



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

Estudio de la Factibilidad de Producción de Etanol a Partir de Residuos de *Chusquea culeou*

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

DIEGO MARCELO DE LA FUENTE LLOVET

PROFESOR GUÍA:

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE
FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO DE CHILE
JUNIO 2012

Actualmente, el etanol es considerado una alternativa para cubrir parte de la creciente demanda de la gasolina y para sustituir al combustible fósil por uno más amigable con el medio ambiente. Su relativamente alto poder calorífico, gran octanaje y contenido de oxígeno avalan esta tendencia. Así, los últimos estudios han apuntado a la obtención de etanol a partir de diversas fuentes y a mejorar los procedimientos para una producción más eficiente.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la factibilidad técnica y prefactibilidad económica para producir bioetanol a partir de residuos de *Chusquea culeou* por medio del estudio de dos estrategias de pretratamiento: ácido diluido y fraccionamiento celulósico a través de solvente orgánico y de celulosa (COSLIF). La materia prima seleccionada, *Chusquea culeou*, es una especie más conocida como colihue, abunda en la zona sur del país, tiene un rápido crecimiento y su riqueza no ha sido bien aprovechada.

El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido comprende la disolución de la hemicelulosa utilizando ácido sulfúrico a una baja concentración y a altas temperaturas. Por su parte, el pretratamiento COSLIF comprende el uso de ácido fosfórico como solvente de celulosa y el uso de etanol como solvente orgánico para precipitar la celulosa y la hemicelulosa con el fin de separar parcialmente la lignina.

Para estudiar ambos pretratamientos se desarrollaron dos experimentos. En el primero, se ensayó el pretratamiento de colihue con ácido diluido, utilizando como variable la concentración de ácido sulfúrico y la concentración de celulosa en la hidrólisis. Las muestras se pretrataron a 121°C, por 30 minutos y fueron sumergidas en soluciones con ácido cuya concentración varió entre 0,5% y 2% v/v. En el segundo experimento se utilizaron las condiciones óptimas reportadas en la literatura para el pretratamiento COSLIF, es decir, ácido fosfórico al 85% v/v, a 50°C y por 1 hora. La variable medida en este caso fue la carga enzimática durante la sacarificación del material, la cual varió entre 15, 30 y 40 FPU/gr.

De los resultados obtenidos se observó que tanto el aumento en la concentración de ácido sulfúrico como en la carga enzimática tienen como consecuencia un incremento en los niveles de sacarificación del material pretratado con ácido diluido. No se puede decir lo mismo del pretratamiento COSLIF ya que los niveles de glucosa alcanzados con una rápida cinética de reacción, no se correlacionaron con los de carga enzimática en el rango estudiado, por lo que se puede pensar que se deben ensayar menores concentraciones de enzima para observar el efecto de la carga enzimática en el rendimiento de la sacarificación. De todas formas, a partir de los resultados se desprende que el pretratamiento es una etapa necesaria para incrementar la liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática.

El pretratamiento que reportó un mayor rendimiento en la sacarificación fue el COSLIF, alcanzándose un 51% de conversión de celulosa en glucosa con 30 FPU/gr, mientras que la mayor conversión obtenida con ácido sulfúrico diluido fue sólo de un 10,4% usando 2% v/v, 30 FPU/gr y 30 CBU/gr.

Posteriormente se estudió la rentabilidad económica del proceso. Se definió un índice para señalar si la utilización de las metodologías estudiadas es rentable. Para eso, se restaron los costos de los insumos principales de los pretratamientos a los ingresos por concepto de venta del producto. Así, se determinó que a partir del colihue disponible en Chile, la mayor cantidad de etanol que se puede obtener con los resultados recabados es de 720.814 [m³] a partir de la condición 85% v/v de ácido fosfórico y 30 FPU/gr. Además se estimó que ninguna de las condiciones estudiadas es rentable pero que un proceso que utiliza el pretratamiento COSLIF podría ser rentable si se disminuye la carga enzimática y se incrementa el rendimiento de la etapa de sacarificación.

Agradecimientos

Llega este momento y no sé cómo, por dónde ni con quién partir. Supongo que lo justo es agradecerle a los que me acompañaron durante este largo camino pero probablemente por lo mismo, por su extensión, las personas que pienso, van a tener que estar en un espacio mucho más reducido que el que reservo para ellos en mi fuero interno.

Comienzo con mi familia: gracias Madre mía por ser la mejor del mundo; gracias por apoyarme siempre y confiar en mí. Gracias Pa por hacerme entender que la vida es más entretenida con esfuerzo y perseverancia. Mil gracias a mis piojas, la Simona y la Josefita que por ellas este periplo se hizo más llevadero. Le agradezco al Fantasma querido por deconstruir y construir todo llenando mi cabeza de nuevos mundos. En fin, le agradezco a toda mi familia (incluidos los Yañez Ruiz) porque han mantenido la paz, la fuerza y la alegría de mi vida.

Por otro lado está el fútbol, mi gran compañero y arma de doble filo: entre vicio y válvula de escape. En ese sentido quiero agradecerles a todos mis compañeros de equipo: a los del Shago, de USB, de la Facultad, de la Universidad, de la Mecánica, de DNA, del DIQBT, de Beauchef F. C., de HPR, de Un Equipo y del CDN. A todos ellos muchas gracias porque con sus pases, gambetas y goles, me enseñaron a ver la vida desde el punto de vista del otro.

Mención especial a mis compañeros de curso del glorioso SJE: Cota, Ro, Nati, Pablo (la Ati también), Pipe, Nacho, Logan, Tomichael, gracias por las reuniones que todo pueden hacer recordar.

A mis compañeros de facultad: Las Feñas, la Cami Flakucha, la Ale, la Barbi, la Sota, la Lili y a los hombres; al Impe, al Luquitas, al Kim, al Richi y a los de primer año. A todos ellos un abrazo apretado. A mis compañeros del DIQBT: Lore, Nico, Edu, Chico, Maripa, Pablote, Esteban, Cami Bay, Richard, Curotto, Gabi, Pan y Camilo, todos conformamos una generación (excepto Pablote, pero igual lo aceptamos) especial. Sé que los caminos serán distintos pero en algún punto nos tenemos que juntar y hacer algo entre todos porque somos un grupo que tiene potencial.

A todo el cuerpo docente y funcionarios del DIQBT y en especial a la profesora María Elena quién siempre tuvo el tiempo y la paciencia para guiarme en esta última etapa. Su dedicación y compromiso deben ser difíciles de igualar. Muchas gracias profe.

A Gonzalo por ser mi compañero de armas, apoyándonos siempre en la espalda del otro sorteamos dificultades que estando solos se habrían complicado. Un abrazo grande compadrito y espero que esta amistad trascienda a la U. Lo mismo pasa con Pablito, fiel amigo de toda la vida que me instó y motivó a seguir este camino y siempre estuvo ahí en los momentos precisos. Muchas gracias a los dos.

Y finalmente gracias a la personita más linda que me podría haber tocado de polola. Natoncita, (si, no me pongo rojo) tus ojitos tornasoles me alumbraron el camino de la forma más alegre y optimista posible. Muchas gracias por tus ánimos infinitos, por siempre confiar en mí y por los buenos momentos que adornaron mi estadía en esta Facultad (que de no haber sido por ella, no te habría conocido jamás). Un beso gigante y muchísimas gracias.

Contenido

CAPÍTULO I: Motivación, Marco Teórico, Antecedentes y Objetivos.

1	Motivación	1
1.1	Antecedentes Energéticos y Medioambientales.....	1
1.2	Situación energética y del bioetanol en Chile.....	2
1.3	Bioetanol como combustible.	4
1.4	Potencial del colihue para la producción de etanol.....	6
2	Marco Teórico	8
2.1	Estructura molecular material lignocelulósico.....	8
2.1.1	Macroestructura de la materia vegetal.....	8
2.1.2	Estructura y crecimiento de las bambusáceas.....	8
2.1.3	Chusquea culeou como materia prima para la producción de bioetanol.....	9
2.2	Pretratamientos del material lignocelulósico.....	11
2.2.1	Pretratamiento con ácido diluido.....	12
2.2.2	Pretratamiento y fraccionamiento de lignocelulosa a través de solvente orgánico y de celulosa (COSLIF).....	13
2.3	Sistema de celulasas para la hidrólisis enzimática.....	14
3	Antecedentes	16
3.1	Procedimientos y resultados obtenidos con pretratamientos con ácido sulfúrico diluido.....	16
3.2	Procedimientos y resultados obtenidos con pretratamiento COSLIF.....	18
3.3	Contenido de glucosa en el colihue a pretratar.....	20
4	Objetivos	21
4.1	Objetivo General	21
4.2	Objetivos Específicos.....	21

CAPÍTULO II: Materiales y Metodología

5	Materiales	22
5.1	Materia Prima.....	22
5.2	Enzimas.....	22
5.3	Reactivos	22
6	Metodologías	23
6.1	Triturado y tamizado del colihue	24
6.2	Secado y determinación de humedad del material	24
6.3	Determinación de la actividad de la celulasa.....	24

6.4	Determinación de la actividad de las celobiasas.....	24
6.5	Pretratamiento con ácido diluido	24
6.6	Pretratamiento COSLIF.....	25
6.7	Hidrólisis enzimática o sacarificación.....	25
6.8	Medición de glucosa.....	26

CAPÍTULO III: Resultados y Discusión.

7	Resultados	27
7.1	Sacarificación del material pretratado con ácido diluido	27
	Efecto de la razón celulosa/celobiasa	31
7.2	Sacarificación del material pretratado con COSLIF	32
7.3	Rendimientos obtenidos	36
	7.3.1 Pretratamiento ácido diluido	36
	7.3.2 Pretratamiento COSLIF.....	37
	7.3.3 Comparación de rendimientos.....	37
7.4	Etanol potencial y comparación de rentabilidad de los pretratamientos estudiados.....	39

CAPÍTULO IV: Conclusión y Recomendaciones.

8	Conclusión	45
9	Recomendaciones	46
10	Bibliografía	47
11	Anexos	53
	11.1 Anexo 1: Propiedades fisicoquímicas de la gasolina y combustibles oxigenados.....	53
	11.2 Anexo 2: Estructura macro y micro-molecular de la biomasa lignocelulósica.....	54
	11.3 Anexo 3: Composición del colihue y otros materiales.	55
	11.4 Anexo 4: Rendimientos de sacarificación obtenidos utilizando el pretratamiento con ácido diluido en distintos tipos de materiales lignocelulósicos.....	56
	11.5 Anexo 5: Memoria de Cálculos.....	57
	11.6 Anexo 6: Materiales y Montajes experimentales	62
	11.7 Anexo 7: Niveles de sacarificación y rendimientos obtenidos con pretratamiento con ácido diluido y COSLIF.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1-1: Fuentes de emisiones mundiales de CO₂</i>	2
<i>Figura 1-2: Estimación de demanda de biocombustibles hasta el 2050</i>	6
<i>Figura 2-1: Estructura nanométrica de la pared celular de las bambusáceas</i>	9
<i>Figura 2-2: Esquema del rol del pretratamiento en el proceso de producción de bioetanol</i>	12
<i>Figura 2-3: Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina. Los cuadrados sólidos representan extremos reductores mientras que los cuadrados abiertos representan los extremos no reductores</i>	15
<i>Figura 3-1: Perfiles cinéticos para la liberación de glucosa obtenidos por Nicklitschek en lenga</i>	17
<i>Figura 3-2: Perfiles de la hidrólisis enzimática de la celulosa luego de pretratar bambú con el método COSLIF</i>	19
<i>Figura 6-1: Diagrama de Bloques de las etapas involucradas en el pretratamiento con ácido diluido para la producción de bioetanol a partir de residuos de colihue</i>	23
<i>Figura 6-2: Diagrama de Bloques de las etapas involucradas en el pretratamiento con ácido diluido para la producción de bioetanol a partir de residuos de colihue</i>	23
<i>Figura 7-1: Cinéticas de sacarificación para las distintas condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática</i>	28
<i>Figura 7-2: Niveles de sacarificación para las distintas condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática</i>	29
<i>Figura 7-3: Niveles de glucosa generada por gramo del material pretratado con ácido sulfúrico diluido después de 72 h de sacarificación en función de la concentración de ácido aplicada</i>	30
<i>Figura 7-4: Niveles de glucosa generada por gramo del material pretratado con ácido sulfúrico diluido después de 72 h de sacarificación</i>	30
<i>Figura 7-5: Cinética de sacarificación para el material pretratado con ácido sulfúrico diluido al 2 %v/v, 30 FPU de celulosa y distintas cargas de celobiasa</i>	32
<i>Figura 7-6: Cinéticas de sacarificación para material pretratado con COSLIF (H₃PO₄ a 85% v/v y 50°C) y sometido a distintas cargas enzimáticas</i>	33
<i>Figura 7-7: Líneas de tendencia de las cinéticas de sacarificación para materiales pretratados con COSLIF (H₃PO₄ a 85% v/v y 50°C) y sometidos a distintas cargas enzimáticas</i>	34
<i>Figura 7-8: Niveles de glucosa generada por gramo del material pretratado con COSLIF después de la sacarificación</i>	35
<i>Figura 7-9: Rendimientos de sacarificación de material pretratado con ácido sulfúrico diluido y con método COSLIF</i>	38
<i>Figura 7-10: Analisis de sensibilidad del rendimiento de sacarificación: Utilidades obtenidas al variar porcentualmente el rendimiento de sacarificación</i>	43
<i>Figura A 1: Estructura de la biomasa lignocelulósica [51]</i>	54
<i>Figura A 2: Chusquea culeou antes de ser pretratada</i>	62

<i>Figura A 3: Máquina astilladora proporcionada por la Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile.</i>	62
<i>Figura A 4: Montaje de los pretratamientos.</i>	63
<i>Figura A 5: Ensayo para determinar la humedad del material.</i>	63
<i>Figura A 6: Sistema de filtración para preparar el material para la sacarificación.</i>	64
<i>Figura A 7: (a) Rotor utilizado para centrifugar las muestras tomadas. (b) Agitador rotatorio utilizado en la reacción de sacarificación. Condiciones de operación: 250 RPM, 50°C por 72 horas.</i>	64
<i>Figura A 8: Diferencias de concentración después de sacarificar distintas muestras.</i>	64

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2-1: Composición química del colihue.</i>	10
<i>Tabla 2-2: Composición química de la bambusácea <i>Dendrocalamus asper</i>.</i>	11
<i>Tabla 3-1: Liberación de glucosa obtenida a partir de <i>Dendrocalamus asper</i> por medio de pretratamiento con ácido diluido.</i>	17
<i>Tabla 3-2: Digestión de glucano de bambú tras 72 h de hidrólisis enzimática.</i>	19
<i>Tabla 7-1: Costos de las materias primas asociadas a cada pretratamiento y razones de materia prima que se deben utilizar para procesar un kilogramo de colihue.</i>	40
<i>Tabla 7-2: Etanol potencial y utilidades por concepto de ventas de producto en relación a los costos de las principales materias primas.</i>	41
<i>Tabla 7-3: Estimación de rendimiento hipotético pretratando el material con COSLIF y sacarificándolo con 1 FPU/gr.</i>	43
<i>Tabla A 1: Propiedades físicoquímicas de la gasolina y combustibles oxigenados.</i>	53
<i>Tabla A 2: Composición del nodo del colihue en %bms.</i>	55
<i>Tabla A 3: Composición de lignina, hemicelulosa y celulosa de distintas materias primas.</i>	55
<i>Tabla A 4: Rendimientos de sacarificación obtenidos de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica pretratada con ácido diluido.</i>	56
<i>Tabla A 5: Niveles de liberación de glucosa y rendimientos de sacarificación del colihue pretratado con ácido sulfúrico diluido.</i>	655
<i>Tabla A 6: Niveles de liberación de glucosa y rendimientos de sacarificación del colihue pretratado por COSLIF.</i>	655

Lista de definición de términos y abreviaciones

MTBE = Metil-tertbutil-eter.

GEI = Gases de efecto invernadero.

Mt = Millones de toneladas.

ERNC = Energías renovables no convencionales.

GNL = Gas natural licuado.

OCDE = Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico.

bms = Base de madera seca.

bmsle = Base de madera seca libre de extraíbles.

AFEX = Explosión de fibras por amoníaco.

FPU = Unidades de papel filtro.

CBU = Unidades de celobiasa.

COSLIF = Cellulose solvent and organic solvent lignocelluloses fractionation (Fraccionamiento de lignocelulosa a través de solvente orgánico y de celulosa)

INTEC = Corporación de Investigación Tecnológica de Chile.

Capítulo I

Motivación, Marco Teórico, Antecedentes y Objetivos

1 Motivación

Esta sección tiene como objetivo dar a conocer las motivaciones del presente trabajo. Para ello se contextualiza la problemática reportando los antecedentes energéticos y medioambientales que hoy se enfrentan en el mundo. Se muestra además una reseña respecto a la situación energética del país y se define el bioetanol como biocombustible dando a conocer su uso como una posible solución para paliar parte del problema. Finalmente se reconoce a la Chusquea culeou o colihue como una posible alternativa para la producción de bioetanol en Chile, informando respecto a sus potenciales ventajas en caso de ser utilizado en el proceso de producción de dicho combustible.

1.1 Antecedentes Energéticos y Medioambientales

En un contexto mundial en que cada vez es más común hablar de crisis económica y problemas medioambientales, el sector energético también se ha visto afectado, debido principalmente a que el consumo de energía aumenta sostenidamente, produciendo un agotamiento progresivo de las fuentes energéticas fósiles no renovables [1]. Este fenómeno se ve reflejado en el constante aumento del precio del petróleo que es fuente energética fósil, no renovable y que hoy en día figura como la energía primaria de mayor demanda, representando un 33% de la energía primaria total [2].

Respecto a los combustibles líquidos se estima que, si en el 2010 se produjeron 86 MM de barriles de combustibles líquidos/día, para el 2035 dicha cifra se elevará a unos 112,2 MM de barriles/día. En relación con los biocombustibles, se estima que la producción del año 2008, de 1,5 MM de barriles de biocombustibles/día, se triplique para el año 2035 [3].

Por otra parte, existe una gran preocupación en lo que al uso de los derivados del petróleo respecta. Se ha estudiado los efectos medioambientales generados por la combustión de dichos derivados y se ha determinado que es uno de los principales responsables del aumento de la concentración mundial de dióxido de carbono (CO₂), considerado el principal gas de efecto invernadero (GEI) antropogénico [4]. El crecimiento de las emanaciones de CO₂ por tipo de combustible desde 1970 hasta el 2009 se puede observar en la Figura 1. En la misma figura se muestran los porcentajes de emanaciones mundiales de CO₂ por tipo de combustible para el año 2009, siendo la combustión de los derivados del petróleo una importante fuente de emisión, ocupando un 37% del total.

Debido a los efectos de los GEI, se ha identificado al uso de los subproductos del crudo como un gran responsable en el fenómeno del calentamiento global, causante de gran parte de los cambios meteorológicos y del medio ambiente que se han suscitado en el último tiempo [5].

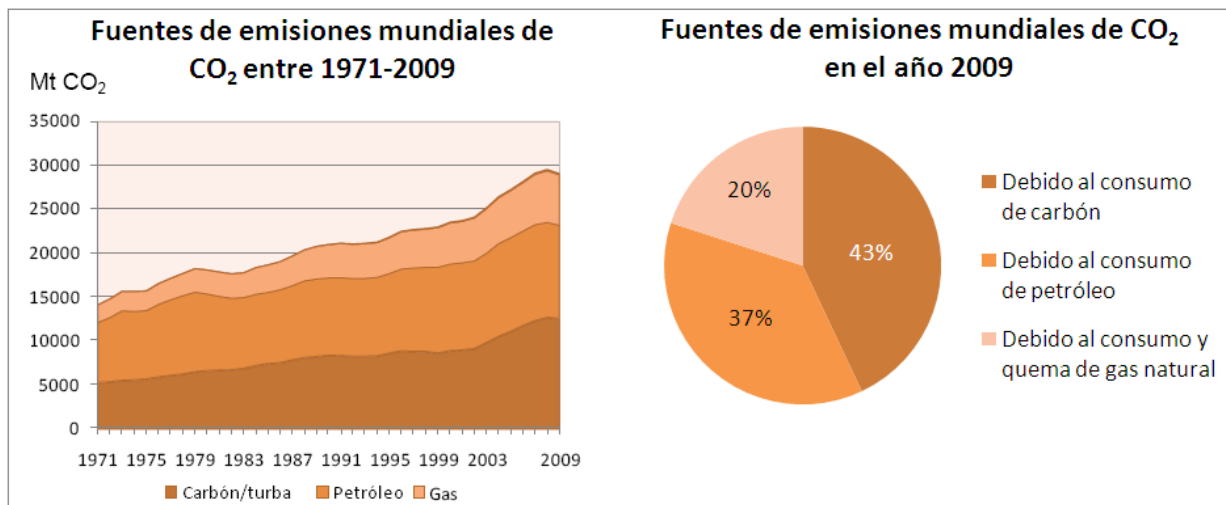


Figura 1-1: Fuentes de emisiones mundiales de CO₂ (Adaptación de [4])

Teniendo en cuenta la tendencia de aumento en el precio del petróleo y que es un recurso cada vez más escaso, junto con la preocupación por encontrar alternativas más sustentables y amigables con el medio ambiente, es que en los últimos años se han incrementado los esfuerzos para reemplazarlo [6]. Acorde con la contingencia mundial, el año 2008, en Chile se promulga la ley 20.257 donde se define el concepto de energías renovables no convencionales (ERNC). Dichas energías incluyen pequeñas hidroeléctricas, provenientes de la biomasa, hidráulica, geotérmica, solar, eólica y maremotriz entre otras [7].

Dependiendo de las formas de utilización de las energías renovables no convencionales, se pueden producir impactos ambientales significativos, disminuyendo aquellos que se producen por las fuentes convencionales de energía y por otra parte, contribuyendo con el aseguramiento de suministro energético y con la sustentabilidad ambiental de las políticas energéticas. La magnitud de la contribución y la implementación y viabilidad económica de las políticas energéticas que se debieran utilizar para mitigar el impacto de las fuentes convencionales de energía dependen de las particularidades de cada país. Dichas particularidades comprenden la ubicación geográfica, el potencial exportable de sus recursos renovables y la característica de los mercados energéticos donde competirán. [8]

1.2 Situación energética y del bioetanol en Chile.

Así como en el mundo, el tema energético, y en particular el de los combustibles, ha sido un asunto de preocupación en Chile. La principal crisis energética del último tiempo, y que dio la señal de alerta respecto a la necesidad de diversificación de la matriz nacional, fue la sufrida en el año 1998 debido a una intensa sequía y a una tardía puesta en marcha de la central Nehuelco. Esto trajo como consecuencias cortes en el suministro e intervenciones legales que apuntaban a reducir y a racionar el consumo eléctrico [9].

Con el objetivo de expandir la matriz energética, en 1995, Chile firma con Argentina el protocolo de integración gasífera. De esta forma, el país no sería tan dependiente de sus recursos hídricos y comenzaría una disminución de los precios [10].

El bajo precio del gas natural, junto a los menores costos de inversión en la instalación de plantas térmicas, concentró el desarrollo eléctrico casi exclusivamente en este combustible, lo que obstaculizó la diversificación de fuentes, requisito urgente para el logro de la seguridad energética [11].

En el año 2004 se comienza a restringir la exportación del recurso a nuestro país ocasionando la “crisis del gas” [12], que se manifestó en escasez de combustibles para la producción de energías debido a la gran dependencia del gas natural. Ante la incertidumbre y debido a las adaptaciones hechas en las centrales termoeléctricas para utilizar diesel y/o petróleo en vez de gas natural, el precio de los combustibles comenzó a subir. Eso, sumado a la poca disponibilidad de hidroelectricidad hacia fines del 2007 y comienzos del 2008, provocó que el sistema de generación se adaptara utilizando combustibles más caros como el diesel o el petróleo [13].

De esta forma, se empezaron a plantear otras alternativas para diversificar y expandir la matriz energética. Una de las medidas fue la implementación de dos puertos, el de Mejillones y el de Quinteros, equipados para recibir gas natural licuado (GNL) de países con los que se suscribieron acuerdos energéticos [14]. Además, el alza en el precio del petróleo constatada durante la guerra de Irak, en el año 2003 y que se ha sostenido hasta hoy, obligó a la búsqueda de otra alternativa, encontrándose en el carbón una opción plausible debido a que es un recurso que tiene una mayor estabilidad en sus precios, suministro mundial y reservas probadas [13].

