	Hongo que lo pretrató
Individuales				
1	Trigo	<i>Ganoderma applanatum</i>	-	-
2	Trigo	<i>Lentinus edodes</i>	-	-
3	Maíz	<i>Ganoderma applanatum</i>	-	-
4	Maíz	<i>Lentinus edodes</i>	-	-
5	Eucalipto	<i>Ganoderma applanatum</i>	-	-
6	Eucalipto	<i>Stereum hirsutum</i>	-	-
Mezclas				
7	Maíz	<i>Ganoderma applanatum</i>	Trigo	<i>Ganoderma applanatum</i>
8	Maíz	<i>Ganoderma applanatum</i>	Trigo	<i>Lentinus edodes</i>
9	Maíz	<i>Lentinus edodes</i>	Trigo	<i>Ganoderma applanatum</i>
10	Maíz	<i>Lentinus edodes</i>	Trigo	<i>Lentinus edodes</i>
11	Maíz	<i>Ganoderma applanatum</i>	Eucalipto	<i>Ganoderma applanatum</i>
12	Maíz	<i>Ganoderma applanatum</i>	Eucalipto	<i>Stereum hirsutum</i>
13	Maíz	<i>Lentinus edodes</i>	Eucalipto	<i>Ganoderma applanatum</i>
14	Maíz	<i>Lentinus edodes</i>	Eucalipto	<i>Stereum hirsutum</i>

Seleccionados los tubos Falcon con medios líquidos de las sacarificaciones, se diluyeron las concentraciones de glucosa que contenían hasta lograr el valor de $2 \left[\frac{g}{L} \right]$ utilizando tampón de Acetato de Sodio 0,05 M y pH: 4,8.

Cada uno de los de los 42 tubos Falcon que se utilizaron para las fermentaciones contenía lo siguiente:

- 10 [mL] fase líquida de sacarificación diluida a $2 \left[\frac{g}{L} \right]$ de glucosa, en forma individual (10 [mL]) o mezcla (5 [mL] de un tipo de fase líquida sacarificada diluida, y 5 [mL] de otro).
- 9 [mL] de medio nutritivo compuesto de $0,008 \left[\frac{g}{mL} \right]$ de extracto de levadura, $0,001 \left[\frac{g}{mL} \right]$ de Fosfato de Amonio, $0,0001 \left[\frac{g}{mL} \right]$ de Sulfato de Magnesio, en agua destilada.
- 1 [mL] de inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Ethanol Red® (Red Star).

Para la preparación del inóculo se pesaron 0,09 [g] de levadura liofilizada cepa Ethanol Red® en un tubo Falcon de 50 [mL] y se agregó 30 [mL] de una solución Cloruro de Sodio (NaCl) 0,9% p/v. Posteriormente el tubo Falcon fue colocado en una cámara incubadora (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270) por 35 [min] a temperatura ambiente.

Finalizado el tiempo, se procedió a realizar 3 diluciones sucesivas.

Del tubo Falcon con 30 [mL] de solución de inóculo se tomaron 3 [mL] y agregaron junto con 27 [mL] de Cloruro de Sodio (NaCl) 0,9% p/v en un nuevo tubo Falcon (dilución 10^{-1}). Luego se tomaron 3 [mL] de la dilución 10^{-1} y agregaron junto con 27 [mL] de Cloruro de Sodio

(NaCl) 0,9% p/v para lograr la dilución 10^{-2} . A partir de la dilución 10^{-2} , se repitió dos veces la misma acción, se tomaron 3 [mL] y se agregan junto con 27 [mL] de Cloruro de Sodio (NaCl) 0,9% p/v para lograr un total de 60 [mL] de dilución 10^{-3} . A partir de la dilución 10^{-3} se tomó 1 [mL] por cada tubo Falcon para fermentación.

Una vez completado los contenidos de los tubos Falcon (20 [mL] de solución total), se colocaron en un agitador orbital (Marca: Labtech, Modelo: LS1-3016 A) a 40 [°C] y 200 RPM por un período de 72 [hrs]. Imágenes del procedimiento se pueden consultar en Anexo D.6.

4.2.7. Determinaciones de concentraciones de bioetanol

Esta etapa fue llevada a cabo en el CIBYB, y en el Laboratorio de Catálisis de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Finalizado el proceso de fermentación, los tubos Falcon se sometieron a un régimen de centrifugación de 3214 g durante un período de 30 [min] (Marca: Eppendorf, Modelo: 5804 R). A continuación las fases líquidas fueron recuperadas y trasladadas a nuevos tubos Falcon para mediciones de bioetanol y almacenamiento. 1,5 [mL] fueron trasladados a tubos Eppendorf de 2 [mL] para determinación de abundancia relativa de isótopos estables de carbono en la Universidad de Waterloo, Canadá. Las cantidades obtenidas de fase líquida se adjuntan en el Anexo B.9.

Para cuantificar la cantidad de bioetanol presente en las muestras se generó una curva de calibración en base a diluciones etanol-agua destilada (10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, y 0,01% v/v). En Anexo B.10. se adjuntan la tabla de diluciones y la curva de calibración obtenida.

La medición de bioetanol de las muestras y la generación de la curva de calibración se realizaron en un cromatógrafo de gases (Marca: Perkin Elmer, Modelo: Clarus 500) utilizando una Jeringa Hamilton Gastight Serie 1700 Modelo 1701RN de 10 [μL]. El proceso correspondió a inyectar dosis de 5 [μL] de muestras, con tiempos de retención de 2 [min]. El área de interés correspondió al peak registrado en el minuto 0,9 por el programa TotalChrom[®]. Se efectuaron un total de 78 mediciones. En el Anexo D.7. se adjuntan imágenes.

4.2.8. Determinaciones de abundancias relativas de isótopos estables de ¹³C

Muestras que fueron separadas en tubos Eppendorf de 2 [mL] de capacidad se empaquetaron y enviaron al Laboratorio de Isótopos Ambientales de la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá. Se adjuntan imágenes anexo D.8.

Los isótopos de carbono se analizaron mediante un sistema PT-GC-IRMS, el cual consiste de un Tekmar 3000, “Purge and Trap Concentrator” (Empresa Tekmar, Cincinnati, Ohio), un cromatógrafo de gases (Thermo Finnigan, San José, California, interface) operando a 940 [°C], y un espectrómetro de masas Deltaplus XL para mediciones de proporciones isotópicas (Thermo Finnigan MAT, Bremen, Alemania) [36].

4.2.8.1. Determinación de la contribución de cada residuo lignocelulósico

La determinación de la contribución de cada residuo lignocelulósico se calculó con la siguiente ecuación [37]:

$$x(\%) = \left(\frac{\delta_s - \delta_{C4}}{\delta_{C4} - \delta_{C3}} \right) * 100. \text{ Ecuación 3.}$$

Donde x corresponde a la fracción de bioetanol con origen de una de las fuentes de glucosa en el medio de fermentación; δ_s es el valor de $\delta^{13}\text{C}$ de la muestra; δ_{C4} y δ_{C3} son los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de bioetanol producidos durante fermentaciones de medios individuales, de fuentes de glucosa pertenecientes a residuos lignocelulósicos C4 y C3 respectivamente.

Parte III

Capítulo V. Resultados

5.1. Rendimientos de bioetanol

A continuación se exponen los rendimientos de bioetanol obtenidos en los 14 tipos de fermentación (tipos de fermentación corresponden al promedio de 3 fermentaciones de la misma clase). De esta sección en adelante se utilizará la abreviatura “Tipo de lignocelulosa-tipo de hongo de pudrición blanca que la pretrató” (e.g. Residuo de eucalipto-*G. applanatum*) para facilitar la lectura.

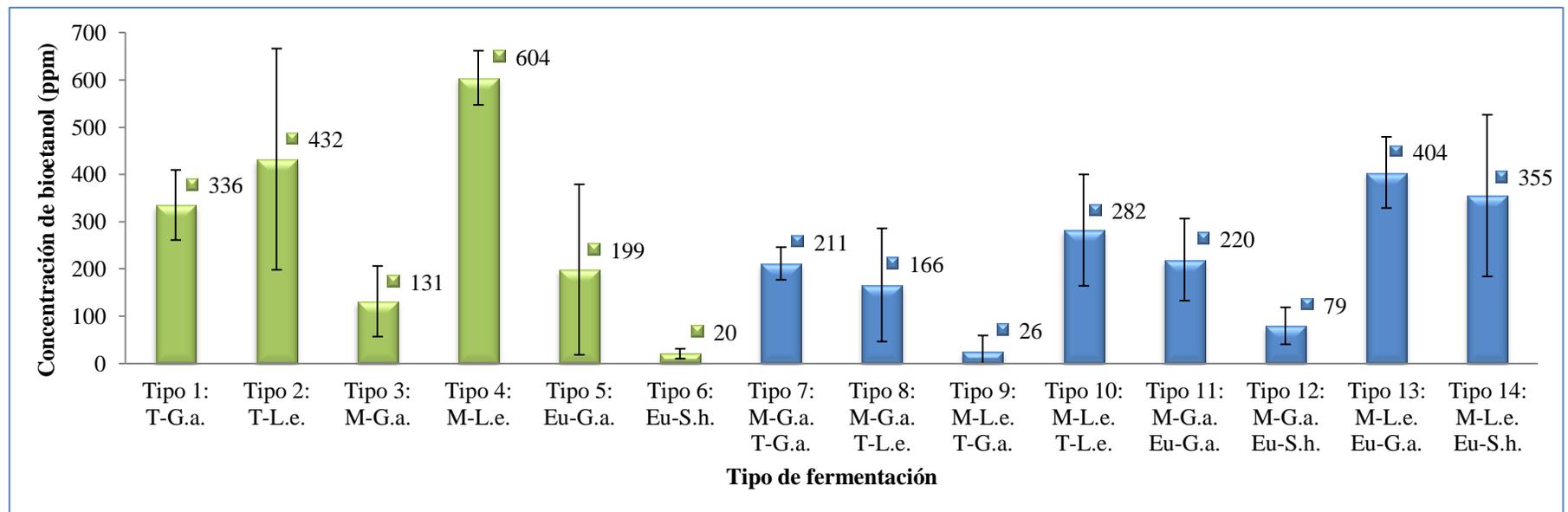


Gráfico 1. Concentraciones de bioetanol obtenidas en los 14 tipos de fermentación. Las barras verdes representan la fermentación de glucosa proveniente de un solo sustrato, y las barras azules la fermentación de glucosa proveniente de dos sustratos distintos. Se grafican las concentraciones de bioetanol en partes por millón (ppm) en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas ilustra el tipo de fermentación. Las barras negras indican la desviación estándar correspondiente a cada tipo de fermentación.

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.

G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

5.1.1. Resultados Análisis estadístico de rendimientos de bioetanol

El análisis estadístico, aplicado a los 42 rendimientos de bioetanol, correspondió al test ANOVA (análisis de varianzas) [38] para determinar diferencias significativas. Posteriormente fue posible separar las medias utilizando el test de Tukey-Kramer (con un nivel de significación $\alpha = 0,05$) [39].

En forma previa a la realización del test ANOVA, fue necesario verificar el cumplimiento de los siguientes requisitos [39]:

- Los tipos de fermentaciones (14 en total) son independientes entre sí.
- La distribución de cada tipo de fermentación es Normal. (Test de Shapiro-Wilk).
- La varianza de cada una de las distribuciones es la misma (homocedasticidad). (Test de Levene).

De los tres supuestos, los 42 rendimientos de bioetanol cumplían inmediatamente 2. La independencia entre sí de los tipos de fermentación (14 en total) y la distribución normal de los grupos. El supuesto de homocedasticidad no fue satisfecho. Por lo anterior, fue necesario aplicar una serie de transformaciones de los datos, tales como: elevar a distintos exponentes (rendimiento², rendimiento³, rendimiento^{0,5}), logaritmos de los rendimientos ($\log(\text{rendimiento})$), pero ninguno permitió satisfacer el requisito de homocedasticidad, solamente la siguiente transformación: $Y = \sqrt{\text{rendimiento}}$ [40].

A continuación se describen los test aplicados (post transformación de datos) y los resultados obtenidos del análisis estadístico a partir del programa "Laboratorio de matrices" MATLAB® (Versión 7.8.0.247 (R2009), 32 bits):

El primer supuesto (independencia) se cumplió debido a que las 42 fermentaciones se efectuaron de manera que no pudiesen influir unas a otras.

Para el segundo supuesto (distribución normal), se aplicó el test de Shapiro-Wilk [39]. Se ingresaron los datos transformados de cada uno de los rendimientos de bioetanol al programa, y como resultado se obtuvo una matriz en la que cada fila reflejaba los valores p obtenidos para rechazar o no la hipótesis nula. Como nivel de significancia se utilizó un valor de $\alpha = 0,001$ [39]. Los valores p de la tabla 22 (Anexo C.1.) fueron mayores al valor significativo α , por ello, se pudo afirmar que los resultados de cada tipo de fermentación siguieron una distribución normal de varianza y media desconocida, cumpliéndose así el segundo supuesto [39].

Para la verificación del tercer supuesto, se aplicó el test de Levene para la homogeneidad de varianzas. El resultado de este test entregó un valor p igual a 0,0545, que es levemente mayor que el nivel de significancia α (0,05) [39], por lo que se aceptó el test nulo de la igualdad de varianzas. Esto último permitió habilitar los datos para realizar el test ANOVA (con datos transformados). A partir de sus resultados, se concluyó que el nivel crítico ($4,7155 \cdot 10^{-6}$) asociado al estadístico F es menor que 0,05 [39], por lo que se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias y se aceptó que todas las medias comparadas no son iguales o existe al menos

una desigual. Posterior a este resultado, se aplicó el test de Tukey-Kramer [39] que arrojó los siguientes resultados (tabla 8):

Tabla 8. Resultados test ANOVA en conjunto con Tukey-Kramer para los rendimientos obtenidos de bioetanol. Las cruces indican entre que tipos de fermentación hay diferencias significativas en relación a las concentraciones de bioetanol producidas.

Tipo de fermentación/ Tipo de fermentación	T-G.a.	T-L.e.	M-G.a.	M-L.e.	Eu-G.a.	Eu-S.h.	M-G.a. T-G.a.	M-G.a. T-L.e.	M-L.e. T-G.a.	M-L.e. T-L.e.	M-G.a. Eu-G.a.	M-G.a. Eu-S.h.	M-L.e. Eu-G.a.	M-L.e. Eu-S.h.
T-G.a.						+			+					
T-L.e.						+			+			+		
M-G.a.				+										
M-L.e.					+	+		+	+			+		
Eu-G.a.														
Eu-S.h.										+			+	+
M-G.a. T-G.a.														
M-G.a. T-L.e.														
M-L.e. T-G.a.													+	+
M-L.e. T-L.e.														
M-G.a. Eu-G.a.														
M-G.a. Eu-S.h.														+
M-L.e. Eu-G.a.														
M-L.e. Eu-S.h.														

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.

G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

5.2. Abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$)

A continuación se presentan los resultados de las abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C obtenidos en los 14 tipos de fermentación (tipos de fermentación corresponden al promedio de 3 fermentaciones de la misma clase).

