



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y**  
**CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE LA MADERA**

---

**RENDIMIENTO DE AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DE**  
*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser **SOMETIDO A UN**  
**PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO PARA LA PRODUCCIÓN DE**  
**ETANOL.**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniera de la Madera

**CONSUELO ZENAIDA FRITZ FUENTES**

Profesores Guía: Sr. René Carmona Cerda. Ingeniero Forestal  
M.Sc. en Ciencias Forestales  
Sra. María Elena Lienqueo. Ingeniero Civil Químico  
Dra. en Ingeniería Química

---

**Santiago, Chile**

**2009**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y**  
**CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE LA MADERA**

**RENDIMIENTO DE AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DE**  
*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser **SOMETIDO A UN**  
**PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO PARA LA PRODUCCIÓN DE**  
**ETANOL.**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniera de la Madera

**CONSUELO ZENAIDA FRITZ FUENTES**

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Sr. René Carmona Cerda	<b>7,0</b>	_____
Prof. Guía Sra. María Elena Lienqueo Contreras	<b>6,5</b>	_____
Prof. Consejero Sr. Ricardo Silva Soto	<b>6,9</b>	_____
Prof. Consejera Sra. Rose Marie Garay Moena	<b>7,0</b>	_____

*AL AMOR DE MI VIDA,*

*A MI FAMILIA Y*

*A MÍ*

## AGRADECIMIENTOS

Comenzaré agradeciendo el apoyo del proyecto Domeyko-Energía, Optimización del proceso de tratamiento de lignocelulosas con miras a la obtención de bioetanol, a través de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, por otorgar el financiamiento necesario para la realización del presente estudio. También agradezco la colaboración recibida por parte del proyecto Finlandia (CCF05).

Agradezco a mis profesores guías, profe María Elena Lienqueo y profe René Carmona, por haberme acogido, por sus enseñanzas, por la paciencia, por la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo de investigación y por la eficiencia y prontitud en las correcciones de esta memoria de título.

Agradezco también a mis profesores consejeros, profe Rose Marie Garay y profe Ricardo Silva, por sus recomendaciones y reparos, por la paciencia de atenderme cada vez que requerí de su ayuda y por la rapidez en las correcciones de este trabajo.

El apoyo brindado por mi familia ha sido fundamental no sólo en la realización de esta memoria, sino que durante toda mi formación personal y profesional. Agradezco el esfuerzo y las múltiples muestras de preocupación y ánimo en este camino. Gracias mamá por darme el empujoncito para elegir una carrera que me hace feliz. Gracias a mis hermanas por todo el cariño y alegría. No puedo dejar de agradecer a mis tíos, tías, abuelos, y primos por formar parte de mí.

También agradezco a los amigos y compañeros, con quienes compartí la vida estudiantil.

Lo mejor siempre se deja para el final, así que agradezco todo, pero todo el apoyo de mi motor, el hombre que me ha sabido entender, comprender y ha tenido la paciencia suficiente durante esta etapa de nuestras vidas, Miguel. Sé que juntos lograremos cumplir todos nuestros sueños y todas nuestras metas. Te amo. Gracias por todo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
<b>RESUMEN</b> _____	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> _____	<b>ii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> _____	<b>1</b>
<b>1.1. Situación mundial del bioetanol.</b> _____	<b>1</b>
<b>1.2. Situación bioetanol en Chile.</b> _____	<b>2</b>
<b>1.3. Recurso forestal chileno.</b> _____	<b>2</b>
<b>1.4. Bioetanol y métodos de obtención.</b> _____	<b>3</b>
<b>1.5. Objetivos del estudio</b> _____	<b>7</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODO</b> _____	<b>8</b>
<b>2.1. Materiales</b> _____	<b>8</b>
2.1.1. Madera. _____	8
2.1.2. Hongos para el pretratamiento. _____	8
2.1.3. Celulasas. _____	8
2.1.4. Reactivos. _____	9
2.1.5. Equipos y materiales de laboratorio. _____	9
<b>2.2. Método</b> _____	<b>10</b>
2.2.1. Reproducción de los HPB. _____	11
2.2.2. Pretratamiento biológico. _____	12
2.2.3. Determinación de la pérdida de peso. _____	13
2.2.4. Medición de la actividad enzimática. _____	13
2.2.5. Hidrólisis enzimática. _____	14
2.2.6. Medición de azúcares reductores. _____	14
2.2.7. Medición de glucosa. _____	15
2.2.8. Estimación de los residuos de lenga. _____	16
2.2.9. Estimación de la cantidad teórica de bioetanol factible de producir. _____	16
2.2.10. Análisis estadístico. _____	17
<b>3. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> _____	<b>19</b>
<b>3.1. Pretratamiento biológico.</b> _____	<b>19</b>
<b>3.2. Hidrólisis enzimática.</b> _____	<b>21</b>
3.2.1. Azúcares reductores. _____	21
3.2.2. Glucosa. _____	24
<b>3.3. Estimación de la disponibilidad de residuos de lenga.</b> _____	<b>28</b>
<b>3.4. Estimación de la producción de bioetanol.</b> _____	<b>31</b>
<b>4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> _____	<b>32</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> _____	<b>38</b>

<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>39</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO I.</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO II.</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO III.</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO IV.</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO V.</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO VI.</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO VII.</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO VIII.</b>	<b>56</b>
<b>APÉNDICE I</b>	<b>57</b>
<b>APÉNDICE II</b>	<b>58</b>
<b>APÉNDICE III</b>	<b>59</b>
<b>APÉNDICE IV</b>	<b>64</b>

## INDICE DE CUADROS

Página

<b>Cuadro 1.</b> Equipos y materiales de laboratorio utilizados en el pretratamiento fúngico. _	9
<b>Cuadro 2.</b> Equipos y materiales de laboratorio utilizados en la hidrólisis enzimática. __	10
<b>Cuadro 3.</b> Equipos y materiales de laboratorio utilizados en la medición de azúcares reductores y glucosa. _____	10
<b>Cuadro 4.</b> Azúcares reductores, expresados en g/L o g/100g, obtenidos luego de la hidrólisis enzimática para cada cepa según el tiempo de ataque y la muestra control. _____	22
<b>Cuadro 5.</b> Glucosa, expresada en g/L o g/100g, obtenida luego de la hidrólisis enzimática para cada cepa según el tiempo de ataque y el control. _____	25
<b>Cuadro 6.</b> Potencialidad de residuos del bosque chileno de lenga para la producción de bioetanol. _____	29
<b>Cuadro 7.</b> Producción y residuos de lenga en el año 2007. _____	30
<b>Cuadro 8.</b> Estimación teórica de la producción de bioetanol a partir de residuos de lenga pretratados con <i>Ganoderma</i> sp durante 60 días. _____	31
<b>Cuadro 9.</b> Tabla ANDEVA para pérdida de peso. _____	59
<b>Cuadro 10.</b> Tabla ANDEVA simple para pérdida de peso según <i>Stereum</i> sp. _____	59
<b>Cuadro 11.</b> Tabla ANDEVA simple para pérdida de peso según <i>Ganoderma</i> sp. _____	59
<b>Cuadro 12.</b> Tabla ANDEVA simple para pérdida de peso según <i>Aurantioporus</i> sp. _____	60
<b>Cuadro 13.</b> Tabla ANDEVA para azúcares reductores. _____	60
<b>Cuadro 14.</b> Tabla ANDEVA para glucosa. _____	60
<b>Cuadro 15.</b> Comparación de medias para pérdida de peso según hongo _____	61
<b>Cuadro 16.</b> Comparación de medias para pérdida de peso según tiempo. _____	61
<b>Cuadro 17.</b> Comparación de medias para azúcares reductores según hongo. _____	61
<b>Cuadro 18.</b> Comparación de medias para glucosa según hongo. _____	62
<b>Cuadro 19.</b> Comparación de medias para glucosa según tiempo. _____	62
<b>Cuadro 20.</b> Pérdida de peso obtenida con <i>Stereum hirsutum</i> . _____	64
<b>Cuadro 21.</b> Pérdida de peso obtenida con <i>Ganoderma applanatum</i> . _____	64
<b>Cuadro 22.</b> Pérdida de peso obtenida con <i>Aurantioporus albidus</i> . _____	64
<b>Cuadro 23.</b> Pérdida de peso registrada para las muestras testigo _____	64
<b>Cuadro 24.</b> Azúcares reductores obtenidos con <i>Stereum hirsutum</i> . _____	65
<b>Cuadro 25.</b> Azúcares reductores obtenidos con <i>Ganoderma applanatum</i> . _____	65
<b>Cuadro 26.</b> Azúcares reductores obtenidos con <i>Aurantioporus albidus</i> . _____	65

<b>Cuadro 27.</b> Azúcares reductores obtenidos por las muestras testigo. _____	65
<b>Cuadro 28.</b> Glucosa obtenida con <i>Stereum hirsutum</i> . _____	65
<b>Cuadro 29.</b> Glucosa obtenida con <i>Ganoderma applanatum</i> . _____	66
<b>Cuadro 30.</b> Glucosa obtenida con <i>Aurantioporus albidus</i> . _____	66
<b>Cuadro 31.</b> Glucosa obtenida por las muestras testigo. _____	66

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Representación secuencial de las etapas del estudio. _____	11
<b>Figura 2.</b> Pérdidas de peso obtenidas durante el pretratamiento para los tres hongos en estudio. _____	19
<b>Figura 3.</b> Concentración de azúcares reductores, expresados en g/L, obtenidos de la hidrólisis enzimática luego del pretratamiento biológico. _____	23
<b>Figura 4.</b> Concentración de glucosa, expresada en g/L o g/100g obtenida de la hidrólisis enzimática luego del pretratamiento biológico. _____	26
<b>Figura 5.</b> Participación de glucosa obtenida sobre del total de azúcares reductores. ____	27
<b>Figura 6.</b> Esquema del mecanismo de acción de los diferentes tipos de actividad de las celulasas. _____	47
<b>Figura 7.</b> Curva determinación actividad enzimática para Celluclast® 1,5L. _____	57
<b>Figura 8.</b> Curva determinación de actividad enzimática para Novozyme® 188 _____	57
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración de DNS para la determinación de azúcares reductores. _____	58
<b>Figura 10.</b> Gráfico de interacción para pérdida de peso. _____	62
<b>Figura 11.</b> Gráfico de residuos para Pérdida de peso. _____	63
<b>Figura 12.</b> Gráfico de residuos para Azúcares reductores. _____	63
<b>Figura 13.</b> Gráfico de residuos para Glucosa. _____	63

# RENDIMIENTO DE AZÚCARES REDUCTORES A PARTIR DE *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser SOMETIDO A UN PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.

## RESUMEN

Los bosques de lenga, *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser, en general, son considerados sobremaduros, debido a la gran cantidad de árboles en fase de desmoronamiento y envejecimiento, obteniéndose rendimientos bajos en los procesos de industrialización. Los residuos representan una importante y posible fuente de biomasa para la generación de biocombustibles.

Los residuos de lenga obtenidos de la empresa Forestal Rusffin, que corresponden a desechos provenientes del proceso de manufactura, fueron sometidos a un pretratamiento biológico con tres hongos de pudrición blanca (HPB), *Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus* y durante tres tiempos de ataque: 30, 45 y 60 días.

Las partículas de madera se adecuaron a un tamaño denominado “pin-chips”, con dimensiones aproximadas de 1 mm de espesor, 1 a 3 mm de ancho y 5 mm de largo, posteriormente fueron sometidos a la acción fúngica. Las cepas se incubaron previamente en granos de trigo y luego fueron inoculadas en los “pin-chips” de lenga, permaneciendo en una cámara de incubación a 25° C según los tres tiempos de ataque.

Se evaluó la pérdida de peso causada por los hongos y la cantidad de azúcares reductores y glucosa obtenidos luego de la hidrólisis enzimática a partir de estos residuos pretratados.

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

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

El tratamiento que permite obtener la mayor cantidad de glucosa corresponde al pretratar los residuos de lenga con el hongo *Ganoderma applanatum* durante 60 días, obteniéndose un 12% de rendimiento de glucosa, con una pérdida de peso de 28,18%. Teóricamente se obtienen 78 litros de bioetanol por cada tonelada seca de residuos de lenga. Considerando los desechos obtenidos de la producción de madera aserrada de lenga del año 2007, podrían producirse 19,8 millones de litros de etanol equivalentes a un 33% y 13% del porcentaje de gasolina que debe ser sustituido en Chile, 2% y 5%, respectivamente.

**Palabras claves:** *Nothofagus pumilio*, hongos pudrición blanca, pretratamiento biológico, bioetanol, hidrólisis enzimática.

**REDUCING SUGARS YIELDS FROM *Nothofagus pumilio*, (Poepp. et Endl.)  
Krasser SUBJECTED TO A BIOLOGICAL PRETREATMENT FOR  
BIOETHANOL PRODUCTION.**

**ABSTRACT**

In general terms Lenga forests (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser are regarded as overmature, which are due to the high proportion of trees under decay and aging. This implies low yields of wood for the industry. The residues are a major source of biomass for biofuel.

Lignocellulosic residues from the company Forestal Russfin which were generated during the industrial processing of Lenga, are subjected to a biological pretreatment with three white rot fungi (WRF), belonging to the genus *Stereum*, *Ganoderma* and *Aurantioporus* for 30, 45 and 60 days.

The wood particles (called pin chips) were milled to reach 1 mm thick, 1 to 3 mm wide and 5 mm long and then they were subjected to fungal action. The strains were previously incubated in wheat grains and then inoculated in the Lenga "pin-chips". Incubation was conducted at 25° C.