No obstante, el uso de energías con altos valores de liberación de CO₂ como el carbón o el petróleo, junto con el crecimiento que ha experimentado un país que debe cumplir con las expectativas del selecto grupo de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) al cual Chile suscribió, son factores que con mucha seguridad han incidido en que el país tenga la segunda mayor tasa de crecimiento de emisión de CO₂ (período 1990-2009) entre los países de la OCDE, sólo superado por Corea [15].

Si bien el país no cuenta con un impuesto específico por concepto de emisiones de CO₂, se han tomado otras medidas para incorporar tecnologías alternativas en la matriz energética, que junto con disminuir el nivel de emisiones, tienen la misión de reducir la dependencia de la matriz de combustibles importados ya que hasta el año 2008 alrededor del 70% de la energía consumida en todos los sectores, era importada [16].

En el año 2008 entró en vigencia la ley 20.257, la cual obliga a las empresas generadoras con capacidad por sobre los 200 MW a acreditar que al menos el 5% de la energía que comercializan es renovable no convencional. Esta exigencia se incrementa anualmente en un 0,5% a partir del 2015 hasta un 10% para el año 2024 [7] aunque una de las metas del actual gobierno es incrementar ese valor a un 20% para el 2020 con el proyecto de ley 20/20, siendo las fuentes claves para lograr dicho objetivo, la energía

geotérmica y la solar [17]. A partir del mismo año, se impulsa una política nacional de biocombustibles como complemento a política nacional de energía, prestando apoyo por medio de catastros de materias primas e investigadores así como por la generación de convenios entre entidades públicas y privadas con diversos países que son referentes internacionales permitiendo también que se creen empresas con capital extranjero y disponiendo de instrumentos de fomento productivo [18].

1.3 Bioetanol como combustible.

Los biocombustibles son recursos energéticos procesados por el ser humano a partir de biomasa, que pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos y que tienen como última finalidad la liberación de la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión. Estos recursos pueden ser de varios tipos y son comúnmente clasificados según el insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos. Debido a los avances de dichas tecnologías, esta clasificación se realiza por generaciones.

Los biocombustibles de primera generación son los que se obtienen, en mayor parte, de las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de azúcares, almidón y/o aceites. Para producirlos se utilizan tecnologías convencionales como fermentación (bioetanol), transesterificación (biodiesel) o digestión aeróbica (biogás).

Los biocombustibles de segunda generación corresponden a los obtenidos a partir de residuos agrícolas y forestales con contenido celulósico, los cuales son sometidos a procesos productivos más complejos como la sacarificación-fermentación o el proceso Fischer-Tropsch, para obtener productos como bioetanol, metanol o gas de síntesis. La principal ventaja respecto a los de primera generación es que en su elaboración no hay desviación de los recursos alimenticios provenientes de la agricultura, aunque comparativamente hay una menor ganancia respecto a la disminución de gases de efecto invernadero.

Adicionalmente se encuentran los biocombustibles de tercera y cuarta generación, que son producidos a partir de cultivos energéticos (exclusivos para la producción de energía) y de bacterias genéticamente modificadas respectivamente [19].

El bioetanol se define como alcohol etílico deshidratado, producido a través de la fermentación de biomasa rica en hidratos de carbono. Se puede emplear en motores de combustión interna, tanto como combustible único o mezclado con gasolina [20]. Para dicho propósito, se debe utilizar un agente desnaturizante que cambia las propiedades organolépticas del etanol excluyéndolo como producto para consumo humano [21]. Como se mencionó anteriormente, el bioetanol se obtiene a través de la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa. En caso que se obtenga a partir de residuos forestales y agrícolas, se clasifica como biocombustible de segunda generación y su proceso de obtención se puede resumir en las siguientes etapas:

- a) Molienda del material (si es necesario)
- b) Pre-tratamiento del material
- c) Hidrólisis (o sacarificación)
- d) Fermentación
- e) Destilación
- f) Deshidratación [22]

En caso de emplear bioetanol puro en un motor de combustión interna, éste debe estar diseñado específicamente para ello [21] y se puede utilizar con una pureza de 95% (alcohol hidratado) [23]. Por otro lado, el uso de mezcla en proporciones bajas de bioetanol en gasolina es posible siempre y cuando se utilice en su forma anhidra (99% de pureza) para eliminar efectos indeseables sobre la mezcla, producidos por el agua (separación de fases gasolina – etanol/agua) [21].

En el Anexo 1 se pueden apreciar las propiedades fisicoquímicas del bioetanol comparadas con las de la gasolina y otros combustibles oxigenados. De dichas propiedades se desprenden ventajas y desventajas del uso del biocombustible. Por una parte, al ser un combustible oxigenado tiene una combustión más limpia y eficiente lo que hace que la emisión de monóxido de carbono (CO) disminuya en un 32,5% y que al utilizarlo como aditivo en la gasolina, se reduzcan los niveles de emisión de óxidos de nitrógeno [24]. Además tiene un mayor octanaje que la gasolina lo que implica un mejor comportamiento antidetonante y que si se ajusta apropiadamente el radio de compresión del motor, aumente su eficiencia [23]. Por otra parte, no sería descartado en una eventual masificación de celdas combustibles ya que es apropiado para la reformación de hidrógeno [25] y cuenta además con una baja presión de vapor de Reid, lo que deriva en una lenta evaporación, reduciendo el riesgo de explosiones [23]. Sin embargo, la última característica mencionada, si bien tiene una parte positiva, es considerada una de las grandes desventajas del uso del bioetanol ya que su baja presión de Reid perjudica el encendido de motor a bajas temperaturas, obligando al uso de componentes auxiliares para encender el motor bajo los 20°C. Otros aspectos negativos son su menor contenido energético en relación a la gasolina, lo que merma la eficiencia por unidad de volumen del biocombustible y que su uso en forma anhidra obliga a un acondicionamiento del motor [23].

Por otro lado, si se comparan las propiedades del bioetanol con las del Metil-tertbutil-eter (MTBE), que corresponde a un combustible líquido con contenido de oxígeno, se observa que el MTBE es un mejor combustible en cuanto a contenido energético y octanaje, sin embargo, se ha observado debido a fugas en tanques contenedores subterráneos, que con pequeñas cantidades de MTBE en agua, esta última queda inutilizable y por lo tanto se deben extremar los cuidados de transporte y almacenamiento del combustible.

Con respecto al metanol, el bioetanol lo supera en octanaje y contenido energético y además no es tóxico, por lo tanto es más apropiado para el uso como combustible líquido [24].

En cuanto a la demanda del bioetanol, se estima que esta representará alrededor de un 73% de la demanda total de biocombustibles en 2020 [26] mientras que la oferta de bioetanol a partir de material

lignocelulósico comenzará a expandirse con mayor rapidez después de ese año [27]. En la Figura 2 se muestra dicho aumento respecto a otros biocombustibles, indicando que se espera que sea un referente en el mercado energético de los próximos años.

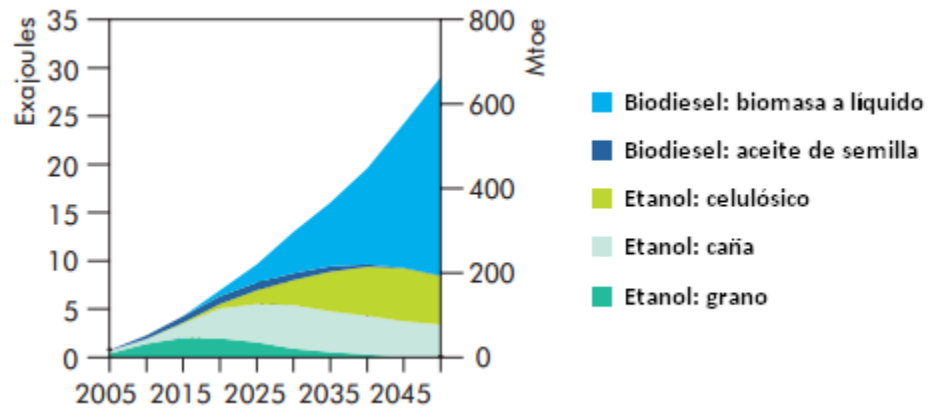


Figura 1-2: Estimación de demanda de biocombustibles hasta el 2050 (Adaptación de [27])

1.4 Potencial del colihue para la producción de etanol.

Como se señaló anteriormente, es posible obtener etanol a partir de residuos de material lignocelulósico transformándolo en un biocombustible de segunda generación. En el marco de este trabajo, la especie seleccionada como materia prima para el proceso de producción de bioetanol corresponde a *Chusquea culeou*, comúnmente conocida como colihue y que corresponde a una bambusácea autóctona, gramínea, perenne, endémica de la zona centro sur de Chile, formada por cañas sólidas, simples y sin ramificaciones. Mide entre 2 y 8 [m] de altura y posee hojas largas y delgadas de 2 a 8 [cm] de largo que nacen en los nodos [28].

Los principales demandantes corresponden a los siguientes rubros: Hortofruticultura (tutores), Minería (portatiros), Tabacos (proceso de secado), y Centros de Venta para Jardinería y Construcción, para los cuales se fabrican partes y piezas para producción de muebles. Sin embargo, los usos de esta materia prima tienen como elementos comunes la escasa incorporación de valor agregado y las pequeñas escalas de producción y utilización, con relación al potencial del recurso. Uno de los factores de este bajo desarrollo productivo, es de origen cultural. Tradicionalmente el colihue, es considerado en el mundo rural como una especie no deseada, lo que ha ocasionado que este recurso en pie tenga un valor cercano a cero y en frecuentes ocasiones se paga por su eliminación o extracción [29].

No obstante, el manejo sustentable de este tipo de especies tiene un rol social importante dentro de los ecosistemas forestales, permitiendo, entre otros aspectos, incrementar el ingreso de la población rural, disminuir la estacionalidad y temporalidad de generación de empleo en un sector como el forestal (donde dichas características están muy marcadas), facilitar la incorporación de pequeños propietarios, así como de la pequeña y micro empresa al desarrollo de áreas forestales y disminuir la presión sobre las especies madereras del bosque nativo ya que se valorizan al diversificar la oferta de productos potenciales [29].

Adicionalmente, las bambusáceas exhiben un rápido crecimiento, alcanzando su mayor tamaño en un par de meses [30]. Se estima que en una plantación de bambú se producen aproximadamente 26.650 cañas por hectárea durante un ciclo de 10 años en promedio y que en el mismo período de tiempo, la productividad anual promedio asciende a aproximadamente 95 toneladas de biomasa seca por hectárea en un año ton/ha/año. Lo anterior indica que los bambúes están entre los mayores productores de biomasa si se comparan con otras plantas bioenergéticas. Por ejemplo, la productividad del pasto varilla, *Panicum virgatum*, es de ~10-20 ton/ha/año, la del Miscanthus es de ~25-62 ton/ha/año, la del junco común es de ~44-69 y la de la caña de azúcar es de ~62-74 ton/ha/año [31].

En otro aspecto, el colihue en particular tiene un contenido de holocelulosa, celulosa y lignina comparable a los de latifoliadas [29], lo que le otorga una buena perspectiva para ser destinado a la obtención de los azúcares que componen su estructura y que pueden ser fermentados para la obtención de bioetanol.

2 Marco Teórico

En esta sección se presenta el marco teórico de la presente investigación. En él se describe la estructura molecular tanto de la materia vegetal como del material a utilizar así como las características de crecimiento de la especie de la cual se extrae y aquellas que se deben tener en consideración al momento de seleccionarla como materia prima del proceso de producción de etanol. Adicionalmente se describen los pretratamientos a estudiar y se describen los sistemas enzimáticos que se utilizan para sacarificar el material.

2.1 Estructura molecular material lignocelulósico.

2.1.1 Macroestructura de la materia vegetal.

La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, un complejo que está conformado por polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina. La composición y porcentaje de dichos polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento.

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4, siendo el disacárido de celobiosa la unidad repetida. Este polímero se acopla en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática.

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que constituyen cadenas ramificadas y por los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. Los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 [32]. Al formar cadenas ramificadas, no presenta regiones cristalinas, lo que la hace más susceptible a la hidrólisis química. [33]

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, formado por alcoholes aromáticos que dan soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales, constituyendo un material adherente que sostiene las fibras celulósicas. [32]

En la Figura A 1 del Anexo 2 se muestra un esquema ilustrando la conformación macro y microestructural de la materia lignocelulósica.

2.1.2 Estructura y crecimiento de las bambusáceas.

Los bambúes han sido reconocidos a lo largo de la historia por su gran utilidad en diversos ámbitos siendo uno de los más importantes, el de la construcción. Por lo mismo, han sido estudiadas sus propiedades estructurales y se ha determinado su conformación a escala nanométrica. En la Figura 2.1 se observa la estructura fibrilar de una especie de bambú llamada *Phyllostachys edulis*, en donde la pared celular que la sostiene está conformada por celulosa, hemicelulosa y lignina de forma aleatoria, teniendo una gran preponderancia los granos de celulosa que se distribuyen como adoquines en la matriz lignocelulósica [34].

Si bien no se han llevado a cabo estudios de este tipo con el colihue, se infiere que su estructura debe ser similar dada la composición de azúcares presentes en esta especie, cuyos valores si han sido determinados y donde la celulosa también es el complejo polimérico preponderante tal y como se muestra en la siguiente sección.

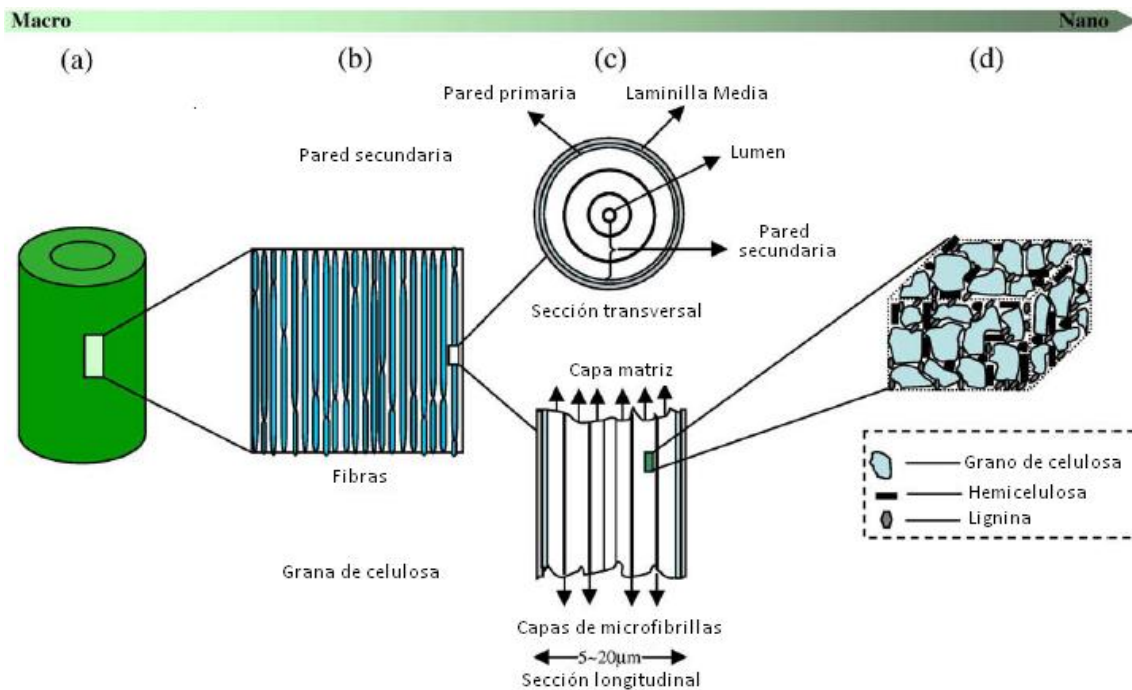


Figura 2-1:

Estructura nanométrica de la pared celular de las bambusáceas (Adaptación de [34]).

Con respecto al crecimiento de estas especies, se ha comprobado que las dimensiones definitivas de los culmos (denominación que se le da a las cañas o varas) de bambú tanto en diámetro como en altura se presentan al final de un primer período de crecimiento [29], que está determinado para cada especie. Transcurrido dicho período, comienza uno de lignificación en el que la lignina se va distribuyendo de forma pareja a lo largo del culmo siendo en un comienzo las secciones de mayor altura, las menos lignificadas [30].

En el caso del colihue, la lignificación total se logra a edades de 3 o 4 años. Un culmo de edades inferiores a la descrita se considera como inmaduro y al encontrarse en plena actividad fisiológica su permanencia resulta relevante para el metabolismo y continuidad de la planta [29].

2.1.3 Chusquea culeou como materia prima para la producción de bioetanol.

En Chile existen cerca de 14 especies de bambusáceas, de las cuales se obtienen diversos productos forestales madereros con presencia en 900 mil [ha] aproximadamente. Dicha existencia se concentra en las regiones IX, X y XI del país donde la biomasa de materia seca de colihue supera las 26 [Mt] y de las cuales 9,85 [Mt] corresponden a rodales puros que pueden ser considerados como un recurso potencial económico inmediato. La existencia media se ha estimado en 147,4 [ton de materia seca/ha], un número promedio de cañas por hectárea de 160.000 especies y la estimación de oferta anual sustentable,

determinada sobre criterios conservadores de corta selectiva de 25% de los individuos, determina una disponibilidad de *Chusquea culeou*, que es la especie que se estudia en este trabajo, de 2,46 [Mt/año]. Esta especie crece en zonas donde predomina el clima templado frío lluvioso, con precipitaciones anuales que superan los 4000 [mm] y en suelos derivados de reciente ceniza volcánica gruesa, ricos en contenido orgánico, ligeramente ácidos y de buen drenaje [29].

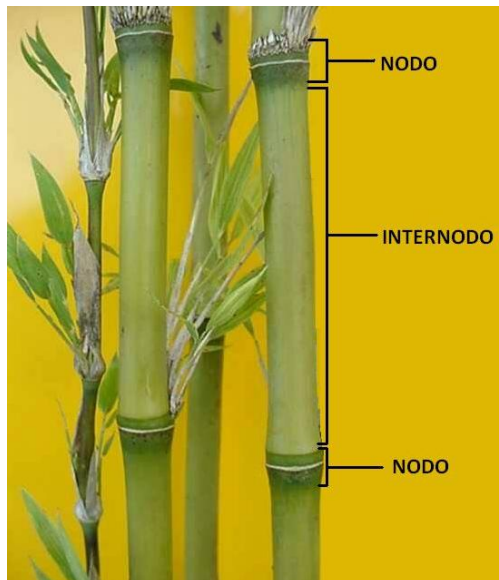


Ilustración 2-1: Nodos e internodos que son parte de la estructura del colihue (Adaptación de [35])

En la Tabla 2-1 se muestran la composición de muestras de colihue obtenidas en la X región del país, con lo cual se establecen valores teóricos de celulosa, holocelulosa y lignina. Dichos valores corresponden a los obtenidos para material provenientes de los nodos y de los internodos (Ilustración 2-1) que conforman las varas de colihue y están expresados en porcentaje base de madera seca (%bms) y en porcentaje base de madera seca libre de extraíbles (%bmsle) [29].

Tabla 2-1: Composición química del colihue

Propiedades	Nodo	Internodo
Extraíbles Totales (%bms)	16,8	17,8
Holocelulosa (%bmsle)	73,1	71,9
Lignina (%bmsle)	22,3	23,0
Celulosa (%bms)	51,4	51,5
Cenizas (%bms)	1,2	1,3

(Fuente: INTEC et al. [29])

De los valores de la Tabla 2-1 se desprende que el porcentaje, en base de madera seca, de la holocelulosa y la lignina son respectivamente 62,6% y 19,09% dado que se obtuvieron después de haber eliminado los extraíbles totales. El detalle del cálculo de esos valores se encuentra en el Anexo 3 junto con la Tabla A 2, que muestra la composición de lignina, holocelulosa y celulosa presente en diversos materiales lignocelulósicos. De ellos se puede desprender que el colihue tiene un porcentaje

considerable de celulosa y un bajo porcentaje de lignina en comparación con otras potenciales materias primas lignocelulósicas.

Sin embargo, la fuente donde se encontró la composición química expuesta anteriormente, no detalla el grado de madurez de los culmos, el cual tiene incidencia directa en su nivel de lignificación y por lo tanto puede ser un parámetro importante a la hora de determinar niveles de sacarificación por unidad másica de materia procesada. Por esa razón se muestra a continuación, en la Tabla 2-2, la composición química de muestras maduras de la especie *Dendrocalamus asper* [38]. Se observa un mayor grado de lignificación que el del colihue aunque la suma de porcentajes de celulosa y hemicelulosa son similares por lo que el material sigue teniendo buenas perspectivas para la obtención de etanol.

Tabla 2-2: Composición química de la bambusácea *Dendrocalamus asper* [38].

Composición	%bms
Celulosa como:	40,7
Glucano	40,7
Hemicelulosa como:	26,5
Xilano	23,6
Manano	0,6
Arabinano	1,1
Galactano	1,2
Ceniza	1,2
Lignina	27,1

(Fuente: Leenakul y Tippayawong [38])

2.2 Pretratamientos del material lignocelulósico.

La utilización de material lignocelulósico como materia prima en la producción de etanol requiere de la separación de sus componentes. Para eso, es esencial una etapa de pretratamiento del material, la cual tiene como objetivo desorganizar el complejo lignocelulósico a través de la remoción de la lignina y la hemicelulosa, reduciendo la cristalinidad de la celulosa e incrementando la porosidad de dicho material [33].

El pretratamiento puede ser llevado a cabo a través de procesos físicos (tamizado y molienda), fisicoquímicos (explosión de vapor, hidrotermólisis, Explosión de fibras por amoníaco (AFEX), explosión con CO₂ y oxidación húmeda), químicos (alcalino, ácido diluido, agentes oxidantes, ozonólisis, líquidos iónicos, fraccionamiento de lignocelulosa a través de solvente orgánico y de celulosa (COSLIF) y organosolv), biológicos (hongos de pudrición blanca) o eléctricos (campo eléctrico pulsado [36]) [37] que pueden asociarse o anteceder a la etapa de hidrólisis de los polisacáridos para obtener sus respectivas unidades monoméricas [33]. En la Figura 2-2 se muestra un esquema de la función que cumple la etapa de pretratamiento en el proceso de producción del etanol.

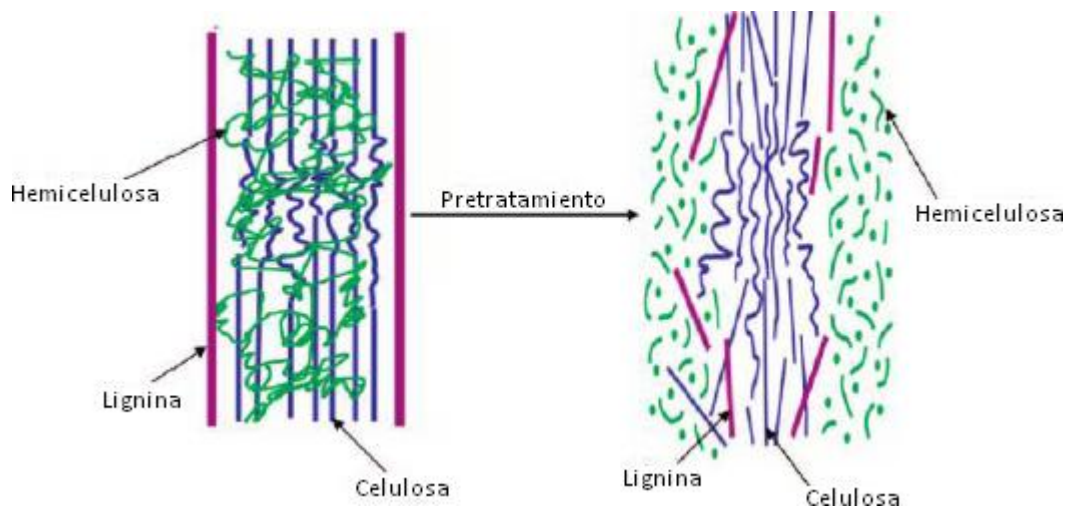


Figura 2-2: Esquema del rol del pretratamiento en el proceso de producción de bioetanol (Adaptación de [37]).

Los pretratamientos utilizados deben reunir los siguientes requerimientos: (1) Mejorar la liberación de azúcares o la predisposición de la matriz para formar azúcares en la hidrólisis; (2) Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos; (3) Evitar la formación de subproductos que puedan ser inhibidores en las siguientes etapas de hidrólisis o fermentación (4) Ser eficiente en cuanto a los costos del proceso [37].