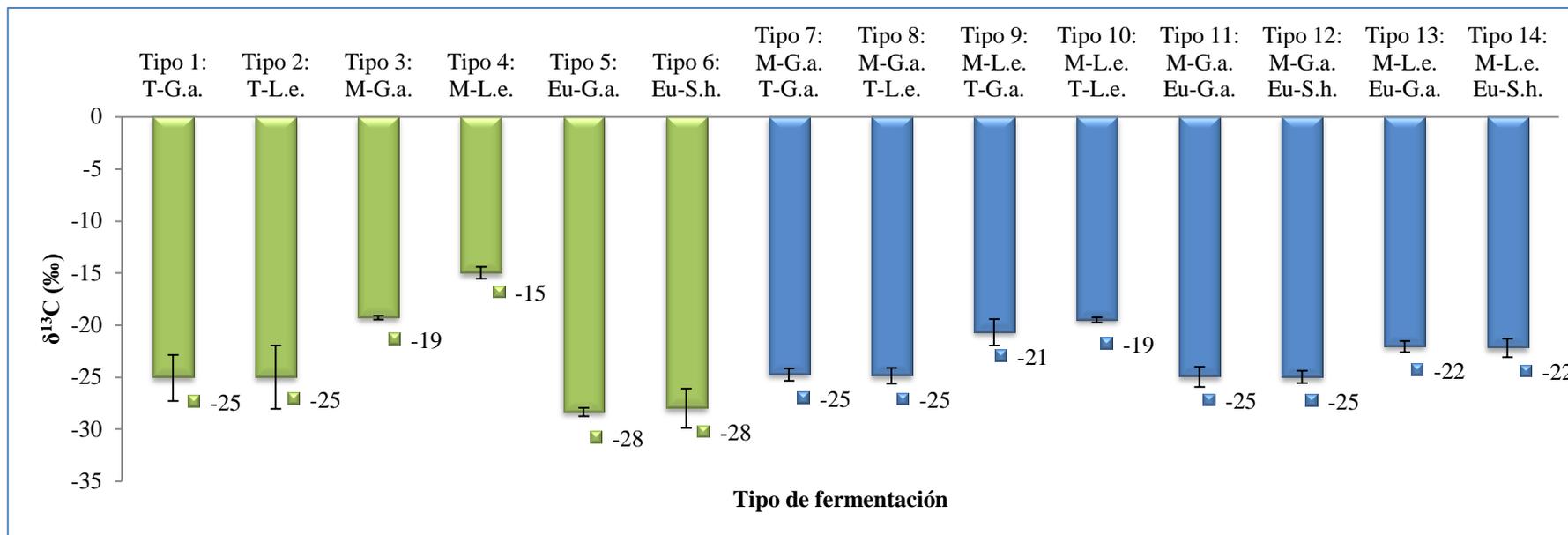


Gráfico 2. Abundancias naturales de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) obtenidas en los 14 tipos de fermentación. Las barras verdes representan la fermentación de glucosa proveniente de un solo sustrato, y las barras azules la fermentación de glucosa proveniente de dos sustratos distintos. Se grafican las abundancias naturales en partes por mil (‰) en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas ilustra el tipo de fermentación. Las barras negras indican las desviaciones estándares correspondiente a cada tipo de fermentación.

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.

G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

5.2.1. Análisis estadístico de datos de las abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$)

Para el caso de las abundancias naturales de isótopos estables de ^{13}C se aplicó una transformación de los datos obtenidos, del tipo: $\text{Arcoseno}\left(\sqrt{\frac{|\delta^{13}\text{C}|}{1000}}\right)$ [41]. Los resultados preliminares arrojaron que los datos cumplían con los primeros 2 supuestos del test ANOVA (i.e. Independencia de experiencias y presentar una distribución Normal de los tipos de fermentación), pero no cumplieron el requisito de homocedasticidad bajo ningún otro cambio de variable adicional (presentaron valores p inferiores al valor significativo en el caso del test de Levene). En consecuencia, fue necesaria la aplicación de tests no-paramétricos que permitiesen analizar los resultados obtenidos de las fermentaciones de forma simultánea y al mismo tiempo tuviesen requerimientos de menor holgura. Los métodos seleccionados correspondieron al test de Kruskal-Wallis [42], que cumple una función análoga al test ANOVA, y al test de Dunn-Sidak que a su vez es análogo del test de Tukey-Kramer [43]. Ambos tests se aplicaron usando el software MATLAB[®] (Versión 7.8.0.247 (R2009), 32 bits). Resultados de los tests en la tabla 9:

Tabla 9. Resultados test Kruskal-Wallis en conjunto con Dunn-Sidak para los valores obtenidos de $\delta^{13}\text{C}$. Las cruces indican entre que tipos de fermentación hay diferencias significativas en relación a los valores de $\delta^{13}\text{C}$.

Tipo de fermentación/ Tipo de fermentación	T-G.a.	T-L.e.	M-G.a.	M-L.e.	Eu-G.a.	Eu-S.h.	M-G.a. T-G.a.	M-G.a. T-L.e.	M-L.e. T-G.a.	M-L.e. T-L.e.	M-G.a. Eu-G.a.	M-G.a. Eu-S.h.	M-L.e. Eu-G.a.	M-L.e. Eu-S.h.
T-G.a.														
T-L.e.														
M-G.a.														
M-L.e.					+	+								
Eu-G.a.														
Eu-S.h.														
M-G.a. T-G.a.														
M-G.a. T-L.e.														
M-L.e. T-G.a.														
M-L.e. T-L.e.														
M-G.a. Eu-G.a.														
M-G.a. Eu-S.h.														
M-L.e. Eu-G.a.														
M-L.e. Eu-S.h.														

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.
G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

5.2.2. Contribución parcial lignocelulosas

A continuación se presentan las contribuciones parciales (expresado en %) de los distintos tipos de lignocelulosas al rendimiento total de bioetanol obtenido a partir de la fermentación de mezclas (i.e. medio de cultivo que contiene glucosa derivada de dos sustratos distintos, pretratados y sacarificados previamente). Estas contribuciones fueron calculadas utilizando la ecuación 3 y los valores de $\delta^{13}\text{C}$ del gráfico 2.

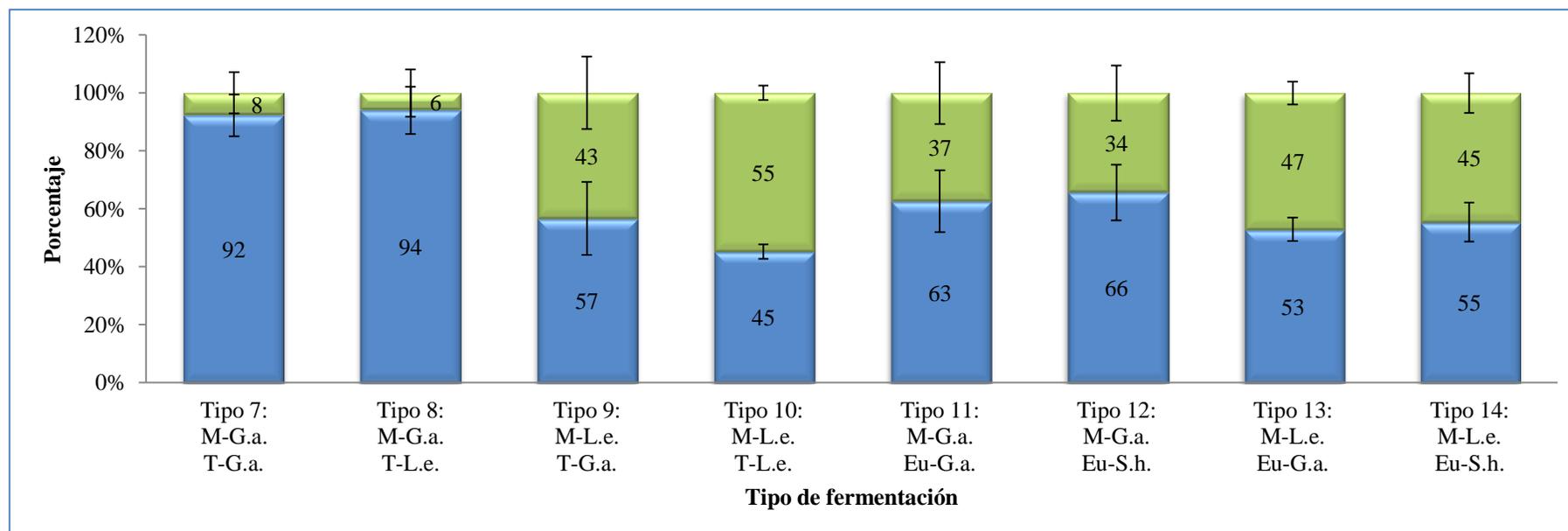


Gráfico 3. Contribución parcial de lignocelulosas a la fermentación de glucosa proveniente de dos sustratos distintos. Las barras verdes representan la contribución de plantas C4 (rastrojos de maíz), y las barras azules la contribución de plantas C3 (rastrojos de trigo o residuos de eucalipto). Se grafican los porcentajes de contribución en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas ilustra los tipos de fermentación. Las barras negras indican las desviaciones estándares correspondientes a cada tipo de contribución.

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.

G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

5.2.3. Análisis estadístico de datos de porcentajes de contribuciones

Para el caso de las contribuciones de lignocelulosas se aplicó un cambio de variable correspondiente a $\text{Arcoseno} \left(\sqrt{\frac{\% \text{ de contribución}}{100}} \right)$ [41]. Los resultados preliminares arrojaron que los datos cumplían con los primeros 2 supuestos del test ANOVA (i.e. Independencia de experiencias y presentar una distribución Normal de los tipos de fermentación), pero no cumplieron el requisito de homocedasticidad bajo ningún otro cambio de variable adicional (presentaron valores p inferiores al valor significativo en el caso del test de Levene). Como consecuencia se volvieron a usar los test no paramétricos Kruskal-Wallis (análogo a ANOVA), y test de Dunn-Sidak (análogo a Tukey-Kramer) [43]. Ambos tests se aplicaron usando el software MATLAB® (Versión 7.8.0.247 (R2009), 32 bits). Los resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados test Kruskal-Wallis en conjunto con Dunn-Sidak para los valores obtenidos de porcentajes de contribución de las lignocelulosas. Las cruces indican diferencias significativas de las contribuciones de plantas C3 de los tipos de fermentación. Los asteriscos revelan las diferencias significativas de las contribuciones de plantas C4 de los tipos de fermentación.

Tipo de fermentación/ Tipo de fermentación	M-G.a. T-G.a.	M-G.a. T-L.e.	M-L.e. T-G.a.	M-L.e. T-L.e.	M-G.a. Eu-G.a.	M-G.a. Eu-S.h.	M-L.e. Eu-G.a.	M-L.e. Eu-S.h.
M-G.a. T-G.a.				+				
M-G.a. T-L.e.				+				
M-L.e. T-G.a.								
M-L.e. T-L.e.								
M-G.a. Eu-G.a.								
M-G.a. Eu-S.h.								
M-L.e. Eu-G.a.								
M-L.e. Eu-S.h.								

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.

G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

Capítulo VI. Discusiones

6.1. Rendimientos de bioetanol

Al observar el gráfico 1 se desprende el hecho de que todas las fermentaciones presentaron distintos rendimientos de bioetanol, lo cual pone de manifiesto que ante diferentes medios de glucosa derivados de un solo sustrato o de dos sustratos diferentes, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Ethanol Red[®] (Red Star) no fue indiferente al momento de ser sometida a un proceso de fermentación. Esta situación no se puede atribuir directamente a cada uno de los rendimientos de azúcares fermentables en las etapas que anteceden al proceso de fermentación alcohólica, ya sea el pretratamiento con hongos de pudrición blanca (HPB) y las cantidades obtenidas de celulosa, o las condiciones de sacarificación aplicadas a las lignocelulosas (que fueron las mismas para todas) y las cantidades obtenidas de glucosa. Todos los rendimientos de cada una de las etapas y cómo podrían afectar a la generación de bioetanol se ven atenuados por las condiciones iniciales de fermentación, puesto que independiente de la cantidad de glucosa total obtenida, previamente se fijó en $2 \left[\frac{g}{L} \right]$ la concentración de glucosa en los caldos que fueron inoculados con levadura. Es por esto que se esgrimen otras razones que podrían explicar la variabilidad de resultados, tales como el propio metabolismo de la cepa utilizada, su selectividad para fermentar hexosas [44], posibles diferencias en los inóculos iniciales en las fermentaciones de cada uno de los tubos Falcon, la utilización de distintas lignocelulosas y los posibles metabolitos generados durante el proceso de pretratamientos de las mismas con hongos de pudrición blanca y la posterior sacarificación, e inclusive inhibidores generados durante la fermentación.

Los últimos puntos del párrafo anterior son los que cobran mayor relevancia antes las posibles explicaciones. El análisis se divide en 4 aristas: la estructura lignocelulósica de los residuos, el metabolismo de los hongos de pudrición blanca, la hidrólisis enzimática, y el proceso de fermentación. Un análisis de los resultados de fermentaciones de medios con glucosa derivada de un solo sustrato permite un mejor entendimiento de los resultados de fermentaciones de glucosa derivada de distintos sustratos.

6.1.1. Hidrólisis enzimática

Si se analiza la posible generación de productos secundarios durante la fase de hidrólisis, esto queda inmediatamente descartado, debido a que no se forman compuestos inhibitorios durante la hidrólisis enzimática [45]. Asimismo, se descarta la formación de compuestos inhibitorios bajo condiciones ácidas y de altas temperaturas, tales como furfural, ácido fórmico, compuestos inorgánicos, y otros derivados de la estructura lignocelulósica bajo condiciones extremas [46] [47].

6.1.2. Estructura lignocelulósica

El siguiente punto, la estructura lignocelulósica de los residuos, puede resultar mucho más interesante. A la ya presentada estructura lignocelulósica en el marco teórico, habría que adicionarle la existencia de ácidos hidroxicinámicos, particularmente el ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido caféico y sinápico. Su presencia en conjunto está en la pared celular de las células vegetales, y su rol correspondería a reducir la biodegradabilidad de la pared celular y

regular el crecimiento de la célula a través de uniones cruzadas de polímeros. Es más, las uniones cruzadas fenólicas, usando ácido ferúlico o ácido p-cumárico, contribuyen a la integridad estructural de la pared celular a través de interacciones covalentes entre las cadenas de hemicelulosa y las de lignina. La asociación entre estas moléculas se daría mediante uniones esterificadas [48]. De esta manera, los porcentajes, y por ende la composición de la estructura lignocelulósica de los residuos sería un factor en caso de que estos ácidos hidroxicinámicos pudiesen ser liberados.

Esta explicación detallada de la unión entre polímeros, se debe a la existencia de estudios que demuestran que los ácidos hidroxicinámicos, en concentraciones de 0,1 y 0,5 $\frac{g}{L}$, generan efectos inhibitorios e inclusive pueden afectar el crecimiento celular de las levaduras [49] [50].

6.1.3. Metabolismo de los Hongos de pudrición blanca (HPB)

Pero no basta la mención de estos dos factores para explicar los diferentes rendimientos de bioetanol obtenidos de las fermentaciones de medios de glucosa derivadas de un solo sustrato, se requiere de un tercer actor que corresponde a los hongos de pudrición blanca. Los hongos de pudrición blanca poseen a su haber 2 metabolismos que operan durante la degradación de residuos lignocelulósicos, el primer metabolismo entra en acción cuando hay carbohidratos que son fácilmente digeribles. Una vez que no hay presencia de este tipo de carbohidratos, entra en acción el metabolismo secundario que corresponde a la degradación de carbohidratos estructurales y de lignina a través de enzimas extracelulares (lignina peroxidasa, lacasa, peroxidasa dependientes de Mn). Las cuales liberarían, entre otras acciones, estos ácidos hidroxicinámicos a través de una acción sinérgica de degradación de los enlaces esterificados [48].