Weight losses provoked by fungi and reducing sugars and released glucose after enzymatic hydrolysis were determined on pretreated samples.

During the hydrolysis or enzymatic saccharification, commercial enzymatic complexes were used (Celluclast ® 1.5 L and Novozym ® 188) in acetate buffer pH 5. Saccharification was conducted in an orbital shaker working at 250 rpm during 48 hours. Enzymatic charge was 25 FPIU/g and the substrate concentration was 10% (w/v)

Results indicate that weight losses, reducing sugars contents and released glucose levels are bigger as incubation time is longer. However, a bigger weight loss does not necessarily involve a greater amount of reducing sugars.

The highest glucose levels were observed for Lenga pin chips treated with *Ganoderma* sp at 60 days, reaching 12% and a weight loss of 28.18%. It implies a theoretical yield of 78 liters of bioethanol per ton of pretreated material (dry basis). If the total volume of residues generated by Lenga wood production for 2007 was used for ethanol production, 19.5 million gallons of ethanol could be generated, which means 33% and 13% the percentage of gasoline that must be replaced in Chile, 2% and 5% respectively.

**Keywords:** *Nothofagus pumilio*, white rot fungi, biological pretreatment, bioethanol, enzymatic hydrolysis.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Situación mundial del bioetanol.

La matriz energética mundial depende fundamentalmente de combustibles fósiles no renovables, lo que ha derivado en un escenario actual de inestabilidad energética y problemas medioambientales. Según datos de la Agencia Internacional de Energía (AIE) (FAO, 2008), más del 80% del consumo mundial de energía primaria se basa en este tipo de combustibles, que incluyen al petróleo (35%), al carbón vegetal (25%) y al gas (21%).

Por otra parte, se estima que la demanda mundial por energía crezca en forma sostenida durante los próximos 25 años, alcanzando hacia el 2030 un aumento del 50%. El 65% del aumento esperado en la demanda energética corresponde a los países en desarrollo, en los cuales el crecimiento económico y de la población es mayor (Almada, 2006).

Por tales motivos, los diferentes gobiernos están tomando decisiones importantes tendientes a encontrar fuentes de energía renovables más amigables con el medioambiente, y que, a su vez, sean más eficientes y menos costosas.

Dentro de las fuentes de energías renovables que satisfacen parte de la demanda mundial por energía primaria está la biomasa, que actualmente aporta un 10% a la matriz energética mundial (FAO, 2008). La biomasa representa un potencial prácticamente inagotable, obteniendo de ella Energías Renovables No Convencionales (ERNC), particularmente biocombustibles.

Los biocombustibles se dividen en los denominados biocombustibles sólidos, principalmente la leña, pellets y briquetas, los líquidos como el bioetanol y biodiésel, cuya importancia radica principalmente en el sector transporte, y los gaseosos, como el biogás.

En la actualidad el bioetanol es, con mucha diferencia, el biocombustible más utilizado. En el año 2007 se produjeron 52 mil millones de litros de bioetanol para combustible, equivalentes a un 1,25% del total de petróleo producido según cifras de la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP, 2007). Estados Unidos fue el mayor productor de ese año con un 51% del total; en segundo lugar Brasil con un 37%; le siguen la Unión Europea y China. En cambio, la producción de biodiésel en el 2007 fue de 10,2 mil millones de litros. La Unión Europea ocupó el primer lugar con un 60%, seguida por EE.UU. con un 17%, mientras que Brasil produjo 2,2% (FAO, 2008).

Por otra parte, Brasil es el mayor productor y consumidor de bioetanol de primera generación a partir de caña de azúcar, mientras que Estados Unidos es el mayor productor de bioetanol, pero a partir de cultivos de maíz. En cuanto al biodiésel, ambos países lo producen a partir de cultivos de soja.

Los motores de los automóviles actuales aceptan hasta un 10% de bioetanol, denominado comercialmente como E-10, sin tener que ser modificados, mientras que la combinación con un 85% de bioetanol (E-85) se utiliza en los vehículos denominados de combustible

flexible (FFV), los cuales están diseñados especialmente para utilizar tal porcentaje de este biocombustible (Knoll *et al.*, 2009).

## **1.2. Situación bioetanol en Chile.**

Chile tiene una alta dependencia de fuentes de energía importadas: un 75% de la matriz energética corresponde a combustibles líquidos, de los cuales un 98% se genera a partir de petróleo importado (ODEPA, 2007). Durante el año 2007, el sector transporte consumió un 36% del petróleo destinado a combustible (CNE, 2008).

Para mantener la tasa de crecimiento económico y productivo del país, Chile debe contar con una matriz energética segura, diversificada e independiente, en lo posible, de importaciones de alto riesgo (ODEPA, 2007).

El actual gobierno está impulsando un ambicioso proyecto denominado Plan de Seguridad Energética (PSE), mediante tres líneas de acción: diversificar la matriz (en términos de insumos y proveedores), lograr una mayor independencia y autonomía y promover el uso eficiente e inteligente de la energía en favor de las ERNC. Según estimaciones de la Comisión Nacional de Energía (CNE, 2008), se espera que para el año 2014 las importaciones de gasolina se reduzcan en una cifra cercana al 100%, disminuyendo las emisiones de CO<sub>2</sub> para el sector transporte (Poniachik, 2006). Si estas emisiones no se reducen, Chile se expone a sanciones y barreras comerciales e impuestos asociados, que afectarían a las exportaciones nacionales (Estrategia, 2009).

El 9 de mayo de 2008 se publicó, en el diario oficial, que Chile autoriza el uso de 2% o 5% de bioetanol mezclado con gasolina y biodiésel mezclado con diésel, quedando ambos biocombustibles libres del impuesto específico que afecta a los combustibles convencionales y considerando tanto a los nacionales como a los importados (CNE, 2008).

## **1.3. Recurso forestal chileno.**

En el país existe un recurso forestal compuesto por 2,3 millones de hectáreas (ha) de plantaciones, primordialmente pino radiata y eucaliptos, cuyo uso se concentra principalmente en la demanda industrial proveniente de las grandes empresas forestales. Además, la superficie de bosque nativo abarca 13,6 millones de ha (INFOR, 2008a), recurso que tiene un bajo aprovechamiento industrial, siendo su principal uso como leña cuyo consumo actual es de 14 millones de m<sup>3</sup> (Anexo IX). Al ser un recurso renovable subutilizado y con alto potencial, se podría manejar en forma sustentable para ser aprovechado en la generación de bioenergía.

Un caso particular lo representa el tipo forestal lenga, *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser, que ocupa una superficie de 3.594.051 ha, lo que equivale al 26,5% del total de bosque nativo, siendo el segundo más abundante en Chile (INFOR, 2008a). Se extiende desde la VII región, por la Cordillera de Los Andes, hasta la XII región.

La lenga corresponde a una especie nativa cuyos bosques son manejados silviculturalmente mediante cortas sucesivas, con regeneración natural bajo dosel de protección o cortas de protección, método aplicado desde 1992 (Schmidt *et al.*, 2003). El método silvicultural

permite mejorar rendimientos y disminuir los períodos de rotación (Schmidt *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2007).

En general, los bosques de lenga son considerados sobremaduros, principalmente debido a la alta proporción de árboles en fase de envejecimiento y desmoronamiento, lo que aumenta la vulnerabilidad a fenómenos patológicos que provocan una disminución importante en el rendimiento de madera sana (Schmidt *et al.*, 1992).

Es importante destacar que, en términos generales, existe una tendencia a cosechar un alto porcentaje de los árboles cuyo diámetro a la altura del pecho (DAP), se encuentre entre las clases 40 y 70 cm (Donoso y Caldentey, 1996) aumentando aún más el volumen considerado como desecho.

En cuanto al uso, actualmente el único producto primario obtenido de la lenga corresponde a madera aserrada, ya que desde el año 2003 no se reporta la producción de astillas para esta especie (INFOR, 2008a), por lo tanto, se esperaría una mayor disponibilidad de residuos tanto industriales como aquellos provenientes del bosque.

En términos de rendimientos, se estima que se extrae del bosque entre el 10% y el 30% como volumen aserrable. Posteriormente, en el aserradero el factor de conversión no supera el 30%; de este rendimiento, del 20% al 30% corresponde a calidad exportable, equivalente al 1%-2% de las existencias totales del bosque (Schmidt *et al.*, 1992). Este bajo aprovechamiento implica obtener grandes cantidades de desechos, que no se están utilizando en ningún proceso productivo. Por lo tanto, es factible emplear estos residuos en la generación de biocombustibles de segunda generación, como una alternativa posible entre otras.

#### **1.4. Bioetanol y métodos de obtención.**

El bioetanol corresponde a un combustible incoloro, volátil y con olor característico suave, obtenido por la fermentación de los azúcares presentes en la materia prima y posterior recuperación mediante destilación. Es posible utilizarlo en los combustibles para el transporte de tres maneras: como aditivo en las gasolinas en reemplazo de otros aditivos oxigenantes; como componente en la fabricación de etil ter-butil éter (ETBE), o directamente como combustible, mezclado en cualquier proporción con gasolina. De esta manera, se aprovecha su característica oxigenante y antidetonante (menos inflamable que la gasolina), con el consiguiente aumento en el número de octanos (alrededor de 106), mejorando así la calidad de las emisiones de la combustión (Armijo, 2006). Se estima que al utilizar sólo bioetanol de primera generación, los gases de efecto invernadero se reducen entre un 40% y 80% respecto de los combustibles fósiles (Acevedo, 2006), mientras que al agregar un 10% a la gasolina, las emisiones de CO se reducen hasta 30% y las de CO<sub>2</sub> entre 6% y 10% (Armijo, 2006).

Según la materia prima y el grado de elaboración o tecnologías empleadas en la producción de estos biocombustibles líquidos, se utiliza el término bioetanol de primera y de segunda generación. El bioetanol de primera generación es aquel en el que se utilizan materias primas ricas en azúcares fáciles de fermentar, como los granos de maíz y trigo, la caña de azúcar y la remolacha (para el caso del bioetanol), y cultivos de semillas oleaginosas (para

el caso del biodiésel). En el bioetanol de segunda generación se utiliza material lignocelulósico, como residuos agrícolas o forestales, en donde los azúcares componen una estructura más compleja, la celulosa, por lo que se debe realizar un pretratamiento para acceder con mayor facilidad a ellos y así poder fermentarlos. La tecnología para esta última generación se encuentra en fase de desarrollo a nivel mundial, y sólo en EE.UU. existen más de una decena de empresas que ya comenzaron las demostraciones en sus plantas piloto, muchas de las cuales esperan comenzar a producir y comercializar bioetanol de segunda generación hacia el año 2011-2012 (Renewable Energy World, 2008).

La mayor desventaja que presenta el bioetanol de primera generación es que compite con los cultivos destinados a la alimentación. El rápido aumento de la demanda de materias primas para la producción de estos biocombustibles ha contribuido al alza de los precios de los alimentos, lo que representa una amenaza directa para la seguridad alimentaria de las personas, tanto en las zonas urbanas como en las rurales (FAO, 2008).

Dado que la biomasa celulósica es el material orgánico que más abunda en la tierra, el éxito en el desarrollo de los biocombustibles de segunda generación comercialmente viables, elaborados a partir de celulosa, hace posible aumentar el rendimiento de las materias primas, permitiendo aprovechar toda la celulosa y no únicamente el azúcar, almidón o aceite. De esta manera, es posible aprovechar una mayor parte de un cultivo existente, maximizando su rendimiento por hectárea y minimizando, al mismo tiempo, la necesidad de expandir las áreas cultivadas o de usar cultivos alimenticios para producir biocombustibles (Hackenberg, 2008).

Por otra parte, el bioetanol de segunda generación ofrece mayores ventajas en lo que respecta a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero. La mayoría de los estudios pronostican que los combustibles avanzados que en un futuro se produzcan a partir de cultivos perennes, residuos leñosos y agrícolas, podrían reducir significativamente el ciclo de vida de las emisiones de gases de efecto invernadero, en comparación con los combustibles derivados del petróleo y los biocombustibles de primera generación (FAO, 2008).

Un estudio realizado por Spitzer y Jungemeier (2006), concluye que el bioetanol de segunda generación produce 32 g de CO<sub>2</sub>/Km recorrido, lo que se traduce en una reducción de 81,76% comparado con la gasolina (ver Anexo I).

En la utilización de biomasa como materia prima para la producción de biocombustibles, específicamente bioetanol, se ha estimado una relación de entrada/salida de energía de 6, esto indica una alta relación entre la energía liberada durante la combustión de alcohol y la energía necesaria para su producción, considerando todo el ciclo de vida del producto desde la extracción de las materias primas y los insumos requeridos, pasando por su transporte, hasta el proceso de transformación a bioetanol; mientras que a partir de almidón es de 1,1-1,2 y para caña de azúcar es de 8. Esto hace atractivos a los residuos lignocelulósicos, sobretodo en países que no cuentan con la facilidad de producir grandes cantidades de caña de azúcar (Sánchez y Cardona, 2005).

Las etapas claves en la producción de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos son el pretratamiento y la hidrólisis de la materia prima, lográndose así un mayor y más fácil acceso a los azúcares que luego serán fermentados.

El pretratamiento es considerado una etapa fundamental e imprescindible, ya que permite aumentar los rendimientos en la hidrólisis posterior, de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad, se disocie el complejo lignina-celulosa y se aumente el contenido de celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático (Negro, 1991). Además, un pretratamiento eficaz debe reunir otras características, tales como bajo consumo energético, bajos costos de inversión, utilización de reactivos económicos y fácilmente recuperables y debe ser aplicable a diversos sustratos (Oliva, 2003). Se distinguen cuatro pretratamientos, que se clasifican según su naturaleza en físicos, químicos, físico-químicos y biológicos.