En este trabajo se estudiarán dos pretratamientos químicos. El primero es el pretratamiento con ácido diluido y se ha elegido debido a la disposición de materiales en el laboratorio para llevarlo a cabo y porque ya se ha probado en otros materiales del mismo tipo con resultados aceptables [38] [39]. El segundo corresponde al fraccionamiento de lignocelulosa a través de solvente orgánico y de celulosa (COSLIF), un pretratamiento que los antecedentes indican que tiene buenos resultados con materia prima proveniente de bambusáceas y que también es implementable en el laboratorio [31].

2.2.1 Pretratamiento con ácido diluido.

El pretratamiento con ácido diluido es uno de los más difundidos dentro de los pretratamientos lignocelulósicos. Es un método en el que se hidroliza la hemicelulosa que contiene la biomasa al someterla a altas temperaturas con un ácido (se ha probado con ácido sulfúrico, nítrico, fosfórico y clorhídrico) que se encuentra a una concentración menor al 4% p/p [37]. Dichas condiciones permiten hidrolizar la hemicelulosa removiéndola, aumentando el tamaño promedio de los poros del sustrato y por lo tanto, aumentando la probabilidad de hidrolizar la celulosa [40]. Con respecto a la lignina, ésta no se solubiliza en un porcentaje importante, pero sí se redistribuiría dentro de la matriz lignocelulósica [41]. Otro fenómeno que se ha constatado, es que al utilizar ácido sulfúrico (H_2SO_4) en la etapa de pretratamiento, el índice de cristalinidad de la celulosa aumenta probablemente gracias a la remoción de la celulosa amorfa [37].

Se ha reportado además que para cargas trabajadas por lotes, las mejores condiciones de temperatura fluctúan entre los 120-160°C [41] y con alta carga de sólidos (10%-40%) [42]. Los sólidos en este procedimiento deben ser neutralizados para la posterior hidrólisis enzimática [37].

Debido a las altas condiciones de acidez y la alta temperatura, los azúcares obtenidos de la hemicelulosa (principalmente xilosa) pueden ser degradados generándose compuestos indeseados como el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF), que actúan como inhibidores del crecimiento de los microorganismos en la etapa de fermentación, disminuyendo así el rendimiento total [41]. Adicionalmente, si bien este pretratamiento puede aumentar considerablemente la hidrólisis de la celulosa, su costo es usualmente mayor al de los pretratamientos fisicoquímicos como por explosión a vapor y el AFEX [42].

Existe una amplia gama de metodologías de pretratamiento con ácido diluido que se han aplicado a una gran cantidad de materiales lignocelulósicos, sin embargo para este trabajo, se elegirá una que se haya probado en el laboratorio ya que se sabe a priori que es posible implementarla con resultados positivos.

2.2.2 Pretratamiento y fraccionamiento de lignocelulosa a través de solvente orgánico y de celulosa (COSLIF).

El fraccionamiento de lignocelulosa a través de solvente orgánico y solvente de celulosa o COSLIF es un pretratamiento en el cual se aplica ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado (>82%) sobre material lignocelulósico en una proporción 1:8 (p/v) a una temperatura de 50°C, presión ambiente y por 30 – 60 minutos. De esta forma se consigue lo siguiente:

- a) Alterar los enlaces del complejo lignina-carbohidrato.
- b) Disolver las fibrillas de celulosa y hemicelulosa a través de la ruptura de los puentes de hidrógeno que se encuentran entre las cadenas de azúcares.
- c) Hidrolizar débilmente la celulosa y la hemicelulosa, lo que implica una pequeña caída en sus grados de polimerización.

A continuación se añade el solvente orgánico a la muestra (se ha probado con etanol y acetona) para precipitar la celulosa y la hemicelulosa y para disolver parcialmente la lignina en la fase líquida. Luego se realizan lavados sucesivos con solvente orgánico y con agua destilada descartando la fase líquida previa centrifugación. Estos lavados son para retirar remanentes de ácido, lignina y el etanol que es utilizado en los lavados previos. Finalmente se cambia el nivel de acidez del sistema utilizando carbonato de sodio a 2 M para fijar la acidez del pellet sólido en pH 7-8 [43].

El uso como solvente de celulosa del ácido fosfórico ha sido estudiado determinándose que es ideal debido a una serie de características:

- a) La disolución de la celulosa puede llevarse a cabo a bajas temperaturas lo que no permite la reacción de hidrólisis ácida de los enlaces β -glucosídicos. Dicha disolución se logra debido a la interacción entre el H_3PO_4 y la celulosa, la cual es disuelta por el ácido a través de una reacción de esterificación entre el radical hidroxilo del polímero y el ácido para formar fosfato de celulosa ($H_3PO_4 + \text{celulosa} \leftrightarrow \text{celulosa-O-PO}_3H_2$). De esta forma se libera un pequeño ión de hidrógeno que difunde fácilmente en la celulosa heterogénea (sin requerir altas temperaturas) y que tenderá a unirse a otro grupo hidroxilo del polímero compitiendo con los enlaces de hidrógeno que unen las distintas cadenas que componen la matriz celulósica, haciendo que esta pierda su estructura sin que decrezca mayormente su grado de polimerización [44].

- b) El ácido fosfórico es capaz de disolver celulosa en presencia de agua y sin una degradación significativa, manteniendo el grado de polimerización de la celulosa [45].
- c) La conformación de la celulosa regenerada con agua después del pretratamiento [44] es amorfa siendo apropiada para la hidrólisis [45].
- d) El ácido fosfórico residual no tiene efectos inhibitorios en la hidrólisis ni en la fermentación.

Las desventajas que se han reportado respecto al uso de este pretratamiento tienen que ver básicamente con el uso intensivo de los solventes, tanto del orgánico (etanol) como el de celulosa (ácido fosfórico), lo que incrementa los costos de operación del proceso por la necesidad de reciclar ambos solventes de forma eficiente, aumentando también los capitales de inversión requeridos [46].

Por lo mismo, la patente WO2007/111605 divulga un proceso de producción de etanol que incluye el pretratamiento muy similar al enunciado el cual es descrito con un factor de recirculación de los solventes, superior al 99% para el ácido fosfórico y cercano al 100% para el etanol, lo cual es posible dado que las trazas de etanol que no se pueden lavar con el segundo lavado con agua, posteriormente serán destiladas al final del proceso y se podrán reutilizar como solvente orgánico en el pretratamiento [47].

2.3 Sistema de celulasas para la hidrólisis enzimática.

Para llevar a cabo la etapa de hidrólisis enzimática, se debe someter al material a un sistema de celulasas que son capaces de hidrolizar la celulosa insoluble hasta convertirla en un conjunto de monómeros que serán fermentados. Las enzimas que componen los sistemas de celulasas se clasifican actualmente por sus características estructurales y son las siguientes:

- i) Endoglucanasas: Cortan un sitio interno amorfo de la celulosa de forma aleatoria, generando oligosacáridos de distintas extensiones y por lo tanto, nuevos extremos que pueden ser hidrolizados por las exoglucanasas.
- ii) Exoglucanasas: Actúan de forma progresiva tanto en los extremos reducidos como en los no reducidos de las cadenas celulósicas, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Las exoglucanasas pueden actuar también en la celulosa microcristalina.
- iii) β -glucosidasas: Hidrolizan las celodextrinas solubles y las celobiosas, transformándolas en glucosa. [48]

En la Figura 2-3 se representa gráficamente el funcionamiento de un sistema de celulasas actuando sobre la celulosa.

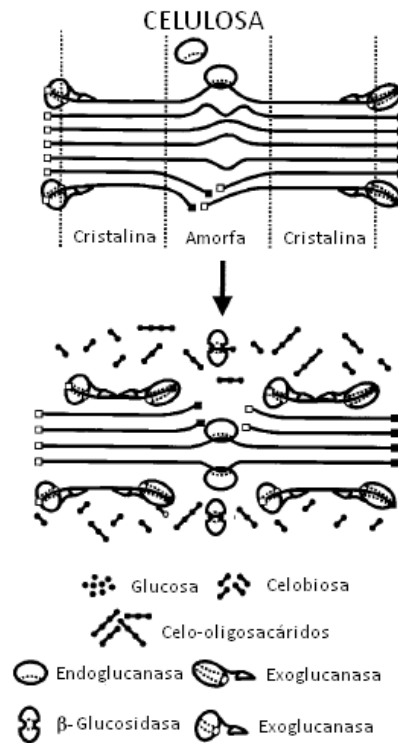


Figura 2-3: Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina. Los cuadrados sólidos representan extremos reductores mientras que los cuadrados abiertos representan los extremos no reductores. (Adaptación de [48]).

Los sistemas de celulasas exhiben una actividad colectiva mayor que la suma de las actividades de cada enzima por sí sola, un fenómeno conocido como sinergismo. Se han reportado 4 tipos de sinergismos en estos sistemas:

- i) Sinergia exo-exo que ocurre entre exoglucanasas que están actuando en los extremos reductores y no reductores de las cadenas celulósicas.
- ii) Sinergia endo-exo entre exoglucanasas y endoglucanasas.
- iii) Sinergia entre exoglucanasas y β -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa (y celodextrinas) liberada por la acción de las primeras.
- iv) Sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los módulos de unión al carbohidrato. [48]

Debe mencionarse que cuando la celobiohidrolasa actúa sola, se puede generar una fuerte competencia entre la unión enzima-sustrato (celulosa) y enzima-producto (celobiosa), ya que es sabido que esta enzima sufre una fuerte inhibición competitiva por la celobiosa. Por lo tanto la presencia de celobiosa para hidrolizar la celobiosa a glucosa es útil puesto que evitaría la inhibición de la exo-enzima [49].

3 Antecedentes

Los antecedentes presentados a continuación describen operaciones y condiciones aplicadas en otros estudios para llevar a cabo pretratamientos con ácido diluido y COSLIF en especies similares a las estudiadas. De esta manera se conforma un precedente para entender las etapas del proceso y se exponen resultados contrastables con los obtenidos en el presente estudio. Adicionalmente, se presentan composiciones químicas señaladas en diversas investigaciones para la materia prima estudiada, las cuales se utilizarán en el cálculo de los rendimientos del presente trabajo.

3.1 Procedimientos y resultados obtenidos con pretratamientos con ácido sulfúrico diluido.

Existe una gran cantidad de pretratamientos con ácido sulfúrico diluido, sin embargo, se priorizaron aquellos que son implementables en el laboratorio y con los cuales se han obtenido resultados aceptables de sacarificación. Por ese motivo, se utiliza como base el pretratamiento llevado a cabo por Niklitschek en el cual se pretrata lenga para ser posteriormente hidrolizada con enzimas y fermentada [41]. Si bien los rendimientos de sacarificación no son los mejores encontrados, es un procedimiento conocido en el laboratorio y se cuenta con los materiales y condiciones para llevarlo a cabo siendo apto para los objetivos del presente trabajo.

En el trabajo mencionado, Niklitschek mezcló ácido sulfúrico diluido a una concentración de 0,75% (v/v) con una carga de sustrato del 10% (peso material/volumen ácido). El mezclado se lleva a cabo a 121°C (temperatura de ebullición del agua a 2 atm) [50]. El tiempo de reacción es de 30 minutos y luego se enfría rápidamente. A continuación las muestras fueron neutralizadas, lavadas con agua destilada y filtradas. Luego se llevó a cabo la hidrólisis enzimática usando concentraciones de enzima de 37 FPU/gr ó 110 FPU/gr.

A partir de muestras tomadas durante las 72 h de duración de la hidrólisis enzimática, se obtuvo la curva de la cinética de hidrólisis enzimática, la cual se presenta en la Figura 3-1. Se constató un rendimiento de sacarificación del 14% para las muestras procesadas con 110 FPU/gr, liberándose aproximadamente 68 mg de glucosa/gr de sustrato. No se observaron grandes diferencias entre los perfiles cinéticos de los experimentos realizados con distinta carga enzimática concluyéndose que este fenómeno se puede deber a que el pretratamiento no logró disminuir considerablemente la cristalinidad de la celulosa, reduciéndose el área específica para la hidrólisis enzimática o a que las concentraciones de enzimas utilizadas son muy altas, por lo que la velocidad de reacción es tal que no depende de la carga enzimática aplicada [41].

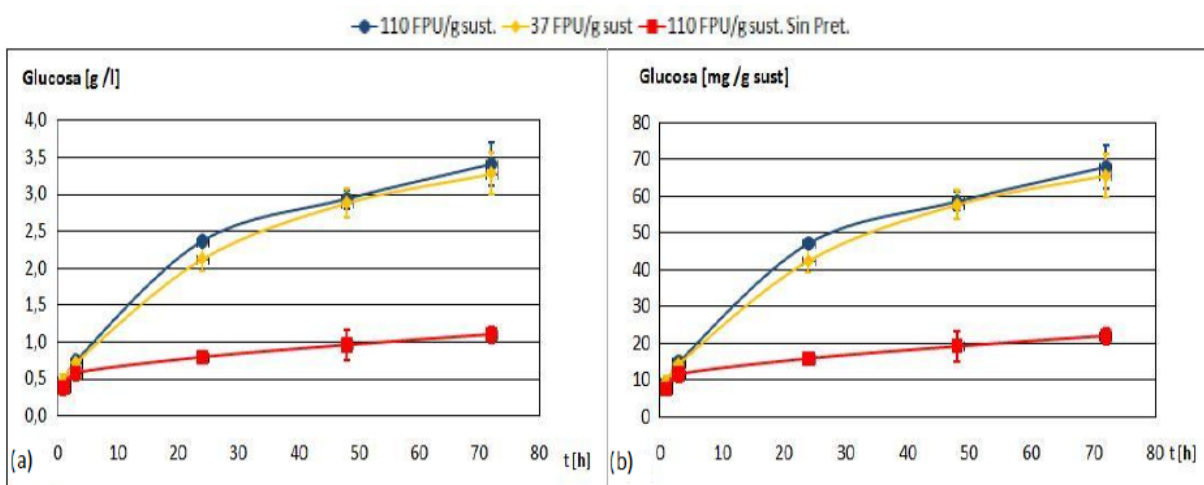


Figura 3-1: Perfiles cinéticos para la liberación de glucosa obtenidos por Nicklitschek en lenga [41].

Por otro lado, Leenakul y Tippayawong probaron el pretratamiento con ácido diluido utilizando bambú (*Dendrocalamus asper*) como materia prima. La cantidad de glucosa liberada por gramo de sustrato pretratado por 30 minutos, utilizando ácido sulfúrico a distintas concentraciones, se muestra en la Tabla 3-1. Se debe precisar que en la hidrólisis enzimática se utilizaron 15 FPU/gr de celulasa y que el tiempo de reacción de dicha etapa fue de 72 h.

Tabla 3-1: Liberación de glucosa obtenida a partir de *Dendrocalamus asper* por medio de pretratamiento con ácido diluido.

Temperatura (°C)	Tiempo residencia (min)	Concentración ácido (%p/p)	Liberación glucosa (mg/g)
120	30	0,6	7,5
		0,9	8,2
		1,2	8,7

(Fuente: Leenakul y Tippayawong [38])

Se observa de la Tabla 3-1 que las concentraciones de ácido están expresadas en %p/p, mientras que la concentración utilizada por Nicklitschek es en %v/v. Teniendo en cuenta la densidad del ácido sulfúrico y del agua¹, una concentración de 1,2 %p/p equivale a 0,65 %v/v siendo el valor que mejor se puede comparar con los resultados obtenidos por Nicklitschek. De esta forma, la cantidad de glucosa liberada al efectuar el pretratamiento con ácido sulfúrico en bambú es aproximadamente un orden de magnitud menor que la reportada en lenga, lo que hace pensar que no es el pretratamiento más adecuado para este tipo de madera. Esta afirmación se ve reforzada al observar la tabla comparativa presentada en el trabajo de Leenakul y Tippayawong donde se compara el pretratamiento utilizado con bambú respecto

¹ La densidad del ácido sulfúrico al 100% a 20°C es de 1,8305 gr/ml mientras que la del agua a la misma temperatura es de 0,9982 gr/ml [56].

al utilizado en otros estudios con otras materias primas y en donde la menor cantidad de azúcares liberada la reporta el bambú [38]. Dicha tabla se puede apreciar en el Anexo 4 del presente trabajo.

3.2 Procedimientos y resultados obtenidos con pretratamiento COSLIF.

Uno de los primeros antecedentes que sirvieron para establecer al ácido fosfórico como solvente ideal de celulosa a condiciones moderadas fue el estudio de Zhang et al. [45]. En este trabajo se determinó la existencia de una concentración límite de H_3PO_4 en la cual la celulosa pasa de estar hinchada por el ácido a estar disuelta en el solvente, pasando a un estado amorfo al regenerarse. Se estableció que a una concentración mayor o igual al 83%, el ácido fosfórico a 50°C de temperatura, es capaz de disolver todos los materiales lignocelulósicos que fueron probados. Adicionalmente, se identificaron los perfiles de hidrólisis enzimática sobre celulosa hinchada y sobre celulosa amorfa regenerada concluyéndose que la velocidad específica de hidrólisis es mayor en el segundo caso. De esta forma, el aumento de accesibilidad del sustrato a través de solventes celulósicos se vislumbra como una buena alternativa para la etapa de pretratamiento de material lignocelulósico [45].

En el año 2007, Zhang et al. publican un artículo en el cual se estudia un pretratamiento de fraccionamiento de lignocelulosa que se lleva a cabo en condiciones moderadas [45]. En él se utiliza el principio de disolución de celulosa con H_2PO_4 descrito anteriormente para lograr altas conversiones de azúcares en la hidrólisis enzimática. El pretratamiento comprende las siguientes etapas:

- a) Tratamiento con ácido fosfórico a una concentración mayor al 82%, a 50°C y durante 30-60 minutos para romper los enlaces lignina-carbohidrato y disolver la celulosa y la hemicelulosa.
- b) Mezclado con acetona para precipitar celulosa y hemicelulosa y disolver parcialmente la lignina.
- c) Lavado con acetona para eliminar aproximadamente el 99,5% del ácido fosfórico de los sólidos precipitados.
- d) Lavado con agua para eliminar la acetona presente en los sólidos precipitados y remover la hemicelulosa.
- e) Destilación del “licor negro” compuesto por H_2PO_4 , acetona y lignina (proveniente del lavado con acetona)
- f) Separación a través de destilación flash de la acetona, H_2PO_4 y hemicelulosa que contiene el “licor blanco” (proveniente de los lavados con agua) [45].

De esta forma se fracciona la lignocelulosa, obteniéndose celulosa amorfa, lignina, hemicelulosa y ácido acético mediante condiciones moderadas de reacción (50°C y presión atmosférica) con fácil reciclaje de acetona y ácido fosfórico [45].

Si bien los resultados obtenidos con el método anteriormente señalado fueron positivos obteniéndose un 90% de digestibilidad de celulosa en casi todos los materiales pretratados (ninguno de ellos bambú) [45], en el año 2010 Sathistsuksanoh et al. prueban el método COSLIF para pretratar bambú con el objetivo de obtener etanol utilizando bajas cargas de celulasas. El solvente orgánico elegido en esa ocasión fue etanol debido principalmente a que la acetona debe recircularse con una eficiencia muy alta (>99,99%) mientras que utilizando etanol se puede permitir una eficiencia de recuperación de entre el 98

y 99%. Por otro lado, el etanol es químicamente más estable que la acetona para efectos de la separación sólido/líquido y menos corrosivo lo que es una ventaja en caso de utilizar una separación por medio de membranas. Adicionalmente, el reemplazo de acetona por etanol permite una reducción del uso de solvente orgánico de 100 a 60 volúmenes [31].

En el estudio recién señalado, las condiciones de pretratamiento fueron 8 ml de ácido fosfórico al 85% por cada gramo de bambú. La humedad del material era aproximadamente de un 6% y la reacción se efectuó a 50°C y presión atmosférica por 1 hr (31). Estas condiciones probablemente se eligieron a partir de otro estudio efectuado por Sathitsuksanoh et al. en el año 2009, donde se determinaron las condiciones óptimas para el pretratamiento de carrizo (pasto silvestre de rápido crecimiento) [43].

Como variable del experimento se probaron distintas cargas enzimáticas, obteniéndose como resultado los valores de digestión de glucano que se pueden apreciar en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Digestión de glucano de bambú tras 72 h de hidrólisis enzimática

Carga enzimática (FPU/gr de glucano)	Digestión Final del Glucano (%)
1	88,2
2	89,8
5	93,3
15	94,9

(Fuente: Sathitsuksanoh et al. [31])

Conjuntamente se registraron las curvas cinéticas para cada carga enzimática utilizada, observándose que a las 72 hrs de reacción, la digestión del glucano convergía a valores cercanos, teniendo un menor porcentaje de digestión total los experimentos con menor carga enzimática. Dichas curvas cinéticas se muestran en la Figura 3-2.

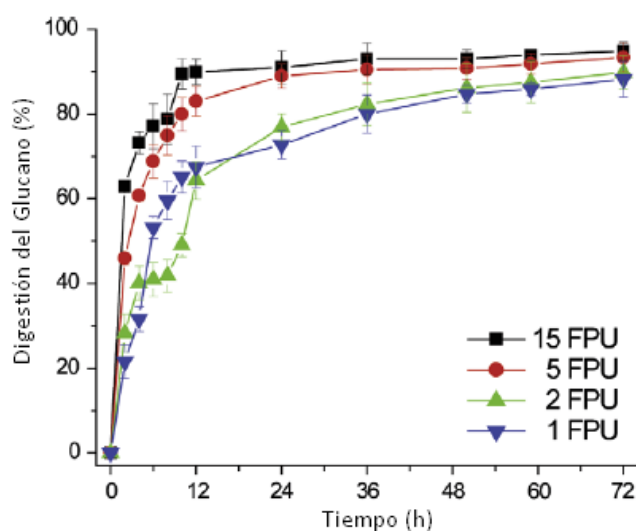


Figura 3-2: Perfiles de la hidrólisis enzimática de la celulosa luego de pretratar bambú con el método COSLIF (Adaptación [31]).

Considerando los antecedentes expuestos se diseñarán experimentos para determinar si es factible aplicar los pretratamientos enunciados en colihue. La metodología y los procedimientos que se utilizarán para lograr el objetivo de este trabajo, se presentan en la sección *Metodologías* de este trabajo.

3.3 Contenido de glucosa en el colihue a pretratar.

Como se mencionó anteriormente, el colihue se encuentra lignificado totalmente después de un período de madurez y por lo tanto, su composición química varía durante su ciclo de vida. Por eso, es necesario contar con la composición química precisa del material que se está utilizando de tal forma que se pueda calcular correctamente el rendimiento de liberación de glucosa en la sacarificación. Por esa razón, se recopilaron los datos experimentales obtenidos por R. González (2012 - Comunicación personal) quien utilizó una metodología de hidrólisis ácida fuerte (ácido sulfúrico al 70%) con el fin de provocar un stress en la pared celular del colihue seleccionado como materia prima del presente estudio y de liberar los azúcares presentes en él. La glucosa liberada fue medida a través del kit Gluco Pap marca Randox (GL2623) y el resultado fue el siguiente:

$$\% \text{ en peso de glucosa} = \frac{\text{g glucosa}}{\text{g colihue}} \cdot 100 = 41,8\% \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

De esta forma queda definido el valor que se utilizará para los cálculos de rendimiento de liberación de glucosa en la sacarificación.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

- Evaluar la factibilidad técnica y prefactibilidad económica de producir bioetanol a partir de residuos de colihue por medio del estudio de dos estrategias de pretratamiento: ácido diluido y COSLIF.

4.2 Objetivos Específicos

- Establecer los parámetros críticos de los pretratamientos que afectarían en la potencial obtención de etanol a partir de colihue.
- Comparar los resultados obtenidos en las distintas estrategias, determinando cual es la más idónea para la posterior fermentación.
- Estimar la producción potencial de etanol a partir de la cantidad de colihue disponible en el país y de los rendimientos de sacarificación obtenidos.
- Generar un análisis de las utilidades por concepto de venta de producto y costos de las principales materias primas de cada pretratamiento.

Capítulo II

Materiales y Metodología

5 Materiales

5.1 Materia Prima

Se utilizaron 50 cañas de colihue de 1,3 m aproximadamente adquiridas en Forestal Oscar Morales, empresa que vende culmos de colihue (*Chusquea culeou*) en la Región Metropolitana. Sin embargo, los colihues que comercializan provienen de la IX Región de la Araucanía. Las cañas tienen una madurez de más de un año y solo una fue descartada por presentar hongos.