La combinación de estos tres factores entrega una base inicial teórica, el siguiente paso corresponde a determinar la influencia de las distintas estructuras lignocelulósicas y los diversos tipos de hongos de pudrición blanca utilizados en esta memoria. Ver tabla 1:

Tabla 1. Porcentajes de celulosa, lignina y hemicelulosa en rastrojos de trigo-rastrojos de maíz-residuos de eucalipto, % peso seco [16], [17].

Lignocelulosa	% de celulosa	% de lignina	% de hemicelulosa
Rastrojo de trigo	30	15	25
Rastrojo de maíz	45	15	35
Residuo de eucalipto	45	31,3	19,2

Se observa que el residuo de eucalipto posee la mayor cantidad de lignina de los 3 residuos lignocelulósicos. Lo que ante una eventual degradación de un gran porcentaje de lignina, permitiría inferir una mayor liberación de ácidos hidroxicinámicos. Esto último, explicaría el valor promedio más bajo de producción de bioetanol entre los primeros 6 tipos de fermentaciones del gráfico 1, y como obtuvo el valor más bajo de residuos pretratados por *G. applanatum* (Notar desviación estándar negativa en gráfico 1). Para poder comparar los pretratamientos de *G. applanatum* y *S. hirsutum*, en relación a residuos de eucalipto, se podrían analizar las pérdidas de peso experimentadas según los días de pretratamiento. El pretratamiento con *S. hirsutum* a 60 días presentó una mayor pérdida de peso de los residuos que durante el pretratamiento de *G. applanatum* durante 45 días [4], lo que en consecuencia traería una mayor liberación de ácidos hidroxicinámicos, y por ende un menor rendimiento en la producción de bioetanol.

Para el caso del rastrojo de maíz, la pérdida de peso por el pretratamiento de *L. edodes* (18 días) fue mucho menor a la experimentada por el pretratamiento de *G. applanatum* (25 días) [33], lo que permitiría explicar la mayor producción de bioetanol en el caso del pretratamiento con *L. edodes* debido a una menor cantidad de ácidos hidroxicinámicos liberados.

En el caso del rastrojo de trigo, pretratamiento realizado por el estudiante memorista, se pudo apreciar que el crecimiento del hongo de pudrición blanca *L. edodes* fue el más bajo durante el período de incubación, siendo superado por el crecimiento de *G. applanatum* en cada medición durante los 25 días de pretratamiento. Las mediciones son de carácter cualitativo, pero se pueden sustentar en base al largo período de tiempo que requiere el hongo *L. edodes* para consumir hemicelulosa. Según un estudio, tarda 84 días (3 meses) en consumir la mitad de la hemicelulosa de residuos de trigo [51], y en el mismo proceso dejar intacta la celulosa. Por lo que se puede asumir que bajo el pretratamiento de *L. edodes* hubo una menor liberación de ácidos hidroxicinámicos.

Los tres últimos párrafos dan sustento a los mayores rendimientos promedios de bioetanol obtenidos de los rastrojos de maíz y de trigo, bajo el pretratamiento de los hongos de pudrición blanca *L. edodes* y *G. applanatum*, en las fermentaciones de medios con contenido de glucosa derivada de un solo sustrato.

6.1.4. Proceso de fermentación

El último punto corresponde al proceso de fermentación. Esta área se divide en tres partes: diluciones de medios obtenidos de la sacarificación, cantidad de inóculo, tipo de fermentación y mediciones de bioetanol.

6.1.4.1. Diluciones de medios obtenidos de la sacarificación

La primera parte tiene relación con las acciones efectuadas en la sección 4.2.6. como fue mencionado anteriormente, una vez realizadas las sacarificaciones y mediciones de glucosa se seleccionaron una serie de tubos Falcon (Anexo B.8.), los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 19. Selección de fases líquidas para las fermentaciones. Posteriormente estas fases líquidas fueron diluidas hasta obtener concentraciones de $2 \frac{g}{L}$ de glucosa.

Tubo Falcon	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Concentración glucosa $[\frac{g}{L}]$
5	maíz (<i>G. applanatum</i>)-5	14,66
12	trigo (<i>G. applanatum</i>)-5	6,14
14	trigo (<i>G. applanatum</i>)-7	5,20
16	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-2	2,94
18	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-4	3,11
20	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-6	3,45
23	maíz (<i>L. edodes</i>)-2	4,13
24	maíz (<i>L. edodes</i>)-3	4,13
28	maíz (<i>L. edodes</i>)-7	5,50

Tubo Falcon	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Concentración glucosa [$\frac{g}{L}$]
30	trigo (<i>L. edodes</i>)-2	3,66
33	trigo (<i>L. edodes</i>)-5	6,01
37	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-4	9,89

Los tubos Falcon de la tabla 19 fueron diluidos a una concentración de glucosa de 2 [$\frac{g}{L}$]. Esta acción contempló solamente la dilución en base a este carbohidrato, pero no consideraba en que concentraciones quedaban los potenciales ácidos hidroxicinámicos (i.e. no todos los tubos diluidos presentaban las mismas concentraciones). Esta situación, podría haber sido subsanada si posterior a esta dilución se hubiesen mezclado todos los contenidos de los pretratamientos de un tipo de sustrato y hongo en particular en un solo recipiente (e.g. Tomar los tubos de trigo (*G. applanatum*)-5 y trigo (*G. applanatum*)-7, diluir cada uno a una concentración de glucosa de 2 [$\frac{g}{L}$], y posteriormente verterlos en un vaso precipitado). Esta acción, y el orden en que fueron colocados los contenidos de los tubos diluidos en las fermentaciones respectivas, habrían afectado los diversos rendimientos de bioetanol en cada uno de los triplicados, y por ende estarían incidiendo en las desviaciones estándares asociadas al gráfico 1. Para ilustrar esta situación se utilizarán 2 ejemplos representativos:

- 1- Rastrojo de trigo pretratado con *L. edodes*. Tubo Falcon 30, trigo (*L. edodes*)-2; 3,66 [$\frac{g}{L}$] de glucosa. Posterior a la dilución se obtuvieron 27,5 [ml] de solución, cantidad que permitió realizar 2 repeticiones solamente. A continuación se tuvo que hacer uso del tubo Falcon 33, trigo (*L. edodes*)-5; **6,01** [$\frac{g}{L}$] de glucosa, para completar la última repetición. Al revisar los resultados de cada una de estas fermentaciones, se obtuvo en el mismo orden en que fueron aplicadas las diluciones: 623, 504, y **170** ppm de bioetanol respectivamente.
- 2- Residuo de eucalipto pretratado con *S. hirsutum*. Tubo Falcon 37, eucalipto (*S. hirsutum*)-4; 9,89 [$\frac{g}{L}$] de glucosa, posterior a la dilución se obtuvieron 98,9 [ml] de solución, cantidad que permitió realizar todas las fermentaciones que requirieron de este sustrato pretratado. Al analizar los resultados obtenidos del triplicado, se obtuvieron 32, 12, y 18 ppm de bioetanol respectivamente.

Estos ejemplos ilustran fielmente la situación planteada, ante distintas concentraciones diluidas de ácidos hidroxicinámicos, los rendimientos de bioetanol no serían los mismos, y este efecto se vería reflejado en las mayores desviaciones estándares calculadas. En caso contrario no se daría esta situación.

El cálculo de la cantidad de ácidos hidroxicinámicos, que potencialmente se liberaron a partir de los residuos lignocelulósicos, no sería fácilmente estimable debido a que la hidrólisis enzimática cuando se lleva a cabo de forma separada de la fermentación, termina siendo inhibida por la presencia de glucosa [45], entonces el parámetro obtenido de concentración de glucosa no permitiría una estimación directa de la concentraciones de inhibidores, los cuales podrían ser inclusive mayor. Bajo una futura repetición de experiencias, se podrían tratar de medir utilizando una Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) [48].

6.1.4.2. Cantidad de inóculo

En relación a la cantidad de inóculo y el proceso de fermentación, todos los rendimientos de bioetanol no se podrían justificar únicamente por variaciones de inóculo, debido que al revisar los resultados entre distintos triplicados se aprecia una marcada tendencia en función de los factores antes mencionados.

6.1.4.3. Tipo de fermentación

El tipo de proceso de fermentación también es un factor a ser analizado, el hecho de utilizar una fermentación batch propicia que la cantidad de inhibidores y aquellos producidos por las mismas levaduras (e.g. ácido acético) durante el proceso se acumulen porque no hay una renovación del medio de cultivo durante la generación de bioetanol [52].

6.1.4.4. Mediciones de bioetanol

Las mediciones de bioetanol no serían un factor determinante, puesto que la utilización de la Jeringa Hamilton Gastight permite realizar mediciones fidedignas debido a su émbolo reforzado. Esto último quedó demostrado entre mediciones de bioetanol efectuadas del mismo tipo de fermentación.

En relación a los resultados obtenidos de bioetanol en las mediciones, sus porcentajes de conversión de glucosa fueron calculados según [53]:

$$(\%) \text{ conversión de glucosa} = \frac{\text{bioetanol producido } \left[\frac{g}{L}\right] * 100}{\text{glucosa inicial en el medio } \left[\frac{g}{L}\right] * 0,511} . \text{ Ecuación 4.}$$

Las fermentaciones tipo 4 (90%) y tipo 6 (3,9%), correspondieron a los mejores y peores valores de conversión en el caso de las fermentaciones individuales. En el caso de las fermentaciones de mezclas, las fermentaciones tipo 13 (79%) y tipo 9 (5%) correspondieron a los mejores y peores porcentajes de conversión respectivamente. Valores que se pueden justificar a partir de los factores mencionados anteriormente.

Como no se hicieron mediciones durante la fermentación, no se podría descartar del todo un posible consumo de bioetanol por parte de la *Saccharomyces cerevisiae* [54].

En líneas generales, se puede sintetizar que a pesar de fijar en $2 \left[\frac{g}{L}\right]$ la cantidad de glucosa para la fermentación inicial, ésto no contemplaba la concentración de potenciales inhibidores, los cuales podían variar y serían mayores a medida que se obtuvieron superiores concentraciones de glucosa en la etapa de sacarificación. Además, esta situación estaría en función de los diferentes hongos de pudrición blanca y las diversas estructuras lignocelulósicas de los residuos. En el caso de las desviaciones estándares, se relacionarían con el orden en que fueron agregadas las diluciones de glucosa para un mismo tipo de fermentación. Todos estos factores también incidieron posteriormente en la fermentación de mezclas de glucosa derivada de dos fuentes distintas.

Analizando las concentraciones de bioetanol de fermentaciones de medios de glucosa derivada de dos sustratos distintos (gráfico 1), se aprecia que ninguna en promedio fue capaz de superar al mayor rendimiento de fermentación de medios de glucosa derivada de un solo sustrato, que correspondió a la fermentación de rastrojos de maíz-*L. edodes*. Pero al hacer este análisis hay que hacer una salvedad, cuando se fermentaron medios derivados de glucosa de un solo sustrato, se estaban fermentando 0,02 [g] de glucosa de un tipo de sustrato. En cambio, al momento de hacer la fermentación de glucosa derivada de dos sustratos distintos, se ocuparon 0,01 [g] de glucosa de cada sustrato (sumando un total de 0,02 [g]), por lo que la elección entre utilizar una mezcla y la fermentación individual va en función de cómo se quieran usar los gramos de glucosa respectivos. Para ilustrar mejor esta situación, se tabularon todos los datos en la tabla 11. En esta tabla se aprecian las fermentaciones de cada tipo de sustrato y hongo de pudrición blanca, y como en base a los resultados experimentales obtenidos previamente se calcularon los valores esperados de la concentración conjunta de sustratos (promedio de la suma de fermentaciones individuales).

Tabla 11. Comparación entre valores obtenidos de fermentaciones individuales, aquellos valores que se esperarían de la fermentación de mezclas, y los valores medidos finalmente.

Tipo	Especie 1	Conc. Bioetanol (ppm) individual	Especie 2	Conc. Bioetanol (ppm) individual	Conc. Esperable (ppm)	Conc. Medida (ppm)	Dif. (%)	Promedio (%)
7	M-G.a.	131	T-G.a.	336	233,5	211	10	467,5
8	M-G.a.	131	T-L.e.	432	281,5	166	70	
9	M-L.e.	604	T-G.a.	336	470	26	1707	
10	M-L.e.	604	T-L.e.	432	518	282	83	
11	M-G.a.	131	Eu-G.a.	199	165	220	25	10,5
12	M-G.a.	131	Eu-S.h.	20	75,5	79	4,4	
13	M-L.e.	604	Eu-G.a.	199	401,5	404	0,6	
14	M-L.e.	604	Eu-S.h.	20	312	355	12	

T = Rastrojo de trigo; M = Rastrojo de maíz; Eu = Residuo de eucalipto.

G.a. = *Ganoderma applanatum*; L.e. = *Lentinus edodes*; S.h. = *Stereum hirsutum*.

La lectura de la tabla 11 se recomienda que sea de la siguiente forma, por ejemplo: “Para el tipo de fermentación 7, la especie 1; rastrojo de maíz pretratada por *G.applanatum* produjo experimentalmente 131 ppm de bioetanol, la especie 2; trigo pretratado por *G.applanatum* produjo experimentalmente 336 ppm de bioetanol. La concentración de bioetanol esperable corresponde al promedio de los dos valores anteriores, y no la suma debido a que se utiliza la mitad de glucosa de cada sustrato, 233,5 ppm en este caso; posteriormente la concentración medida experimentalmente de la fermentación tipo 7 es igual a 211 ppm, y el porcentaje de diferencia entre estos dos últimos valores: 10%”. Los colores rojo y azul indican inhibición o sinergia respectivamente.

A partir de la tabla 11 se aprecia que ninguna de las combinaciones de sustratos pretratados por hongos de pudrición blanca: rastrojos de maíz-rastrojos de trigo, dio como resultado una sinergia, sino que todo lo contrario, por lo que no se recomendaría la realización de esta fermentación conjunta. Solamente la fermentación tipo 7 se aproximó al valor esperado, pero aun así estuvo lejos por un 10%.

La situación de las combinaciones de rastrojos de maíz-residuos de eucalipto pretratados por hongos de pudrición blanca fue diametralmente opuesta, de hecho, presentaron sinergias a partir de cada uno de los resultados de fermentación. Solamente la fermentación tipo 13 con su diferencia de un 0,6% fue virtualmente equivalente a fermentar los sustratos de forma separada. Siendo de esta forma totalmente recomendable su fermentación conjunta

Estos resultados, en conjunto con los obtenidos del test de ANOVA y Tukey-Kramer, permiten escoger que fermentaciones serían convenientes para llevar a cabo, además de demostrar estadísticamente la existencia de diferencias significativas entre fermentaciones de medios de glucosa derivada de un solo sustrato, y aquellas fermentaciones de medios de glucosa derivada de dos sustratos distintos.

6.2. Abundancia relativa de isótopos estables de ^{13}C

A partir de los resultados del gráfico 2, se puede destacar la obtención de valores esperados a partir de la fermentación de medios de glucosa derivada de un solo sustrato (primeros 6 tipos de fermentación). Para el caso de los rastrojos de trigo y residuos de eucalipto, sus valores de $\delta^{13}\text{C}$ estuvieron dentro del rango correspondiente a las plantas C3 (-40‰ a -20‰) [10] [41], siendo coherentes con la discriminación isotópica que ocurre en las rutas metabólicas de estas plantas. En el caso de rastrojos de maíz, sus valores de $\delta^{13}\text{C}$ variaron entre -14‰ y -19‰, siendo este último un valor límite en los rangos asociados a plantas C4 [10] [41]. Las cifras de todos estos resultados fueron claves para el estudio, puesto que los valores promedio de $\delta^{13}\text{C}$ entre los tipos C3 y C4 variaron al menos en -5‰, lo que permite hacer las comparaciones pertinentes.