El pretratamiento biológico, utilizado en este estudio, consiste en someter el material lignocelulósico al ataque de microorganismos degradadores de lignina y poliosas, aunque algunos de estos también poseen actividad celulolítica. Se utilizan hongos degradadores de lignocelulosas, pudiéndose distinguir entre estos a los hongos de pudrición café o parda (HPC), como aquellos que atacan preferentemente la celulosa, y a los hongos de pudrición blanca (HPB), que tienen preferencia por la lignina antes que por la celulosa. Estos últimos se han mostrado más efectivos en el tratamiento de materiales lignocelulósicos (Oliva, 2003 y Martínez *et al.*, 2005), ya que, algunos poseen patrones de selectividad en la degradación (Blanchette, 1991; Kirk y Cullen, 1998 y Martínez *et al.*, 2005). La selectividad hace referencia a que estos hongos degradan preferentemente la lignina y la hemicelulosa, y finalmente la celulosa; mientras que existen otros que degradan simultáneamente todos los componentes estructurales de la célula.

Las ventajas del pretratamiento biológico respecto de los otros tres tipos mencionados previamente son el bajo requerimiento energético, no necesita instalaciones ni equipo costoso y las condiciones ambientales en las que se produce el proceso, las cuales son amigables con el ambiente al no utilizar procesos ácidos. Como inconveniente debe citarse que la tasa de hidrólisis en la etapa siguiente es muy baja (Oliva, 2003; Kumar *et al.*, 2009).

Existen numerosos estudios que demuestran las potencialidades de un pretratamiento fúngico sobre residuos lignocelulósicos. Yu *et al.* (2009) concluyeron que los rendimientos en la tasa de hidrólisis enzimática se mejoran. A su vez, Lee *et al.* (2007) lograron aumentar en un 21% la cantidad de azúcares liberados con respecto a la muestra control. Además, se ha estudiado la combinación del biológico con otros tipos de pretratamientos, ya que la combinación permite aumentar la degradación de la lignina en comparación con uno solo (Yu *et al.*, 2009). Combinando el pretratamiento fúngico con un proceso de etanolisis, se logró reducir la energía necesaria para la separación de los componentes estructurales en un 15%, y se obtuvo un rendimiento de etanol correspondiente al 62% del teórico (Itoh *et al.*, 2003). También se han realizado estudios que combinan pretratamientos y hongos, obteniéndose un mayor porcentaje de azúcares fermentables cercanos al 50% (Lopretti *et al.*, 2007)

La siguiente etapa del proceso corresponde a la hidrólisis, la cual puede llevarse a cabo a través de una vía enzimática o ácida. La primera es un proceso que utiliza enzimas celulolíticas, denominadas celulasas, las cuales son producidas por hongos o bacterias. El complejo enzimático está conformado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. La gran desventaja que presenta está en el alto costo de las enzimas necesarias, sin embargo, esta es una de las principales líneas de acción de los laboratorios especializados en biotecnología, reducir costos y producir enzimas cuyo valor no sea un obstáculo en el desarrollo de estas investigaciones. Por otra parte, la hidrólisis ácida requiere equipos e instalaciones más costosas; además los riles generados deben ser neutralizados para no contaminar el medioambiente.

Por otra parte, se ha descrito que durante las etapas de pretratamiento e hidrólisis es posible que se generen compuestos formados a partir de productos de degradación de azúcares y de lignina que pueden actuar como inhibidores de las enzimas, afectando el rendimiento de azúcares (Pérez *et al.*, 2002; Oliva, 2003; Sánchez y Cardona, 2005; Taherzadeh y Karimi, 2008 y Kristensen *et al.*, 2009). Se discutirán brevemente aquellos inhibidores que podrían afectar el rendimiento en la hidrólisis enzimática.

En este estudio los residuos de lenga son sometidos a un pretratamiento biológico con HPB, con el fin de degradar la lignina y dejar más accesible la celulosa para la posterior sacarificación o hidrólisis enzimática. De este modo, se determina la concentración de azúcares reductores obtenidos del hidrolizado. Cabe señalar que los azúcares reductores corresponden a aquellos monosacáridos que poseen grupos aldehídos (aldosas) y cetónicos (cetosas) en su estructura lineal. La madera de latifoliadas posee mayoritariamente aldopentosas y aldohexosas, entre las que destacan la xilosa y glucosa, respectivamente, siendo esta última la más abundante (Pérez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005; Taherzadeh y Karimi, 2008 y Kumar *et al.*, 2009). Por tal motivo, también se determinó la cantidad de glucosa obtenida y se estimó teóricamente el bioetanol que puede ser producido a partir de estos residuos pretratados.

Durante el pretratamiento fúngico, los residuos de lenga se almacenan en una cámara de incubación a 25° C durante 30, 45 y 60 días. En la hidrólisis o sacarificación enzimática se utiliza una carga de enzimas comerciales de 25 FPIU/g seco de residuos a un 10% (p/v) durante 48 horas a 50° C y 250 rpm. La determinación de azúcares reductores se realiza por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) y la glucosa se mide utilizando un kit comercial basado en su oxidación.

El presente estudio forma parte del proyecto Domeyko-Energía de la Universidad de Chile, denominado **“Optimización del proceso de tratamiento de lignocelulosas con miras a la obtención de bioetanol”**, dentro del cual se propone la utilización de residuos de lenga como materia prima para la obtención de bioetanol de segunda generación. Los objetivos de la presente memoria son:

## **1.5. Objetivos del estudio**

### **Objetivo general.**

Evaluar el rendimiento de azúcares reductores obtenidos a partir de residuos de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser previamente tratado con hongos de pudrición blanca, para la producción de bioetanol.

### **Objetivos específicos.**

Analizar el rendimiento de azúcares reductores luego de una sacarificación enzimática, a partir de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser tratado con tres hongos de pudrición blanca y sometido a tres tiempos de ataque, 30, 45 y 60 días.

Estimar la cantidad de alcohol producido con aquel tratamiento que presente el mejor rendimiento de azúcares reductores.

## 2. MATERIALES Y MÉTODO

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Madera.

Como sustrato lignocelulósico para el pretratamiento biológico y posterior hidrólisis enzimática, se emplearon residuos de madera de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser, los que se obtuvieron de un aserradero de lenga, propiedad de Forestal Rusffin, ubicado en el sector de Santa Alicia, Tierra del Fuego, XII Región.

Para realizar el pretratamiento con los hongos, la madera fue llevada a una granulometría tipo “pin-chips”, empleándose para ello un molino de martillo marca Condux Werk, modelo LHM 20116. Estas partículas fueron cribadas a través tamices con un número de malla entre 2,5 y 3,5. El tamaño de los “pin-chips” correspondió a partículas de 1 mm de espesor, 1 a 3 mm de ancho y 5 mm de largo, aproximadamente, con un CH de 11%.

#### 2.1.2. Hongos para el pretratamiento.

Para el pretratamiento biológico se utilizaron cepas de tres hongos de pudrición blanca, las que fueron suministradas por el proyecto y almacenadas en la micoteca del Laboratorio de Biodeterioro y Preservación, del Departamento de Ingeniería de la Madera.

Los hongos utilizados pertenecen a las especies *Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus*.

#### 2.1.3. Celulasas.

La hidrólisis o sacarificación enzimática se realizó utilizando un complejo enzimático celulolítico formado por diferentes componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad, cuya denominación y mecanismo de acción son los siguientes (Montenecourt y Eveleigh, 1979, citado por Oliva, 2003):

##### 1. Endo- $\beta$ -glucanasas

$\beta$  - (1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.4.)

##### 2. Exo- $\beta$ -glucanasas.

a.  $\beta$  -(1,4)-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.) Celobiohidrolasa (CBH)

b.  $\beta$  -(1,4)-glucanglucanohidrolasas (EC 3.2.1.74.) Glucohidrolasa (GGH)

##### 3. $\beta$ - glucosidasa (EC 3.2.1.21.)

En el Anexo II se describe el mecanismo de acción de las enzimas celulasas.

Las enzimas fueron adquiridas al Laboratorio SIGMA-ALDRICH®, y sus nombres comerciales corresponden a Celluclast® 1,5L (C2730), celulasas de *Trichoderma reesei* (ATCC 26921) y Novozyme® 188 (C6105), celobiasa obtenida de *Aspergillus niger*.

La celobiasa o  $\beta$ -glucosidasa se debe agregar al complejo enzimático para complementar la acción de las celulasas del hongo, ya que diversos estudios señalan que las celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa acumulada en el medio de reacción (Dekker, 1988; Pérez *et al.*, 2002; Oliva, 2003; Sánchez y Cardona, 2005; Taherzadeh y Karimi, 2007 y Hoyer, *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que al utilizar sólo las celulasas de *Trichoderma reesei*, la cantidad de azúcares reductores es menor comparado con los azúcares obtenidos de una hidrólisis en donde se utilizó el sinergismo entre celulasas de este hongo y la celobiasa de *Aspergillus niger* (Chen *et al.*, 2007).

#### **2.1.4. Reactivos.**

La realización de la hidrólisis enzimática requirió de ácido acético y acetato de sodio para preparar un buffer acetato cuya concentración fue de 0,05 M y pH 5.

Para la medición de los azúcares reductores se preparó el reactivo con ácido dinitrosalicílico (DNS), indicada en el Anexo III, utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (10,6 g), hidróxido de sodio (19,8 g), sal de Rochelle (306 g), fenol (7,6 ml) y metabisulfito de sodio (8,3 g) mezclados con 1416 ml de agua destilada; mientras que la curva de calibración se realizó con glucosa anhidra.

La medición de glucosa se realizó utilizando un kit comercial de glucosa basado en la enzima glucosa oxidasa peroxidasa (provista por el Laboratorio RANDOX®), el cual cuenta con dos reactivos: el reactivo A, compuesto por buffer fosfato, 4-aminofenazona, fenol, glucosa oxidasa, peroxidasa, y el reactivo B o estándar compuesto por glucosa (Anexo IV).

#### **2.1.5. Equipos y materiales de laboratorio.**

El pretratamiento fúngico y la hidrólisis enzimática se realizaron en el Laboratorio de Biodeterioro y Preservación, del Departamento de Ingeniería de la Madera. En los Cuadros 1 y 2 se indican los equipos y materiales utilizados en ambas actividades respectivamente.

**Cuadro 1. Equipos y materiales de laboratorio utilizados en el pretratamiento fúngico.**

Autoclave o esterilizador	Balanza digital ( $\pm 0,01$ g)
Cámara de incubación	Estufa de secado
Cámara de flujo laminar	Bomba de vacío
Matraces Erlenmeyer de 500 ml	Instrumentos e insumos menores

**Cuadro 2. Equipos y materiales de laboratorio utilizados en la hidrólisis enzimática.**

pH-metro	Tubos Falcon de 50 ml
Agitador-incubador orbital (“shaker”)	Instrumentos e insumos menores

La determinación de los azúcares reductores y de la glucosa se realizó en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Los equipos utilizados se indican en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Equipos y materiales de laboratorio utilizados en la medición de azúcares reductores y glucosa.**

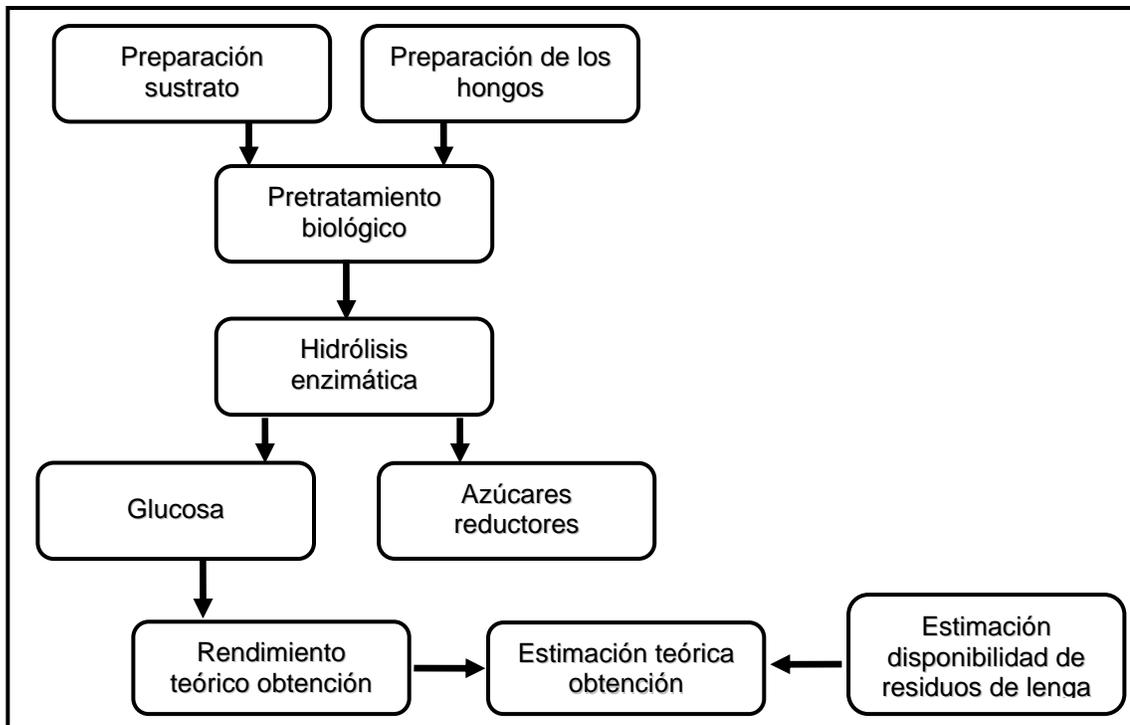
Espectrofotómetro Ultrospec, modelo 3000 (rango UV-visible)	Lector de microplacas Anthos, modelo 2010
Centrífuga de tubos Eppendorf	Instrumentos e insumos menores

**2.2. Método**

El efecto del pretratamiento biológico sobre el rendimiento de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática se evaluó mediante el manejo de dos variables, con tres niveles cada una. La primera corresponde al hongo de pudrición blanca, *Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus*, y la segunda al tiempo de ataque, 30, 45 y 60 días.