5.2 Enzimas

Las enzimas utilizadas en el presente trabajo son celulasas provenientes del hongo *Trichoderma reesei* (ATC 26921) cuyo nombre comercial es Celluclast® 1,5 L (Cat Sigma C2730) y celobiasas de nombre comercial Novozyme® 188 (Cat Sigma C6105) que son producidas por el hongo *Aspergillus niger*. Ambas enzimas fueron adquiridas del laboratorio SIGMA-ALDRICH®.

5.3 Reactivos

Para el pretratamiento con ácido diluido se utilizó ácido sulfúrico al 98% v/v p. a., carbonato de sodio anhidro p. a. e hidróxido de sodio en lentejas p. a., todos ellos de marca comercial Merck®. Por su parte, para el procedimiento COSLIF, se utilizó etanol absoluto p. a., ácido orto-fosfórico al 85% v/v p.a. y carbonato de sodio anhidro p. a. Todos también adquiridos en Merck. Cabe señalar que para las condiciones requeridas, los reactivos se disolvieron con agua destilada.

6 Metodologías

Con el fin de clarificar la metodología utilizada para determinar el efecto de los pretratamientos aplicados al colihue, en la Figura 5-1 y 5-2 se muestran los diagramas de bloques de los pretratamientos con ácido diluido y COSLIF respectivamente.

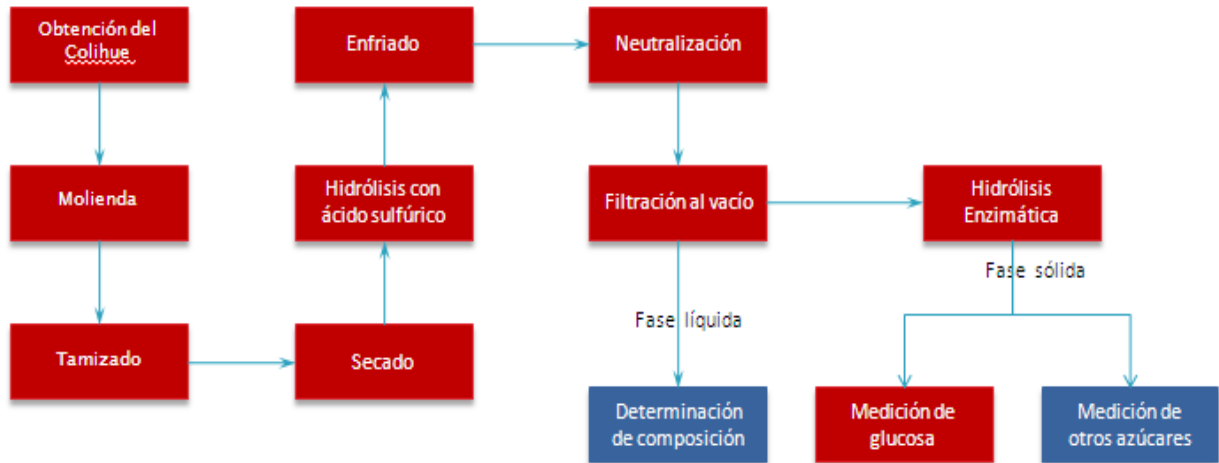


Figura 6-1: Diagrama de Bloques de las etapas involucradas en el pretratamiento con ácido diluido para la producción de bioetanol a partir de residuos de colihue. Los bloques rojos corresponden a las etapas aplicadas en el trabajo y en azul, las etapas que restarían para generar un balance de masa de los azúcares presentes en el material.

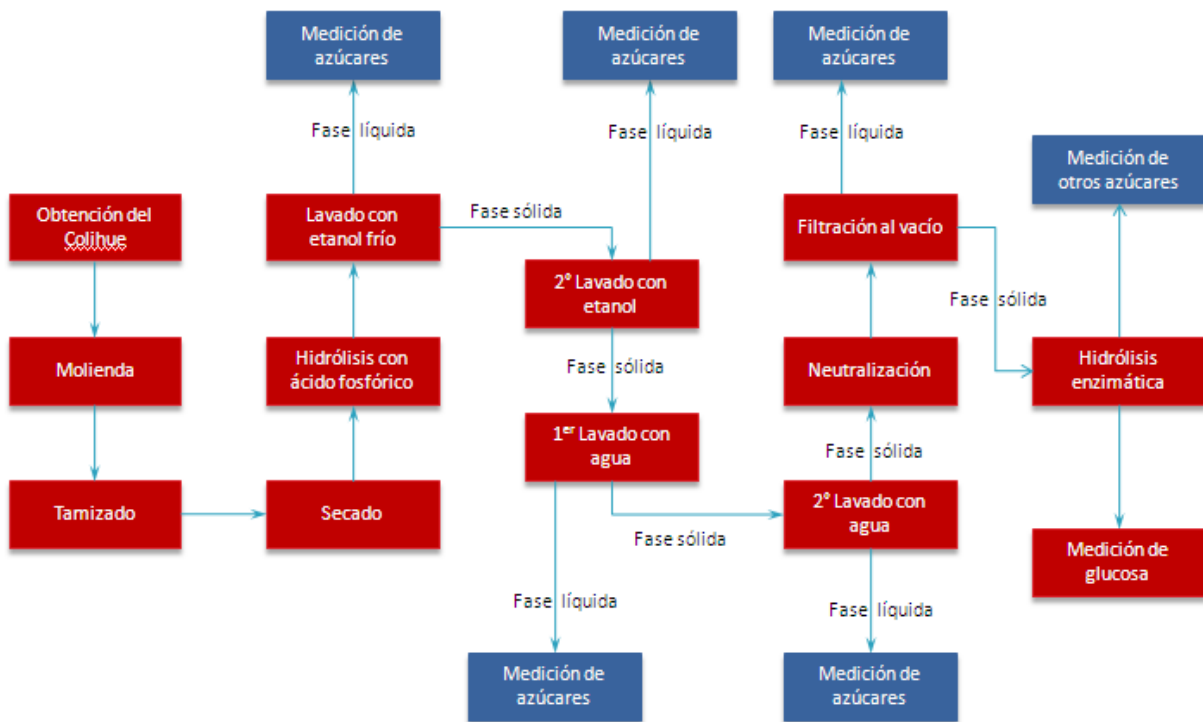


Figura 6-2: Diagrama de Bloques de las etapas involucradas en el pretratamiento con ácido diluido para la producción de bioetanol a partir de residuos de colihue. Los bloques rojos corresponden a las etapas aplicadas en el trabajo y en azul, las etapas que restarían para generar un balance de masa de los azúcares presentes en el material.

6.1 Triturado y tamizado del colihue

Cada culmo de colihue fue cortado transversalmente en tres trozos con sierra circular. Los trozos fueron triturados en una máquina astilladora Laski spol. (modelo KDO 90/12) y de esta forma se obtuvo un material con dimensiones aceptables para ser tamizado y posteriormente utilizado en los experimentos. El trabajo de aserrado y triturado fue realizado en las dependencias de la Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile la cual, gentilmente, también proporcionó la maquinaria y mano de obra para realizar dicho trabajo.

Como se dijo anteriormente, las astillas se tamizaron en tamices con tamaño de apertura de 2 y 1 mm (mallas N° 10 y N° 18) con lo cual el material a utilizar quedó reducido a dimensiones que se encuentran entre los 2-16 mm y los 0,5-1 mm de largo.

6.2 Secado y determinación de humedad del material

El material astillado se extendió dejándolo al sol en una base de madera durante 20 horas. A continuación se recogió el material para verificar su contenido de humedad.

Para determinar el nivel de humedad del material, tres muestras de 3 gr cada una fueron sometidas a secado en una estufa a 65°C; se controló su masa a las 12 y 24 horas de haber comenzado el procedimiento. El porcentaje de humedad se estimó una vez que la masa del material que está siendo secado se mantuvo constante en el tiempo. Como no hubo variación en la masa de las muestras entre las 12 y las 24 horas, se detuvo el proceso y se determinó el porcentaje de humedad a través de la Ecuación 5.1 que se muestra a continuación.

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{Masa inicial} - \text{Masa final}}{\text{Masa inicial}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

6.3 Determinación de la actividad de la celulasa

La actividad para las celulasa Celluclast® 1,5L empleada en el presente estudio fue de 87 FPU/ml. El procedimiento para estimar dicho valor corresponde al método clásico utilizado en previos estudios [51] [52].

6.4 Determinación de la actividad de las celobiasas

La actividad para las celobiasa Novozyme® 188 empleada en el presente estudio fue de 650 CBU/ml. El procedimiento para estimar dicho valor corresponde al método clásico utilizado en previos estudios [50] [53].

6.5 Pretratamiento con ácido diluido

El material tamizado y secado se inserta en tubos Falcon de 50 ml a una razón de 1:10 (p/v) junto con ácido sulfúrico a concentraciones de 0%, 0,5%, 1% y 2%. A continuación, el conjunto de tubos se disponen en una olla a presión que contiene 1,5 lt de agua destilada, el recipiente se cierra y se introduce en una campana extractora de gases sobre la llama directa de un mechero. Una vez que el

agua hierve, se deja reaccionar a 121°C por 30 minutos; transcurrido ese tiempo, se retira la olla y se enfría mediante un baño de hielo; al cabo de un tiempo se retiran las muestras y se depositan en hielo.

Cuando los tubos alcanzan la temperatura ambiente se añaden 25 ml de agua destilada a cada tubo y se cambia la acidez de su contenido utilizando hidróxido de sodio 2M hasta fijar el pH entre 8 y 11. Finalmente, la mezcla es filtrada al vacío utilizando un papel de pre-filtro AP20 con retención nominal de 0,8 a 8 micras y se reserva la fracción sólida para llevar a cabo la sacarificación enzimática.

6.6 Pretratamiento COSLIF

En tubos Falcon de 50 ml, se mezclan el material tamizado y secado con ácido fosfórico al 0% y 85% a una razón de 1:8 (p/v). Luego, se insertan los tubos en un baño de agua rotatorio que gira a 100 RPM a una temperatura de 50 °C, dejando reaccionar su contenido por 1 hora. La disolución de la biomasa y la hidrólisis parcial se detiene añadiendo 20 ml de etanol frío.

Luego, se centrifuga cada tubo a 4000 RPM (2057 x g) por 15 minutos a 20°C, se retira el sobrenadante o “licor negro” y se agregan 25 ml de etanol. A continuación se lleva a cabo una nueva centrifugación a las mismas condiciones que la anterior y se retira nuevamente el sobrenadante para hacer un nuevo lavado pero esta vez con 25 ml de agua. Las muestras se centrifugan bajo las mismas condiciones ya enunciadas y se retira nuevamente el sobrenadante o “licor blanco” que contiene etanol y hemicelulosa. Posteriormente se añaden 25 mL de agua y se neutraliza la mezcla con una pequeña cantidad de carbonato de sodio a 2 M hasta alcanzar un pH entre 5-7. Finalmente, la mezcla se filtra al vacío utilizando un papel de pre-filtro AP20 con retención nominal de 0,8 a 8 micras y se reserva la fracción sólida para llevar a cabo la sacarificación enzimática.

6.7 Hidrólisis enzimática o sacarificación

La etapa de sacarificación se realiza utilizando una carga de sustrato del 5% p/v (0,2 gr de material, 4 ml de reacción) en un tubo Falcon de 15 ml. El medio donde ocurre la reacción está formado por enzimas celulolíticas comerciales que conforman un sistema compuesto por celulasas y celobiasas. Dichas enzimas se añaden al medio de reacción habiendo calculado una carga enzimática definida y que en el caso de las celulasas (*Celluclast* 1.5) se miden por unidades de papel filtro por gramo de material (FPU/gr) y en el caso de las celobiasas (*Novozyme* 188) por unidades de celobiasa por gramo (CBU/gr). De esta forma, se administran cargas de glucanasa de 0, 1, 15 y 30 FPU/gr y cargas de celobiasas acorde a una relación CBU de celobiasa/FPU de glucanasa de 1:7,5 y en otro caso a una razón 1:1. Añadidos los volúmenes de enzimas se completan los 4 ml del medio de reacción con tampón acetato de sodio (50 mM, pH 4,8) y los tubos se dejan incubando en un agitador rotatorio de 250 RPM a 50°C durante 72 horas. A las 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas se extraen muestras de 30 µl de la fase líquida teniendo la precaución de retirar la menor cantidad de partículas sólidas posible y se guardan en refrigerador a 4°C hasta que se realice la medición de glucosa.

En el proceso de hidrólisis enzimática del material pretratado mediante COSLIF, las cargas de celulasas son de 0, 5, 15, 30 y 40 FPU/gr mientras que las cargas de celobiasas se encuentran a una razón CBU de celobiasa/FPU de glucanasa de 1:1. El volumen de reacción es de 20 ml siendo la carga de sustrato de un

1% p/v (0,2 gr de material) y se toman muestras de 800 μ l. Las demás condiciones como tiempo de reacción, rotación del incubador, temperatura e intervalos de muestreo se mantienen iguales.

Cabe señalar que en ambos casos las muestras a las que no se les aplica ácido en los pretratamientos y que sirven de blanco, se les añaden cargas de 0 y 15 FPU/gr para tener controles negativos. Además, todos los experimentos se realizan en duplicado, reportándose los valores promedios obtenidos.

6.8 Medición de glucosa

Para estimar la concentración de glucosa se utiliza un kit comercial de ensayo Gluco-Pap marca Randox (GL2623), cuyo principio de funcionamiento se basa en la actividad de la enzima glucosa oxidasa. En el caso del material pretratado con ácido diluido, el procedimiento usado para determinar dichos valores es el método clásico utilizado en estudios previos [41] [51].

En el caso de la medición de azúcares del material hidrolizado al que se le aplicó el pretratamiento COSLIF, el procedimiento de medición se ajusta en parte a lo señalado en los protocolos que utilizan dicho pretratamiento, es decir, las muestras de 800 μ l se centrifugan a 4000 RPM (1699 xg) por 5 minutos a 20°C, luego se retiran 500 μ l del sobrenadante y se esperan 30 minutos. A continuación se acidifica la mezcla con 50 μ l de ácido sulfúrico al 10% y se almacenan las muestras en el refrigerador a 4°C hasta que se obtengan todas. Finalmente se estima la concentración de glucosa utilizando el kit comercial de ensayo Gluco-Pap mencionado anteriormente y se lleva a cabo el protocolo señalado en estudios previos [41] [51].

Capítulo III

Resultados y Discusión

7 Resultados

A continuación se exponen los resultados de sacarificación y rendimiento para los materiales pretratados tanto con el método ácido diluido como con el método de fraccionamiento lignocelulósico a través de solvente orgánico y de celulosa (COSLIF) y se comparan dichos resultados para finalmente analizar los niveles potenciales de producción de etanol en el país.

7.1 Sacarificación del material pretratado con ácido diluido

Con el fin de comparar los niveles de liberación de glucosa para las distintas concentraciones de ácido y cargas enzimáticas utilizadas en el pretratamiento con ácido diluido y posterior hidrólisis, se llevó a cabo el experimento señalado en la *Metodología*. Con los resultados obtenidos se confeccionaron los gráficos que se muestran en la Figura 7-1 en los que se puede apreciar una reacción cinética de primer orden en todos los casos en que fue aplicada una carga enzimática. Se observa además que los resultados obtenidos conforman líneas de tendencia coherentes que están dentro del rango de los errores asociados y que en todos los casos una mayor carga enzimática implicó un mayor nivel de sacarificación.

Respecto a las mediciones efectuadas en los blancos sin enzimas, se puede decir que los niveles de liberación de glucosa en todas las condiciones de pretratamiento se mantuvieron nulos o cercanos a cero durante todo el período de reacción tal y como se muestra en cada uno de los gráficos de la Figura 7-1. De esta forma se puede afirmar que la liberación de glucosa durante el pretratamiento fue muy baja o nula, hecho que fue confirmado al realizar mediciones de glucosa en la fase líquida de las muestras pretratadas, siendo los niveles obtenidos todos nulos o muy bajos. Esto se debe a la utilización del ácido sulfúrico diluido que a alta temperatura no hidroliza la celulosa presente en el material, sino que sólo retira la hemicelulosa y parte de la celulosa amorfa que contiene dicho material. Para comprobar este hecho se debiera hacer un análisis de todos los azúcares presentes en la fase líquida con el fin de determinar la cantidad de hemicelulosa que se retira en el pretratamiento. Este estudio no es parte de los alcances del presente trabajo, por lo que se recomienda realizarlos a futuro.

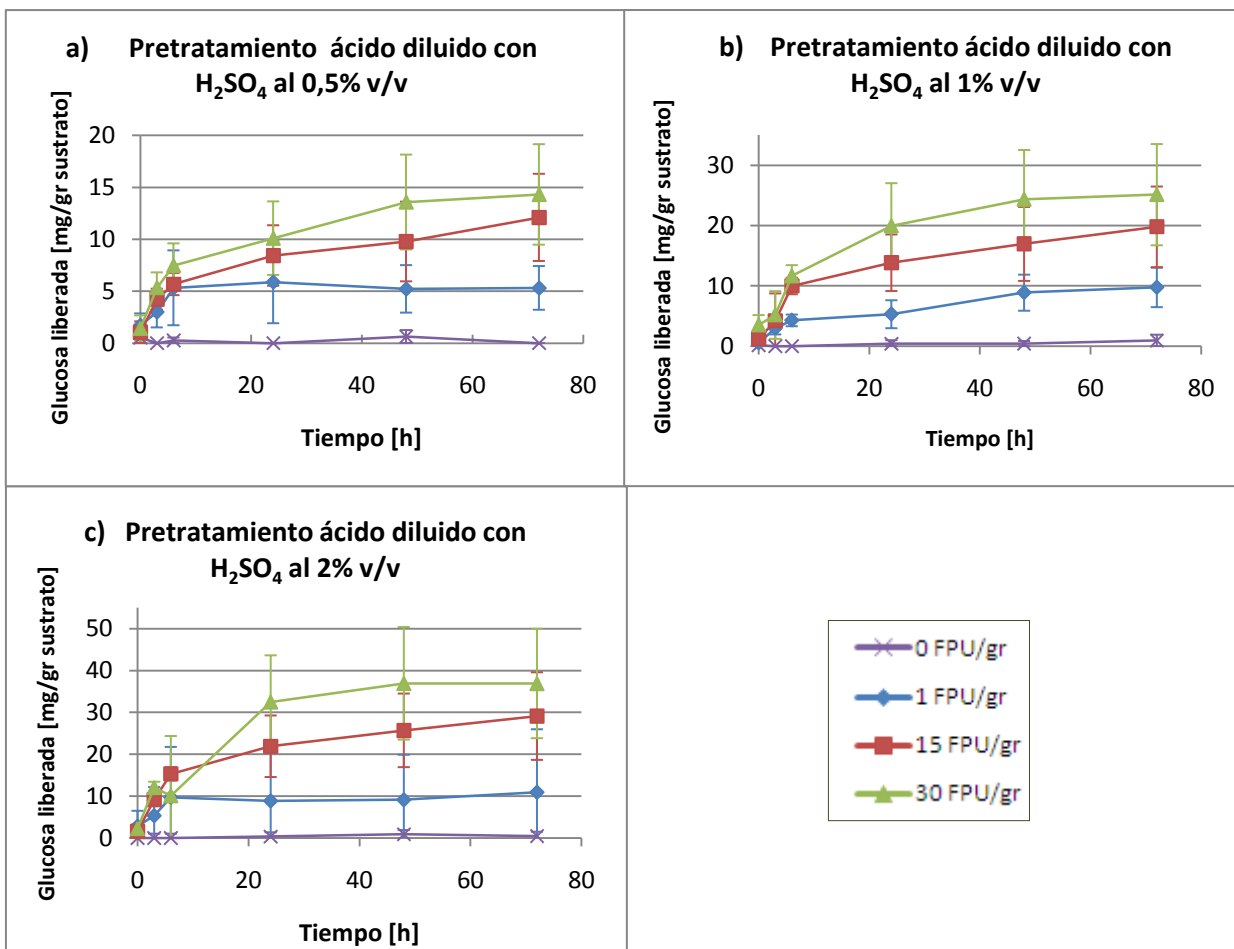


Figura 7-1: Cinéticas de sacarificación para las distintas condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática. Las muestras se analizaron en duplicado. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

Por otro lado, se observa que en el caso del material sacarificado con 15 FPU/gr, aún no se llega a un nivel constante de sacarificación, mientras que en los materiales sacarificados con 1 y 30 FPU/gr se alcanzaron niveles límites, lo que permite concluir que se ha llegado a un estado estacionario. Este fenómeno se aprecia mejor en la Figura 7-2 donde las pendientes de los dos últimos puntos medidos de cada tendencia es positiva para el material hidrolizado con 15 FPU/gr (Fig. 7-2 b) y prácticamente nulas para las del material hidrolizado con 1 y 30 FPU/gr (Figs. a) y c)). Esto indica que el tiempo de hidrólisis del material al que se le aplicó una carga enzimática de 15 FPU/gr fue insuficiente para liberar la mayor cantidad de glucosa que permitía dicha condición.

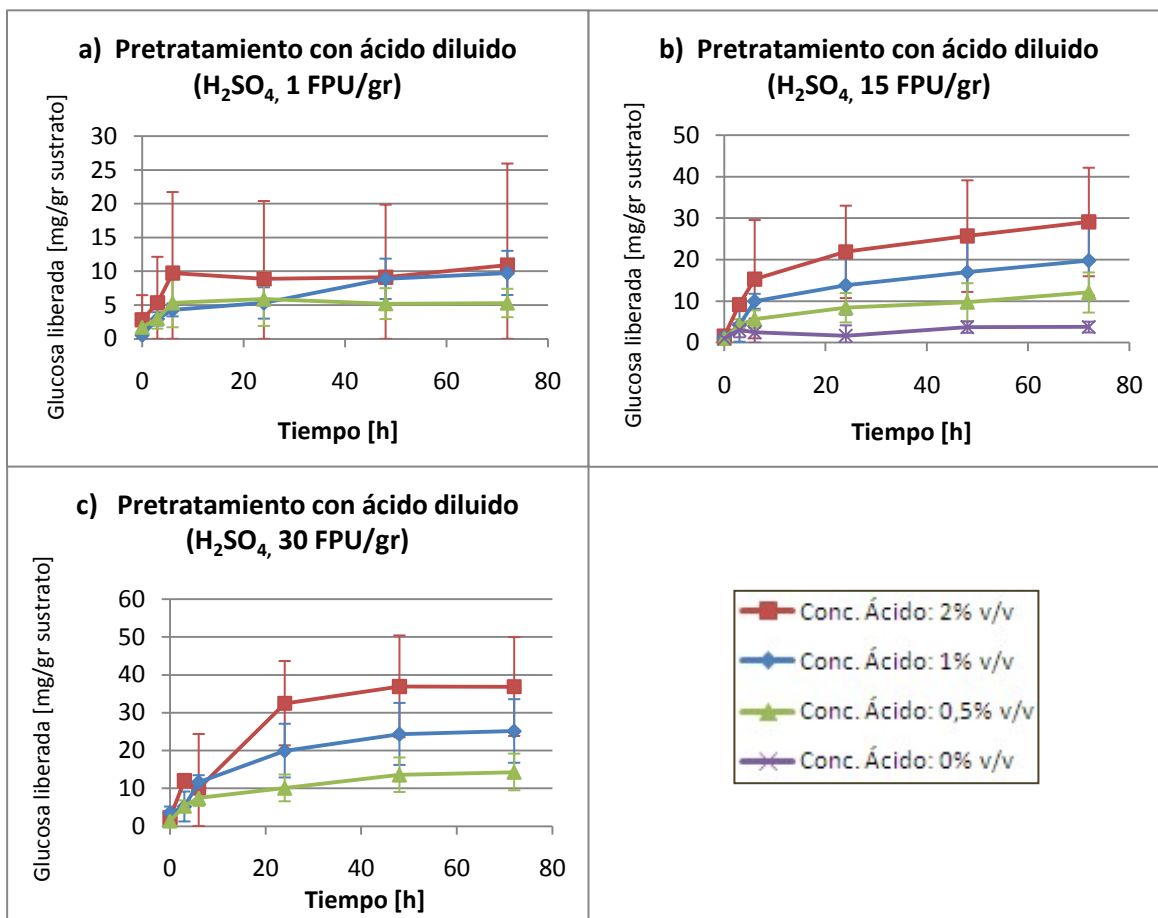


Figura 7-2: Niveles de sacarificación para las distintas condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática. Las muestras se analizaron en duplicado. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

Por otra parte, como se explicó en la *Metodología*, se llevó a cabo un pretratamiento control sin ácido sulfúrico. Para esto, el material fue sumergido en agua destilada y calentado a 121°C en el autoclave. De esta forma se pudo apreciar con mayor claridad las diferencias en los niveles de sacarificación entre los materiales que fueron pretratados y los que se sacarifican directamente, sin pretratar.