Los resultados obtenidos del último párrafo son tremendamente relevantes, en el sentido que dan sustento a la principal hipótesis que conduce a la memoria. Lo anterior puede ser acrecentado a partir de las bajas desviaciones estándares (la máxima fue de 3‰) observadas en el gráfico 2, demostrando una gran reproducibilidad de las experiencias, y el hecho de que esta reproducibilidad no se vió influida mayormente por la concentración de bioetanol en la muestra, esto quiere decir, que inclusive con 4 ppm de bioetanol se obtuvieron resultados positivos del análisis del espectrómetro de masas.

En un plano estadístico, los resultados arrojados por el test de Kruskal-Wallis y Dunn-Sidak (para todos los tipos de fermentación) fueron coherentes debido a la diferencia significativa existente entre los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los rastrojos de maíz-*L. edodes* (-15‰ en promedio) y los valores de las fermentaciones tipo 5 (residuo de eucalipto-*G. applanatum*) y 6 (residuo de eucalipto-*S. hirsutum*) correspondientes a -28‰ cada uno. A juicio del test, todos los otros tipos de fermentaciones no presentaron diferencias significativas a pesar de tener desviaciones estándares bajas (la máxima es de 3‰), puesto que estuvieron entre los -19‰ y los -25‰ en promedio.

Lo fascinante de la fermentación hecha por *Saccharomyces cerevisiae*, corresponde a la fiel representación de $\delta^{13}\text{C}$ de los tejidos de las plantas de las cuales proviene la glucosa fermentada. Esto último, se refiere a que la fermentación por parte de levaduras no corresponde a un proceso de fraccionamiento isotópico (i.e. no provoca variaciones de isótopos de carbono) [55], sino más bien mantiene las variaciones generadas a nivel de rutas metabólicas de las plantas C3 y C4, inclusive a niveles intramoleculares. Lo anterior puede ser mejor expuesto a partir de la siguiente ilustración:

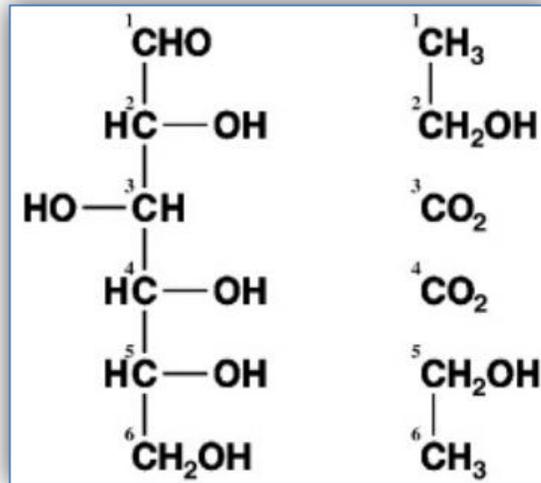


Ilustración 7. Posiciones de los carbonos en la molécula de glucosa y sus distribuciones en los productos de fermentación [55].

Estudios anteriores, han demostrado que los carbonos de la molécula de glucosa se distribuyen en los productos de la fermentación alcohólica como se presenta en la ilustración 7: Los carbonos 1 y 2 de la glucosa pasan a formar una molécula de bioetanol, los carbonos 3 y 4 proceden a integrar las moléculas de dióxido de carbono, y finalmente los carbonos 5 y 6 a otra molécula de bioetanol [55] [56]. Esta evidencia es muy relevante debido a que permite demostrar que la fermentación hecha con *Saccharomyces cerevisiae* se puede utilizar como una auténtica sonda biológica [55]. Para ejemplificar esto último, se puede revisar el valor de $\delta^{13}\text{C}$ de la fermentación tipo 3 (rastroy de maíz-*G. applanatum*), cuyo valor correspondió a -19 ‰ y que está en el límite aceptable de las plantas C4. En un comienzo, se pensó que este valor se debía a un fraccionamiento isotópico durante la fermentación, pero esto no ocurre en la práctica. El motivo de tal diferencia se debe a una variación isotópica que ocurre a nivel intramolecular de la glucosa. Se ha demostrado, tanto para plantas C3 y C4, que el carbono 6 de la glucosa presenta un valor de $\delta^{13}\text{C}$ inferior a los otros carbonos de la estructura (prueba de una distribución no estadística de los isótopos de carbono 13 en la molécula [56]). La influencia de este carbono se vería entonces reflejada en la producción de una de las moléculas de bioetanol. Por ende, al presentar un cambio isotópico el rastroy de maíz, este cambio se vería inmediatamente plasmado en la composición isotópica de una molécula de bioetanol, que en este caso disminuyó a -19 ‰.

La discusión de los siguientes resultados contempla las fermentaciones de medios que contienen glucosa derivada de dos sustratos pretratados y sacarificados previamente. A primera vista del gráfico 2 (últimos 8 tipos de fermentación), se observa que todas las fermentaciones presentaron valores de $\delta^{13}\text{C}$ que no variaron en demasía entre un resultado y otro del mismo tipo de fermentación, esta reproducibilidad se vió respaldada a partir de los promedios resultantes de los tipos de fermentación y las desviaciones estándares calculadas (el máximo es de un 0,97 ‰).

Además, el gráfico 2 permite inferir que los tipos de fermentación 7-8-9-11-12-13-14 (con valores entre -21‰ y -25‰) presentaron una mayor influencia por parte de residuos lignocelulósicos C3. Solamente la fermentación tipo 10 con su promedio de -19‰ representó una posible contribución, en mayor magnitud, por parte de lignocelulosas C4.

6.3. Contribución parcial de lignocelulosas

A nivel estadístico, solamente los resultados de contribuciones de las fermentaciones tipo 7 y 8 tuvieron diferencias significativas con el tipo 10 y viceversa (gráfico 3). Este resultado es una consecuencia directa de la gran contribución que realizó el rastrojo de trigo-*G. applanatum* y trigo-*L. edodes* con un 92% y 94% respectivamente, en contraste con la más baja contribución de las plantas C3, que fue el rastrojo de trigo-*L. edodes* en la fermentación tipo 10 con un 45%.

De forma contraria, los mismos tipos de fermentación mirados desde el punto de vista de las plantas C4 arrojaron que el rastrojo de maíz-*L. edodes* con contribución de un 55% presentó diferencias significativas con los rastrojos de maíz-*G. applanatum* (el mismo para el tipo 7 y 8) con un 8% y un 6% respectivamente.

El resto de los porcentajes no presentó diferencias significativas, lo que es coherente con los porcentajes exhibidos por los elementos excluidos que no difieren, en promedio, de gran manera entre sí.

Independiente de las diferencias significativas que existan, se comprobó una clara supremacía de las plantas C3 (65,6% en promedio) por sobre las plantas C4 (34,4% en promedio) al momento de fermentar glucosa de dos fuentes distintas bajo las condiciones escogidas (La única excepción la representó el tipo de fermentación 10). Esta situación podría atribuirse directamente a las propiedades químicas que presentan los isótopos de carbono [57].

Según estipulaba la química clásica, las propiedades de las moléculas constituidas por diferentes isótopos no diferían entre sí. Un supuesto que ha sido rebatido en la actualidad a través del uso de herramientas como el espectrómetro de masas, demostrando efectivamente que las moléculas constituidas por distintos isótopos presentan las siguientes diferencias [57]:

1. Las moléculas isotópicas más pesadas presentan una movilidad menor.
2. Las moléculas isotópicas más pesadas presentan energías de enlace mayor.

En el caso del punto uno, se justifica debido a que las moléculas poseen una energía cinética dada por la ecuación:

$$k * T = \frac{1}{2} * m * v^2 . \text{ Ecuación 5.}$$

Donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, m la masa de la molécula, y v la velocidad. Las moléculas al estar en un sistema con la misma temperatura tendrían que presentar la misma energía cinética, por lo que inevitablemente los compuestos isotópicamente más pesados deberían tener una menor velocidad. Como consecuencia de esto, presentarían velocidades de difusión menores y también una menor frecuencia de colisión con otras moléculas, por lo que los compuestos isotópicamente livianos reaccionarían de forma más rápida [57].

El segundo punto se justifica debido al mayor tamaño del núcleo atómico de los isótopos más pesados, al realizar un ejercicio de fuerzas de atracción y repulsión, se determina que las moléculas isotópicamente más pesadas requieren de una mayor energía para romper sus enlaces [57].

La suma de estos factores mencionados permite una explicación teórica a los resultados obtenidos de las contribuciones de los distintos residuos lignocelulósicos. *Saccharomyces cerevisiae*, como otros sistemas biológicos, prefiere incorporar a sus productos moléculas isotópicas menos pesadas [55]. Bajo estos supuestos se puede justificar la mayor contribución por parte de los residuos lignocelulósicos C3. El presentar una menor cantidad de isótopos de carbono 13 haría más livianas las moléculas, por lo que poseerían una mayor velocidad de difusión, de colisión en el citosol, y además requerirían una menor energía para romper sus enlaces y formar los productos de la fermentación (presentados en la ilustración 7) en las mitocondrias.

No se puede hablar de una discriminación isotópica propiamente tal, si no más bien de una preferencia ante otras fuentes de glucosa más pesadas, como las moléculas de glucosa con origen en plantas C4, que igual las procede a metabolizar en caso de no tener esta elección entre distintos sustratos. Esto permitiría explicar por qué existe un margen de contribución por parte de las plantas C4 en el producto de bioetanol.

Hay que recordar que no toda la fuente de glucosa presente en el medio de fermentación va directamente a la producción de bioetanol, sino que también es derivada al crecimiento celular y otras reacciones metabólicas [58], por lo que situaciones como la acontecida en la fermentación tipo 10 podrían ocurrir. Aun así, este margen de contribución no llega a ser tan marcado como en las fermentaciones tipo 7 y tipo 8 (gráfico 3).

Observando las cantidades promedio de bioetanol, se aprecia que no existe una relación directa entre la cantidad producida y los valores de los aportes parciales por cada una de las lignocelulosas, por lo que la influencia de los hongos de pudrición blanca y la generación de metabolitos durante el pretratamiento podrían estar influyendo en la contribución parcial de las lignocelulosas [59].

Tomando en cuenta esto último, se aprecia que la glucosa con origen de maíz-*G. applanatum* recibe la menor preferencia por parte del metabolismo de la levadura. Esta situación se da ante la existencia de otra fuente disponible de glucosa, ya sea de eucalipto-*G. applanatum* o eucalipto-*S. hirsutum* (gráfico 3), y se vuelve más severa en caso de que exista otra fuente disponible como el rastrojo de trigo pretratado por *G. applanatum* o por *L. edodes*. Bajo la situación que se utilice glucosa con origen de maíz pretratado por *L. edodes*, se aprecia que existe una mayor contribución, con respecto a la situación anterior por parte de este elemento en el producto final, ya sea ante la presencia de otra fuente derivada de glucosa con origen de residuos de trigo o eucalipto. Siendo superior su contribución en caso de que ambos sustratos estén pretratados con el mismo hongo de pudrición blanca, el cual corresponde a *L. edodes*. Ante esta evidencia, los grados de contribuciones estarían además siendo afectados según el pretratamiento de cada tipo de hongo de pudrición blanca.

Capítulo VII. Conclusiones

Dada la situación energética actual de Chile, sus emisiones contaminantes, y la poca diversidad de fuentes energéticas, se han tenido que desarrollar nuevos caminos para la producción de combustibles, tales como la generación de bioetanol de segunda generación. Los principales aliados en esta búsqueda corresponden a variabilidad de residuos lignocelulósicos, de suelos de cultivo, y los distintos climas que presenta el país.

Enmarcada en esta situación, se encontró la necesidad de realizar experiencias de fermentación (HFS) a partir de mezclas de medios de glucosa ($2 \frac{g}{L}$ de concentración inicial) con distintos orígenes de residuos lignocelulósicos (rastrajos de maíz, rastrajos de trigo, residuos de eucalipto), los cuales fueron previamente pretratados con diferentes hongos de pudrición blanca (*Ganoderma applanatum*, *Lentinus edodes*, y *Stereum hirsutum*), para luego ser sacarificados a través de un proceso de hidrólisis enzimática. Las concentraciones de bioetanol se midieron con el uso de un cromatógrafo de gases, y las mediciones de $\delta^{13}C$ con un espectrómetro de masas. A partir de los resultados se buscó determinar qué efectos se produjeron, y de qué manera contribuyeron cada uno de estos residuos lignocelulósicos en la producción de bioetanol.

A partir de todos los análisis, se concluyó lo siguiente:

La fermentación de medios de cultivo que contienen glucosa derivada de dos sustratos distintos, pretratados y sacarificados previamente, presentó rendimientos de bioetanol que van en función del tipo de residuo lignocelulósico escogido y del tipo de hongo de pudrición blanca que le pretrató. Para rastrajos de maíz, cualquier fermentación efectuada en conjunto con medios derivados de glucosa de rastrajos de trigo generó inhibiciones de producto, esto quiere decir que se obtuvieron rendimientos de bioetanol por debajo de las fermentaciones individuales de estos sustratos (467,5% en promedio menos de lo esperable). En caso de ser fermentados los rastrajos de maíz con residuos de eucalipto, se crearon sinergias, por lo que sus fermentaciones siempre generaron rendimientos mayores a los obtenidos individualmente (10,5% en promedio sobre lo esperable). Ambos casos se vieron influidos en sus diversos rendimientos, probablemente a partir de la presencia de ácidos hidroxicinámicos, los que actúan afectando de forma negativa la producción de bioetanol. Su concentración está en función del tipo de residuo lignocelulósico y el hongo de pudrición blanca que efectuó el pretratamiento. Además, los resultados obtenidos de los test estadísticos ANOVA y Tukey-Kramer permitieron demostrar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tipos de fermentaciones. Lo anterior permite crear la elección entre efectuar una fermentación con los sustratos en forma de mezclas o individualmente, según sea conveniente.

El bioetanol obtenido como producto de la fermentación alcohólica de glucosa, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, corresponde a un fiel reflejo del fraccionamiento isotópico que ocurre en las rutas metabólicas de plantas C3 y C4, comportándose como una auténtica sonda al momento de analizar diferencias de isótopos estables de carbono 13, tanto a nivel de tejidos como también a nivel intramolecular. Estadísticamente, se pudo demostrar con el uso del test Kruskal-Wallis (análogo a ANOVA) y de Dunn-Sidak (análogo a Tukey-Kramer) la existencia de diferencias significativas en los valores medidos de $\delta^{13}C$ entre los distintos tipos de fermentación de lignocelulosas.

Relacionado con lo anterior, las contribuciones parciales (medidas en porcentaje) de los residuos lignocelulósicos a las fermentaciones de mezclas de glucosa derivada de distintos sustratos, va en función de una preferencia biológica por parte de la *Saccharomyces cerevisiae* de incorporar moléculas isotópicas de glucosa con menor peso a los productos de la fermentación. Esto quiere decir que la producción de bioetanol tuvo en general una contribución muy marcada por parte de las lignocelulosas C3 (65,6% en promedio), rastrojos de trigo y residuos de eucalipto, siendo mayor que las contribuciones de la glucosa con origen de plantas C4 (34,4% en promedio), rastrojos de maíz, debido al mayor peso que poseen estos isótopos por estar enriquecidos de carbono 13, lo que les hizo presentar velocidades de difusión y de colisión más bajas, y energías de enlace más elevados. Los tests estadísticos de Kruskal-Wallis y de Dunn-Sidak permitieron demostrar diferencias significativas entre los distintos porcentajes de contribución de las plantas C3 y C4, por lo que se determinó que existe una influencia de los hongos de pudrición blanca en el grado de contribución de cada uno de estos residuos.