De la combinación de los distintos niveles de las variables indicadas resultaron 9 tratamientos, cada uno con tres repeticiones y un testigo que correspondieron a residuos de lenga que no fueron inoculados. Por lo tanto, la evaluación de los tratamientos se realizó mediante un análisis de varianza a través de un diseño estadístico bifactorial de 3 x 3 de efectos fijos. El factor A correspondió al hongo de pudrición blanca, mientras que el factor B correspondió al tiempo de ataque (Canavos, 1988). Las variables respuesta fueron la pérdida de peso, la cantidad de azúcares reductores y de glucosa obtenidos.

En la Figura 1 se representa esquemáticamente la secuencia de etapas del estudio, desde la preparación de las cepas fúngicas y del sustrato hasta la estimación teórica de bioetanol.



**Figura 1. Representación secuencial de las etapas del estudio.**

### 2.2.1. Reproducción de los HPB.

La reproducción de los hongos se llevó a cabo de la siguiente manera:

#### **Preparación del medio de cultivo.**

Se utilizó una mezcla de agar-agar y extracto de malta al 2% y 3% p/p respectivamente, usando como solvente agua destilada. El pH usado para asegurar el crecimiento del hongo fue de 4,5. Este medio de cultivo fue dosificado en placas petri de 100 mm de diámetro y 15 mm de alto, y luego esterilizado.

#### **Esterilización.**

La esterilización del medio de cultivo se realizó en un autoclave a una presión de vapor saturado de 15 psi (121 °C), por un tiempo de 20 minutos.

#### **Inoculación.**

El proceso de inoculación se realizó extrayendo con un asa de platino un trozo de medio de cultivo con el hongo ya crecido (micoteca del Laboratorio de Biodeterioro y Preservación), y colocándolo en el centro de cada una de las placas petri preparadas con el nuevo medio de cultivo agar-malta. Se mantuvieron todas las medidas de bioseguridad necesarias para lograr un ambiente aséptico. El material de trabajo se dejó bajo la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada y se aplicó un baño de luz ultravioleta durante 20 minutos.

## **Incubación.**

Finalizado el proceso anterior, los hongos se desarrollaron en la cámara de incubación por un período de 10 días, con temperatura controlada a 25° C y humedad relativa del 60%.

### **2.2.2. Pretratamiento biológico.**

Antes de iniciar la etapa del pretratamiento biológico, se debió utilizar un material que sirviera como vehículo entre el hongo crecido *in vitro* y el sustrato (lenga). Para esto se utilizaron granos de trigo en una proporción de 3% p/p con respecto al sustrato. De esta forma se asegura que el hongo se propague homogéneamente por toda la madera.

La inoculación de la semilla con cada hongo se llevó a cabo bajo las mismas medidas de bioseguridad y asepsia mencionadas anteriormente.

Una vez que la semilla de cada hongo estuvo lista, se realizó el pretratamiento biológico en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, en los cuales se introdujeron los “pin chips” de lenga y la semilla correspondiente.

El procedimiento utilizado en esta etapa de pretratamiento biológico fue el siguiente:

#### **Preparación de la semilla.**

Se dejó crecer a cada hongo sobre granos de trigo en tubos de ensayo bajo condiciones similares a las descritas en el punto 2.2.1. (Reproducción de los HPB).

#### **Preparación del sustrato.**

Se utilizó una cantidad de “pin chips” de lenga equivalente a 50 g (seco a 103° C), los cuales se hidrataron hasta lograr un contenido de humedad de 85% (b.s.) y se depositaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Luego fueron llevados a un autoclave para su esterilización a 15 psi (121 °C), durante 20 minutos.

#### **Inoculación.**

Una vez que la semilla de cada hongo invadió los granos de trigo, transcurridos entre 7 y 10 días, se procedió a la inoculación de dicha semilla en cada matraz con “pin chips” de lenga. Este procedimiento nuevamente se llevó a cabo en condiciones estériles bajo la cámara de flujo laminar.

#### **Incubación.**

Los matraces fueron llevados a la cámara de incubación con temperatura controlada a 25° C, y se incubaron según los tiempos de ataque del estudio a 30, 45 y 60 días.

### 2.2.3. Determinación de la pérdida de peso.

Finalizado el tiempo de ataque, se calculó la pérdida de peso a los residuos de lenga en cada uno de los matraces según la siguiente fórmula:

$$P/P (\%) = \frac{P_{oi} - P_{of}}{P_{oi}} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

P/P: pérdida de peso, expresada en %

P<sub>oi</sub>: correspondió al peso seco inicial, en gramos, antes del pretratamiento

P<sub>of</sub>: correspondió al peso seco final, en gramos, luego del pretratamiento

El peso seco inicial correspondió al peso seco en gramos de los residuos de lenga antes del ataque fúngico. Estos residuos fueron secados al aire y se calculó su contenido de humedad secando una alícuota en una estufa a  $103 \pm 2^\circ \text{C}$  por un período de 24 horas. El contenido de humedad que presentaron los residuos fue de aproximadamente 11%, luego se calculó el peso húmedo y se determinó la cantidad de agua que faltaba para alcanzar un contenido de humedad de 85%.

Una vez finalizado el ataque fúngico, los matraces se llevaron a una estufa de secado a temperatura controlada de  $40^\circ \text{C}$  durante 72 horas. No se utilizó una temperatura de secado superior con el objetivo de no alterar las enzimas propias de cada hongo, ya que con temperaturas superiores éstas se desnaturalizan (Tahezadeh y Karimi, 2007), afectando futuros estudios enzimáticos planificados por el proyecto patrocinador.

El peso seco final se determinó tomando nuevamente una alícuota de lenga de cada matraz y llevándola a una estufa a  $103 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 24 horas.

Posteriormente, los residuos de lenga pretratados fueron traspasados a bolsas plásticas con cierres herméticos y almacenados a una temperatura de  $5^\circ \text{C}$ .

### 2.2.4. Medición de la actividad enzimática.

Este ensayo se realizó previo a la hidrólisis o sacarificación enzimática, y su objetivo fue determinar la actividad enzimática de cada celulasa comercial al momento de su utilización, es decir, conocer la velocidad de reacción de la enzima frente al sustrato de modo de dosificar la cantidad correcta a los residuos de lenga pretratados según la carga enzimática propuesta. Este ensayo se realizó según el procedimiento elaborado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) con el nombre de “Medición de la actividad de celulasas” (Ghose, 1987), señalado en el Anexo V. Estas determinaciones se presentan en el Apéndice I.

### **2.2.5. Hidrólisis enzimática.**

La hidrólisis enzimática se realizó a los “pin-chips” de lenga pretratados con los hongos en los tiempos de ataque ya indicados y a la madera testigo. Para esto, se determinó la humedad de cada muestra según la ecuación 1, secando en estufa una alícuota a  $103 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Las soluciones enzima-sustrato se prepararon al 10% p/v de “pin-chips” secos y se aplicó una carga enzimática total correspondiente a 25 FPIU/g seco de “pin-chips” de lenga, utilizándose las enzimas comerciales Celluclast® 1,5L y Novozyme® 188.

En tubos Falcon de 50 ml se agregó el equivalente a 1 g seco de “pin-chips” de lenga húmedos, se les introdujo el complejo enzimático hidrolítico compuesto por las celulasas comerciales (endo- $\beta$ -glucanasas, exo- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasa) y el buffer acetato 0,05 M, pH 5, hasta completar 10 ml.

Además, para cada experiencia se incluyó un blanco conteniendo sólo la muestra pretratada y el buffer (denominado blanco muestra), para detectar la liberación de azúcares producidas por la acción fúngica, y también se agregó un tubo conteniendo sólo la enzima y el buffer (denominado blanco enzima), para detectar el contenido de azúcares propios del complejo enzimático.

Los tubos Falcon se llevaron a un agitador orbital (“shaker”) bajo las siguientes condiciones: temperatura de  $50^\circ \text{C}$ , pH 5 y agitación de 250 rpm durante 48 horas.

Finalmente, se determinó la cantidad total de azúcares reductores y glucosa liberados durante la etapa de hidrólisis, así como también la cantidad liberada por la acción fúngica y la liberada por el complejo enzimático, tal como se mencionó anteriormente.

### **2.2.6. Medición de azúcares reductores.**

Una vez finalizadas las 48 horas de hidrólisis enzimática, de cada uno de los tubos Falcon, se retiró una alícuota de 1 ml, teniendo precaución de extraer sólo la fracción líquida, la que fue traspasada a un tubo Eppendorf. Estas muestras del hidrolizado fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante dos minutos, utilizándose el sobrenadante para medir la cantidad de azúcares reductores según el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), adaptado al formato de microplacas de 96 pocillos (Salazar *et al.*, 2006) (Anexo IV).

Se utilizó una mezcla de sustrato-DNS equivalente a la dilución 1:2 en cada uno de los pocillos de las placas termoresistentes. Estas placas fueron luego incubadas a  $100^\circ \text{C}$  durante 10 minutos y posteriormente enfriadas en abundante hielo para detener la reacción y proceder a la medición. Se utilizó una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas Anthos, modelo 2010. Cuando fue necesario, las muestras se diluyeron en agua destilada.

Se debió utilizar una curva de calibración para traducir los valores de absorbancia a concentración de azúcares reductores, expresados en g/L. La curva de calibración se preparó con una solución de D(+)-glucosa, cuya linealidad se mantuvo entre 0,2 g/L y 1 g/L, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,99. Esta curva se presenta en el Apéndice II.

La fórmula de cálculo utilizada fue la siguiente:

$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = \frac{\text{ABS}_{\text{muestra}} + c}{m} \quad (2)$$

Donde:

Azúcares reductores: corresponde a la cantidad de azúcares totales obtenidos de la muestra, expresados en g/L.

$\text{ABS}_{\text{muestra}}$ : corresponde a la absorbancia o densidad óptica de la muestra a 550 nm

m: se define como la pendiente de la curva de calibración

c: se define como la intersección con el eje X

Finalmente, reemplazando los valores obtenidos en la curva de calibración, la fórmula quedó de la siguiente manera:

$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = \frac{\text{ABS}_{\text{muestra}} + 0,0739}{1,0998} \quad (3)$$

De acuerdo con los objetivos planteados en la presente memoria de título, la medición y evaluación del rendimiento solo se realizaría a los azúcares reductores, sin embargo, el principal azúcar del cual se obtiene el bioetanol es la glucosa. Basándose en esto, el proyecto patrocinador otorgó el financiamiento necesario para la medición de glucosa, ya que es fundamental contar con información cuantificada de esta variable. De esta manera, la estimación de la cantidad de bioetanol factible de producir con los residuos de lenga pretratados se realizó considerando la cantidad de glucosa y no de azúcares reductores, entregándose así información más precisa.

### **2.2.7. Medición de glucosa.**

Para medir la cantidad de glucosa se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tubos Eppendorf, con las muestras del hidrolizado previamente centrifugadas, la que se mezcló con 1000  $\mu\text{l}$  del reactivo propio del kit comercial de glucosa (reactivo A), en cubetas plásticas de 1,5 ml de capacidad. En los casos necesarios, las muestras fueron diluidas en agua destilada antes de la determinación de glucosa.

Las cubetas se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente (aprox. 25° C). Además se añadieron dos cubetas como blanco, una conteniendo sólo el reactivo del kit (reactivo A) y otra con el reactivo A y el reactivo B, según lo dispuesto en el protocolo del laboratorio de procedencia del kit, detallado en el Anexo IV.

La medición se realizó en un espectrofotómetro Ultrospec, modelo 3000, en donde se midió la absorbancia (UV en rango visible), a 500 nm. Las muestras se midieron frente a la absorbancia del reactivo A.

La fórmula de cálculo empleada en la determinación de la concentración de glucosa fue la siguiente:

$$\text{Glucosa (g/L)} = \frac{\text{ABS}_{\text{muestra}}}{\text{ABS}_{\text{estándar}}} \quad (4)$$

Donde:

Glucosa (g/L): es la concentración de glucosa presente en la muestra, expresada en g/L

ABS<sub>muestra</sub>: corresponde a la absorbancia de la muestra a 500 nm

ABS<sub>estándar</sub>: corresponde a la absorbancia de la mezcla del reactivo A y B a 500 nm

Los azúcares obtenidos, según el método ya mencionado, se usaron en conjunto con la información obtenida en las dos secciones siguientes, estimándose la cantidad de bioetanol factible de producir con los residuos de lenga.

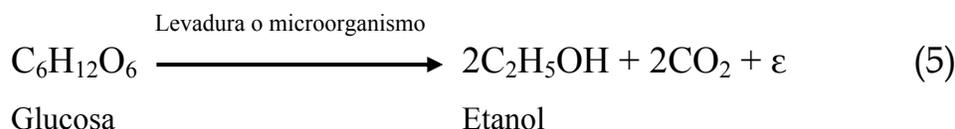
### 2.2.8. Estimación de los residuos de lenga.