En la Figura 7-3 se observa que, un ligero incremento en la concentración de ácido (0% a 0,5% v/v), consigue aumentar en 3,2 veces la liberación de glucosa del material cuando se utiliza una carga de 15 FPU/gr. La brecha aumenta si se compara con el nivel de sacarificación del material pretratado con 2% v/v. En ese caso, el incremento de la concentración del ácido hizo que aumentara en 7,1 veces la liberación de glucosa al sacarificar con 15 FPU/gr.

Asimismo, la diferencia entre los niveles de sacarificación para los materiales pretratados con 0,5% y 2% v/v de ácido fueron de 106% (carga enzimática: 1 FPU/gr), 141% (carga enzimática: 15 FPU/gr) y 157% (carga enzimática: 30 FPU/gr). Dichas diferencias demuestran que a mayor concentración de ácido existe

un mayor nivel de sacarificación y dejan en evidencia la importancia de pretratar el material para lograr un mayor rendimiento de sacarificación.

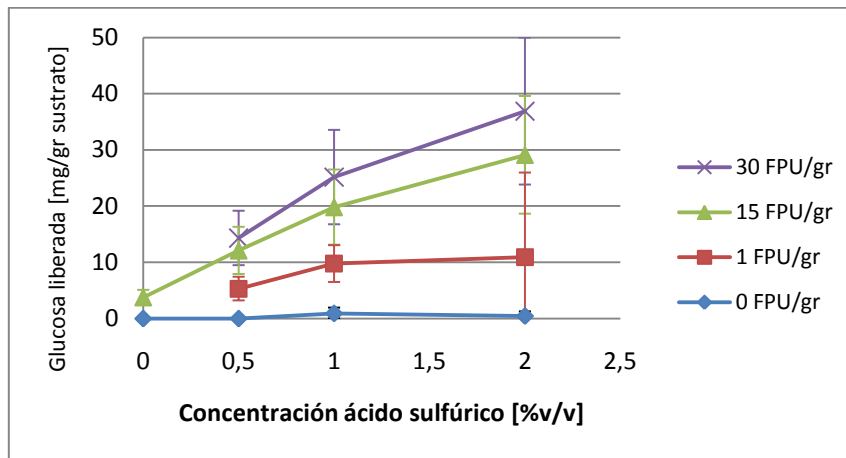


Figura 7-3: Niveles de glucosa generada por gramo del material pretratado con ácido sulfúrico diluido después de 72 h de sacarificación en función de la concentración de ácido aplicada. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

En líneas generales, en la Figura 7-4 se pueden comparar con mayor claridad los niveles de sacarificación finales para cada condición, observándose un mayor nivel de sacarificación a medida que aumenta tanto la concentración de ácido en el pretratamiento como la carga enzimática aplicada.

Un efecto del pretratamiento que se puede observar fácilmente en la Figura 7-4, es el mayor nivel de sacarificación que presentó el material pretratado con ácido diluido al 0,5% v/v y sacarificado con 1 FPU/gr en comparación con el del material sin pretratar y sacarificado con 15 FPU/gr. La diferencia entre los niveles es de un 40,7% y refuerza la necesidad de pretratar el material.

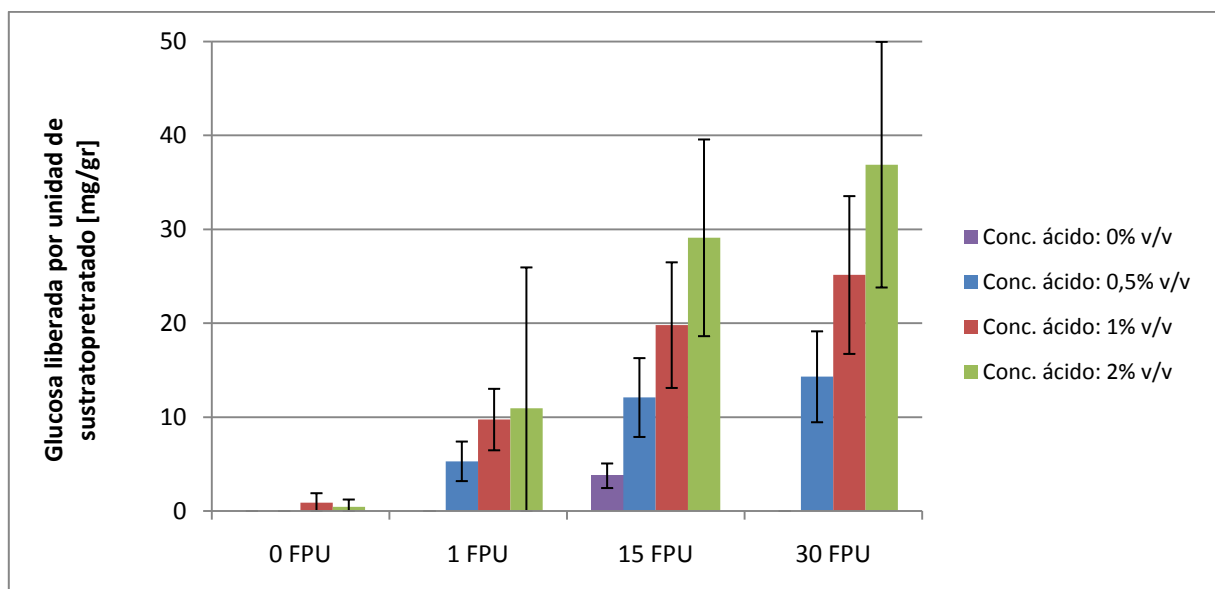


Figura 7-4: Niveles de glucosa generada por gramo del material pretratado con ácido sulfúrico diluido después de 72 h de sacarificación. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

Dado que existe una diferencia considerable entre los niveles de glucosa medidos, se puede decir que es posible ampliar el rango de las condiciones, aumentando la cantidad de ácido o la carga enzimática utilizada. Sin embargo, el incremento de estos dos parámetros puede ser perjudicial para el proceso de obtención de etanol ya que al incrementar la concentración del ácido en el pretratamiento se generan productos inhibidores de la fermentación [50] lo cual obliga a ser más estrictos en la separación de dichos componentes en una posterior etapa de detoxificación, aumentando los costos operacionales [52]. Por otro lado al aumentar la carga enzimática los costos de los insumos pueden incrementarse considerablemente.

Efecto de la razón celulasa/celobiasa

Como se explicó en el *Marco Teórico*, una concentración muy alta de ácido puede provocar la degradación de la hemicelulosa produciendo subproductos indeseados que actúan como inhibidores en la fermentación. Por otro lado, el incremento de la carga enzimática implica un aumento en los costos de producción del etanol. Por lo tanto, y dado que se sabe que uno de los componentes de la mezcla, la celobiohidrolasa (exoglucanasa), sufre una fuerte inhibición por producto [49], una saturación de celobiasas que degraden la celobiosa presente en el medio de sacarificación puede aumentar la liberación de glucosa al medio sin incurrir en un aumento de celulasa ni de ácido en el proceso. Por lo anteriormente explicado, se efectúa un experimento con la mejor condición de pretratamiento y sacarificación, es decir, con 2% v/v de ácido sulfúrico y 30 FPU de celulasas pero se aumenta la proporción de CBU de celobiasas/FPU de celulasas de 1:7,5 a 1:1.

Las curvas cinéticas que se obtuvieron para las condiciones mencionadas, se contrastan en la Figura 6-4, observándose un mayor nivel de sacarificación cuando aumenta la proporción celobiasas/glucanasas. Mientras que al utilizar 4 CBU/gr de celobiasas se obtuvo un nivel de sacarificación de 36,9 mg de glucosa por gramo de material pretratado, dicho nivel aumentó a 44,8 mg al ser sacarificado con 30 CBU/gr. Esto nos indica que probablemente en el experimento que se hizo con una menor proporción de dichas enzimas, la saturación de celobiasas en el medio de sacarificación no fue suficiente y la reacción fue inhibida por el producto generado por las exoglucanasas, es decir, por la celobiosa. Considerando el error que se observa en las mediciones, nada asegura con certeza que la condición con menor carga de celobiasa no pueda llegar a los niveles de sacarificación de la condición que tiene una mayor carga. Sin embargo, el aumento de celobiasas dio a conocer valores con menor error en la reacción de sacarificación probablemente porque al anularse la inhibición por producto que puede afectar a las exoglucanasas, se regula la velocidad de reacción de hidrólisis de la celulosa. A pesar de esto, probablemente el incremento en un 21% de la sacarificación no compense los costos en los que se incurre al aumentar en 7,5 veces la carga de celobiasas utilizada, pero ese análisis se profundizará más adelante.

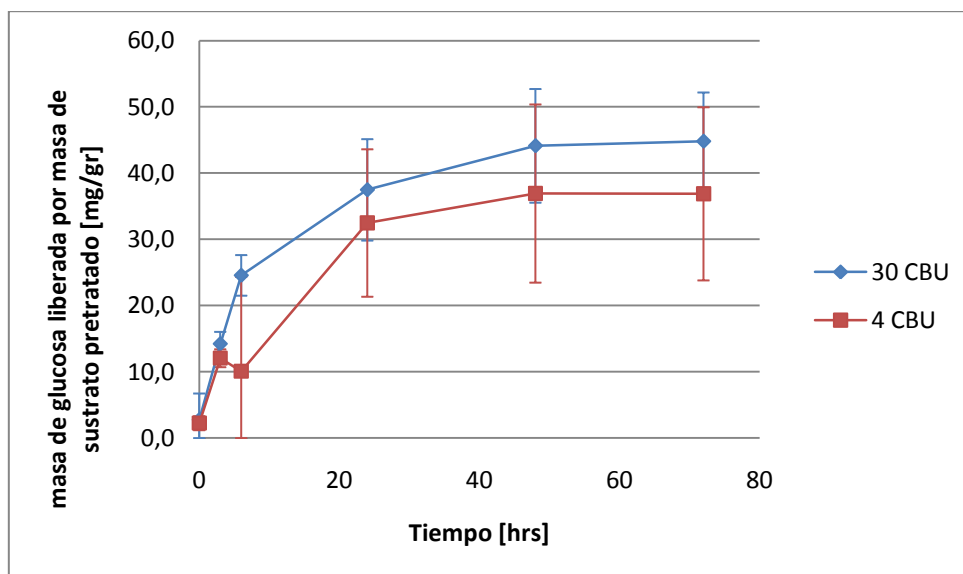


Figura 7-5: Cinética de sacarificación para el material pretratado con ácido sulfúrico diluido al 2 %v/v, 30 FPU de celulosa y distintas cargas de celobiasa. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

Respecto a los errores observados en los gráficos presentados, se puede decir que si bien todos los valores obtenidos contienen un error considerable, éstos están asociados mayormente al método de detección de glucosa ya que las tendencias obtenidas son coherentes y coinciden con el comportamiento esperado, es decir, que la liberación de azúcares aumente con el incremento de concentración de ácido y de carga enzimática.

Por otro lado, en las Figuras 7-1 c) y 7-2 a) se observa un gran error en los puntos medidos durante la sacarificación del material pretratado al 2% v/v de ácido y sacarificado con 1 FPU/gr. Esto se debe a que en el duplicado de dicho ensayo los niveles de glucosa se mantuvieron prácticamente en cero siendo que en la muestra principal, la absorbancia medida fue incluso mayor que la registrada para el material pretratado con 0,5% v/v de ácido y sacarificado con 15 FPU/gr. La única explicación que cabe para lo observado es que el ensayo duplicado falló en alguna de las etapas llevadas a cabo por un error humano. Dada la poca trascendencia de dicha medición, y que la programación experimental no permitía repetir aquel ensayo, se decidió dejar los valores y comentar que probablemente el nivel de sacarificación final para aquella condición debería parecerse más al obtenido en el ensayo original, es decir, cercano a los 20 mg de glucosa por gramo de sustrato.

7.2 Sacarificación del material pretratado con COSLIF

Los experimentos desarrollados para probar la eficacia del pretratamiento COSLIF en colihue se efectuaron utilizando las condiciones óptimas señaladas por Sathitsuksanoh et al. [43], es decir: 85% v/v de ácido fosfórico durante 1 hora a 50°C en baño de agua rotatorio a 100 RPM [43]. Las cargas de celulosa se definieron como variables utilizándose cargas de 0, 15, 30 y 40 FPU/gr de celulosas. La proporción de CBU celobiasa/FPU celulosa usada es igual a 1 debido a la experiencia obtenida en el pretratamiento con ácido diluido. Dadas esas condiciones, se midieron los niveles de sacarificación y se

obtuvieron las curvas cinéticas que se muestran en la Figura 7-6, la cual da cuenta de las cuatro sacarificaciones correspondientes a las obtenidas con las distintas cargas enzimáticas. En ella se observa que en ausencia de celulasa se liberó un nivel muy bajo de glucosa, lo que demuestra el efecto que tienen las enzimas si se compara con los niveles de sacarificación de las otras condiciones.

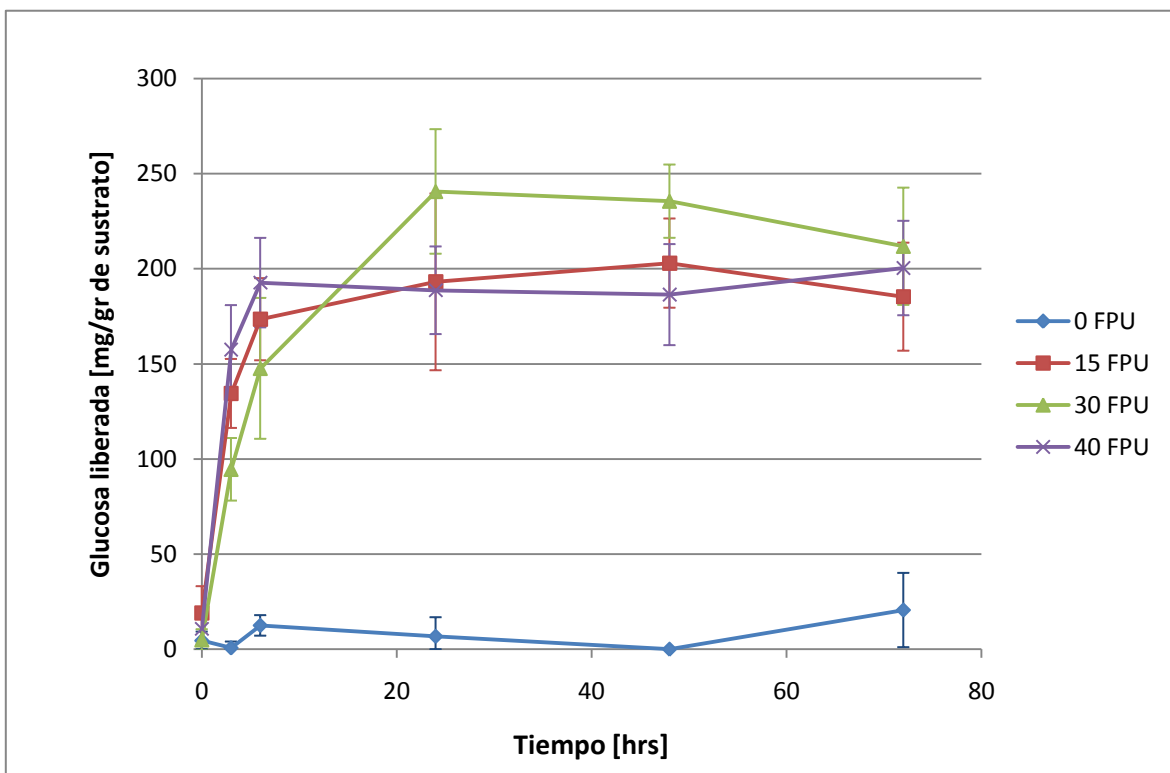


Figura 7-6: Cinéticas de sacarificación para material pretratado con COSLIF (H₃PO₄ a 85% v/v y 50°C) y sometido a distintas cargas enzimáticas. Las muestras se analizaron en duplicado. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

En la Figura 7-6 se observa también que ninguna de las tendencias converge a un valor fijo de sacarificación. Dada la fenomenología de la reacción, se esperaría que a medida que aumenta el tiempo de la sacarificación, el nivel de glucosa liberada también aumente hasta alcanzar un valor límite y que a partir de ese momento, dicho nivel se mantenga relativamente constante. Esta tendencia se respalda en las curvas obtenidas por Sathitsuksanoh et al. en bambú [31] y permite calcular rendimientos representativos para cada condición que pueden compararse con los obtenidos en el pretratamiento con ácido diluido.

Para poder discutir de mejor manera los resultados, se graficó una línea de tendencias adecuada para la reacción de sacarificación. Se aprecia en la Figura 7-6, que la cinética de sacarificación se parece a una curva exponencial inversa. Por esta razón, se modeló el comportamiento cinético de la reacción minimizando el error cuadrático medio de los puntos obtenidos utilizando la función que se muestra en la Ecuación 6.1.

$$y = -b \cdot e^{-a \cdot x} + c \quad (\text{Ecuación 7.1})$$

El método numérico utilizado es el que ocupa el programa Microsoft Excel 2007 por defecto en su aplicación Solver, es decir, el método de Newton.

De esta forma se obtienen tendencias congruentes con los resultados obtenidos tal y como se observa en la Figura 7-7, permitiendo determinar valores de mayor confianza para los niveles de sacarificación alcanzados dada la diferencia (error) de los valores medidos, que en general se hace considerable en las muestras tomadas después de las 6 horas de reacción. Cabe señalar que el cálculo de los rendimientos obtenidos se efectúa con los valores de sacarificación finales, obtenidos a través de las líneas de tendencia de cada condición.

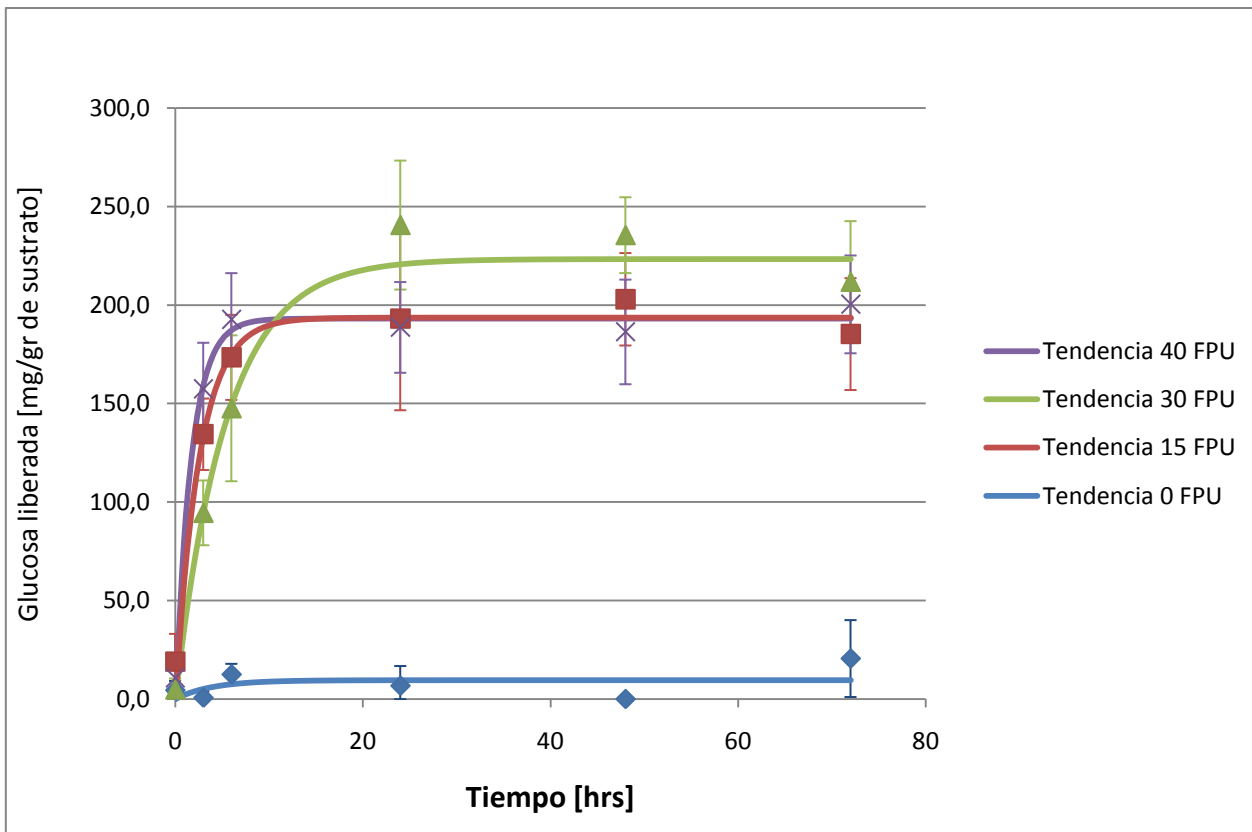


Figura 7-7: Líneas de tendencia de las cinéticas de sacarificación para materiales pretratados con COSLIF (H_3PO_4 a 85% v/v y $50^\circ C$) y sometidos a distintas cargas enzimáticas. Las muestras se tomaron en duplicado. El nivel máximo teórico de liberación de azúcares por gramo de material es de 438 mg/gr.

De las tendencias graficadas en la Figura 7-7 se observa en líneas generales que los niveles máximos de sacarificación se lograron antes de las 30 horas de reacción y que éstos, en el rango de carga enzimática estudiado, no tienen una relación directa con la carga enzimática aplicada ya que el material sacarificado con 30 FPU/gr, si bien fue el que tuvo una cinética más lenta, fue el que liberó una mayor cantidad de azúcares. Se aprecia también que los niveles de sacarificación entre los materiales sacarificados con 15 y 40 FPU/gr fueron muy parecidos y sus líneas de tendencia en general son muy similares teniendo una cinética levemente más lenta la curva obtenida a partir del material sacarificado con 15 FPU/gr.

No se puede concluir tajantemente que los niveles de sacarificación del material tratado con 30 FPU/gr de celulasas sean mayores que el resto, ya que si se observa en la Figura 7-6 la unión de los últimos puntos medidos para esa condición muestra una pendiente negativa dejando entrever que las mediciones anteriores podrían contener un alto nivel de error, hecho que es respaldado al constatar los errores que se muestran en dicha curva. Adicionalmente, la diferencia entre los niveles de glucosa liberada por los materiales sacarificados con 30 FPU/gr y el resto es de aproximadamente un 6,7% en comparación con el valor potencial de glucosa a obtener. Dicha diferencia no es considerable y se puede concluir que los niveles finales de sacarificación obtenidos son prácticamente iguales dado el error asociado a las mediciones y que por lo tanto no existe una dependencia de la carga enzimática en el rango estudiado.

Utilizando los niveles de sacarificación dados por los estados estacionarios de las líneas de tendencia graficadas en la Figura 7-7 se confeccionó el gráfico presentado en la Figura 7-8, para comparar los niveles de sacarificación alcanzados por cada condición. Además, se incluyó en dicha figura el mayor nivel de sacarificación alcanzado por uno de los materiales pretratados con ácido diluido.

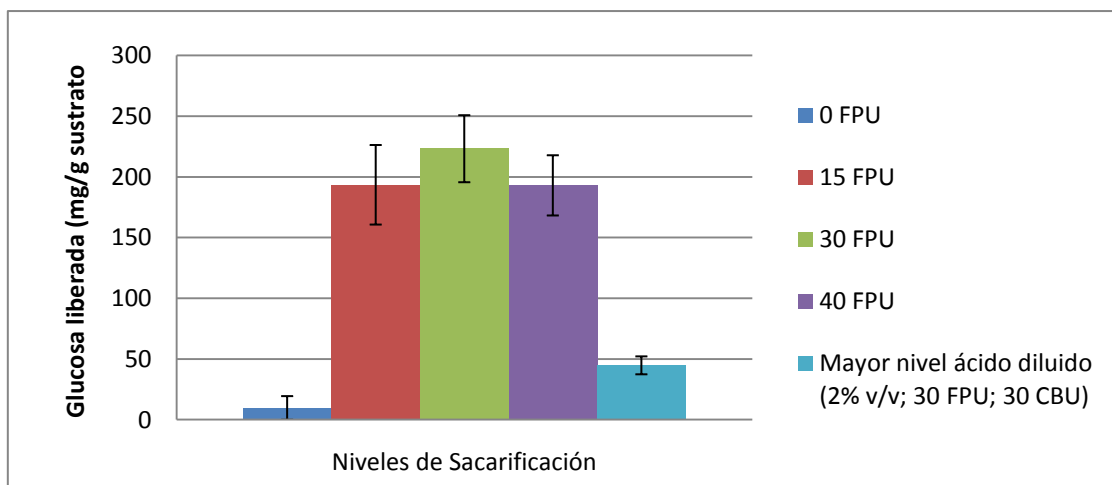


Figura 7-8: Niveles de glucosa generada por gramo del material pretratado con COSLIF después de la sacarificación.