Estos tres últimos párrafos permiten asentar las bases para continuar la investigación de fermentaciones de medios de cultivo que contienen glucosa derivada de dos sustratos distintos (e.g. análisis de inhibidores), y como siguiente paso una optimización del proceso en post de encontrar las mejores alternativas de producción de bioetanol de segunda generación.

Capítulo VIII. Recomendaciones

Si se realizan nuevamente fermentaciones de esta índole, mezclar los medios diluidos de las sacarificaciones por tipo antes de agregarlos a los tubos Falcon para la fermentación.

Se recomienda estudiar nuevos procesos de fermentación que no permitan que los inhibidores jueguen un rol importante, tales como un proceso fed-batch o un proceso continuo. Así, los inhibidores pueden estar en bajas concentraciones, y en algunos casos pueden ser convertidos en compuestos menos tóxicos por las levaduras durante el proceso.

Para disminuir la contaminación de la columna del cromatógrafo de gases, se recomienda pasar las muestras por filtros de nitrocelulosa previamente.

Para la medición de bioetanol en el cromatógrafo de gases, se recomienda usar la jeringa de embolo reforzado. Esta cualidad permite hacer una inyección veloz y mucho más confiable que una jeringa sin esta característica. Durante las repeticiones de medición se obtuvo una gran fidelidad entre distintos análisis de la misma muestra.

El envío de muestras a Canadá se recomienda que sea con los tubos Eppendorf bien sellados. No es necesario colocarlos en hielo seco o mantenerlos refrigerados, puesto que el análisis de abundancias naturales de isótopos de carbono no requiere de una gran concentración de bioetanol en las muestras. Inclusive con 4 ppm se obtienen resultados positivos.

Referencias

- [1] MINISTERIO DE ENERGÍA. The Use of Energy Statistics to Estimate CO2 Emissions. [en línea]
<http://antiguo.minenergia.cl/minwww/export/sites/default/05_Public_Estudios/estadisticas_energeticas/25-IEA-The_Use_of_Energy_Statistics_to_Estimate_CO2_Emissions.pdf>
[Consulta: 17/06/2011].
- [2] MINISTERIO DE ENERGÍA. Política Pública de Chile en Cambio Climático y descripción del Mercado Energético Nacional. [en línea]
<http://antiguo.minenergia.cl/minwww/export/sites/default/05_Public_Estudios/descargas/presentaciones/Ministro_Raineri_PP_Cambio_climatico.pdf>
[Consulta: 17/06/2011].
- [3] MINISTERIO DE ENERGÍA. Antecedentes sobre la matriz energética en Chile y sus desafíos para el futuro. [en línea]
<http://antiguo.minenergia.cl/minwww/opencms/02_Noticias/descargas_noticias/antecedentes_matriz_energetica_2011.pdf>
[Consulta: 23/06/2011].
- [4] CARMONA R. Transformaciones bioquímicas de la biomasa. Experiencias en Chile y su impacto en la matriz energética nacional. En: Presentaciones del Seminario Internacional "Biocombustibles y su futuro en la matriz energética": 4 de Noviembre 2007. Santiago, Universidad de Chile.
- [5] JURI Awad, Sebastián Andrés. Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Memoria (Ingeniería Civil, mención en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011. 76 h.
- [6] A.GARCÍA, R.CARMONA, M. LIENQUEO, O.SALAZAR. 2011. The current status of liquid biofuels in Chile. *Energy* 36 (2011) 2077-2084.
- [7] PEZOA Conte, Ricardo Miguel. Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Memoria (Ingeniería Civil, mención Química. Magister, mención Ciencias de la Ingeniería Química). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2010. 162 h.
- [8] NIKLITSCHK Contente, Tomás Andrés. Selección de Condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol. Memoria (Ingeniería Civil, mención Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2010. 105 h.
- [9] GARCÍA, Respuesta más detallada a oferta de tesis [en línea] En: < cristorsion@hotmail.com > 30 de diciembre de 2010 < agarcia@uchile.cl > [24 de diciembre 2010].
- [10] P.STADDON.2004. Carbon isotopes in functional soil. Vol. 19 No.3.

- [11] J. FREITAS, B. FLETCHER, R. ARAVENA, J.BARKER. 2010. Methane production and isotopic fingerprinting in ethanol fuel contaminated sites. Vol. 48, No. 6, pp. 844-857.
- [12] D. WEBER, A. ROBMANN, S. SCHWARZ, H. L. SCHMIDT. 1997. Correlations of carbon isotope ratios of wine ingredients for the improved detection of adulterations. pp. 158-164.
- [13] T. HIGUCHI. 1997. Biochemistry and molecular biology of wood. Springer Verlag, London.
- [14] A. MARTINEZ. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Vol.8, No.3, pp. 195-204. ISSN 1139-6709.
- [15] OAK RIDGE NATIONAL LABORATORY. Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges. [en línea]
<<https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181>>
[Consulta: 03/03/2012].
- [16] Y. SUN, J. CHENG. 2001. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Elsevier. *Bioresource Technology* 83, pp. 1–11.
- [17] R.L. HOWARD, E. ABOTSI, E.L. JANSEN VAN RENSBURG, S. HOWARD. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, vol. 2 (12), pp. 602-619.
- [18] G. BRODEUR, E. YAU, K. BADAL, J. COLLIER, K. B. RAMACHANDRAN, S. RAMAKRISHNAN. 2011. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review, *Enzyme Research*, vol. 2011.
- [19] N. MOSIER, C. WYMAN, B. DALE, R. ELANDER, Y.Y. LEE, M. HOLTZAPPLE, M. LADISCH. 2004. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96 (2005), pp. 673–686.
- [20] I. DILL, G. KRAEPELIN. 1985. Palo Podrido: Model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Environ. Microbiol.* 52 (1986), pp. 1305–1312.
- [21] G. F. LEATHAM, T. K. KENT. 1982. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *Microbiology Letters* 16 (1983), pp. 65-67.
- [22] J.W. LEE, K.S. GWAK, J. Y. PARK, M.J. PARK, D. H. CHOI, M. KWON, I. G. CHOI. 2007. Biological Pretreatment of Softwood *Pinus densiflora* by Three White Rot Fungi. *The Journal of Microbiology*, Diciembre 2007, pp. 485-491.
- [23] A. DEMERS, R. DOANE, S. GUZMÁN, R. PAGANO. Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass for the Production of Second Generation Biofuels. Fulfillment of the requirements for the Degree of Bachelor of Science. Faculty of Worcester Polytechnic Institute, 2009. 40 h.
- [24] M. GALBE, G. ZACCHI. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, Septiembre 2009, pp. 618-628.

- [25] M. KARMAKAR, R. R. RAY. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, vol. 6, no. 1, pp. 41–53.
- [26] T.M. Wood, S.I. MCCRAE. 1979. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Advances in Chemistry*, pp. 181-209.
- [27] M.R. ADAMS. 1990. Topical aspects of fermented foods. *Technology*, vol. 1, Julio 1990, pp. 140-144.
- [28] TEMPEH. Fermentation. [en línea]
<<http://www.tempeh.info/fermentation/fermentation.php>>
[Consulta: 20/03/2012].
- [29] X. Xu, L. CAO, X. CHEN. 2007. Elementary Flux Mode Analysis for Optimized Ethanol Yield in Anaerobic Fermentation of Glucose with *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Vol. 16, Febrero 2008, pp. 135-142.
- [30] THOMSON, Alexander. An Investigation Into the Implications of Using Very Wet Biomass as a Fuel. Tesis (Magister en Ciencias, Energy Systems and the Environment). Glasgow, Reino Unido. University of Strathclyde, 2006. 105 h.
- [31] BOUTTON, T.W. Stable Carbon Isotope Ratios of Natural Materials: II. Atmospheric, Terrestrial, Marine, and Freshwater Environments. En su: *Carbon Isotope Techniques*. BEditors 1991. pp. 173-185.
- [32] C. FRITZ, R. CARMONA, M.E. LIENQUEO, O. SALAZAR, A. GARCÍA. Rendimiento de azúcares fermentables hidrolizados enzimáticamente a partir de residuos de lenga y eucalipto pretratados con hpb y ácido diluido. Congreso en Temuco, 28 Octubre 2010.
- [33] C. FRITZ. Lista de residuos lignocelulósicos pretratados con diversos hongos de pudrición blanca (HPB). Santiago, Chile 2009.
- [34] FRITZ Fuentes, Consuelo Zenaida. 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, mención Madera). Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, 2009. 66 h.
- [35] R.CARMONA, M.E.LIENQUEO, O. SALAZAR, A. GARCIA. 2009. Bioenergy II: Biological pretreatment with fungi as a tool for improvement of the enzymatic saccharification of eucalyptus globulus labill to obtain bioethanol. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. Vol.7:A77.
- [36] J. FREITAS, B. FLETCHER, R. ARAVENA, J. BARKER. 2010. Methane production and isotopic fingerprinting in ethanol fuel contaminant sites. *Groundwater*, pp. 844-857.
- [37] C. CERRI, CH. FELLER, J. BALESSENT, R. VICTORIA, A. PLENECASSAGNE. 1985. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. *Acad. Sci., Sér. D*, 300 Sér. II, 9: 423-427.

- [38] UNIVERSIDAD DE VALENCIA. Análisis de la varianza ANOVA. [en línea]
<<http://www.uv.es/montes/biomecanica2004/anova.pdf>>
[Consulta: 18/04/2012].
- [39] Northern Arizona University. Interpreting the one-way analysis of variance (anova). [en línea]
<<http://oak.ucc.nau.edu/rh232/courses/EPS525/Handouts/Interpreting%20the%20One-way%20ANOVA.pdf>>
[Consulta: 17/04/2012].
- [40] Northern Arizona University. Data transformation. [en línea]
<<http://oak.ucc.nau.edu/rh232/courses/EPS625/Handouts/Data%20Transformation%20Handout.pdf>>
[Consulta: 17/04/2012].
- [41] A. GARCÍA. FONDECYT de Iniciación 11110368: "Efecto del uso de mezclas de lignocelulosas en la producción de etanol de segunda generación".
- [42] PROYECTO DE INNOVACIÓN EDUCATIVA. Prueba de Kruskal-Wallis (k muestras independientes). [en línea]
<http://e-stadistica.bio.ucm.es/web_spss/proc_kruskal.html>
[Consulta: 19/04/2012].
- [43] FW. PAULA-SILVA, LA. DA SILVA LA, YL. KAPILA. 2010. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J. Endod.* pp. 36-231.
- [44] E. TOMÁS-PEJÓ, JM. 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. *Biotechnol Bioeng.* pp. 15-100.
- [45] M.J. TAHERZADEH, K. KARIMI. 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, pp. 707-738.
- [46] A. NILSSON. Control of fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Department of Chemical Engineering II, Lund University. Lund, Sweden.
- [47] C. N. HAMELINCK, G. VAN HOOIJDONK, A. PC. FAAIJ. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, pp. 384-410.
- [48] M. J. DINIS, R. M.F. BEZERRA, F. NUNES, A. A. DIAS, C. V. GUEDES, L. M.M. FERREIRA, J. W. CONE, G. S.M. MARQUES, A.R.N. BARROS, M. A.M. RODRIGUES. 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, pp. 4829-4835.
- [49] D. STEAD. 1995. The effect of hydroxycinnamic acids and potassium sorbate on the growth of 11 strains of spoilage yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, pp. 82-87.

- [50] D. STEAD. 1993. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, pp. 135–141.
- [51] E. MOYSON, H. VERACHTERT. 1991. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 421-424
- [52] M.J. TAHERZADEH, K. KARIMI. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, pp. 472-499.
- [53] D. SALVACHÚA, A. PRIETO, M. LÓPEZ-ABELAIRAS, T. LU-CHAU, A. T. MARTÍNEZ, M. J. MARTÍNEZ. 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. Elsevier. *Bioresource Technology* 102, pp. 7500–7506.
- [54] R. GONZÁLEZ, B. A. ANDREWS, J. MOLITOR, J. A. ASENJO. 2003. Metabolic Analysis of the Synthesis of High Levels of Intracellular Human SOD in *Saccharomyces cerevisiae* rhSOD 2060 411 SGA 122. *Biotechnology Bioengineering* 82, pp. 152 – 169.
- [55] E. A. HOBBIE, R. A. WERNER. 2003. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C3 and C4 plants: a review and synthesis. *New Phytologist*, pp. 371–385.
- [56] A. ROSSMANN, M. BUTZENLECHNER, H. L. SCHMIDT. 1991. Evidence for a Nonstatistical Carbon Isotope Distribution in Natural Glucose. *Plant Physiol*, pp. 609-614.
- [57] International Atomic Energy Agency. Abundancia y fraccionamiento de los isótopos estables. [en línea]
<<http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/documents/LIBRO%20IS%20C3%93TOPOS/PDF%20Isotopos-I/Seccion%203.pdf>> [Consulta: 12/05/2012].
- [58] P. K. HERMAN. 2002. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, pp. 602–607
- [59] M. R. HENN, I. H. CHAPELA. 2000. Differential C Isotope Discrimination by Fungi during Decomposition of C3- and C4-Derived Sucrose. *Applied and environmental microbiology*, pp. 4180–4186.
- [60] MINISTERIO DE ENERGÍA. Programa país de eficiencia energética. [en línea]
<http://antiguo.minenergia.cl/minwww/export/sites/default/05_Public_Estudios/energias_limpias/presentaciones/dia2/3-Cardenas_presentacion.pdf>.
[Consulta: 23/06/2011].
- [61] COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA. Balance nacional de energía 2008. [en línea]
<http://antiguo.cne.cl/cnewww/export/sites/default/06_Estadisticas/Documentos/BNE2008.xls>
[Consulta 23/06/2011].

Anexos

Anexo A. Antecedentes generales y motivación

Anexo A.1. Discusión energética de Chile y el mundo, Chile como productor de bioetanol

El principal cuestionamiento que existe actualmente hacia el crecimiento de los países que buscan el desarrollo, es el cómo y a que costo se está logrando. En varios estudios, como el presentado en “El seminario energía limpias y reconstrucción 2010”, se ilustra una proyección de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) que busca el desarrollo mundial a través de la aumento del producto interno bruto pero con un crecimiento bajo en relación al uso de energías. Chile lamentablemente no aparece bien evaluado debido al alto consumo energético que ha experimentado en los últimos años para lograr su estatus [60].