En este estudio, además de determinar la cantidad de azúcares obtenidos a partir de los residuos de lenga pretratados, se estimó la cantidad de dichos residuos susceptibles de ser transformados a bioetanol. Para ello se recopiló información de varios estudios realizados en Chile acerca de la superficie total de lenga, aquella protegida y la cantidad productiva. Asimismo, se entregó información acerca de la productividad, rendimientos en el bosque y en el aserradero y la producción de madera aserrada correspondiente al año 2007, con la consiguiente cantidad de residuos generados.

### 2.2.9. Estimación de la cantidad teórica de bioetanol factible de producir.

La estimación de la cantidad teórica de bioetanol producida a partir de residuos de lenga pretratados con HPB, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, se realizó considerando el mejor tratamiento, es decir aquel que presentó la mayor cantidad de glucosa.

Se utilizó el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, que corresponde a 0,511 g de etanol y 0,489 g de CO<sub>2</sub> por cada 1 g de glucosa, cuya conversión se representa en el Anexo VI y corresponde a la siguiente ecuación:



### 2.2.10. Análisis estadístico.

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos factores asociados, es decir, cepa fúngica (*Stereum sp*, *Ganoderma sp* y *Aurantioporus sp*) y tiempo de ataque (30, 45 y 60 días), para cada una de las tres variables respuesta (pérdida de peso, concentración de azúcares reductores y concentración de glucosa), se realizó un análisis de varianza bifactorial con un nivel de confianza del 99% (Canavos, 1988) por medio del programa estadístico StatGraphic Plus®.

El modelo estadístico utilizado para el ANDEVA bifactorial es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (6)$$

Con:  $i = 1, \dots, a$  ( $a = 3$ )  
 $j = 1, \dots, b$  ( $b = 3$ )  
 $k = 1, 2, \dots, n$  ( $n = 27$ )

Donde:

$Y_{ijk}$ : k-ésima observación de pérdida de peso para el tratamiento (i, j)

$\mu$ : efecto de la media

$\alpha_i$ : efecto principal causado por el i-ésimo nivel del factor A (cepa hongo)

$\beta_j$ : efecto principal causado por el j-ésimo nivel del factor B (tiempo ataque)

$(\alpha\beta)_{ij}$ : efecto de la interacción para el i-ésimo nivel del factor A y el j-ésimo nivel del factor B

$\varepsilon_{ijk}$ : k-ésimo error aleatorio en el tratamiento (i, j)

Debido a que la variable respuesta pérdida de peso (P/P), se encuentra expresada en porcentaje, ésta se debe normalizar antes de realizar el análisis de varianza. Para esto, se utilizó una transformación comúnmente empleada en estos casos, con la fórmula  $Y' = \arcsen \sqrt{P/P}$  (Ostle, 1965).

Además, con el objetivo de identificar diferencias dentro de cada una de las cepas fúngicas y de los tiempos empleados para cada variable respuesta, cuando corresponda, se realizó un análisis de varianza simple por medio del programa estadístico StatGraphic Plus® con un nivel de confianza del 99% y cuyo modelo estadístico asociado se presenta a continuación:

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ik} \quad (7)$$

Con:  $i = 1, \dots, a$  ( $a = 3$ )  
 $k = 1, 2, \dots, n$  ( $n = 9$ )

Donde:

$Y_{ik}$ : k-ésima observación de la cantidad de glucosa para el tratamiento (i)

$\mu$ : efecto de la media

$\alpha_i$ : efecto principal causado por el i-ésimo nivel del factor (cepa hongo o tiempo acción)

$\varepsilon_{ik}$ : k-ésimo error aleatorio en el tratamiento (i)

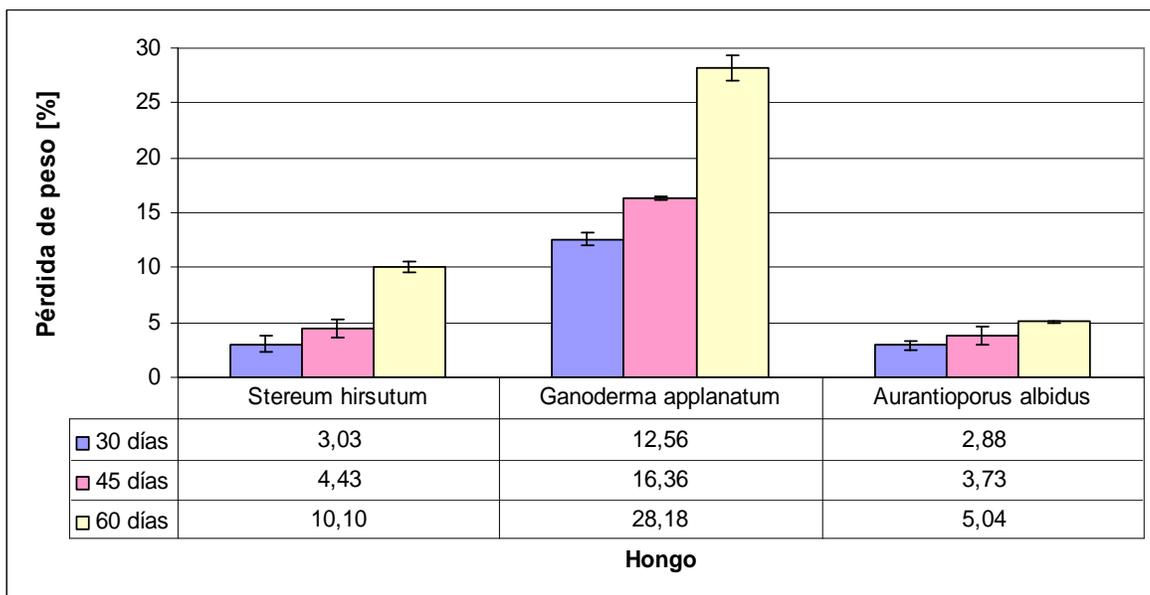
### 3. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Pretratamiento biológico.

Al analizar el efecto de la cepa fúngica y el tiempo de ataque sobre la variable respuesta pérdida de peso, se determinó, con un error del 1%, que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo, y que, además, existe una interacción entre ellos (Apéndice III).

La comparación de las medias, a través del método de contrastes múltiples de Duncan, considerando un error del 1%, determinó la existencia de diferencias entre los tres HPB utilizados (*Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus*) y entre los tres tiempos de ataque del estudio (30, 45 y 60 días) (Apéndice III).

Los valores obtenidos se resumen en la Figura 2, para los tres hongos y bajo los tres tiempos de ataque, y corresponden al promedio de tres repeticiones (Apéndice IV). Además se muestra la variabilidad de los datos según el error estándar para cada tiempo.



**Figura 2. Pérdidas de peso obtenidas durante el pretratamiento para los tres hongos y los tres tiempos en estudio.**

Según la Figura 2, se observa que el hongo *Ganoderma applanatum* presentó la mayor pérdida de peso en los tres tiempos de ataque. Las pérdidas de peso ocasionadas por la acción de las cepas *Stereum hirsutum* y *Aurantioporus albidus* fueron menores que las

ocasionadas por *Ganoderma applanatum*, comprobándose que existen diferencias estadísticamente significativas entre estas cepas fúngicas (Apéndice III).

Tal como se observa en la Figura 2, *Stereum hirsutum* ocasionó pérdidas de peso menores al 10%. Mediante el análisis estadístico realizado a los tiempos de ataque para esta cepa, se comprobó que sólo hubo diferencia estadística significativa entre los 30 y 60 días (Apéndice III).

*Ganoderma applanatum*, como fue señalado anteriormente, ocasionó las mayores pérdidas de peso del estudio en los tres tiempos de ataque. A los 30 días su acción provocó la pérdida de 12,5% y a los 45 fue de 16,4%. A los 60 días los residuos de lenga bajo la acción de este hongo perdieron 28,2% de peso, encontrándose una diferencia de casi 16 puntos porcentuales con el primer tiempo y de 12 con el segundo, existiendo diferencias estadísticas significativas entre los 30 y 60 días y entre los 45 y 60 días del estudio (Apéndice III).

*Aurantioporus albidus* por su parte, se mostró como el hongo menos agresivo de los tres utilizados. No existieron diferencias estadísticas significativas entre los tiempos del estudio (Apéndice III), y las pérdidas de peso ocasionadas fueron de 2,9% a los 30 días, 3,7% a los 45 días y 5% a los 60 días (Figura 2).

Con respecto a los tiempos estudiados, se observó que transcurridos 30 días de acción fúngica el hongo *Ganoderma applanatum* presentó diferencias estadísticamente significativas en relación a *Stereum hirsutum* y *Aurantioporus albidus*, quienes no presentaron diferencias entre ellos. Esto también se comprobó para un tiempo de ataque de 45 días. Sin embargo, a los 60 días se observaron diferencias estadísticamente significativas para la pérdida de peso entre las tres cepas utilizadas, es decir, se observó que conforme transcurre el tiempo la pérdida de peso es mayor.

Es importante señalar que la pérdida de peso es un indicador de la biodegradación de los residuos de lenga, lo cual se asocia con la biodegradación de la lignina, ya que se utilizaron hongos que degradan preferentemente ese componente de la pared celular. Sin embargo, la compleja batería enzimática de dichos hongos degrada por etapas la lignina y las fuentes de carbono (azúcares), que necesita para su subsistencia, además, los HPB son los únicos que pueden degradar todos los componentes de la pared celular (Kuhad *et al.*, 1997, citado por Zaid, 2004). En este estudio se observó una mayor pérdida de peso conforme el tiempo de ataque aumentó, lo que involucraría una degradación de los polisacáridos, derivando en una mayor cantidad de azúcares reductores y de glucosa que están disponibles o que se pierden, análisis que se realizó posteriormente.

### **3.2. Hidrólisis enzimática.**

Antes de realizar la hidrólisis, se debió determinar la actividad enzimática a cada enzima comercial, los resultados de dicha actividad se entregan en extenso en el Apéndice I y se resumen de la siguiente manera:

Celluclast® 1,5L presentó una actividad de 70,3 FPIU/ml.

Novozyme® 188 presentó una actividad de 807 CBIU/ml.

Los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática se presentan a continuación.

#### **3.2.1. Azúcares reductores.**

El análisis estadístico determinó, con un error del 1%, la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las cepas fúngicas utilizadas. Sin embargo, este análisis no determinó diferencia alguna en cuanto al factor tiempo de ataque, por lo tanto, los tiempos estudiados no influyen en la cantidad de azúcares reductores obtenidos luego de la hidrólisis enzimática realizada a los residuos de lenga pretratados (Apéndice III).

Las cantidades de azúcares reductores totales obtenidos en este estudio se presentan en la Figura 3, y corresponden a un promedio de tres repeticiones (Apéndice IV), además se señala la variabilidad de los datos según el error estándar. Por su parte, en el Cuadro 4 se presentan los datos segregados según la fuente liberadora de azúcares.

Mediante el método de contrastes múltiples de medias de Duncan (Apéndice III) se determinó, con un 1% de error, que no existen diferencias significativas entre las cepas de *Aurantioporus albidus* y *Stereum hirsutum*, y que existen diferencias en el tratamiento con *Ganoderma applanatum*, obteniéndose con ésta la mayor cantidad de azúcares reductores, alcanzándose un máximo de 24,93 g/L a un tiempo de ataque de 60 días (Figura 3).

La información contenida en el Cuadro 4 indica, en la última columna, el valor total de azúcares reductores obtenidos; mientras que el valor neto, es decir la cantidad de azúcar liberada exclusivamente por la acción de la hidrólisis enzimática, se presenta en la quinta columna.

Los datos de azúcares reductores totales también pueden expresarse en g/100g, es decir, gramos de azúcares reductores por cada 100 gramos de residuos secos de lenga pretratados, ya que se utilizó una concentración de sustrato del 10% p/v.