Se aprecian niveles sustancialmente mayores de sacarificación en comparación con los obtenidos en cualquiera de las condiciones en las que se aplicó el pretratamiento con ácido diluido, teniendo la mejor condición de dicho pretratamiento una sacarificación aproximadamente 5 veces menor que la obtenida con la mejor condición del material pretratado con COSLIF.

En líneas generales, se logró un nivel de sacarificación cercano a los 200 mg de glucosa por gramo de sustrato pretratado, el cual se mantuvo relativamente constante independiente de las cargas enzimáticas aplicadas. Esto junto con la similitud de las curvas obtenidas para distintas cargas enzimáticas son un buen antecedente para pensar que al disminuir la carga enzimática (parámetro de interés por el costo comercial de las enzimas), los niveles de sacarificación se mantendrán parecidos a los obtenidos suponiendo un ahorro considerable de enzima a utilizar. Además se debe recalcar que este pretratamiento se lleva a cabo a una menor temperatura que el pretratamiento con ácido diluido (50°C

versus 121°C) y que el calor proveniente de los destiladores que se usan para recircular el etanol se puede aprovechar para alcanzar la temperatura requerida, siendo menos costoso en términos energéticos que el pretratamiento con ácido diluido, pero más costoso dada la cantidad de insumos utilizados (ácido fosfórico concentrado al 85% v/v y etanol) si éstos no se reciclan.

7.3 Rendimientos obtenidos

7.3.1 Pretratamiento ácido diluido

A partir de los resultados de sacarificación, se calculó los rendimientos de cada procedimiento ensayado. En la Tabla A 5 del Anexo 7 se muestra la cantidad de glucosa liberada por unidad de sustrato para el pretratamiento con ácido diluido y a partir de esos valores, se confeccionó parte del gráfico que se muestra en la Figura 7-9. Se observa en dicha figura, que el mayor rendimiento alcanza el 10,2% respecto al nivel máximo teórico de sacarificación que se puede obtener del material (438 mg/gr de biomasa). Este valor proviene de los 44,8 mg de glucosa liberados a partir de un gramo del material pretratado con ácido sulfúrico diluido al 2% v/v y sacarificado con cargas enzimáticas de 30 FPU de celulasa y 30 CBU de celobiasa.

Aunque parecen valores bajos de rendimiento, estos son consistentes si se comparan con los obtenidos a partir de los resultados de estudios anteriores. Por un lado, según el estudio de Leenakul y Tippayawong en *Dendrocalamus asper* [38] (bambusácea) pretratado a 120°C por 30 minutos, habiendo aplicado una concentración de ácido sulfúrico de 0,65% v/v y sacarificado con 15 FPU/gr de celulasa, la cantidad de glucosa liberada por unidad de sustrato fue de 8,7 mg/g. En esta memoria, para una condición similar, en que el material fue procesado bajo las mismas condiciones sólo que con 0,5% v/v de ácido en el pretratamiento, la liberación de glucosa por unidad de sustrato correspondió a 12,1 mg/g, valor levemente mayor al obtenido en *Dendrocalamus asper*.

Por otro lado, si se compara el rendimiento de 14% obtenido por Nicklitschek [14] desde lenga pretratada con ácido sulfúrico al 0,75% v/v y sacarificada con 37 FPU/gr y el obtenido en la presente experiencia de 5,7% para una condición similar, se observa un rendimiento 7,5 puntos porcentuales menor. Esto probablemente se debe a que los resultados del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido varían dependiendo del material (Ver Tabla A4 del Anexo 4), siendo más idóneo para pretratar lenga que bambú. Esto probablemente se deba a la diferencia en la composición de lignina de los materiales comparados.

Como el material se seleccionó maduro, se piensa que contiene un grado de lignificación considerable y que por lo tanto su composición se asemeja más a la registrada para *Dendrocalamus asper* por Leenakul y Tippayawong [38] (Ver Tabla 2-2 del *Marco Teórico*) que a la constatada por INTEC et al. para *Chusquea culeou* [29] (Ver Tabla 2-1 del *Marco Teórico*), estudio que no explicita el grado de madurez del material. Este hecho se ve respaldado por las mediciones de glucosa del material utilizado que se asemejan bastante a las presentes en *Dendrocalamus asper* en desmedro de las medidas previamente en *Chusquea culeou*.

De esta forma, si se compara la composición de un 16% de lignina presente en lenga (Ver Tabla A 3 del Anexo 3) con el 27,1% registrado para *Dendrocalamus asper* (Ver Tabla 2-2 del Marco Teórico) se concluye que el mayor contenido de lignina en comparación con el de lenga hace al colihue más recalcitrante e impide que sea degradado con la velocidad y al nivel registrado por Nicklitschek para lenga, dado que el ácido actúa con mayor dificultad sobre la matriz hemicelulósica.

Se pensó que un factor que podría influir en el rendimiento de sacarificación era el pH del medio de reacción que no fue medido antes de comenzar la hidrólisis enzimática. Sin embargo, se hicieron pruebas posteriormente que señalaron que la variación de pH es insignificante al momento de poner en contacto el material pretratado con el medio de reacción.

7.3.2 Pretratamiento COSLIF

Por otra parte, en la Tabla A 6 del Anexo 7 se muestran los niveles de liberación de glucosa y los rendimientos de sacarificación obtenidos utilizando el pretratamiento COSLIF. Dichos resultados se muestran gráficamente en la Figura 7-9 donde se observa que el mayor rendimiento se obtiene utilizando en la sacarificación una carga de glucanasa de 30 FPU/gr. Bajo esta condición, se alcanzó un 51% del máximo teórico de sacarificación. Si se comparan los valores mostrados en la Tabla A 6 del Anexo 7 con los obtenidos por Sathitsuksanoh et al., trabajo en que se sacarifica un material parecido (bambusácea de otra especie) [31] bajo condiciones de pretratamiento similares pero cargas enzimáticas menores, se observa un rendimiento considerablemente menor. Por ejemplo, para el material sacarificado con 15 FPU/gr en el presente estudio se obtuvo un rendimiento que corresponde al 46% del reportado por el estudio mencionado (44,2% de rendimiento versus 94,9%).

La diferencia mencionada se puede deber a errores en la aplicación del método, ya sea en el pretratamiento, como en la hidrólisis y posterior obtención de muestras. Un hecho que llamó la atención se produjo en la última etapa enunciada ya que al tomar las muestras, se constató que la concentración de glucosa medida por el kit variaba dependiendo de dónde se efectuó el muestreo, es decir, no era la misma si se extraía desde el seno o del fondo de la muestra. Por lo tanto se sospecha que se formó un gradiente de concentración después de las centrifugaciones y que el rendimiento habría sido mayor si éstas se hubieran extraído desde el fondo de los tubos. Sin embargo, para no provocar problemas con el método de detección, el cual impone muestras libres de impurezas, las muestras se extrajeron a partir del seno de la solución. Para la aplicación posterior de este procedimiento, se recomienda un muestreo de menor volumen para evitar grandes diferencias de concentración en el seno de la solución.

7.3.3 Comparación de rendimientos

Si se comparan los rendimientos entre los pretratamientos utilizados en el presente estudio, se aprecia una diferencia considerable, alcanzándose una eficiencia notablemente mayor al utilizarse el pretratamiento COSLIF en desmedro del pretratamiento con ácido diluido, pudiéndose concluir que al menos para sacarificar *Chusquea culeou*, el pretratamiento COSLIF es más efectivo en cuanto a la digestión del glucano, que el que utiliza ácido a bajas concentraciones. La diferencia entre los rendimientos se puede apreciar gráficamente en la Figura 7-9, donde se observa la gran diferencia que

existe entre las condiciones ensayadas, siendo el mejor rendimiento obtenido con el pretratamiento COSLIF, un 430% mayor que el mejor obtenido con ácido diluido.

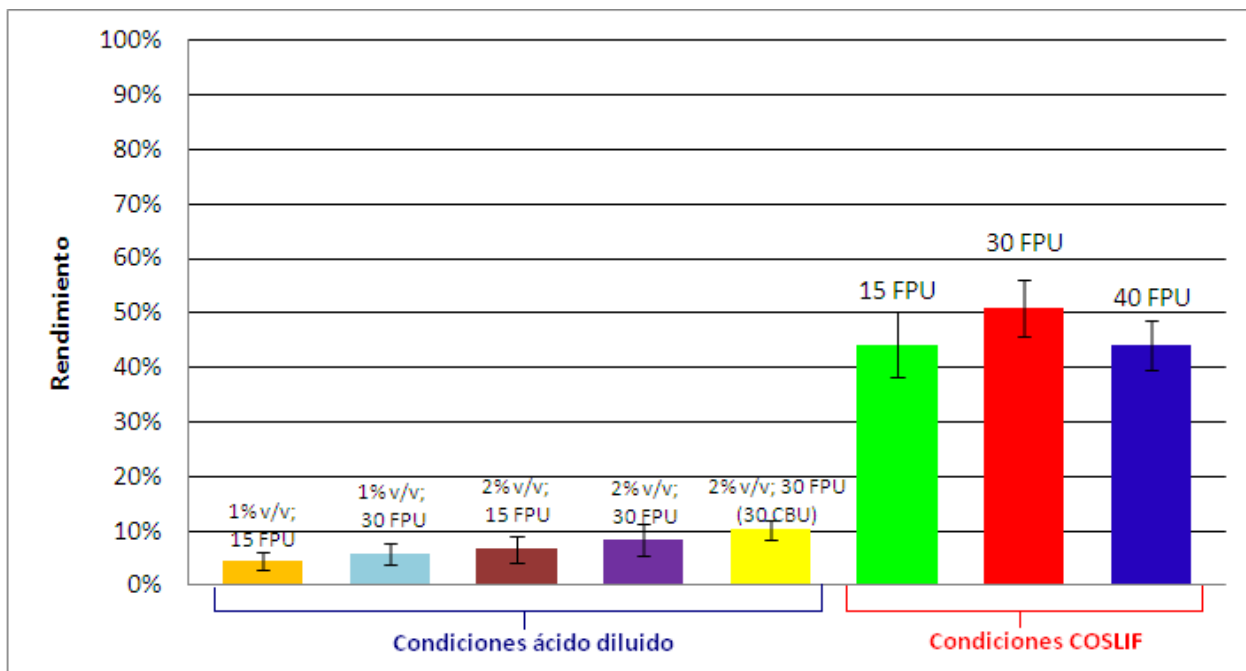


Figura 7-9: Rendimientos de sacarificación de material pretratado con ácido sulfúrico diluido y con método COSLIF.

Una hipótesis que ya ha sido planteada para explicar estas diferencias tan notorias, es que el incremento de accesibilidad a la celulosa es un factor crítico para mejorar la posterior sacarificación del material. De esta forma, si bien el pretratamiento con ácido diluido permite aumentar la accesibilidad al remover parte de la hemicelulosa que contiene el material aumentando su porosidad, el pretratamiento COSLIF además de remover parte de la hemicelulosa, remueve parte de la lignina lo que incrementa el nivel de accesibilidad que tendrán las enzimas para actuar sobre la celulosa. Para confirmar este hecho se debería hacer una medición de la lignina presente en los lavados efectuados durante el pretratamiento y mediante un balance de masa determinar qué porcentaje ha sido removido del material. Un protocolo estándar que se utiliza para precisar dichos valores es el de determinación de extraíbles en biomasa proporcionado por el NREL [54]. Sin embargo, a partir de los rendimientos obtenidos no es posible determinar cuál es el procedimiento más conveniente desde el punto de vista económico ya que si bien la metodología que utiliza el pretratamiento COSLIF utiliza menos energía (pretratamiento a 50°C) y no requiere de una etapa de remoción de inhibidores de la fermentación (furfural e hidroximetilfurfural), es más extensivo en el uso de solventes ya que se utiliza ácido en una alta concentración (85% v/v de ácido fosfórico) y etanol en una gran proporción (45 ml para tratar 1 gramo de material). Por lo anteriormente señalado, es recomendable efectuar una evaluación de factibilidad económica con el fin de determinar que alternativa es la más conveniente en términos económicos.

En sintonía con lo anterior, en la siguiente sección se indica la cantidad de etanol que se podría producir potencialmente en la zona sur del país utilizando los rendimientos obtenidos para posteriormente

discutir acerca de la rentabilidad de los pretratamientos y de esta forma generar un primer punto de comparación respecto a las economías de cada procedimiento.

7.4 Etanol potencial y comparación de rentabilidad de los pretratamientos estudiados.

Como se mencionó en el *Marco Teórico* del presente estudio, INTEC et al. estimaron una oferta anual sustentable de colihue de 2,46 [Mt/año]. Para dicha estimación supusieron un peso promedio de biomasa seca de 147,3 [ton/ha] y 160 mil culmos por hectárea [29]. A partir de dichos datos y de los rendimientos de las etapas críticas del proceso de producción de etanol, se puede efectuar una estimación gruesa de la cantidad de alcohol etílico que se puede obtener considerando la oferta anual sustentable mencionada. Además, se puede efectuar una estimación del costo de la principal materia prima al calcular el peso promedio de un culmo de colihue. Si se tiene en cuenta que el valor de un culmo es de aproximadamente 2 centavos de dólar [29], se determina el costo por kilogramo del material. Sabiendo el costo de las principales materias primas de cada pretratamiento se puede hacer un balance de dichos costos en comparación con los ingresos por concepto de venta del producto obtenido.

En la Tabla 7-1 se muestra los costos de las materias primas más incidentes en la economía de cada pretratamiento, los cuales serán multiplicados por la cantidad que se requiera de cada una de ellas en cada condición. En la cuarta columna de dicha tabla se muestra la cantidad que se requiere de cada materia prima para tratar un kilogramo de sustrato. Se observa un uso bastante intensivo en comparación con las demás materias primas, del etanol y del ácido fosfórico. Se podría pensar que el uso del ácido sulfúrico también es elevado pero como se utiliza en baja concentración, debe diluirse y por lo tanto su uso por unidad de masa tratada disminuye.

Para determinar el precio del producto obtenido, se estima un precio de mercado del bioetanol que sea competitivo con el de la gasolina. Con ese objetivo, se promedia el precio que impone la ENAP para el combustible fósil en el país y se fija el precio del bioetanol de tal forma que sea un 60% de dicho precio dado que el poder calorífico del combustible proveniente de biomasa es un 60% menor que el de la gasolina. Excluyendo el IVA (impuesto de 19%) que afecta a las bencinas pero no el impuesto específico a los combustibles ya que los biocombustibles están exentos de este, el precio final calculado para el etanol es de \$ 381 por litro. Este valor es aplicable también para el precio de compra del solvente orgánico utilizado en el pretratamiento COSLIF. Se debe remarcar que este análisis sólo incluye los costos asociados a la compra de los insumos más costosos que se utilizan en cada pretratamiento (y no otra etapa) y se descartan los costos energéticos así como los operacionales. Detalles de los cálculos realizados se encuentran en el Anexo 5 de este informe.

Tabla 7-1: Costos de las materias primas asociadas a cada pretratamiento y razones de materia prima que se deben utilizar para procesar un kilogramo de colihue.

	Materias Primas	\$/Unidad	Razón Mat. Prima/Colihue
Comunes para ambos pretratamientos	Colihue [kg]	\$ 0,00004	1
	Novozyme 188 [It] (celobiasas)	\$ 1.339	0,002
	Celluclast 1,5L [It] (celulasas)	\$ 1.339	0,012
Pretrat. COSLIF	Etanol [It]	\$ 381	45
	Ácido Fosfórico [It](85%)	\$ 1.896 ²	8
Pretrat. Ac. Diluido	Ácido Sulfúrico [It](98%)	\$ 733 ²	0,20

(Fuente: Adaptación Schneuer [52] e INTEC et al. [29])

En la Tabla 7-2 se muestran las condiciones de pretratamiento y sacarificación estudiadas, los rendimientos obtenidos y una estimación del etanol que se podría obtener suponiendo que se lleva a cabo una etapa de fermentación con un rendimiento del 89% [52]. Además se supone una conversión teórica máxima de 0,51 gramos de etanol por gramo de glucosa [41] con lo cual se tiene un rendimiento neto de un 45% en la fermentación. El punto de comparación mostrado en la Tabla 7-2 es la resta de los ingresos por concepto de venta del producto con los costos por concepto de compra de las materias primas que se utilizan para obtener el producto. Dichos valores, dadas sus magnitudes, se expresan en millones de dólares³.

Como se explicó en el *Marco Teórico* de este informe, se han patentado procesos de gran escala los que requieren de una recirculación de los solventes utilizados. Por lo mismo se supone una recirculación del etanol utilizado en los lavados del procedimiento COSLIF de un 100% ya que el etanol que queda como remanente en la fase sólida que será sacarificada y fermentada, es recolectado en la destilación final con lo cual se podría recircular a la entrada del proceso sin incurrir en costos adicionales de purificación. Adicionalmente, el proceso patentado indica que más del 99% del ácido fosfórico es arrastrado en el primer y segundo lavado y que por lo tanto, dicho porcentaje podría ser recirculado, separándolo antes de la lignina, prácticamente en su totalidad al proceso [47]. De esta forma, sabiendo el precio de venta del etanol y el de las materias primas del proceso, se pueden estimar utilidades que contrastan el valor de venta del producto con el costo de los materiales distintivos de cada procedimiento.

² Cotización realizada el 26 de Abril del 2012 en Oxiquim S.A.

³ El valor del dólar en pesos chilenos corresponde al fijado por el Banco Central para el día 30 de Abril del 2012 [57]

Tabla 7-2: Etanol potencial y utilidades por concepto de ventas de producto en relación a los costos de las principales materias primas

	Condición	Rend. Sacarif.	Etanol Potencial [It]	Utilidades [MMUSD]
Pretrat. Ácido Diluido	0,5% v/v; 1 FPU/gr	1,2%	17.135.635	\$ -243
	0,5% v/v; 15 FPU/gr	2,8%	39.055.331	\$ -1.317
	0,5% v/v; 30 FPU/gr	3,3%	46.187.930	\$ -2.492
	1% v/v; 1 FPU/gr	2,2%	31.487.817	\$ -411
	1% v/v; 15 FPU/gr	4,5%	63.932.445	\$ -1.470
	1% v/v; 30 FPU/gr	5,7%	81.155.063	\$ -2.631
	2% v/v; 1 FPU/gr	2,5%	35.315.065	\$ -782
	2% v/v; 15 FPU/gr	6,6%	93.941.553	\$ -1.804
	2% v/v; 30 FPU/gr	8,4%	119.079.616	\$ -2.953
	2% v/v; 30 FPU/gr (30 CBU/gr)	10,2%	144.672.864	\$ -3.186
Pretrat. COSLIF	85% v/v; 15 FPU/gr	44,2%	624.895.809	\$ -1.188
	85% v/v; 30 FPU/gr	51,0%	720.814.120	\$ -2.371
	85% v/v; 40 FPU/gr	44,1%	623.321.966	\$ -3.390

En la Tabla 7-2 se aprecia que en ninguna de las condiciones se podría vender la totalidad del producto sin tener saldos negativos, considerando sólo los costos variables mencionados en la Tabla 7-1; incluso queda excluido el etanol de entrada ya que se utiliza sólo en la puesta en marcha del proceso, después se recircula. Debe mencionarse que para proyectos de esta índole, la rentabilidad también depende de productos secundarios que podrían comercializarse ayudando a la economía del proyecto en el marco de lo que hoy se conoce como biorefinería. De esta forma, se podrían aprovechar equipos de la industria del petróleo [55] e incluir la venta de co-productos como CO₂, lignina, levadura o xilitol [52], para determinar la factibilidad económica de un proyecto que utilice el proceso productivo estudiado.

De la Tabla 7-2 se desprende también que debido a la mayor eficiencia del proceso obtenida al pretratar el material con la metodología COSLIF, se produce una mayor cantidad de etanol en comparación con la que se podría obtener a partir del material pretratado con ácido diluido. Esto se traduce en que para una misma carga enzimática, el pretratamiento COSLIF va a resultar más conveniente desde el punto de vista económico, que el pretratamiento con ácido diluido independiente de la concentración de ácido utilizada. La condición más conveniente para el pretratamiento COSLIF es la destacada con color rojo en la tabla enunciada y corresponde a la que utiliza una menor carga enzimática (15 FPU/gr). Probablemente si se disminuye la carga enzimática a 1 FPU/gr, se obtendrá una mayor utilidad que las calculadas para el material pretratado con ácido diluido y sacarificado con esa carga. Dicho valor será estimado más adelante.

Se observa también en la Tabla 7-2, que la mayor cantidad de etanol que se puede obtener con los resultados recabados es de 0,720 [MMm³]. La condición que permitiría llegar a esa cifra es la que tiene un mayor rendimiento, es decir, pretratamiento del material mediante COSLIF con H₃PO₄ al 85% v/v y carga enzimática de 30 FPU/gr.

Para contrastar ese valor con las necesidades del país, se calcula la demanda de etanol en Chile determinando primero la demanda anual de la gasolina sin plomo. Para eso, se toman los valores de demanda del combustible fósil de los años 2007 y 2008 correspondientes a 3,047 [MMm³] y 3,147 [MMm³] respectivamente. Suponiendo que la demanda aumenta 0,1 [MMm³], se tiene una demanda anual aproximada de 3,55 [MMm³] de combustible. Si se define la demanda de bioetanol como el 5% de la demanda de gasolina, considerando una mezcla válida entre el biocombustible y el combustible fósil, se obtiene una demanda anual de aproximadamente 0,1775 [MMm³].

La demanda cubierta por un proyecto que produzca la cantidad de etanol calculada para la mejor condición del presente estudio es de un 405,6% por lo que habría que pensar en exportar el producto.

Por otro lado, en la Figura 7-2 se muestra la incidencia que tiene la carga enzimática en la rentabilidad de un proceso productivo de esta índole. Se observa que manteniendo el resto de las condiciones y variando las cargas enzimáticas utilizadas, las utilidades calculadas son menos negativas. Lo mismo ocurre con la concentración de ácido en el caso de pretratar el material con ácido diluido: a menor concentración de ácido, se obtienen menores rendimientos pero las utilidades son menos negativas. Esto se debe principalmente a que el incremento del rendimiento entre una condición y otra, no compensa el diferencial de gastos desde el punto de vista de los ingresos generados por ventas del producto que dicho incremento genera. Posiblemente si disminuyera el valor de las materias primas dicho diferencial de gastos no perdería importancia frente a un leve incremento de rendimiento, pero el presente análisis señala que en las condiciones actuales, eso no ocurre.

A pesar de las utilidades negativas mostradas en la Tabla 7-2, se piensa que existen alternativas en cuanto a los rendimientos de sacarificación y particularmente en la metodología que utiliza el pretratamiento COSLIF. Se debe mencionar que los valores de rendimiento obtenidos distan bastante de los reportados con bambusáceas en el estudio de Sathitsuksanoh et al. el cual, además, se efectuó a bajas cargas enzimáticas (1, 2, 5 y 15 FPU obteniéndose 88,2%, 89,8%, 93,3% y 94,9% de digestión de glucano a las 72 hrs, respectivamente) [31]. De esta forma, se insinúa que es posible incrementar las utilidades de un eventual proceso de producción de etanol a partir de colihue ya que sería factible disminuir la carga enzimática y obtener mayores rendimientos que los reportados en el presente trabajo.

En caso de obtenerse mayores rendimientos con la carga enzimática probada, los ingresos por concepto de venta de producto aumentarán. Con el fin de clarificar la incidencia que tiene el rendimiento en la economía del proceso, en la Figura 7-10 se muestra una curva de sensibilidad generada con el rendimiento obtenido para el pretratamiento COSLIF sacarificando el material con 15 FPU/gr (caso más rentable de dicho pretratamiento). De esta manera, se puede observar la variación de las utilidades en relación a la variación del rendimiento, apreciándose una línea de tendencia la cual, a partir de su ecuación característica, indica que una variación de un 100% en el rendimiento obtenido para la condición enunciada, hará que las utilidades aumenten en un 76%. Adicionalmente, extrapolando la curva obtenida, se determina que para lograr que las utilidades comiencen a ser positivas, el rendimiento tiene que ser superior al 102,3% lo cual es improbable pero dadas las holguras que pueden existir en las variables implicadas del cálculo, podría ser factible en un escenario positivo.