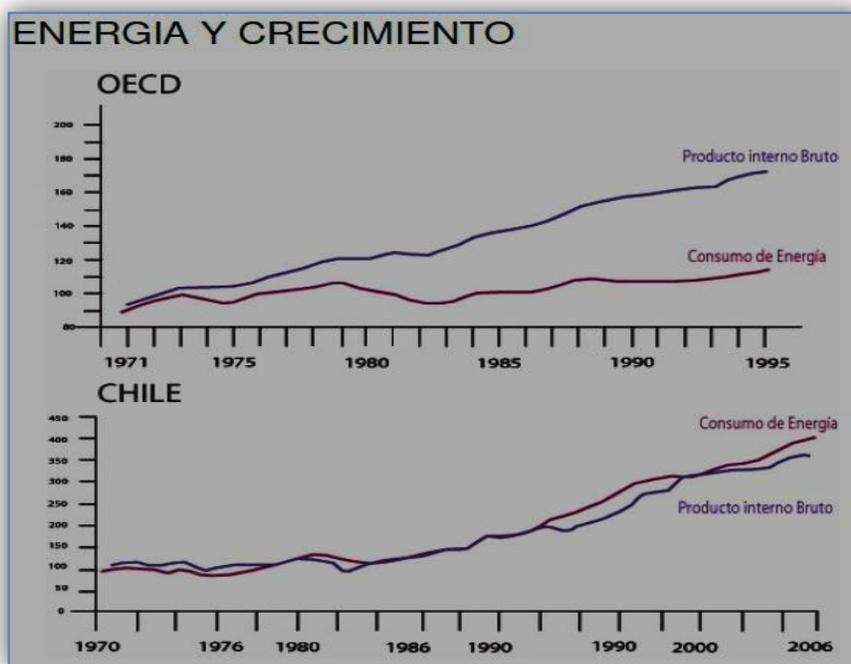


Gráfico 4. Energía y desarrollo económico. Se aprecia que Chile tiene un aumento en el consumo de energía que se eleva sobre la tasa de crecimiento del producto interno bruto, lo cual no es positivo sin una diversidad en la matriz energética [60].

Esta acción ha traído como resultado que el país se haya vuelto una de las naciones con mayor crecimiento de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) del mundo occidental. Además de duplicar la tasas de emisiones de GEI de la región Latinoamérica y cuadruplicar la tasa mundial en el mismo período [2].

Lo anterior no resulta sorprendente al momento de analizar las fuentes energéticas actuales del país y como éstas se distribuyen en la matriz energética. Al analizar datos entregados por la Comisión Nacional de Energía (CNE), se ve claramente que llegado el año 2010, más del 60% de generación de energía viene de la mano de combustibles de origen fósil (Petróleo, carbón, gas natural). De una manera muy lamentable, la producción a partir de biomasa, y otras fuentes de Energías Renovables No Convencionales (ENRC) alcanza solamente a aportar un 3% de la matriz [3].

Los balances energéticos también avalan la postura de una dependencia energética de combustibles fósiles tremenda, solamente entre 2007-2008 se experimentó un alza del consumo de petróleo crudo y carbón en más de un 10%. Siendo el sector de transporte terrestre el que más consume como producto derivado del petróleo crudo las gasolinas, 11.895 [m³] en total [61]. Lo que genera una gran cantidad de GEI ya que el sector de transporte representa el 36,7% del consumo nacional de energía [60].

A todo lo anterior se le añade que el consumo importado de energías alcanza valores sobre 70%, indicando una baja generación de energías a partir de fuentes propias [61].

La suma de acciones ha llevado que se tomen decisiones gubernamentales en torno a la baja cantidad de fuentes de energías renovables y la diversificación de la matriz energética, un paso importante fue firmar el acuerdo de Copenhague en Enero 2010 [2]. En dicho documento, Chile manifestó la voluntad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, y ya para el año 2020 haber reducido las tasas de emisiones en un 20% al menos [2]. Este último punto toma una gran relevancia, ya que coloca en primer plano la necesidad de buscar nuevas fuentes energéticas, tales como las ENRC.

El desarrollo de alianzas estratégicas entre distintas entidades como la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO), Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), Servicio Nacional de Geología y Minería (SERNAGEOMIN) y otras han sido parte fundamental de las líneas de acción [2].

En cuanto a la producción de energía a partir de biomasa forestal y sus desechos, se ha puesto en campaña definitiva la generación de información para la inversión en estas materias, a través de mediciones y catastros a nivel nacional [2]. Especial importancia en esta materia posee el bioetanol.

La posibilidad de generar nuevas fuentes ENRC traería como consecuencia la diversificación de la matriz energética, la disminución de gases de efecto invernadero, el desarrollo de una industria de biorefinería sobre la biomasa, y en caso del bioetanol, contribuiría a la oferta (2% a 5% en mezclas con gasolina) [4].

La pregunta que sigue a continuación es: ¿qué tipo de bioetanol podría producir un país como Chile?, conocida es la potencia de países como EEUU y Brasil para producir este combustible de primera generación de manera masiva y eficaz. Poseen grandes extensiones de terreno para poder cultivar las plantaciones de maíz y caña de azúcar, sus dos fuentes principales para la producción de bioetanol, y además estas especies poseen una conversión eficiente de energía solar en tejido vegetal. El país cumple con solamente una de estas características, que corresponde a la exhibición de altos rendimientos para el cultivo de especies, en cuanto a la superficie cultivable se ve en una tremenda desventaja, solamente un 34,9% de los 75.707.366

hectáreas de territorio continental son para terreno agrícola, y solo un 5.000.000 hectáreas son arables, el resto posee problemas de profundidad, pedregosidad, y pendiente [6]. Si a esto último se le suma el conflicto por el uso de terrenos agrícolas para la alimentación, se puede dar por descartada la producción de bioetanol de primera generación.

Distinta es la visión que se logra captar en el momento que se fija una posible producción de bioetanol de segunda generación. Utilizando residuos lignocelulósicos de la industria forestal y agrícola nacional, se podría cambiar el futuro de producción de bioetanol en el país. Considerando los residuos obtenidos de las plantaciones agrícolas, más las plantaciones de bosques productivos (5.000.000 hectáreas productivas), se logra acceder a una cantidad no despreciable de desechos para la generación de bioetanol [6].

El siguiente cuestionamiento sería la elección de desechos agrícolas, lo ideal es que posean una gran cantidad de hectáreas cultivadas. Los que cumplen de inmediato esta característica corresponden al trigo y al maíz. Durante los años 2006-2007 se cultivaron 282.400 hectáreas y 134.930 hectáreas respectivamente, siendo uno de los productos agrícolas con mayor producción, y por ende con una mayor cantidad de residuos potenciales [6].

Otra cualidad que poseen de interés, es su posibilidad de altos índices de hectáreas cultivadas en una cercanía geográfica. Desde la sexta a la novena región del país se perfilan como los cultivos más cosechados por hectárea [6].

Estas características hacen de Chile un país con potencialidad para producir bioetanol de segunda generación.

Anexo B. Metodología y procedimientos

Anexo B.1. Cálculo factor de humedad rastrojo de trigo

Tabla 12. Pérdida de humedad rastrojo de trigo.

Placa	Peso rastrojo húmedo (peso placa + trigo - peso placa) [g]
1	82,3-75,8=6,5
2	87,5-80,19=7,31
3	50,3 - 43,58= 6,72
Posterior a las 24 horas de secado	
Placa	Peso placa + rastrojo trigo [g]
1	81,7
2	86,8
3	49,7
Placa	Peso rastrojo seca [g] (peso placa + rastrojo trigo – peso placa)
1	81,7-75,8 = 5,9
2	86,8-80,19= 6,61
3	49,7-43,58=6,12
La pérdida de agua corresponde a	
Placa	rastrojo húmedo - rastrojo seco [g]
1	6,5-5,9=0,6
2	7,31-6,61=0,7
3	6,72-6,12=0,6

Promedio de perdida de agua de 0,63 [g].

$$\frac{\text{Paja trigo húmeda} - \text{Paja trigo seca}}{\text{Paja trigo seca}} * 100 = \text{Porcentaje humedad base seca. Ecuación 6.}$$

$$\frac{6,5 - 5,9}{5,9} * 100 = 10\%.$$

- 10% de humedad base seca.
- 50 [g] peso seco + 10% de los 50 [g] peso seco = muestra total a sacar de rastrojo de trigo.
- 50 [g] peso seco rastrojo + $\frac{50*10}{100}$ [g] = 55 [g] de rastrojo de trigo húmedo para cada matraz.

Anexo B.2. Determinación del contenido de humedad durante el período de incubación de rastrojo de trigo en matraces Erlenmeyer

La medición comenzó con el primer día de incubación. Se registró el peso del matraz de una medición y la consecutiva, luego la diferencia se agregó con agua destilada autoclavada para mantener los niveles de humedad.

Tabla 13. Control de humedad durante proceso de incubación de rastrojos de trigo en matraces Erlenmeyer.

Medición inicial	
Matraz	Peso [g]
1	378,62
2	477,15
3	440,5
4	416,98
5	452,99
6	337,67
7	401,39
8	399,68
9	391,02
Segunda medición	
Matraz	Peso inicial – Peso segunda medición [g]
1	378,62-378,18=0,44
2	477,15-476,55=0,6
3	440,5-439,76=0,74
4	416,98-416,4=0,58
5	452,99-452,3=0,69
6	337,67-336,83=0,84
7	401,39-400,87=0,52
8	399,68-398,32=1,36
9	391,02-389,64=1,38
Tercera medición	
Matraz	Peso inicial – Peso tercera medición [g]
1	378,62-375,79=2,83
2	477,15-473,65=3,5
3	440,5-436,66=3,84
4	416,98-414,62=2,36
5	452,99-450,13=2,86
6	337,67-334,2=3,47
7	401,39-398,09=3,3
8	399,68-394,32=5,36
9	391,02-386,57=4,45
Cuarta medición	
Matraz	Peso inicial – Peso cuarta medición [g]
1	378,62-376,76=1,86
2	477,15-475,01=2,14
3	440,5-437,99=2,51
4	416,98-415,4=1,58
5	452,99-451,04=1,95
6	337,67-335,05=2,62
7	401,39-399,04=2,35
8	399,68-396,59=3,09
9	391,02-388,11=2,91

Después de la cuarta medición se detuvo el proceso de incubación (25 días) y comenzó el proceso de secado que consistió en aumentar la temperatura de la cámara de incubación (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270) a 45 [°C] y sostenerlo por 5 días. Las tapas de los matraces fueron removidas para efectuar este proceso. Las diferencias de peso también se llevaron a cabo con respecto al peso de inicio del período de incubación.

Tabla 14. Proceso de secado de matraces Erlenmeyer post-período de incubación.

Primera medición	
Matraz	Peso inicial – Peso primera medición [g]
1	378,62-371,77=6,85
2	477,15-470,56=6,59
3	440,5-424,47=16,03
4	416,98-413,07=3,91
5	452,99-447,24=5,75
6	337,67-328,75=8,92
7	401,39-395,54=5,85
8	399,68-394,08=5,6
9	391,02-377,06=13,96
Segunda medición	
Matraz	Peso inicial – Peso segunda medición [g]
1	378,62-358,82=19,8
2	477,15-455,86=21,29
3	440,5-404,87=35,63
4	416,98-395,96=21,02
5	452,99-431,36=21,63
6	337,67-319,32=18,35
7	401,39-389,22=12,17
8	399,68-369,21=30,47
9	391,02-361,3=29,72

Para una mayor estabilidad fue necesario que los matraces perdieran al menos 20 [g] de agua, esta situación además permitió controlar la humedad presente en el rastrojo de trigo pretratada al momento de realizar las sacarificaciones.

Anexo B.3. Determinación del factor de humedad de muestras lignocelulósicas

Tabla 15. Factores de humedad de los residuos lignocelulósicos pretratados.

Sustrato pretratado	Peso Placa [g]	Peso placa + sustrato [g] antes de colocar en la estufa
Trigo (<i>G. applanatum</i>)	34,4042	34,5483
Trigo (<i>L. edodes</i>)	33,5197	33,8665
Maíz (<i>G. applanatum</i>)	33,8380	33,9044
Maíz (<i>L. edodes</i>)	33,8063	34,0737
Eucalipto (<i>G. applanatum</i>)	33,8407	34,2172
Eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)	43,5192	44,2818

24 [hrs] en la estufa de secado a 105 [°C]		
Sustrato pretratado	Peso Placa + sustrato [g]	% humedad base seca
Trigo (<i>G. applanatum</i>)	34,5287	15,74
Trigo (<i>L. edodes</i>)	33,8306	11,54
Maíz (<i>G. applanatum</i>)	33,9015	4,56
Maíz (<i>L. edodes</i>)	34,0600	5,4
Eucalipto (<i>G. applanatum</i>)	34,2018	4,26
Eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)	44,2405	5,725
Sustrato pretratado	Factor de humedad	
Trigo (<i>G. applanatum</i>)	1,1574	
Trigo (<i>L. edodes</i>)	1,11547	
Maíz (<i>G. applanatum</i>)	1,04566	
Maíz (<i>L. edodes</i>)	1,054	
Eucalipto (<i>G. applanatum</i>)	1,042	
Eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)	1,057	

Anexo B.4. Preparación de tampón Acetato de Sodio

Se colocaron 4,102 [g] de Acetato de Sodio en un vaso precipitado de 1000 [mL], luego agua destilada hasta completar 800 [mL]. El pH inicial correspondió a 7,5. Seguidamente se bajó este pH con Ácido Acético utilizando un gotario. Una vez logrado el pH 4,8, se adicionó el resto de agua destilada hasta completar los 1000 [mL].

3 [L] de tampón de Acetato de Sodio 0,05 M y pH: 4,8 fueron preparados.

Anexo B.5. Cantidades obtenidas de fase líquida luego de la sacarificación

Los tubos Falcon utilizados para la sacarificación fueron centrifugados bajo un régimen de 8228 g durante 5 [min] (Marca: Eppendorf, Modelo: 5804 R). La fase líquida se traspasó a un nuevo tubo Falcon de 50 [mL]. A continuación se presentan las cantidades obtenidas de fase líquida de las sacarificaciones de materiales lignocelulósicos.

Tabla 16. Cantidades obtenidas de fase líquida luego de la sacarificación. Entre paréntesis va el hongo de pudrición blanca (HPB) que pretrató al residuo lignocelulósico.

Tubo Falcon con rastrojo de maíz (<i>G. applanatum</i>)	Cantidad obtenida [mL]	Tubo Falcon con rastrojo maíz (<i>G. applanatum</i>)	Cantidad obtenida [mL]
1	17,5	5	17,5
2	17,5	6	17,5
3	17,5	7	17,5
4	17,5		
Tubo Falcon con rastrojo de trigo (<i>G. applanatum</i>)	Cantidad obtenida [mL]	Tubo Falcon con rastrojo de trigo (<i>G. applanatum</i>)	Cantidad obtenida [mL]
1	19	5	18
2	19	6	20
3	19	7	19
4	19		

Tubo Falcon con residuo de eucalipto (<i>G. applanatum</i>)	Cantidad obtenida [mL]	Tubo Falcon Con residuo de eucalipto (<i>G. applanatum</i>)	Cantidad obtenida [mL]
1	22,5	5	22,5
2	22,5	6	22,5
3	22,5	7	22,5
4	22,5		
Tubo Falcon con rastrojo de maíz (<i>L. edodes</i>)	Cantidad obtenida [mL]	Tubo Falcon con rastrojo de maíz (<i>L. edodes</i>)	Cantidad obtenida [mL]
1	17	5	17
2	16	6	15
3	16	7	15
4	15		
Tubo Falcon con rastrojo de trigo (<i>L. edodes</i>)	Cantidad obtenida [mL]	Tubo Falcon con rastrojo de trigo (<i>L. edodes</i>)	Cantidad obtenida [mL]
1	20	4	20
2	20	5	20
3	20		
Tubo Falcon con residuo de eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)	Cantidad obtenida [mL]	Tubo Falcon con residuo de eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)	Cantidad obtenida [mL]
1	22,5	4	22,5
2	22,5	5	22,5
3	22,5		

Anexo B.6. Protocolo de uso del kit RANDOX GLUC-PAP

A continuación se presenta el protocolo utilizado para medir las concentraciones de glucosa en los medios derivados de las sacarificaciones:

- Pocillos de muestra: 300 [µL] de reactivo del kit y 3 [µL] de muestra (diluciones de los tubos Eppendorf).
- Pocillos correspondientes al estándar: 300 [µL] de reactivo del kit y 3 [µL] del estándar (provisto por el kit).
- Pocillos correspondientes al blanco: 303 [µL] del reactivo del kit.