**Cuadro 4. Azúcares reductores, expresados en g/L o g/100g, obtenidos luego de la hidrólisis enzimática para cada cepa según el tiempo de ataque y la muestra control.**

Hongo	Tiempo (días)	Azúcares reductores (g/L), liberados por			
		Pretratamiento <sup>(1)</sup>	Enzima <sup>(2)</sup>	Hidrólisis neto <sup>(3)</sup>	TOTAL
<i>Stereum hirsutum</i>	30	0,60	0,60	5,17	6,37
	45	0,72	0,73	5,48	6,92
	60	0,91	0,73	11,26	12,90
<i>Ganoderma applanatum</i>	30	2,41	0,60	17,72	20,73
	45	2,48	0,73	20,10	23,30
	60	2,64	0,73	21,55	24,93
<i>Aurantioporus albidus</i>	30	1,88	0,60	10,64	13,12
	45	1,41	0,73	10,07	12,21
	60	1,86	0,73	11,74	14,32
Control o testigo*	30	1,47	0,60	3,10	5,17
	45	0,63	0,73	4,61	5,98
	60	0,50	0,73	3,12	4,36

<sup>(1)</sup>: azúcares reductores determinados al hidrolizado de “pin-chips” pretratado, más el buffer

<sup>(2)</sup>: azúcares reductores determinados al hidrolizado del complejo enzimático, más el buffer

<sup>(3)</sup>: azúcares reductores netos obtenidos del hidrolizado (lenga+enzimas+buffer), determinados restando al total (1) y (2)

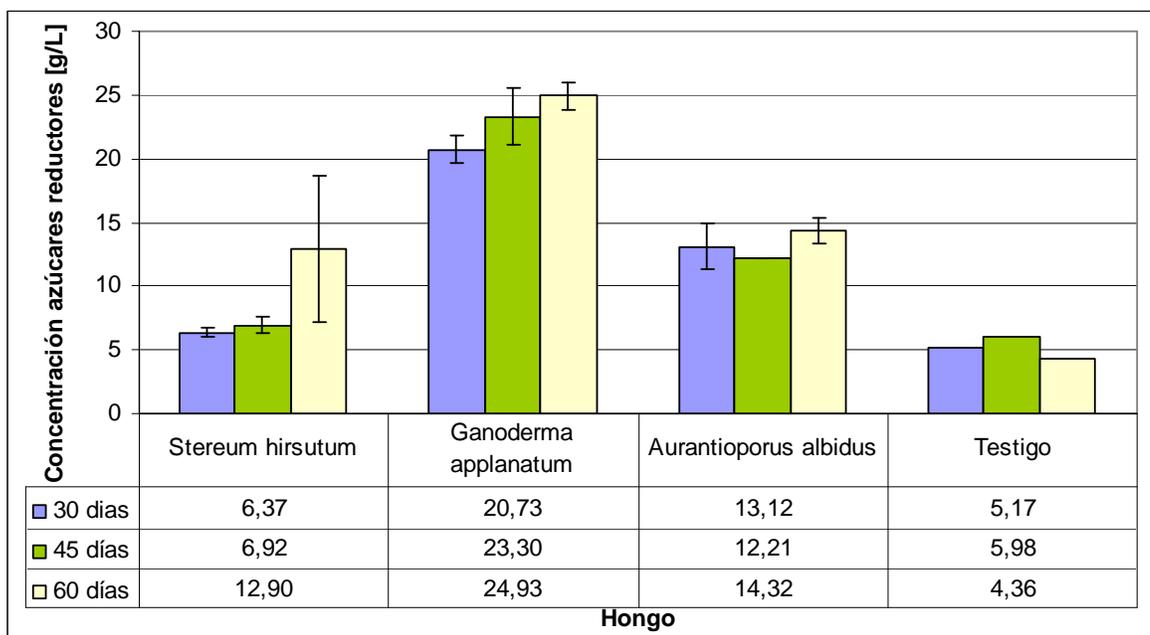
(\*): muestra control o testigo se refiere a aquellos residuos de lenga que no fueron atacados por HPB

De acuerdo al Cuadro 4, se observa que los azúcares propios del complejo enzimático presentaron una concentración máxima de 0,73 g/L. Similares valores se obtuvieron para aquellos azúcares liberados por el pretratamiento con *Stereum hirsutum* y aquéllos liberados por la muestra control, por lo tanto, este hongo no liberó una cantidad de azúcares reductores significativa. Esto implicaría que la alteración provocada por parte de *Stereum hirsutum* no permitió que las celulosas comerciales tuvieran un acceso adecuado para hidrolizar la celulosa, o que el hongo consumió los azúcares presentes.

Por el contrario, las concentraciones de azúcares reductores liberados por *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus* fluctuaron entre 2,41 a 2,64 g/L y entre 1,41 a 1,88 g/L, respectivamente. Estos hongos, especialmente *Ganoderma applanatum*, parecieron lograr una deslignificación exitosa y permitieron, además, una liberación de azúcares (Cuadro 4).

Según el balance derivado del Cuadro 4, el rendimiento neto de la hidrólisis, es decir la fracción de azúcares liberados exclusivamente por la sacarificación enzimática sobre el total de azúcares fue para *Stereum hirsutum* de entre 79,2% a 87,3%; para *Ganoderma applanatum* de 85,5% a 86,4% y para *Aurantioporus albidus* de 81,1% a 82,5%. Por su parte, en la muestra control o testigo se observó un promedio de 69,5% (considerando una concentración promedio de azúcares reductores de 5,17 g/L). Esto ratifica que la etapa de pretratamiento fúngico mejoró la obtención de azúcares reductores en la etapa de hidrólisis

enzimática, ya que el hongo liberó una mayor cantidad de azúcares y, aparentemente, degradó de preferencia la lignina, dejando los polisacáridos más accesibles para la sacarificación enzimática.



\*: Control o Testigo se refiere a la muestra de lenga que fue incubada pero sin hongo.

**Figura 3. Concentración de azúcares reductores, expresados en g/L, obtenidos de la hidrólisis enzimática luego del pretratamiento biológico.**

La mayor cantidad de azúcares reductores totales se obtuvo con *Ganoderma applanatum*, alcanzándose valores de 20,73 g/L, 23,3 g/L y 24,93 g/L a los 30, 45 y 60 días, respectivamente (Figura 3). Además, esta cepa fúngica presentó las mayores pérdidas de peso (Figura 2), por lo tanto, su deslignificación parece ser selectiva con respecto a la degradación de lignina.

*Aurantioporus albidus* fue la segunda cepa fúngica más exitosa en la obtención de azúcares reductores, obteniéndose 13,12 g/L, 12,21 g/L y 14,32 g/L a los 30, 45 y 60 días, respectivamente (Figura 3). Estos valores contrastan con las bajas pérdidas de peso observadas (Figura 2), lo cual puede atribuirse a que este hongo pareciera ser selectivo en su degradación.

Los valores de azúcares reductores obtenidos con *Stereum hirsutum* fueron los más bajos, con 6,37 g/L, 6,92 g/L y 12,9 g/L a los 30, 45 y 60 días, respectivamente (Figura 3). Con valores de pérdida de peso más altos que *Aurantioporus albidus*, parece ser que este hongo, además de degradar la lignina, utiliza los azúcares para su consumo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no existen diferencias estadísticas significativas entre la

utilización de *Stereum hirsutum* o *Aurantioporus albidus* para la obtención de azúcares reductores a partir de lenga (Apéndice III).

Al establecer la comparación con la muestra control, se observó que la cantidad de azúcares reductores obtenidos con el hongo *Stereum hirsutum* fue 1,2 veces mayor para los 30 y 45 días, y 3 veces mayor para los 60 días; con el hongo *Ganoderma applanatum* fue 4 veces mayor para los 30 y 45 días, y 6 veces mayor para los 60 días; mientras que para *Aurantioporus albidus* fue de 2,5 veces mayor para los 30 días, 2 veces mayor para los 45 días y 3,3 veces mayor para los 60 días, todos comparados con los obtenidos por el testigo a los correspondientes tiempos. Lo anterior pone en evidencia que el pretratamiento fúngico aumenta la cantidad de azúcares reductores.

### 3.2.2. Glucosa.

El análisis estadístico realizado a esta variable respuesta, concluyó que la especie fúngica (*Stereum hirsutum*, *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus*) y el tiempo de ataque (30, 45 y 60 días), tienen un efecto estadísticamente significativo a un nivel de confianza de 99%, sin embargo, no existe la interacción entre ellos (Apéndice IV).

El método de comparación o contraste de medias de Duncan, concluyó (con un error del 1%), que no existen diferencias entre *Aurantioporus albidus* y *Stereum hirsutum* y que el tratamiento con *Ganoderma applanatum* fue el mejor, resultado esperable debido a la estrecha relación entre las variables azúcares reductores y glucosa, ya que la misma conclusión se obtuvo en el análisis de los azúcares reductores. Además se concluyó que el factor tiempo presentó diferencias significativas en los niveles 30 y 60 días y entre 45 y 60 días (Apéndice III).

La cantidad total de glucosa obtenida mediante la hidrólisis enzimática de los residuos de lenga sometidos al pretratamiento fúngico se muestra en la Figura 4, y correspondió a un promedio de tres repeticiones (Apéndice IV), donde, además, se muestra la variabilidad de los datos a través del error estándar. Por otra parte, se realizó una segregación según la fuente liberadora de glucosa que se resume en el Cuadro 5.

De igual manera que para los azúcares reductores, los datos de glucosa pueden expresarse en g/100g, es decir, gramos de glucosa por cada 100 gramos de residuos secos de lenga pretratados.

En el Cuadro 5 se presenta la segregación de la cantidad de glucosa obtenida; la última columna indica la cantidad total de glucosa, mientras que la quinta columna señala la cantidad neta obtenida en la etapa de hidrólisis enzimática.

**Cuadro 5. Glucosa, expresada en g/L o g/100g, obtenida luego de la hidrólisis enzimática para cada cepa según el tiempo de ataque y el control.**

Hongo	Tiempo (días)	Glucosa (g/L), liberada por			
		Pretratamiento <sup>(1)</sup>	Enzima <sup>(2)</sup>	Hidrólisis neta <sup>(3)</sup>	TOTAL
<i>Stereum hirsutum.</i>	30	0,09	0,25	1,08	1,43
	45	0,11	0,30	2,09	2,50
	60	0,10	0,31	5,52	5,93
<i>Ganoderma applanatum</i>	30	0,25	0,25	6,22	6,72
	45	0,37	0,30	7,98	8,66
	60	0,44	0,31	11,06	11,81
<i>Aurantioporus albidus</i>	30	0,71	0,25	3,03	4,00
	45	0,12	0,30	3,87	4,29
	60	0,41	0,31	6,15	6,87
Control o testigo	30	0,12	0,25	1,69	2,06
	45	0,11	0,30	1,52	1,93
	60	0,07	0,31	1,02	1,40

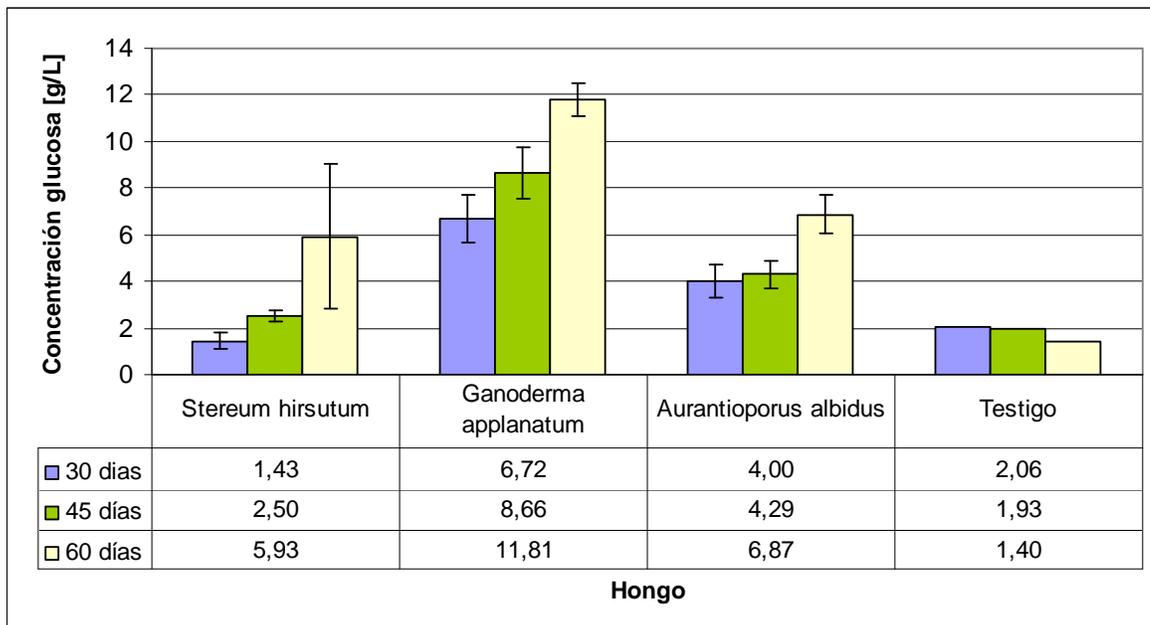
<sup>(1)</sup>: glucosa determinada al hidrolizado de “pin-chips” pretratado, más el buffer

<sup>(2)</sup>: glucosa determinada al hidrolizado del complejo enzimático, más el buffer

<sup>(3)</sup>: glucosa neta obtenida del hidrolizado (lenga+enzimas+buffer), determinada restando al total (1) y (2)

La cantidad de glucosa propia del complejo enzimático resultó ser menor que aquella propia del material pretratado con *Ganoderma applanatum* y *Aurantioporus albidus*, y mayor que la obtenida con *Stereum hirsutum* y con la muestra testigo o control (ver columnas Enzima y Pretratamiento del Cuadro 5). Esto concordó con los resultados obtenidos en los azúcares reductores, demostrando que *Stereum hirsutum* no es un hongo liberador de glucosa y que su deslignificación aparentemente no permitió un mayor acceso a la celulosa.

En cuanto a los rendimientos netos de la obtención de glucosa luego de la hidrólisis, es decir la fracción de azúcares liberados exclusivamente por la sacarificación enzimática sobre el total de azúcares, se obtuvieron entre 75,81% y 93,14% para *Stereum hirsutum*; 92,23% a 93,67% para *Ganoderma applanatum* y 75,82% a 90,21% para *Aurantioporus albidus*, mientras que para la muestra control se observó un promedio de 77,8%. Por lo tanto, el pretratamiento fúngico mejora el rendimiento de la glucosa en la hidrólisis de los residuos de lenga en comparación con aquel material que no fue sometido a la acción de los hongos.



\*: Control o Testigo se refiere a la muestra de lenga que fue incubada pero sin hongo.

**Figura 4. Concentración de glucosa, expresada en g/L o g/100g obtenida de la hidrólisis enzimática luego del pretratamiento biológico.**

La mayor cantidad de glucosa se obtuvo al pretratar los residuos de lenga con el hongo *Ganoderma applanatum* para dos de los tres tiempos del estudio. Se observó que esta variable está en directa relación con la pérdida de peso y la cantidad de azúcares reductores. A los 30 días se obtuvo una concentración de 6,72 g/L, a los 45 días aumentó casi 2 puntos, mientras que a los 60 días existió una diferencia de 5 puntos con relación al primer tiempo, obteniéndose 11,81 g/L o 11,81 g/100g, es decir, se obtuvieron casi 12 gramos de glucosa por cada 100 gramos de residuos de lenga secos pretratados, superando en ocho veces al valor del testigo (Figura 4), siendo éste el mejor tratamiento encontrado.