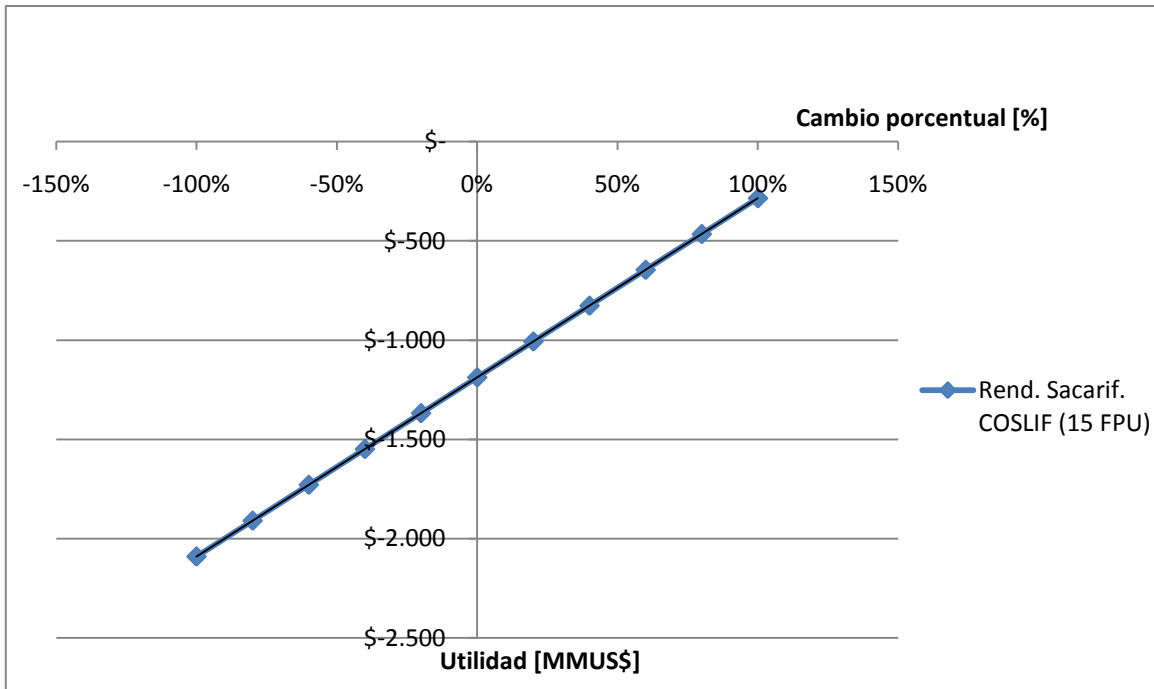


Figura 7-10: Analisis de sensibilidad del rendimiento de sacarificación: Utilidades obtenidas al variar porcentualmente el rendimiento de sacarificación.

Por otra parte, para saber la incidencia que tiene el ahorro de enzimas al sacarificar el material con una menor carga enzimática, se debe tener clara la incidencia de dicha carga en la cinética de la reacción. Como no es posible modelar ese comportamiento *a priori*, es aconsejable primero realizar otros experimentos que contemplen menores cargas enzimáticas en la sacarificación. Dado que de los resultados obtenidos y en particular que de las cinéticas de sacarificación del material pretratado con COSLIF (Ver Figura 7-7), no se puede descartar que es posible lograr un nivel de sacarificación similar al obtenido con cargas enzimáticas inferiores a 15 FPU/gr, se supuso que la tasa de decaimiento de rendimientos en relación a la reducción de carga enzimática (de 15 FPU/gr a 1 PFU/gr) es coincidente con la reportada por Sathitsuksanoh et al. [31]. Así, realizando una regla de tres simple con los resultados de dicho estudio, se calcula un rendimiento hipotético para la sacarificación con 1 FPU/gr del material utilizado en el presente estudio. En la Tabla 7-3 se presentan los rendimientos obtenidos por Sathitsuksanoh et al. para sacarificaciones con 15 y 1 FPU/gr así como el obtenido en el presente estudio para 15 FPU/gr y el calculado para 1 FPU/gr, suponiendo la misma reducción de rendimiento.

Tabla 7-3: Estimación de rendimiento hipotético pretratando el material con COSLIF y sacarificándolo con 1 FPU/gr

Carga Enz. [FPU/gr]	Rendimiento	
	Sathitsuksanoh et al.	Presente Estudio
15	94,9%	44,2%
1	88,2%	41,1%

Fuente: Adaptación de Sathitsuksanoh et al. [31]

Luego, si se calcula la utilidad con este nuevo rendimiento hipotético (41,1%) para la condición impuesta (COSLIF, 1FPU/gr), ésta se mantiene negativa aunque con una considerable disminución alcanzando los MMUS\$ -19.

Así, se concluye que un incremento del rendimiento y una disminución de la carga enzimática son parámetros que se deben mejorar en conjunto para obtener utilidades positivas. Para ejemplificar lo señalado, se realizó el mismo cálculo respecto a las utilidades sólo que esta vez se impusieron los parámetros reportados por Sathitsuksanoh et al., es decir, una carga enzimática de 1 FPU/gr y un rendimiento de sacarificación del 88,2%. El resultado es una utilidad positiva que corresponde a MMUS\$943, la que permitiría suponer que un proyecto que utilice este procedimiento, podría ser rentable.

De esta forma, se puede concluir que con ninguno de los rendimientos obtenidos se puede hacer rentable el proceso de producción de etanol a partir de colihue, a menos que se logren negociar precios muy inferiores de materias primas en relación a los cotizados. Sin embargo, los rendimientos obtenidos para las condiciones estudiadas en el pretratamiento COSLIF difieren bastante en relación con los reportados en materiales similares por lo que nuevos ensayos que utilicen menores cargas enzimáticas y que generen mayores rendimientos podrían hacer rentable el proceso de producción de etanol.

El detalle de los cálculos realizados en esta sección se encuentra en el Anexo 5: *Memoria de Cálculos*.

Capítulo IV

Conclusión y Recomendaciones

8 Conclusión

Realizado el estudio de factibilidad de producción de etanol a partir de *Chusquea culeou*, las conclusiones son las siguientes:

Se constató a través de los resultados obtenidos, que el pretratamiento del material estudiado, ya sea con ácido sulfúrico diluido o con la metodología COSLIF, incrementa el rendimiento de sacarificación en la etapa de hidrólisis enzimática. Sin embargo, y a pesar del beneficio técnico descrito, los rendimientos alcanzados con las condiciones de pretratamiento y sacarificación estudiadas, no permiten que el proceso productivo sea rentable ya sea por el uso intensivo de materias primas o por los bajos niveles que se pueden producir de etanol a partir de dichos rendimientos.

En el caso del proceso que utiliza el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, los parámetros estudiados fueron la concentración de ácido durante el pretratamiento y la carga de enzimas utilizada durante la sacarificación. Se observó un incremento en los niveles de glucosa liberada en la sacarificación a medida que se aumenta la concentración de ácido y la carga de celulasas. Respecto al proceso que utiliza el pretratamiento COSLIF, el parámetro estudiado fue la carga de celulasas, la cual, en los rangos ensayados, no tuvo una incidencia considerable en el nivel de sacarificación final.

En líneas generales, los mayores rendimientos se obtuvieron con el procedimiento COSLIF (mayor rendimiento: 51%) en desmedro de los obtenidos con el pretratamiento con ácido diluido (mayor rendimiento: 10,2%). La condición que reportó el mejor rendimiento fue aquella que se pretrató con COSLIF y que se sacarificó con una carga enzimática de 30 [FPU/gr].

Utilizando dicha condición, se estimó una producción de etanol a partir de *Chusquea culeou* de 0,72 [MMm³] que corresponde al 405,6% de la demanda interna y que si bien es la mayor que se puede obtener con los resultados reportados, no es la que genera mayores utilidades. En ese sentido, la condición más conveniente es el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido al 0,5% v/v y sacarificación con 1 FPU/gr (MMUS\$ -243) aunque se estima que utilizando dicha carga enzimática después del pretratamiento con COSLIF se pueden obtener mejores utilidades (MMUS\$ -19).

Aunque los resultados obtenidos no son del todo positivos en cuanto a su viabilidad económica, se debe señalar que estimaciones hechas asumiendo una mejora en el rendimiento de sacarificación y un uso menos intensivo de enzimas (1 FPU/gr) indican que el proceso de producción de etanol utilizando el pretratamiento COSLIF podría ser rentable y que dado a la disponibilidad y bajo costo del material estudiado, la *Chusquea culeou* se presenta como una buena alternativa para llevarlo a cabo.

9 Recomendaciones

Del trabajo realizado se desprendieron una serie de observaciones que pueden ser útiles a la hora de perfeccionar los resultados y rendimientos obtenidos con los pretratamientos que aborda este estudio. A continuación, dichas observaciones se presentan como recomendaciones.

- Es difícil imaginar un proceso de producción de etanol empleando el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido y que sea rentable. Esto debido a los rendimientos obtenidos en el presente estudio y a los reportados en anteriores, que dan cuenta de niveles insuficientes de sacarificación lo que imposibilita su implementación desde el punto de vista económico. Además, un procedimiento de esta índole requiere de una etapa de detoxificación, la cual hace aún más caro el proceso. Se debe considerar, sin embargo, que es posible que un proceso de este tipo sea rentable dentro del concepto de biorefinería donde otros subproductos permitan incrementar los ingresos, se aproveche la energía de forma eficiente y productos de otros procesos productivos puedan ser utilizados como materias primas.
- Se recomienda efectuar un balance de masa del proceso para determinar con precisión la composición del material que se está procesando y para saber la cantidad de lignina y de hemicelulosa se está retirando en los lavados (punto de comparación para saber si se está llevando a cabo bien el procedimiento).
- Con el fin de aumentar el rendimiento de sacarificación del procedimiento que utiliza el pretratamiento COSLIF, se pueden hacer ensayos probando otros tamaños de partícula (tamaños más pequeños pueden facilitar la separación sólido líquido en los lavados), tomar muestras de menor volumen (se evitan gradientes de concentración en las muestras) y probar con otros volúmenes de reacción (la cinética enzimática puede depender de la concentración de glucosa en el medio).
- Para mejorar los aspectos económicos del procedimiento que utiliza el pretratamiento COSLIF, se recomienda realizar ensayos con menores cargas enzimáticas que las probadas en el presente trabajo. En particular, intentar con una carga de celulasas de 1 FPU/gr. Además se pueden realizar experimentos con menores cargas de celobiasas ya que basta con que no se produzca una inhibición por producto en las celulasas. En cuanto al material, se pueden probar sacarificaciones con material que posea un menor tiempo de madurez ya que en la etapa de crecimiento del colihue, el porcentaje de celulosa que contiene es mayor que cuando ha llegado a su fase madura.
- Durante la investigación bibliográfica se encontró un pretratamiento que puede ser muy promisorio debido a la baja cantidad de insumos que se requieren para llevarlo a cabo. Se trata del pretratamiento con campo eléctrico pulsado (PEF) [36] [37] el cual se ha comprobado que genera perforaciones en el material que podrían ser aprovechadas por las enzimas durante la sacarificación.

10 Bibliografía

- [1] UNIVERSIDAD DE CHILE. "Optimización del tratamiento de lignocelulosas con miras a la obtención de etanol." <<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/programas-de-investigacion-domeyko/linea-energia/proyectos-e-iniciativas/optimizacion-del-tratamiento-de-lignocelulosas-con-miras-a-la-obtencion-de-bioetanol/52157/descripcion>> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [2] FONDO MONETARIO INTERNACIONAL. "Perspectivas de la economía mundial.", Departamento de Tecnología y Servicios Generales del FMI, Washington D.C., EE.UU, 2011.
- [3] U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. "International Energy Outlook 2011.", Washington D.C., EE.UU, 2011.
- [4] INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. "Cambio climático 2007. Informe de síntesis." <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_sp.pdf> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [5] NICHOLAS, S. "Informe Stern: la economía del cambio climático." <<http://www.ambientum.com/documentos/general/resumeninformestern.pdf>> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [6] KÁDÁR, Zs.; SZENGYEL, Zs. y K., RÉCZEY. "Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol." *Industrial Crops and Products*, Vol. 20, n. 1, pp. 103-110, 2004.
- [7] BIBLIOTECA DEL CONGRESO NACIONAL DE CHILE. "Ley 20257." <http://centralenergia.cl/uploads/2009/12/Ley_ERNC_LEY-20257.pdf> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [8] CHAMY, R. y VIVANCO, E. "Identificación y clasificación de los distintos tipos de biomasa disponibles en Chile para la generación de biogás." CNE, GNZ, Santiago, Chile, 2007.
- [9] EMOL. "Energía en Chile. Generación, crisis y soluciones." <http://www.economiaynegocios.cl/especiales/especial_energia/Crisis_2a.html> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [10] EMOL. "Todo sobre la crisis del gas." <http://www.economiaynegocios.cl/especiales/crisisdelgas_2005/index.htm> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[11] CHILE SUSTENTABLE. "Crisis energética en Chile: rol y futuro de las energías renovables no convencionales.", Editores: AEDO, M. P. y LARRAÍN S.

<http://www.archivochile.com/Chile_actual/patag_sin_repre/03/chact_hidroay-3%2000025.pdf>. [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[12] MADARIAGA, M. "Energía y MedioAmbiente"

<<http://www.energiaymedioambiente.cl/archives/1228>>. [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[13] CAMINO, V. y MIRANDA J. "Gestión del riesgo en el abastecimiento energético a nivel país"

<http://web.ing.puc.cl/~power/alumno11/gestionriesgo/Web_files/Page1319.htm>. [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[14] EDITEC S.A. "Elctricidad Interamericana."

<http://www.revistaei.cl/revistas/imprimir_noticia_neo.php?id=908>. [En línea]

[Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[15] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. "CO2 emissions from fuel combustion. Highlights." Paris, Francia, 2011.

[16] GARCÍA, A. E., CARMONA, R. J., LIENQUEO, M. E. y SALAZAR, O. "The current status of liquid biofuels in Chile.", Energy, Vol 36, n. 4, pp. 2077-2084, 2011.

[17] CHILE DESARROLLO SUSTENTABLE. "Energía 20/20".

<<http://www.chiledesarrollosustentable.cl/desarrollo-sustentable/responsabilidad-social/energia-2020/>>. [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[18] CHIBBARO, A. "Panorama de las Energías Naturales Renovables y la Agricultura – Una mirada a la Agroenergía en el MERCOSUR y Chile.", Seminario CNE-FAO-GORE-ODEPA, Santiago, Chile, 2009.

[19] ÁLVAREZ, C. "Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional."

<<http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlosalvarez.pdf>>. [En línea]

[Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

[20] INSTITUTO PARA LA DVIERSIFICACIÓN Y AHORRO DE ENERGÍA. "Glosario."

<<http://www.idae.es/index.php/relmenu.72/letra.B/mod.glosario/mem.listado>> [En línea]

[Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]

- [21] COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA. "Bioetanol."
<http://www.cne.gov.cl/web_cne/energias/biocombustibles/tipos-de-energia/336-bioetanol> [En línea]
[Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [22] GARCÍA, L., et al. Diseño de un proceso para la hidrólisis de residuos lignocelulósicos.
<<http://cnea.cicataqro.ipn.mx/cnea/files/BM05P.pdf>> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [23] EUROPEAN BIOMASS INDUSTRY ASSOCIATION. "Bioethanol."
<<http://www.eubia.org/212.0.html>> [En línea] [Fecha consulta: 8 de Mayo de 2012]
- [24] PURWADI, R. "Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy."
Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Gotemburgo, Suecia, 2006.
- [25] HAMELINCK, C., VAN HOOIJDONK, G. y FAAIJ A. "Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term.", Biomass and Bioenergy, Vol 28, n. 4, págs. 384-410, 2004.
- [26] PINTO, M. "Global Biofuels Outlook 2010-2020". Hart Energy, Rotterdam, Holanda, 2011.
- [27] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. "Energy Technology Perspectives". Paris, France, 2008.
- [28] MARQUEZ, J. "Proyecto de norma comercial de clasificación por aspecto y usos para la bambúsacea autóctona Chusquea culeou (colihue)." Tesis para obtener el título de Ingeniero Forestal, Universidad Austral de Chile, Chile, 2002.
- [29] INTEC, et al. "Bambú en Chile." [ed.] CAMPOS J. y otros. Santiago, Chile, 2003, 144 pp..
- [30] SHIMOKAWA, T. et al. "Effects of growth stage on enzymatic saccharification and simultaneous saccharification and fermentation of bamboo shoots for bioethanol production.", Bioresource Technology, Vol. 100, n. 24, pp. 6651-6654, 2009.
- [31] SATHITSUKSANO, P., et al. "Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings." Bioresource Technology, Vol. 101, n. 13, pp. 4926-4929, 2010.
- [32] CUERVO, L., FOLCH, J. L. y QUIROZ, R. E. "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol.", BioTecnología, Vol. 13, n. 3, pp. 11-25, 2009.
- [33] PEREIRA, N. et al. "Series on Biotecnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery.", Vol II, Escuela de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

- [34] ZOU, L., et al. "Nanosacle structural and mechanical characterization of the cell wall of bamboo fibers", *Materials Science and Engineering*, Vol. 29, n. 4, pp. 1375-1379, 2009.
- [35] BIG PLANT NURSERY.
Big plants online. <<http://www.bigplantsonline.co.uk/acatalog/chusqueaculeou.jpg>>. [En línea] [Fecha Consulta: 30 de Marzo de 2012]
- [36] KUMAR, P. et al. "Pulsed electric field pretreatment of switchgrass and wood chip species for biofuel production.", *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 50, n. 19, Minneapolis, EE.UU., pp. 10996-11001, 2011.
- [37] KUMAR, P. et al. "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.", *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 48, n. 8, pp. 3713-1729, 2009.
- [38] LEENAKUL, W. y TIPPAYAWONG, N. "Dilute acid pretreatment of bamboo for fermentable sugar production.", *Journal of Sustainable Energy & Environment*, Vol. 1, pp. 117-120, 2010.
- [39] BALLESTEROS, I., et al. "Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production.", *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 42, n. 1, pp. 84-91, 2008.
- [40] HENDRIKS, A. y ZEEMAN, G. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomas.", *Bioresource Technology*, Vol. 100, n. 1, pp. 10-18, 2009.
- [41] NIKLITSCHKEK, T. "Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de bioetanol.", *Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile 2010.*
- [42] SUN, Y. y CHENG, J. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.", *Bioresource Technology*, Vol. 83, n. 1, pp. 1-11, 2002.
- [43] SATHITSUKSANO, P., et al. "Saccharification of a Potential Bioenergy Crop, *Phragmites australis* (Common Reed), by Lignocellulose Fractionation Followed by Enzymatic Hydrolysis at Decreased Cellulase Loadings." *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 48, n. 13, pp. 6441-6447, 2009.
- [44] ZHANG, Y. H. P., CUI, J., LYND L. R. y KUANG, L. R. "A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure.", *Biomacromolecules*, Vol. 7, n. 2, pp. 644-648, 2006.
- [45] ZHANG, Y.H.P., et al. "Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions.", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 97, n. 2, págs. 214-223, 2007.

- [46] SATHITSUKSANO, N., et al. "Solvent fractionation of lignocellulosic biomass.", Bioalcohol production, [ed.] Keith Waldron, Vol. 3, n. 4, pp. 122-140, 2010.
- [47] ZHANG, P. "Cellulose-solvent-based lignocellulose fractionation with modest reaction conditions and reagent cycling.". Patente Industrial: WO2007/111605, Estados Unidos, 4 de Octubre de 2007. Proceso Productivo.
- [48] LYND, L. R., et al. "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.", Microbiology and molecular biology reviews, Vol. 66, n. 3, pp. 506-577, 2002.
- [49] BELANCHE, L. y PÉREZ, J. "Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática.", Zubía, n. 12, 1994, pp. 227-240.
- [50] PEZOA, R. "Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación." Memoria de Ingeniero Civil Químico y Tesis de Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Chile, 146 pp., 2010.
- [51] JURÍ, S. "Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: Líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca." Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Chile, 66 pp., 2011.
- [52] SCHNEUER, D. "Estudio exploratorio de producción de bioetanol y coproductos de biorefinería a partir de rastrojos de maíz." Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología e Ingeniero Civil Industrial, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Chile, 2009.
- [53] CORTÍNEZ, V. "Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos.", Memoria de Ingeniero Civil Químico y Tesis de Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Chile, 2010.
- [54] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY "Determination of extractives in biomass." <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>>. [En línea] [Fecha Consulta: 08 de Mayo de 2012.]
- [55] DRAPCHO, C., PHU NHUAN, N. y WALKER, T. "Biofuels Engineering Process Technology.", Mc Graw-Hill, 371 pp., 2008.
- [56] PERRY, R., GREEN, D. "Perry's chemical engineers' handbook.", McGraw-Hill, 7ª Edición, Estados Unidos, 1999.

[57] BANCO CENTRAL DE CHILE. "Estadísticas económicas."
<<http://www.bcentral.cl/estadisticas-economicas/mediodia/mediodia.htm>>. [En línea] [Fecha Consulta: 30 de Abril de 2012.]

[58] AGENCIA CHILENA DE EFICIENCIA ENERGÉTICA. "Estadísticas"
<<http://www.acee.cl/576/propertyvalue-17981.html>>. [En línea] [Fecha Consulta: 19 de Junio de 2012.]

11 Anexos

11.1 Anexo 1: Propiedades fisicoquímicas de la gasolina y combustibles oxigenados

Tabla A 11.1: Propiedades fisicoquímicas de la gasolina y combustibles oxigenados

Propiedades del combustible	Gasolina	Combustibles oxigenados		
		Metanol	Etanol	MTBE
Densidad [kg/m ³] a 15,56°C	719-779	794	792	742
Poder Calorífico Inferior [kJ/kg]	41.800-44.200	19.934	26.749	35.123
Calor de evaporación [kJ/kg]	~349	1104	839	326
Punto de inflamación	-42,8	6,5	12	-28
Octanaje (RON)	90-100	107	108	116
Octanaje (MON)	81-90	92	92	101
Presión de vapor Reid [kPa]	55-103	32	16	54

(Fuente: Adaptación de Purwadi [24])

11.2 Anexo 2: Estructura macro y micro-molecular de la biomasa lignocelulósica.

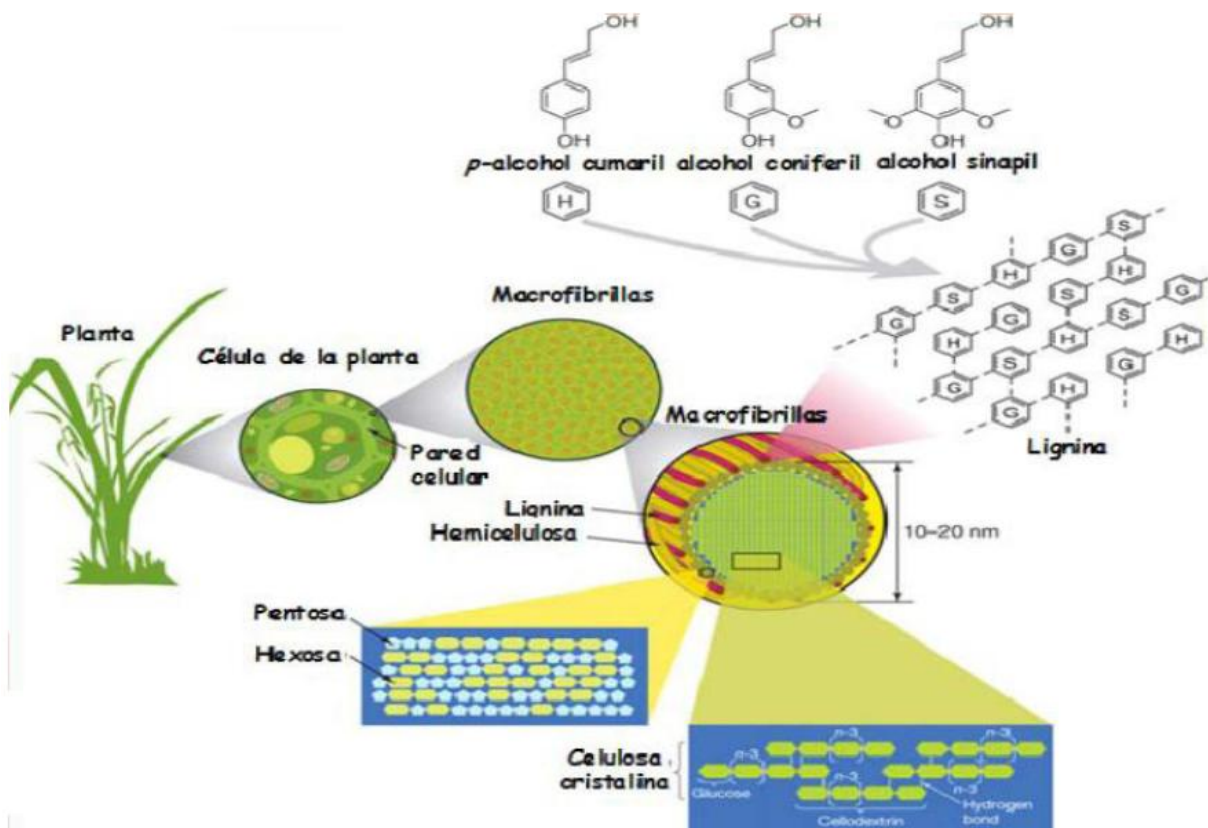


Figura A 1: Estructura de la biomasa lignocelulósica [51].