Utilizando una gradilla de múltiples pocillos se colocaron primero los 3 [µL] de muestra o el estándar, y luego el reactivo del kit para poder respetar los 25 [min] de incubación. A continuación se depositó la gradilla en un lector de espectrofotometría de placas (Marca: Biochrom Asys, Modelo: UVM340) donde se leyeron las muestras a una longitud de onda de 500 nm. En total se hicieron 5 repeticiones por cada tubo eppendorf, 6 para el estándar, y 6 para el blanco. En el tabla 17 se exhiben los resultados utilizados en esta memoria.

Para calcular la concentración de glucosa en la fase líquida de los tubos Falcon se usó la siguiente ecuación:

$$Conc. gluc. \left[\frac{mg}{dL} \right] = \frac{Abs.muestra}{Abs.estandar} * Conc. gluc.estandar \left[\frac{mg}{dL} \right] * Factor de diluc. \text{ Ecuación 7.}$$

Donde la concentración de glucosa corresponde al valor de absorbancia de la muestra diluida dividido el valor de absorbancia del estándar, multiplicado por el valor de la concentración de glucosa estándar (Proveído por el kit, $100 \left[\frac{mg}{dL} \right]$) y el factor de dilución (20).

Valores de absorbancia utilizados para la cuantificación de la concentración de glucosa:

Tabla 17. Valores de absorbancia utilizados para la cuantificación de glucosa.

Eppendorf	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Valor absorbancia medición 1	Valor absorbancia medición 2	Promedio
1	maíz (<i>G. applanatum</i>)-1	0,319	0,31	0,315
2	maíz (<i>G. applanatum</i>)-2	0,389	0,339	0,364
3	maíz (<i>G. applanatum</i>)-3	0,393	0,316	0,355
4	maíz (<i>G. applanatum</i>)-4	0,47	0,325	0,398
5	maíz (<i>G. applanatum</i>)-5	0,524	0,346	0,435
6	maíz (<i>G. applanatum</i>)-6	0,4	0,337	0,369
7	maíz (<i>G. applanatum</i>)-7	0,307	0,305	0,306
8	trigo (<i>G. applanatum</i>)-1	0,32	0,31	0,315
9	trigo (<i>G. applanatum</i>)-2	0,313	0,305	0,309
10	trigo (<i>G. applanatum</i>)-3	0,305	0,299	0,302
11	trigo (<i>G. applanatum</i>)-4	0,332	0,313	0,323
12	trigo (<i>G. applanatum</i>)-5	0,344	0,326	0,335
13	trigo (<i>G. applanatum</i>)-6	0,298	0,296	0,297
14	trigo (<i>G. applanatum</i>)-7	0,341	0,307	0,324
15	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-1	0,285	0,301	0,293
16	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-2	0,299	0,296	0,298
17	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-3	0,303	0,27	0,287
18	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-4	0,324	0,275	0,300
19	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-5	0,269	0,278	0,274
20	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-6	0,294	0,313	0,304
21	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-7	0,293	0,3	0,297
22	maíz (<i>L. edodes</i>)-1	0,296	0,351	0,324
23	maíz (<i>L. edodes</i>)-2	0,309	0,314	0,312
24	maíz (<i>L. edodes</i>)-3	0,313	0,31	0,312
25	maíz (<i>L. edodes</i>)-4	0,295	0,292	0,294
26	maíz (<i>L. edodes</i>)-5	0,314	0,296	0,305
27	maíz (<i>L. edodes</i>)-6	0,303	0,317	0,310
28	maíz (<i>L. edodes</i>)-7	0,36	0,295	0,328
29	trigo (<i>L. edodes</i>)-1	0,313	0,292	0,303
30	trigo (<i>L. edodes</i>)-2	0,316	0,296	0,306
31	trigo (<i>L. edodes</i>)-3	0,311	0,313	0,312
32	trigo (<i>L. edodes</i>)-4	0,307	0,299	0,303

Eppendorf	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Valor absorbancia medición 1	Valor absorbancia medición 2	Promedio
33	trigo (<i>L. edodes</i>)-5	0,296	0,371	0,334
34	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-1	0,342	0,332	0,337
35	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-2	0,343	0,304	0,324
36	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-3	0,331	0,336	0,334
37	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-4	0,405	0,353	0,379
38	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-5	0,347	0,334	0,341
Estándar	-	0,496	0,499	0,498
Blanco	-	0,263	0,263	0,263

Anexo B.7. Concentraciones de glucosa obtenidas tras la sacarificación

Tabla 18. Valores de concentración de glucosa obtenidos tras la sacarificación.

Tubo Falcon	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Concentración glucosa [$\frac{g}{L}$]	Tubo Falcon	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Concentración glucosa [$\frac{g}{L}$]
1	maíz (<i>G. applanatum</i>)-1	4,39	20	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-6	3,45
2	maíz (<i>G. applanatum</i>)-2	8,61	21	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-7	2,85
3	maíz (<i>G. applanatum</i>)-3	7,80	22	maíz (<i>L. edodes</i>)-1	5,15
4	maíz (<i>G. applanatum</i>)-4	11,47	23	maíz (<i>L. edodes</i>)-2	4,13
5	maíz (<i>G. applanatum</i>)-5	14,66	24	maíz (<i>L. edodes</i>)-3	4,13
6	maíz (<i>G. applanatum</i>)-6	8,99	25	maíz (<i>L. edodes</i>)-4	2,60
7	maíz (<i>G. applanatum</i>)-7	3,66	26	maíz (<i>L. edodes</i>)-5	3,58
8	trigo (<i>G. applanatum</i>)-1	4,43	27	maíz (<i>L. edodes</i>)-6	4,00
9	trigo (<i>G. applanatum</i>)-2	3,92	28	maíz (<i>L. edodes</i>)-7	5,50
10	trigo (<i>G. applanatum</i>)-3	3,32	29	trigo (<i>L. edodes</i>)-1	3,368
11	trigo (<i>G. applanatum</i>)-4	5,07	30	trigo (<i>L. edodes</i>)-2	3,66
12	trigo (<i>G. applanatum</i>)-5	6,14	31	trigo (<i>L. edodes</i>)-3	4,17
13	trigo (<i>G. applanatum</i>)-6	2,89	32	trigo (<i>L. edodes</i>)-4	3,41
14	trigo (<i>G. applanatum</i>)-7	5,20	33	trigo (<i>L. edodes</i>)-5	6,01
15	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-1	2,55	34	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-1	6,31
16	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-2	2,94	35	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-2	5,15
17	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-3	2,00	36	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-3	6,01
18	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-4	3,11	37	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-4	9,89
19	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-5	0,89	38	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-5	6,60

Anexo B.8. Selección de fases líquidas para las fermentaciones

Tabla 19. Selección de fases líquidas para las fermentaciones. Posteriormente estas fases líquidas fueron diluidas hasta obtener concentraciones de 2 $\left[\frac{g}{L}\right]$ de glucosa.

Tubo Falcon	Lignocelulosa sacarificada-repetición	Concentración glucosa $\left[\frac{g}{L}\right]$
5	maíz (<i>G. applanatum</i>)-5	14,66
12	trigo (<i>G. applanatum</i>)-5	6,14
14	trigo (<i>G. applanatum</i>)-7	5,20
16	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-2	2,94
18	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-4	3,11
20	eucalipto (<i>G. applanatum</i>)-6	3,45
23	maíz (<i>L. edodes</i>)-2	4,13
24	maíz (<i>L. edodes</i>)-3	4,13
28	maíz (<i>L. edodes</i>)-7	5,50
30	trigo (<i>L. edodes</i>)-2	3,66
33	trigo (<i>L. edodes</i>)-5	6,01
37	eucalipto (<i>S. hirsutum</i>)-4	9,89

Anexo B.9. Cantidades de fase líquida obtenidas del proceso de fermentación

Tabla 20. Cantidades de fase líquida obtenidas del proceso de fermentación. Las numeraciones indican el tubo Falcon al cual correspondieron los tipos de fermentaciones (3 repeticiones por cada tipo).

Tubos Falcon	Fase líquida obtenida[mL]
trigo (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 1-3	17,5
trigo (<i>L. edodes</i>), fermentaciones 4-6	17,5
maíz (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 7-9	17,5
maíz (<i>L. edodes</i>), fermentaciones 10-12	17,5
eucalipto (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 13-15	17,5
eucalipto (<i>S. hirsutum</i>), fermentaciones 16-18	15
maíz (<i>G. applanatum</i>) y trigo (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 19-21	15
maíz (<i>G. applanatum</i>) y trigo (<i>L. edodes</i>), fermentaciones 22-24	15
maíz (<i>L. edodes</i>) y trigo (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 25-27	15
maíz (<i>L. edodes</i>) y trigo (<i>L. edodes</i>), fermentaciones 28-30	17,5
maíz (<i>G. applanatum</i>) y eucalipto (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 31-33	17,5
maíz (<i>G. applanatum</i>) y eucalipto (<i>S. hirsutum</i>), fermentaciones 34-36	17,5
maíz (<i>L. edodes</i>) y eucalipto (<i>G. applanatum</i>), fermentaciones 37-39	17,5
maíz (<i>L. edodes</i>) y eucalipto (<i>S. hirsutum</i>), fermentaciones 40-42	17,5

Anexo B.10. Curva de calibración para proceso de cuantificación de concentraciones de bioetanol en el cromatógrafo de gases

Tabla 21. Diluciones hechas para la curva de calibración.

Dilución % v/v	Cantidad de etanol de análisis [μL]	Agua destilada [μL]
10	150	1350
5	750 de la dilución 10% v/v	750
1	300 de la dilución 5% v/v	1200
0,5	750 de la dilución 1% v/v	750
0,1	300 de la dilución 0,5% v/v	1200
0,05	750 de la dilución 0,1% v/v	750
0,01	300 de la dilución 0,05% v/v	1200

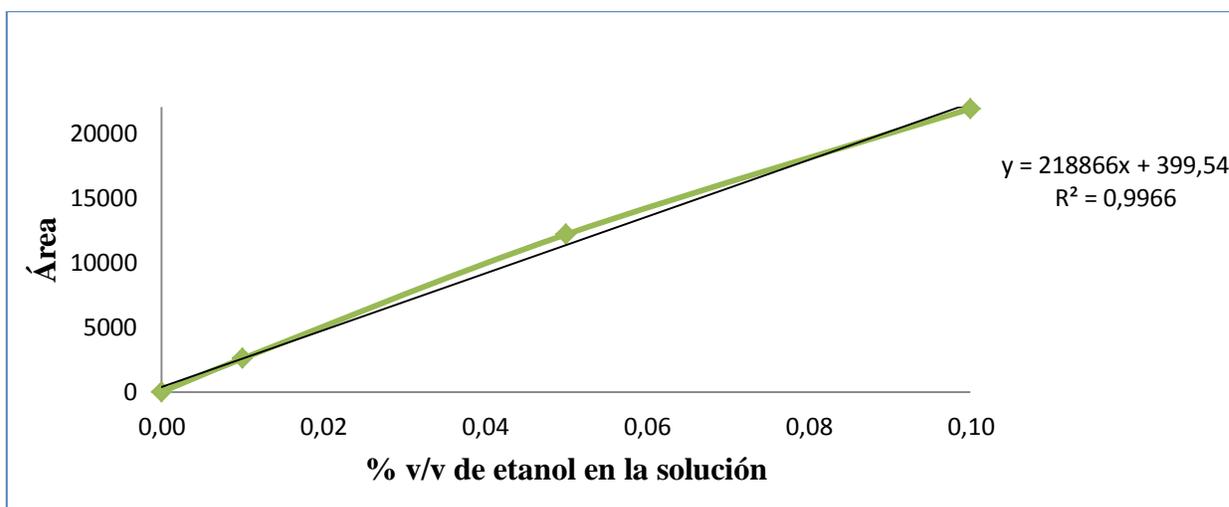


Gráfico 5. Curva de calibración área, según porcentaje volumen-volumen de etanol en solución. Los puntos corresponden al promedio de las áreas entregadas por el programa (TotalChrom®) para la dilución correspondiente. Solamente se utilizó hasta la dilución 0,1% v/v debido a que las muestras obtenidas de la fermentación no arrojaron mayores valores de área. El coeficiente de correlación de Pearson indica que existe una relación casi lineal entre las áreas medidas y los porcentajes de etanol en solución para el rango utilizado.

Anexo C. Resultados

Anexo C.1. Resultados test estadístico

Tabla 22. Valores *p* obtenidos del test de Shapiro-Wilk.

Fermentación	Valor <i>p</i>
Tipo de fermentación 1: Rastrojo de trigo- <i>G. applanatum</i>	0,8487
Tipo de fermentación 2: Rastrojo de trigo- <i>L. edodes</i>	0,7694
Tipo de fermentación 3: Rastrojo de maíz- <i>G. applanatum</i>	0,8368
Tipo de fermentación 4: Rastrojo de maíz- <i>L. edodes</i>	0,2013
Tipo de fermentación 5: Residuo de eucalipto- <i>G. applanatum</i>	0,3044
Tipo de fermentación 6: Residuo de eucalipto- <i>S. hirsutum</i>	0,4863
Tipo de fermentación 7: Rastrojo de maíz- <i>G. applanatum</i> /Rastrojo de trigo- <i>G. applanatum</i>	0,9900
Tipo de fermentación 8: Rastrojo de maíz- <i>G. applanatum</i> /Rastrojo de trigo- <i>L. edodes</i>	0,9362
Tipo de fermentación 9: Rastrojo maíz- <i>L. edodes</i> /Rastrojo de trigo- <i>G. applanatum</i>	0,6829
Tipo de fermentación 10: Rastrojo de maíz- <i>L. edodes</i> /Rastrojo de trigo- <i>L. edodes</i>	0,2672
Tipo de fermentación 11: Rastrojo de maíz- <i>G. applanatum</i> /Residuo de eucalipto- <i>G. applanatum</i>	0,6324
Tipo de fermentación 12: Rastrojo de maíz- <i>G. applanatum</i> /Residuo de eucalipto- <i>S. hirsutum</i>	0,4163
Tipo de fermentación 13: Rastrojo de maíz- <i>L. edodes</i> /Residuo eucalipto- <i>G. applanatum</i>	0,7832
Tipo de fermentación 14: Rastrojo de maíz- <i>L. edodes</i> /Residuo de eucalipto- <i>S. hirsutum</i>	0,8589

Tabla 23. Resultados test ANOVA, rendimientos de bioetanol.

Fuente	SS	df	MS	F	Prob>F
Grupo	1360,46	13	104,651	7,47	4,70502*10 ⁻⁶
Error	392,18	28	14,007		
Total	1752,64	41			

Tabla 24. Resultados test Kruskal-Wallis, abundancias naturales de isótopos estables de ¹³C (δ¹³C).

Fuente	SS	df	MS	Chi-cuadrado	Prob>Chi-cuadrado
Grupo	5297,83	13	407,526	35,2	0,0008
Error	872,67	28	31,167		
Total	6170,5	41			

Tabla 25. Resultados test Kruskal-Wallis, contribución parcial de lignocelulosas.