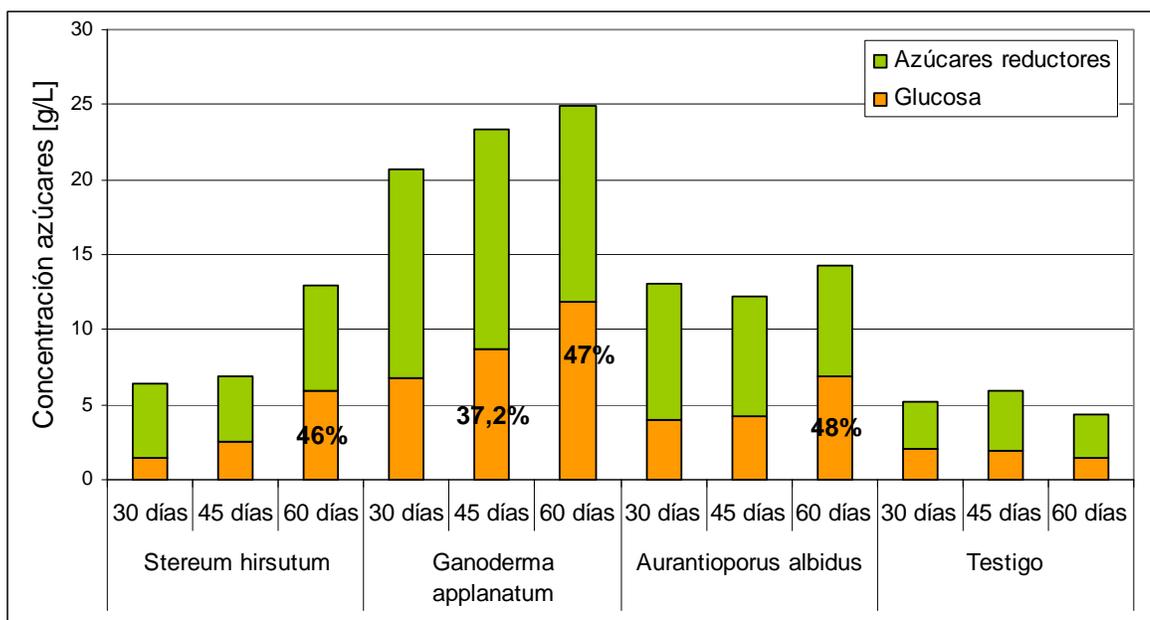
El segundo mejor tratamiento también se alcanzó con *Ganoderma applanatum*; a los 45 días se obtuvieron 8,66 g/100g, superando en cuatro veces al valor del testigo (Figura 4).

El tercer mejor tratamiento se obtuvo al pretratar los residuos de lenga con *Aurantioporus albidus* durante 60 días, donde se obtuvieron 6,87 gramos de glucosa por cada 100 gramos de material seco pretratado, superando en casi cinco veces al testigo. Además, este valor fue ligeramente mayor que aquel obtenido con *Ganoderma applanatum* a los 30 días del estudio, siendo este último el cuarto mejor tratamiento con 6,72 g/L (Figura 4).

La acción de *Stereum hirsutum* a los 30 días no liberó suficiente glucosa y se observó un valor menor que el de la muestra control (Figura 4). Por otra parte, el análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas para los tres tiempos del estudio (Apéndice III).

Según los datos obtenidos en el presente estudio es posible afirmar, sólo para *Ganoderma applanatum*, que una mayor pérdida de peso involucraría una mayor degradación de la lignina, permitiendo que las enzimas comerciales tengan un mayor acceso a la celulosa, aumentando el rendimiento de azúcares reductores y glucosa (Figuras 3 y 4, respectivamente). Sin embargo, para los hongos *Stereum hirsutum* y *Aurantioporus albidus*, no se observó tal comportamiento. Aún más, el efecto de la cepa de *Stereum hirsutum* ocasionó menores rendimientos, mientras que con *Aurantioporus albidus*, a pesar de presentar una pérdida de peso no mayor del 5%, se obtuvieron mayores cantidades de azúcares reductores y glucosa según tiempo de ataque comparado con *Stereum hirsutum* (Figuras 3 y 4, respectivamente).

En la Figura 5 se indica la participación de la glucosa sobre el total de azúcares reductores obtenidos en este estudio, donde es posible observar que más del 50% de los azúcares reductores no están siendo identificados ni cuantificados.



**Figura 5. Participación de glucosa obtenida sobre del total de azúcares reductores.**

Como se muestra en la Figura 5, a los 30 días del estudio la glucosa se presentó como el azúcar más abundante en el total de azúcares reductores obtenidos a partir de la muestra testigo con casi un 40%, mientras que con el pretratamiento fúngico se alcanzó un máximo de 32,4%. Sin embargo, si se observan los valores de la muestra testigo para los siguientes dos tiempos, el valor prácticamente se mantiene en 32%. Es posible asumir dicho valor como un promedio, ya que la muestra testigo no fue sometida a ningún tipo de ataque biológico, por lo tanto, los azúcares no tendrían que haber sufrido modificación en ninguno de los tiempos estudiados.

A los 45 días, la glucosa sobrepasa el 35% del total de azúcares, alcanzándose un máximo de 37,15%, y a los 60 días se superó el 45%, llegando a un máximo de casi 48% para aquellos residuos de lenga pretratados con *Aurantioporus albidus* (Figura 5). Estos resultados indicarían que el pretratamiento biológico aumentó la cantidad de glucosa liberada por la hidrólisis enzimática. Sin embargo, con el pretratamiento fúngico se liberaron otro tipo de azúcares, los que no fueron identificados ni cuantificados y que pueden ser fermentados, aumentando así el rendimiento de la hidrólisis. Un ejemplo es la xilosa, la cual es el segundo azúcar más abundante (Pérez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005; Taherzadeh y Karimi, 2008 y Kumar *et al.*, 2009).

Por otra parte, es preciso señalar que durante la hidrólisis enzimática, dadas las condiciones del proceso, se generan compuestos inhibidores que afectan el rendimiento de los azúcares, especialmente de la glucosa que posteriormente será fermentada. Este aspecto es discutido más adelante.

En las dos secciones siguientes se estimó la cantidad de residuos de lenga disponibles, y la cantidad de bioetanol que puede ser producido a partir del mejor pretratamiento con HPB y posterior hidrólisis enzimática a estos residuos.

### **3.3. Estimación de la disponibilidad de residuos de lenga.**

El tipo forestal lenga, *Nothofagus pumilio*, ocupa una superficie de 3.594.051 ha, equivalente a un 26,5% del total de bosque nativo en Chile (INFOR, 2008a). Un 16,5% del total de lenga se encuentra bajo la protección del Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado (SNASPE). Por otro lado, la superficie productiva de lenga se ha estimado en 600 mil ha para la XII región, equivalentes al 45,7% del total de bosques de lenga de la región (Schmidt, 2008), lo que se traduce en una superficie de lenga productiva estimada total para el país de 1.512.409 ha. Otro estudio indica que la cantidad de bosques comerciales disponibles del bosque nativo chileno es de aproximadamente 4.500.000 ha (INFOR, 2008b), equivalentes al 32,9% del total de bosque nativo chileno. Aplicando este porcentaje a la superficie total de lenga, se obtiene una superficie productiva de 1.181.908 ha. Considerando los datos anteriores y bajo un criterio conservador, se decidió emplear en las estimaciones, el valor de 1.181.908 ha como superficie productiva de lenga.

En cuanto a la productividad de los bosques de lenga, ésta se ha estimado en 3,10 m<sup>3</sup>/ha/año (Manosalva, 1995); 3,15 m<sup>3</sup>/ha/año (Schmidt y Urzúa, 1982); 6,5 m<sup>3</sup>/ha/año; 4,2 m<sup>3</sup>/ha/año; 6,6 m<sup>3</sup>/ha/año; 3,0 m<sup>3</sup>/ha/año (Schmidt *et al.*, 2003); 6,38 m<sup>3</sup>/ha/año (Chávez, 2002); 4,9 m<sup>3</sup>/ha/año, 7,2 m<sup>3</sup>/ha/año y 6,4 m<sup>3</sup>/ha/año (Schmidt y Caldentey, 2001). Basándose en la información anterior, en las estimaciones se utilizó una productividad promedio de 5,14 m<sup>3</sup>/ha/año.

En el proceso de extracción de trozas desde el bosque, Donoso y Caldentey (1996), estimaron que un 30% de lo cosechado equivale a trozas de calidad aserrable, Schmidt *et al.* (2003) registraron valores desde 25% hasta 67% (38,63% promedio), además es común el abandono de éstas debido a los criterios de selección de la calidad utilizados en el bosque, aumentando así los residuos originados en la extracción. Donoso y Caldentey

(1996), estimaron que un 43,5% del volumen bruto aserrable queda en el bosque. El rendimiento utilizado en la estimación correspondió a 30%.

Las investigaciones realizadas en cuanto a los rendimientos volumétricos, han arrojado que el volumen aserrable fluctúa entre 25% y 68%, con un promedio de 33%, mientras que el volumen astillable lo hace entre 10% y 64%, con un promedio de 30% (Donoso y Caldentey, 1996; Chávez, 2002 y Schmidt *et al.*, 2003). Por otra parte, la conversión en el aserradero según un estudio de Donoso y Caldentey (1996), fue del orden de 36,2% de madera aserrada. Schmidt *et al.* (1992) registraron una conversión del 30%, valor confirmado por un estudio posterior de Schmidt *et al.* (2003). Para las estimaciones acerca de la disponibilidad de residuos de lenga se usó un rendimiento en el aserradero de 30%.

En términos de producción, durante el año 2007 se produjeron 54.200 m<sup>3</sup> de madera aserrada de lenga, la cifra más baja de los últimos cinco años, con un promedio de 63.120 m<sup>3</sup> (INFOR, 2008a).

A partir de los datos informados anteriormente, se estimó la cantidad disponible de residuos de lenga para la producción de bioetanol de segunda generación. En el Cuadro 6 se resume la potencialidad de residuos a partir de los bosques chilenos de lenga, mientras que en el Cuadro 7 se muestran los volúmenes de residuos generados según la producción de madera aserrada del año 2007.

**Cuadro 6. Potencialidad de residuos del bosque chileno de lenga para la producción de bioetanol.**

Superficie total (ha)	3.594.051	
Superficie total SNASPE (ha)	593.018	16,5%
Superficie productiva (ha)	1.181.908	32,9% del total
Disponibilidad total (m <sup>3</sup> /año)	6.075.006	Considerando una productividad de 5,14 m <sup>3</sup> /ha/año
<b>Residuo total potencial(m<sup>3</sup>)</b>	<b>4.252.504</b>	<b>Asumiendo corta anual de 5,14 m<sup>3</sup>/ha/año y residuos en la extracción del 70%</b>

La cantidad de residuos totales de lenga para el país se estimó en 4.252.504 m<sup>3</sup> ssc (m<sup>3</sup> sólidos sin corteza). Sin embargo, se espera que la superficie intervenida anualmente aumente mediante un eficiente manejo silvicultural. En la región de Magallanes se intervienen 2 mil ha/año, lo que equivale a casi 1 millón de m<sup>3</sup> de residuos y se ha pronosticado que de aumentar a 5 mil ha/año, los residuos llegarían a 3 millones de m<sup>3</sup> sólo para esta región (Schmidt, 2008; García *et al.*, 2009). Además, de las 5 mil ha/año de la

corta de regeneración, se podrían cosechar 5 mil ha/año de corta final y 15 mil ha/año de raleo (Schmidt, 2008), por lo tanto, la cantidad de residuos aumentaría, lográndose destinar su uso a la generación de combustibles de segunda generación, disminuyendo la contaminación atmosférica por el uso de este material como leña ilegal.

**Cuadro 7. Producción y residuos de lenga en el año 2007.**

Producción madera aserrada 2007 (m <sup>3</sup> )	54.200	Rendimiento aserradero: 30%
Trozas que ingresan al aserradero (m <sup>3</sup> )	180.667	
Residuos aserradero (m <sup>3</sup> )	126.467	70% de las trozas al aserradero
Extracción bosque (m <sup>3</sup> )	602.222	
Residuos bosque (m <sup>3</sup> )	421.556	70% de la extracción bosque
<b>Residuo total (m<sup>3</sup>)</b>	<b>548.022</b>	

Según el Cuadro 7, el año 2007 hubo un residuo industrial estimado en 548.022 m<sup>3</sup>, los cuales no tienen un uso formalmente establecido. Ese año se cosecharon unos 181 mil m<sup>3</sup> en trozas de lenga, equivalentes aproximadamente a 83.984 ton considerando una densidad básica de 464 kg/m<sup>3</sup> (Labarthê, 2005). Los residuos generados en el proceso de aserrío se estimaron en 126.467 m<sup>3</sup>, mientras que en la extracción desde el bosque se estimó un residuo de 421.556 m<sup>3</sup>, totalizando 548.022 m<sup>3</sup>, equivalentes a 254 mil ton residuales.

Las estimaciones expuestas permitieron determinar que un 90% de la madera de lenga cosechada corresponde a desechos. Schmidt (2008), reportó para la XII región una cifra superior, indicando que los desechos son del orden de 95%. Por lo tanto, existe material residual disponible para la producción de bioetanol.