11.3 Anexo 3: Composición del colihue y otros materiales.

Los valores porcentuales de holocelulosa y lignina mostrados en la Tabla 2-1 son en base de madera seca libre de extraíbles. Eso significa que los extraíbles totales no son incluidos en el total másico y por lo tanto esos porcentajes se hacen más pequeños si se agregan los extraíbles a dicho total. De esta forma, si hay un 73,1% de holocelulosa, ese 73,1 es sobre un total de 100 e incluyendo los extraíbles totales sería sobre un total de 100+16,8=116,8. Luego el valor del % en base másica seca de holocelulosa sería de:

$$\frac{73,1}{116,8} \cdot 100 = 62,59\%$$

El porcentaje de lignina que se calcula de la misma forma que el valor anterior:

$$\frac{22,3}{116,8} \cdot 100 = 19,09\%$$

Dichos valores se suman al 16,8% de Extraíbles totales y al 1,2% de cenizas, dando un total de 99,68%. Se infiere que no se obtiene un 100% al sumarse las composiciones porque los valores poseen un solo decimal y por posibles errores experimentales.

De esta forma, la composición del nodo del colihue en %bms se resume en la Tabla A 2 (la celulosa forma parte de la Holocelulosa)

Tabla A 2: Composición del nodo del colihue en %bms (Adaptación [29])

Propiedades	Nodo
Extraíbles Totales (%bms)	16,8
Holocelulosa (%bms)	62,59
Lignina (%bms)	19,09
Hemicelulosa (%bms)	11,19
Celulosa (%bms)	51,4
Cenizas (%bms)	1,2

(Fuente: Adaptación de INTEC et al. [29])

A continuación se muestra la Tabla A 3 con la composición de lignina, hemicelulosa y celulosa de otras materias primas que podrían servir para producir bioetanol de segunda generación.

Tabla A 3: Composición de lignina, hemicelulosa y celulosa de distintas materias primas.

	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Residuos de Pasto	25-40	35-40	18-30
Paja de trigo	30	50	15
Pastos de crecimiento rápido	45	31,4	12
Residuos de Lengua	43	36	16

(Fuente: Adaptación de Laura Cuervo et al. [32])

11.4 Anexo 4: Rendimientos de sacarificación obtenidos utilizando el pretratamiento con ácido diluido en distintos tipos de materiales lignocelulósicos

Tabla A 4: Rendimientos de sacarificación obtenidos de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica pretratada con ácido diluido

Biomasa lignocelulósica	Condiciones de pretratamientos			Rendimiento de azúcar (g/100g)
	Temperatura (°C)	Concentración de ácido (%p/p)	Tiempo de residencia (min)	
Bambú	120-140	0,6-1,2	30-90	4,3-8,5
Paja de centeno	121	0,6-1,5	30-90	12,5-19,7
Pasto Bermuda	121	0,6-1,5	30-90	19,5-22,9
Olivo (árbol)	170-210	0,2-1,4	10	13,6-24,5
Biomasa salina	165	1,4	8	28-33

(Fuente: Adaptación de Leenakul y Tippayawong [38])

11.5 Anexo 5: Memoria de Cálculos

A continuación se detallan los cálculos realizados para obtener los resultados reportados. Adicionalmente se incluyen ejemplos de cálculo para cada operación realizada.

Una vez aplicado el ensayo Gluco-Pap, se midien en un espectrofotómetro las absorbancias arrojadas por las muestras a 500 nm. A todas las absorbancias obtenidas se les restan el promedio de 4 blancos (pocillos sin muestra) y si algún valor, una vez aplicada dicha operación, es negativo, se impone como valor nulo ya que es imposible que exista una concentración negativa de glucosa. A partir de las absorbancias medidas, se calcula la concentración de glucosa presente en el medio de reacción a través de Ecuación 8.1 habiendo antes determinado la absorbancia promedio de 4 pocillos que contienen una cantidad fija de glucosa y que son utilizados como medida estándar en dicho cálculo.

$$[Glucosa] = \frac{[Estándar] \cdot Abs. Muestra}{Abs. Estándar} \quad (Ecuación 11.1)$$

[Glucosa] corresponde a la concentración de glucosa presente en la muestra; [Estándar] corresponde a la concentración de glucosa estándar y que según el kit utilizado, es de 900 mg/l; Abs. Muestra es el valor de la absorbancia medido de la muestra; y Abs. Estándar es el valor del promedio de las absorbancias medidas en los pocillos estándares.

Ejemplo de Cálculo (Tiempo de reacción: 72 hrs. Pretratamiento: Ácido diluido al 0,5% v/v. Carga enzimática: 30 FPU/gr):

$$[Glucosa] = \frac{900 \left[\frac{mg}{l} \right] \cdot 0,27}{0,32} = 743,2 \left[\frac{mg}{l} \right]$$

De la concentración de glucosa se estima la masa de glucosa presente en cada tubo. Para eso, se multiplica el volumen de reacción por la concentración de glucosa presente en dicho volumen tal y como se muestra en la Ecuación 8.2. Cabe señalar que cada vez que se saca una muestra, el volumen de reacción disminuye y que dicha variación se considera en el cálculo de masa de glucosa presente en cada tubo.

$$Masa Glucosa = Volumen Reacción * [Glucosa] \quad (Ecuación 11.2)$$

Ejemplo de Cálculo (Tiempo de reacción: 72 hrs. Pretratamiento: COSLIF. Carga enzimática: 15 FPU/gr):

$$Masa Glucosa = 0,018 [l] \cdot 2059 \left[\frac{mg}{l} \right] = 37,1 [mg]$$

Calculada la masa de glucosa se divide dicho valor por la masa de sustrato utilizada tal y como se aprecia en la Ecuación 8.3 y se obtiene la cantidad de masa de glucosa liberada por unidad de sustrato pretratado.

$$\text{Masa Glucosa por unidad de sustrato} = \frac{\text{Masa Glucosa}}{\text{Masa Sustrato}} \quad (\text{Ecuación 11.3})$$

Ejemplo de Cálculo (Tiempo de reacción: 48 hrs. Pretratamiento: Ácido diluido al 1% v/v. Carga enzimática: 15 FPU/gr):

$$\text{Masa Glucosa por unidad de sustrato} = \frac{3,4 \text{ [mg]}}{0,2 \text{ [g]}} = 17 \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right]$$

Paralelamente se calcula la cantidad de glucosa que contiene el material utilizado a través la Ecuación 8.4. Para esos efectos, es necesario considerar la humedad del material pretratado, con lo cual se sabe la cantidad de masa seca del material que es la utilizada nominalmente en las composiciones de colihue encontradas en la bibliografía.

$$G_{\text{sustrato}} = \frac{M_{\text{sustr.}} \cdot (1 - \text{Hum}_{\text{sustr.}}) \cdot \text{Celulosa}_{\text{colihue}} \cdot PM_{\text{glu}} \cdot \text{Mono}_{\text{glu}}}{PM_{\text{celulosa}}} \quad (\text{Ecuación 11.4})$$

Ejemplo de Cálculo (1 gramo de sustrato):

$$G_{\text{sustrato}} = \frac{1 \text{ [g]} \cdot (1 - 0,056) \cdot 0,418 \cdot 180 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot 8000 \left[\frac{1}{\text{g}} \right]}{1296000 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} = 0,438 \left[\frac{\text{g}}{\text{g}} \right]$$

Los parámetros utilizados para calcular la glucosa presente en el sustrato (G_{sustrato}) son la masa del sustrato ($M_{\text{sustr.}}$), la humedad que posee el material ($\text{Hum}_{\text{sustr.}}$), la composición de celulosa que contiene el colihue ($\text{Celulosa}_{\text{colihue}}$), el peso molecular de la glucosa (PM_{glu}) que corresponde a un valor fijo de 180 g/mol, el peso molecular de la celulosa (PM_{celulosa}) que corresponde a 1.296.000 g/mol (41) y el número promedio de monómeros de glucosa que contiene la celulosa (Mono_{glu}) que corresponde a 8.000 monómeros (41).

Luego se calcula, a través de la Ecuación 8.5, el rendimiento de sacarificación utilizando el valor teórico de glucosa presente en el material.

Es importante señalar que dependiendo de la composición teórica de celulosa (de la cual se tiene cierto nivel de incertidumbre) el valor del rendimiento variará.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa Glucosa por unidad de sustrato}}{(1000 \left[\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right] \cdot G_{\text{sustrato}})} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 11.5})$$

Ejemplo de Cálculo (Tiempo de reacción: 72 hrs. Pretratamiento: Ácido diluido al 2% v/v. Carga enzimática: 30 FPU/gr):

$$\text{Rendimiento} = \frac{36,9 \left[\frac{mg}{g} \right]}{\left(1000 \left[\frac{mg}{g} \right] \cdot 0,438 \left[\frac{g}{g} \right] \right)} \cdot 100 = 8,4\%$$

Para determinar el error presente en los resultados, se utiliza la desviación estándar de los valores de las absorbancia medidas. Los valores de desviación estándar obtenidos se propagan en cada operación para finalmente ser representados gráficamente.

La propagación de la desviación estándar depende de la operación que se está realizando. Si la operación corresponde a una suma o resta como se muestra en la Ecuación 8.6, la desviación estándar del valor obtenido será la que se muestra en la Ecuación 8.7.

$$x = a + b - c \quad (\text{Ecuación 11.6})$$

$$\delta_x = \sqrt{\delta_a^2 + \delta_b^2 + \delta_c^2} \quad (\text{Ecuación 11.7})$$

Donde δ_x , δ_a , δ_b y δ_c son las desviaciones estándar del valor respectivo. Por otro lado, si la operación corresponde a una multiplicación o división como se muestra en la Ecuación 8.8, la desviación estándar corresponderá a la mostrada en la Ecuación 8.8.

$$x = \frac{a \cdot b}{c} \quad (\text{Ecuación 11.8})$$

$$\delta_x = x \cdot \sqrt{\left(\frac{\delta_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\delta_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\delta_c}{c}\right)^2} \quad (\text{Ecuación 11.9})$$

Un ejemplo de cálculo de la propagación expresada en la Ecuación 8.8 es el que se usa para calcular la desviación estándar de la absorbancia de la muestra sin blanco $\delta_{Abs.Muestra}$, (Tiempo de reacción: 72 hrs. Pretratamiento: COSLIF. Carga enzimática: 40 FPU/gr) y que se muestra en la Ecuación 8.10.

$$\begin{aligned} \delta_{Abs.Muestra} &= \sqrt{\delta_{Prom.Abs.}^2 + \delta_{Blanco}^2} \quad (\text{Ecuación 11.10}) \\ &= \sqrt{0,036^2 + 0,013^2} = 0,039 \end{aligned}$$

Donde $\delta_{Prom.Abs.}$ es la desviación estándar del promedio de las absorbancias de las muestras y δ_{Blanco} corresponde a la desviación estándar del promedio de las cuatro absorbancias medidas para determinar el valor del blanco.

Un ejemplo de cálculo de la propagación expresada en la Ecuación 8.9 es el que se usa para calcular la desviación estándar de la concentración de glucosa en la muestra $\delta_{[glucosa]}$ (Tiempo de reacción: 72 hrs. Pretratamiento: Ácido diluido al 2% v/v. Carga enzimática: 30 FPU/gr) y que se muestra en la Ecuación 8.11.

$$\begin{aligned}\delta_{[glucosa]} &= [Glucosa] \cdot \sqrt{\left(\frac{\delta_{Abs.muestra}}{Abs.Muestra}\right)^2 + \left(\frac{\delta_{Abs.Estándar}}{Abs.Estándar}\right)^2} && \text{(Ecuación 11.11)} \\ &= 1916,2 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,08}{0,68}\right)^2 + \left(\frac{0,11}{0,32}\right)^2} = 679,2\end{aligned}$$

Para calcular la cantidad de etanol potencial (Q_{etanol}) que se podría producir a partir del colihue disponible en el país, se utilizó el dato proporcionado por INTEC et al. respecto a una oferta anual sustentable de colihue de 2,46 [Mt/año] ($Q_{colihue}$). Multiplicando dicho valor por los rendimientos de las etapas de sacarificación ($Rend_{Sacarif}$), fermentación ($Rend_{Ferm}$) y destilación ($Rend_{Dest}$), se obtiene la cantidad de etanol potencial tal y como se muestra en la Ecuación 8.12. Cabe señalar que el rendimiento de la fermentación se calcula a partir de la cantidad teórica máxima que se puede obtener de etanol a partir de 1 gramo de glucosa ($Conv_{glu-et}$), es decir, 0,51 gramos de etanol el cual tiene una densidad de 0,789 [kg/l] (ρ_{etOH}).

$$Q_{etanol} = \frac{Q_{colihue} \cdot Rend_{Sacarif} \cdot Rend_{Ferm} \cdot Conv_{glu-et} \cdot Rend_{Dest}}{\rho_{etOH}} \quad \text{(Ecuación 11.12)}$$

Ejemplo de Cálculo (Pretratamiento: COSLIF. Carga enzimática: 15 FPU/gr)

$$= \frac{2460000000 \left[\frac{kg}{año}\right] \cdot 0,442 \cdot 0,89 \cdot 0,51 \left[\frac{g \text{ etanol}}{g \text{ glucosa}}\right] \cdot 0,98}{0,789 \left[\frac{kg}{l}\right]} = 623.321.966 \left[\frac{l}{año}\right]$$

Para estimar un precio de compra de colihue por kilogramo, se utilizaron los datos proporcionados por INTEC et al., quienes estiman un promedio de biomasa seca ($\overline{Biomasa}_{seca}$) de 147,3 [ton/ha] y una cantidad de cañas por hectárea ($\overline{Cañas}$) de 160.000 mil [cañas/ha]. De esta forma se obtiene el peso de cada caña ($M_{caña}$) tal y como se aprecia en la Ecuación 8.13.

$$M_{caña} = \frac{\overline{Biomasa}_{seca}}{\overline{Cañas}} = \frac{147,3 \left[\frac{ton}{ha}\right]}{160.000 \left[\frac{cañas}{ha}\right]} \cdot 1000 \left[\frac{kg}{ton}\right] = 0,92 \left[\frac{kg}{caña}\right] \quad \text{(Ecuación 11.13)}$$

De esta forma se puede estimar un valor comercial de colihue por unidad másica ya que se sabe que en promedio una caña se vende a US\$ 0,002. Así, el precio de compra de la principal materia prima se desprende de la Ecuación 8.14.

$$Precio \text{ kg}_{colihue} = \frac{Precio_{caña}}{M_{caña}} = \frac{0,002 \left[\frac{US\$}{caña}\right]}{0,92 \left[\frac{kg}{caña}\right]} = 0,0217 \left[\frac{US\$}{kg}\right] \quad \text{(Ecuación 11.14)}$$

Asumiendo un precio de dólar de 484,7⁴ se tiene un precio de \$0,00004 $\left[\frac{US\$}{kg}\right]$ para el colihue.

Para el cálculo de las utilidades también se tuvo que estimar el precio de venta del producto. Así, se fija el precio del etanol de tal forma que sea un 60% del valor promedio de la gasolina ($\overline{P_{gasolina}}$) sin considerar el IVA. En la Ecuación 8.15 se observa dicho cálculo.

$$P_{etanol} = \frac{0,6 \cdot \overline{P_{gasolina}} \cdot (1 - IVA)}{\rho_{etOH}} \quad (Ecuación 11.15)$$
$$= \frac{0,6 \cdot 759,5 \left[\frac{pesos}{l}\right] \cdot (1 - 0,19)}{0,789 \left[\frac{kg}{l}\right]} = 381,01 \left[\frac{pesos}{kg}\right]$$

Las utilidades se calculan restando los ingresos con los costos, siendo los ingresos la multiplicación del precio del etanol (P_{etanol}) por la cantidad potencial de etanol producida (Q_{etanol}) y los costos la sumatoria de la cantidad de materia prima utilizada por el precio de cada una de ellas.

⁴ El valor del dólar en pesos chilenos corresponde al fijado por el Banco Central para el día 30 de Abril del 2012 (57)

11.6 Anexo 6: Materiales y Montajes experimentales

A continuación se muestran imágenes del material utilizado, de los montajes experimentales realizados y de alguno de los equipos necesarios para la producción de etanol a partir de *Chusquea culeou*



Figura A 2: *Chusquea culeou* antes de ser pretratada. (a) A la izquierda se muestra el material sin triturar y a la derecha se muestra el material triturado sin tamizar. (b) Se muestra el material tamizado.



Figura A 3: Máquina astilladora proporcionada por la Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile.



Figura A 4: Montaje de los pretratamientos. (a) Recipiente utilizado como autoclave para pretratar con ácido diluido las muestras a 120°C. (b) Baño de agua utilizado para pretratar por COSLIF las muestras a 50°C.



Figura A 5: Ensayo para determinar la humedad del material. Las muestras fueron ubicadas en una estufa a 65°C hasta que ya no perdían masa.

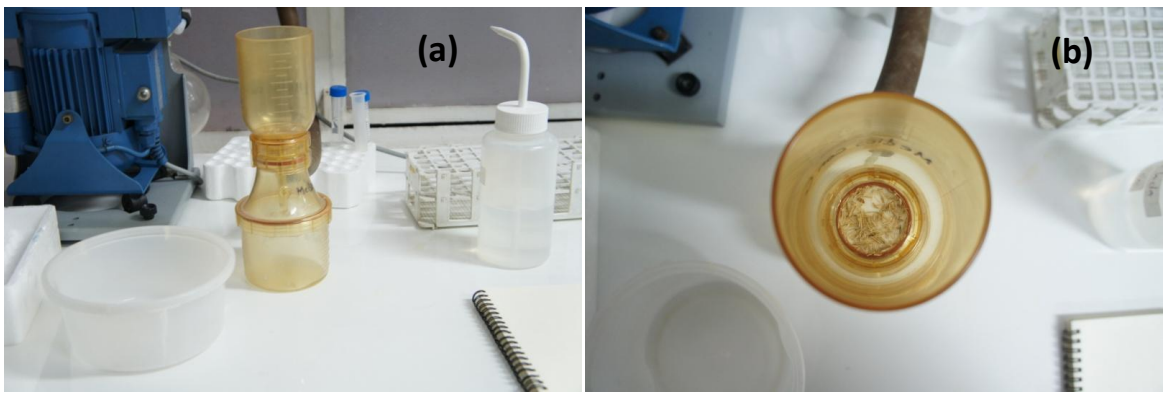


Figura A 6: Sistema de filtración para preparar el material para la sacarificación. (a) Se aprecia la bomba conectada al filtro de vacío. (b) Material filtrándose.



Figura A 7: (a) Rotor utilizado para centrifugar las muestras tomadas. (b) Agitador rotatorio utilizado en la reacción de sacarificación. Condiciones de operación: 250 RPM, 50°C por 72 horas.

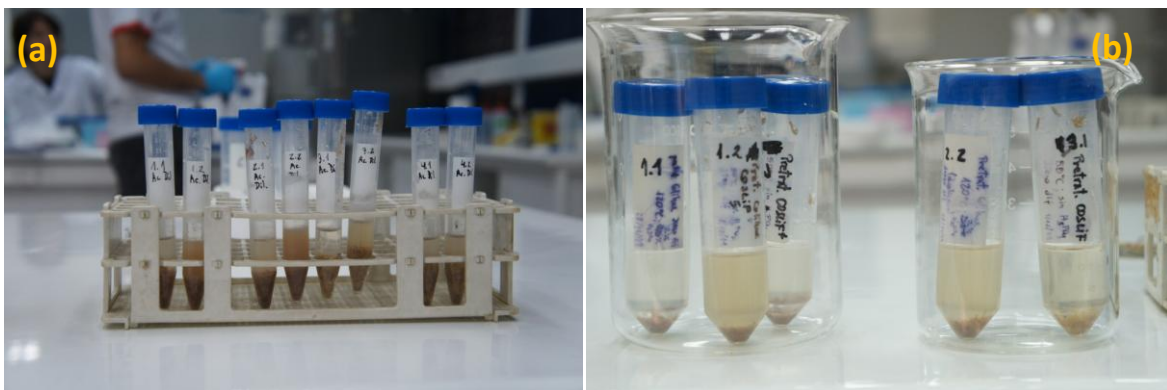


Figura A 8: Diferencias de concentración después de sacarificar distintas muestras. (a) Muestras pretratadas con ácido diluido. (b) Muestras pretratadas mediante COSLIF. Se observó una mayor turbiedad en las muestras que posteriormente contenían mayor concentración de glucosa.

11.7 Anexo 7: Niveles de sacarificación y rendimientos obtenidos con pretratamiento con ácido diluido y COSLIF.

A continuación se muestran, en las Tablas A 5 y A 6, los niveles de sacarificación y los rendimientos obtenidos para cada condición de pretratamiento e hidrólisis enzimática ensayada.

Tabla A 5: Niveles de liberación de glucosa y rendimientos de sacarificación del colihue pretratado con ácido sulfúrico diluido. El nivel máximo teórico de glucosa por unidad de sustrato es de 438 mg/g.

Condiciones		Glucosa por unidad de sustrato [mg/g]	Rendimiento [%]
1	Ác. Sulf. 0,5% v/v; 0 FPU/gr	0,0	0,0%
2	Ác. Sulf. 0,5% v/v; 1 FPU/gr	5,3	1,2%
3	Ác. Sulf. 0,5% v/v; 15 FPU/gr	12,1	2,8%
4	Ác. Sulf. 0,5% v/v; 30 FPU/gr	14,3	3,3%
5	Ác. Sulf. 1% v/v; 0 FPU/gr	0,9	0,2%
6	Ác. Sulf. 1% v/v; 1 FPU/gr	9,8	2,2%
7	Ác. Sulf. 1% v/v; 15 FPU/gr	19,8	4,5%
8	Ác. Sulf. 1% v/v; 30 FPU/gr	25,1	5,7%
9	Ác. Sulf. 2% v/v; 0 FPU/gr	0,5	0,1%
10	Ác. Sulf. 2% v/v; 1 FPU/gr	10,9	2,5%
11	Ác. Sulf. 2% v/v; 15 FPU/gr	29,1	6,6%
12	Ác. Sulf. 2% v/v; 30 FPU/gr	36,9	8,4%
13	Ác. Sulf. 0% v/v; 0 FPU/gr	0,0	0,0%
14	Ác. Sulf. 0% v/v; 15 FPU/gr	3,8	0,9%
15	Ác. Sulf. 2% v/v; 30 FPU/gr (30 CBU/gr)	44,8	10,2%

Tabla A 6: Niveles de liberación de glucosa y rendimientos de sacarificación del colihue pretratado por COSLIF. El nivel máximo teórico de glucosa por unidad de sustrato es 438 mg/g

Condiciones		Glucosa por unidad de sustrato [mg/g]	Rendimiento [%]
1	Ác. Fosf. 85% v/v; 0 FPU/gr	9,6	2,2%
2	Ác. Fosf. 85% v/v; 15 FPU/gr	193,6	44,2%
3	Ác. Fosf. 85% v/v; 30 FPU/gr	223,3	51,0%
4	Ác. Fosf. 85% v/v; 40 FPU/gr	193,1	44,1%
5	Ác. Fosf. 0% v/v; 0 FPU/gr	9,5	2,2%
6	Ác. Fosf. 0% v/v; 15FPU/gr	2,6	0,6%