Fuente	SS	df	MS	Chi-cuadrado	Prob>Chi-cuadrado
Grupo	896,5	7	128,071	17,94	0,0123
Error	253	16	15,812		
Total	1149,5	23			

Anexo D. Ilustraciones

Anexo D.1. Reducción de tamaño de partículas de rastrojo de trigo



Ilustración 8. Reducción de tamaño de partículas de rastrojos de trigo. A: Máquina chipeadora (Marca: LASKI Spol. S.S.O, Modelo: KDO 90/12). **B:** Molino de cuchillas (Marca: Wiley Mill, Modelo: Model. #2, Arthur H. Thomas Co.). Ambos utilizados en el proceso de reducción de tamaño rastrojo de trigo. Lugar: A: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, B: Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Anexo D.2. Siembra de placas Petri e inoculación de tubos de ensayo con hongos de pudrición blanca (HPB)



Ilustración 9. Preparación de placas Petri para siembra con hongos de pudrición blanca (HPB). A: Placas Petri sometidas a luz ultravioleta por 10 [min] en la cámara de flujo (Marca: Bioair, Modelo: Aura Mini). **B:** Placas Petri sembradas con HPB colocadas en la cámara incubadora (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270). Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

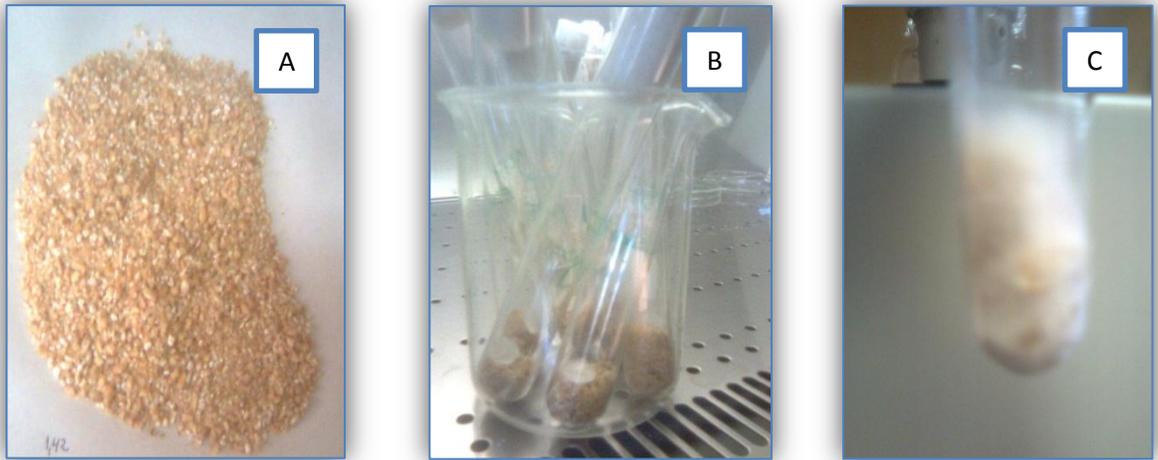


Ilustración 10. Preparación de tubos de ensayo para ser inoculados con hongos de pudrición blanca (HPB). A: granos de trigo después de pasar por la juguera de cuchillas. B: inoculación de los granos molidos de trigo en los tubos de ensayo con HPB provenientes de las placas Petri. C: crecimiento de micelios al interior de tubos de ensayo luego de una semana de incubación. Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Anexo D.3. Preparación rastrojo de trigo, inoculación de matraces Erlenmeyer, pretratamiento y posterior almacenamiento



Ilustración 11. Proceso de preparación de rastrojo de trigo molido y matraces Erlenmeyer. A: Secado de rastrojo de trigo molido para calcular factor de humedad. B: Matraces Erlenmeyer con 50 [g] base seca de rastrojo de trigo molido en su interior. C: Autoclavado de matraces Erlenmeyer. D: Medición de peso total del matraz Erlenmeyer previo a inoculación con granos molidos de trigo como vehículos de transporte de hongos de pudrición blanca (HPB). Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

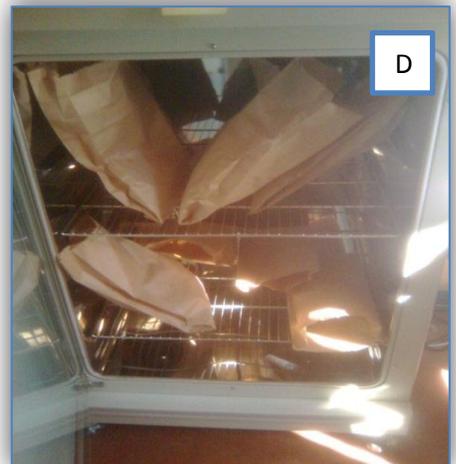


Ilustración 12. Inoculación matraces Erlenmeyer con hongos de pudrición blanca (HPB). A: Traspaso de los granos molidos en tubos de ensayo a los matraces Erlenmeyer para llevar a cabo la inoculación de los HPB. B: Matraces inoculados colocados en la cámara incubadora (Marca: ZHICHENG, Modelo: ZDP-A2270) durante 25 días. C: Crecimiento de micelios al interior de uno de los 9 matraces Erlenmeyer durante el pretratamiento. D: Almacenamiento del contenido de los matraces Erlenmeyer en bolsas de papel concluido el proceso de pretratamiento y secado. Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Anexo D.4. Proceso de sacarificación

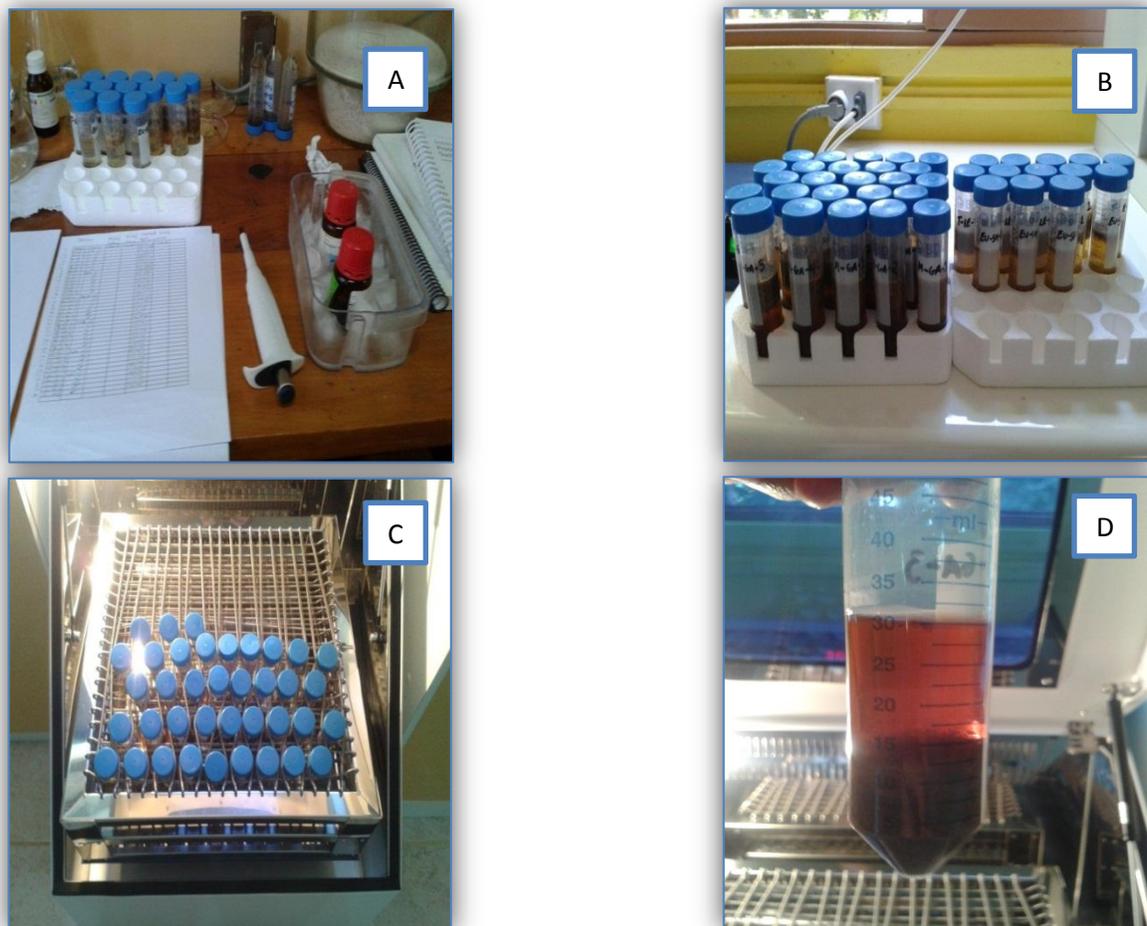


Ilustración 13. Proceso de sacarificación. A: Preparación de tubos Falcon, adición de elementos. **B:** 38 tubos Falcon preparados para el proceso de sacarificación. **C:** 38 tubos Falcon en el agitador orbital (Marca: Labtech, Modelo: LS1-3016 A) a 50 [°C] y 200 RPM por un período de 72 [hrs]. **D:** tubo Falcon posterior al período de 72 [hrs] de sacarificación, en el fondo restos lignocelulósicos y la fase líquida con contenido de azúcares. Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Anexo D.5. Determinación de concentraciones de glucosa del proceso de sacarificación

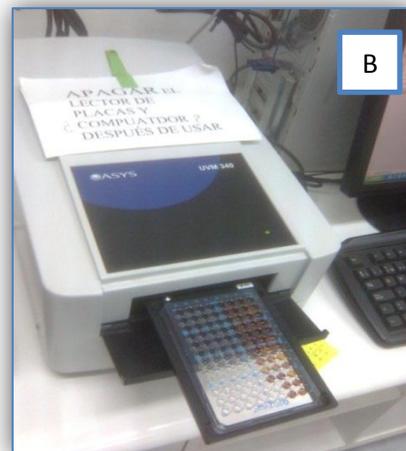


Ilustración 14. Proceso de cuantificación de concentraciones de glucosa. A: Tubos Falcon con fases líquidas de la sacarificación. B: Espectrofotómetro de placas (Marca: Biochrom Asys, Modelo: UVM340), se aprecia en la figura la gradilla con múltiples pocillos para hacer lecturas simultáneas. Lugar: CIBYB de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Anexo D.6. Fermentaciones



Ilustración 15. Dilución fases líquidas de sacarificaciones. A: Proceso de dilución, se agregó tampón Acetato de Sodio 0,05 M y pH 4,8 con el uso de una bureta B: Fases líquidas de sacarificación diluidas a una concentración de $2 \frac{g}{L}$ de glucosa. Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

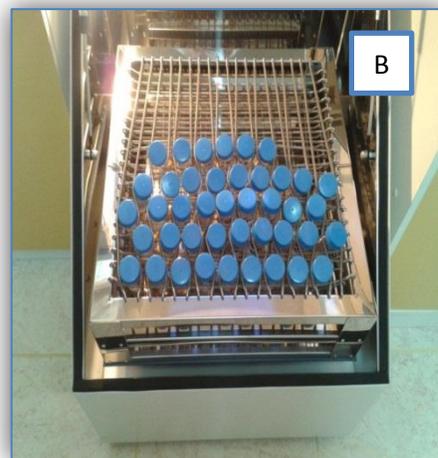
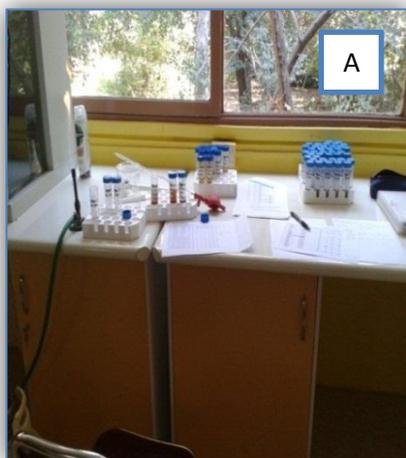


Ilustración 16. Preparación de fermentaciones. A: Adición de componentes. B: 42 tubos Falcon en el agitador orbital (Marca: Labtech, Modelo: LS1-3016 A) a 40 [°C] y 200 RPM por un período de 72 [hrs]. Lugar: Departamento de Ingeniería de la Madera y sus Biomateriales de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile.

Anexo D.7. Determinación de concentraciones de bioetanol del proceso de fermentación

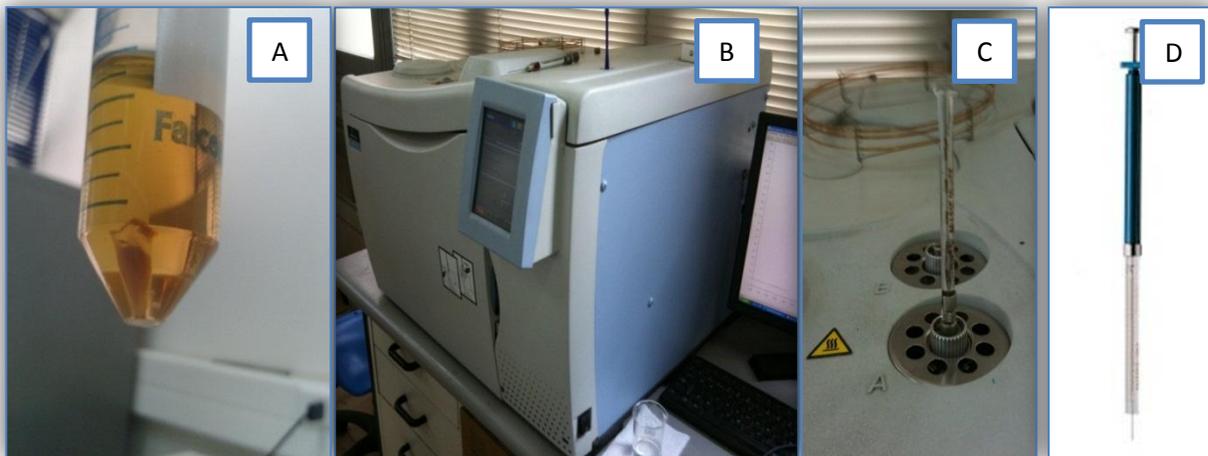


Ilustración 17. Determinación de concentraciones de bioetanol. A: Tubo Falcon de fermentación posterior a la centrifugación a 5000 RPM por 30 [min], en el fondo se aprecia el pellet de levaduras, toda la fase líquida es recuperada para análisis. B: Cromatógrafo de gases (Marca: Perkin Elmer, Modelo: Clarus 500). C: Inserción de jeringa en el equipo, un total de 5 [μL] por muestra. D: Jeringa Hamilton Gastight Serie 1700 Modelo 1701RN de 10 [μL] utilizada en la memoria. Lugar: Laboratorio de Catálisis de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

Anexo D.8. Envío de muestras al laboratorio de isótopos ambientales para determinación de $\delta^{13}\text{C}$ en la fracción de bioetanol

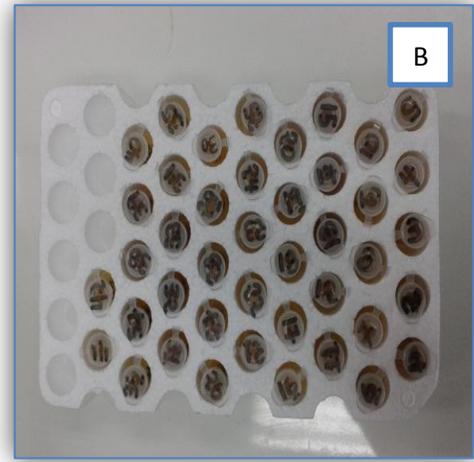


Ilustración 18. Envío de muestras al Laboratorio de Isótopos Ambientales de la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá. A: Tubo Eppendorf de 2 [mL] con muestra de fase líquida de una fermentación. B: Gradilla de plumavit conteniendo los 42 tubos Eppendorf para análisis.