A pesar de existir el potencial antes descrito, el principal uso de una buena parte de los residuos de lenga, y en general del bosque nativo, es para calefacción. Según el consumo industrial de madera del año 2007, el 27% se utilizó como leña, y de esta cifra el 63% correspondió a madera del bosque nativo (Anexo VIII). Un estudio indica que en las ciudades de Coyhaique y Puerto Aysén existe un consumo total de leña de 289.365 m<sup>3</sup> ssc, donde la lenga tiene una participación de 71% (INFOR, 2004). El uso alternativo es un aspecto que debe ser considerado al momento de evaluar económicamente la producción de bioetanol a partir de lenga, o en términos más generales, de bosque nativo.

### 3.4. Estimación de la producción de bioetanol.

La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares a alcohol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). La teoría en la que se basa esta transformación se presenta en el Anexo VI. En éste se habla de un rendimiento teórico, equivalente a un 100%, y de un rendimiento experimental, expresado como porcentaje del teórico.

Los resultados estimativos se presentan en el Cuadro 8 y se determinaron basándose en el mejor tratamiento, que correspondió al pretratamiento de los residuos de lenga con *Ganoderma* sp durante 60 días, con el cual se obtuvieron aproximadamente 12 gramos de glucosa por cada 100 gramos de residuos secos pretratados.

**Cuadro 8. Estimación teórica de la producción de bioetanol a partir de residuos de lenga pretratados con *Ganoderma* sp durante 60 días.**

Pretratamiento fúngico seleccionado	Glucosa (g/kg)	Etanol teórico (g/kg) <sup>(1)</sup>	Etanol teórico (L/ton) <sup>(2)</sup>
<i>Ganoderma applanatum</i> (60 días)	<b>120</b>	<b>61,32</b>	<b>77,69</b>

<sup>(1)</sup>: 0,511 g etanol cada 1 g de glucosa

<sup>(2)</sup>: considerando una densidad del etanol de 0,7893 g/ml

De acuerdo a lo expuesto en el Cuadro 8, se obtienen 120 gramos de glucosa por cada kilogramo de residuos secos de lenga, sometidos a la acción del hongo *Ganoderma applanatum* durante 60 días, equivalentes a aproximadamente 78 litros de bioetanol puro por cada tonelada seca de residuos de lenga.

Si se consideran los residuos generados durante el año 2007 (Cuadro 7) y el rendimiento teórico de 78 L/ton, de las 254 mil toneladas estimadas se obtendrían unos 19,8 millones de litros de etanol puro o 19,8 mil m<sup>3</sup>, equivalentes a un 33% y 13% de la gasolina que debe ser sustituida según el reemplazo autorizado en Chile, 2% y 5% de sustitución, respectivamente (CNE, 2008).

Por otro lado, considerando el residuo potencial (Cuadro 8), equivalentes a 1,9 millones de toneladas, y el rendimiento teórico de 78 L/ton, podrían obtenerse 153 mil m<sup>3</sup> de bioetanol puro, satisfaciendo el 5% de sustitución de gasolina de 93 octanos consumida por el sector transporte el año 2007 (CNE, 2008).

Sin embargo, durante la producción de etanol no sólo se generaría este biocombustible, sino que además una serie de productos químicos secundarios con diversos usos en otras industrias, tales como preservantes, fertilizantes, desinfectantes, vitaminas, resinas, plásticos biodegradables, entre otros, los cuales deben ser utilizados de manera de que la industria sea más eficiente y sustentable. Junto con esto, también se debe considerar la ubicación de la planta industrial y el abastecimiento de los residuos lignocelulósicos (Renewable Energy World, 2008).

#### 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se discuten aquellos factores que pueden estar influyendo en cada una de las variables del estudio y, consecuentemente, en la producción teórica de bioetanol.

En cuanto a la pérdida de peso para *Ganoderma applanatum*, Bodadilla *et al.* (2005) realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la durabilidad de la madera de *Melia azederach* y *Pawlonia tomentosa*, sometidas a tres meses de ataque fúngico con *Ganoderma applanatum*, determinándose pérdidas de peso de 25,72% y 29,51%, respectivamente. En el presente estudio se obtuvo una pérdida de peso en ese rango transcurridos dos meses (Figura 2), lo cual implicaría que esta especie fúngica se comporta de manera similar que en estas especies de latifoliadas estudiadas.

Por otra parte, se ha descrito que los HPB presentan dos patrones morfológicos de degradación: una degradación simultánea, en la cual la celulosa, hemicelulosa y lignina son removidas más o menos en forma paralela, y una deslignificación selectiva, en la cual la lignina y la hemicelulosa son removidas antes que la celulosa (Blanchette, 1991; Kirk y Cullen, 1998; Martínez *et al.*, 2005). La degradación simultánea se asocia a madera de latifoliadas, mientras que el patrón selectivo a latifoliadas y coníferas (Martínez *et al.*, 2005), por lo cual se podría pensar que los HPB utilizados en el presente estudio, especialmente *Stereum hirsutum*, además de degradar la lignina, comienzan a utilizar los azúcares disponibles, con la consiguiente disminución en el rendimiento de éstos.

La información recopilada por Martínez *et al.* (2005), define a *Ganoderma australe* como un hongo selectivo respecto a su ataque a la lignina, mientras que Blanchette (1991) recopiló información que demuestra la selectividad del hongo *Ganoderma applanatum* frente a este compuesto. Según esto, entonces, el hongo *Ganoderma applanatum* utilizado en el presente estudio habría presentado el mismo patrón, degradando de manera selectiva la lignina y la hemicelulosa antes que la celulosa, obteniéndose así los mejores rendimientos en azúcares reductores (Figura 3) y glucosa (Figura 4). Ahora bien, si la cepa de *Ganoderma* utilizada presenta un patrón selectivo frente a la lignina y hemicelulosa, esta última resultaría hidrolizada y existiría xilosa que no está siendo cuantificada, la que podría ser fermentada aumentando la cantidad de bioetanol factible de producir a partir de residuos de lenga.

Ciertamente, el mecanismo o patrón de degradación dependerá del sustrato. Se ha observado que la especie *Ganoderma applanatum* degrada selectivamente la madera de *Nothofagus dombeyi*, mientras que lo hace de manera simultánea en *Laurelia phillipiana* (Blanchette, 1991). Por lo tanto, ya que la lenga pertenece al género *Nothofagus* y fue pretratada con *Ganoderma applanatum* se esperaría que en el presente estudio este hongo haya degradado selectivamente, arrojando así las mayores concentraciones de azúcares (Figuras 3 y 4).

Yu *et al.* (2009) estudiaron el efecto de un hongo selectivo sobre madera de sauce y abeto chino y concluyeron que los rendimientos en la tasa de hidrólisis enzimática se mejoran, además demostraron que la selectividad es un factor importante en la biodegradación de la madera.

En cuanto a las enzimas involucradas en el proceso de degradación de la madera, se ha descrito que *Ganoderma applanatum* presenta depósitos de manganeso, es decir, secreta mayoritariamente la enzima manganeso peróxidasa en su actividad deslignificante (Blanchette, 1984), mientras que *Stereum hirsutum*, como ya se mencionó, presenta una mayor actividad de lacasas. Sería importante aclarar las diferencias entre estas enzimas de manera de comprender mejor la selectividad en la degradación y su impacto en la posterior hidrólisis y obtención de bioetanol

Con la información recopilada para *Aurantioporus albidus*, sólo se logró establecer que se trata de un hongo frecuente en los bosques de lenga. Rajchenberg (1996) estudió los hongos que afectan a esta especie forestal, y concluyó que esta cepa fúngica es la segunda más común causante de la pudrición blanca en el duramen. A pesar de ello, no se encontraron estudios acerca de la acción de este hongo sobre lenga. El presente trabajo demuestra que, pese a tener pérdidas de peso menores que *S. hirsutum* (Figura 2), se logró obtener una mayor cantidad de azúcares reductores (Figura 3) y glucosa (Figura 4) en comparación con *S. hirsutum*, lo que estaría indicando que *A. albidus* posee un mecanismo enzimático selectivo al igual que *G. applanatum*.

Es preciso señalar que el objetivo general de cualquier tipo de pretratamiento es dejar más accesible la celulosa para la posterior etapa de hidrólisis, logrando aumentar el rendimiento de azúcares reductores y glucosa. El pretratamiento fúngico utilizado en el presente estudio se perfilaría como un método más amigable con el medio ambiente y menos costoso, ya que no requeriría instalaciones complejas ni grandes equipos. Además, existen estudios que combinan un pretratamiento biológico con otro, obteniéndose así mejores rendimientos y reducción de energía. Por lo tanto, se esperaría que los rendimientos obtenidos mejoraran.

Lo anterior fue demostrado por Itoh *et al.* (2003) quienes lograron aumentar la productividad de etanol al utilizar un pretratamiento biológico con *Ceriporiopsis subvermispora* luego de 4 semanas, seguido de un proceso de etanólisis. El propósito del pretratamiento biológico con HPB fue reducir la energía de entrada requerida para la separación de los componentes estructurales de la madera antes de la etanólisis, logrando una reducción de un 15%.

Por su parte, Yu *et al.* (2009) concluyeron que los rendimientos en la tasa de hidrólisis enzimática se mejoran al combinar un pretratamiento biológico con uno físico y químico. Lee *et al.* (2007) estudiaron el efecto del pretratamiento biológico en madera de *Pinus densiflora* sometido al ataque de *Stereum hirsutum* durante 8 semanas, y lograron aumentar el rendimiento de azúcares en un 21% con respecto a la muestra control, concluyendo que las enzimas extracelulares de este hongo poseen una alta actividad de ligninasas, especialmente lacasas (Mouso *et al.*, 2007), y baja actividad de celulasas, por lo tanto, fue considerado como un efectivo y potencial hongo para el pretratamiento biológico. Por el contrario, en el presente estudio no se observa este comportamiento, obteniéndose con este

hongo los rendimientos en azúcares más bajos (Figuras 3 y 4), por lo que *Stereum hirsutum* pareciera ser un hongo efectivo en el pretratamiento de madera de coníferas y no de latifoliadas como la lenga. Como se sabe, la lignina es un componente que se encuentra en mayor proporción en coníferas que en latifoliadas (Tahezadeh y Karimi, 2008) y, en el caso de los residuos de lenga sin pretratamiento, se observó un valor de 16,8%<sup>1</sup>, por lo que, la actividad de ligninasas de *Stereum hirsutum* pudo resultar poco significativa y/o el hongo tal vez esté consumiendo azúcares para su desarrollo, con la consiguiente baja en la cantidad de azúcares liberados.

En términos de producción experimental de bioetanol, Ballesteros *et al.* (2004) obtuvieron 17 g/L y 19 g/L de etanol a partir de eucalipto y álamo, respectivamente, utilizando un pretratamiento de explosión a vapor y el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), mientras que en este estudio sólo se logró una concentración máxima teórica de 6,13 g/L.

Con la acción combinada de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus* sobre aserrín (residuos de la industria forestal) durante 45 días, Lopretti *et al.* (2007) obtuvieron 13 g/L de azúcares reductores, valor similar a lo que se obtuvo en este estudio con la cepa de *Aurantioporus albidus* para los tres tiempos de ataque.

Según la información adjunta en el Anexo VII, es posible apreciar que los pretratamientos físicos y químicos aumentan el rendimiento en la producción de etanol en comparación con el fúngico utilizado en el presente estudio. La mayor concentración de etanol obtenida experimentalmente a partir de álamo sometido a un pretratamiento con ácido sulfúrico corresponde a 45,7 g/L, equivalente a un 94% del teórico, mientras que en este estudio se logró una concentración teórica de 6,13 g/L. Además, actualmente se estudian los procesos de hidrólisis y fermentación simultáneas (proceso SSF), con lo cual se mejoran los rendimientos.

Si bien el pretratamiento tiene ventajas ambientales y mejora la obtención de bioetanol en comparación con aquel material sin pretratar, no logran, según las condiciones de este estudio, obtenerse rendimientos similares a los obtenidos con otros pretratamientos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las investigaciones a nivel mundial van dirigidas a combinar distintos tipos de pretratamientos y utilizar procesos SSF, aumentándose así los rendimientos. Por otro lado, el pretratamiento debe ser optimizado y para esto es necesario evaluar cada una de las variables a distintos niveles.

Algunos factores importantes que pueden influir en las bajas concentraciones de azúcares obtenidas en el presente estudio en comparación con otros son: la carga enzimática, la concentración de sustrato, el tamaño de las partículas, el sinergismo de las celulasas y las condiciones de agitación y tiempo en la etapa de hidrólisis, las cuales son discutidas a continuación.

La carga enzimática es una variable decisiva en la producción de bioetanol a partir de una sacarificación o hidrólisis enzimática, ya que un aumento de la enzima implica mayores costos de producción, por lo que la cantidad aplicada debe ser reducida al máximo. En este

---

<sup>1</sup> Comunicación personal, profesor René Carmona, Ing. Forestal

estudio se utilizó una carga enzimática de 25 FPIU/g seco de “pin-chips” de lenga. Chen *et al.* (2008) estudiaron cinco niveles de dosificación, determinando que existe un aumento en la cantidad de azúcares reductores y productividad de la hidrólisis al aumentar de 10 a 20 FPIU/g, y que no existen diferencias entre 20 y 30 FPIU/g, es decir usar 20 FPIU/g seco sería el óptimo. Sin embargo, Kristensen *et al.* (2009) recomiendan utilizar una carga de 10 FPIU/g seco. Por lo tanto, la carga enzimática utilizada en el presente estudio, además de encarecer el proceso, podría estar generando inhibidores, tales como derivados furanos y ácidos, influyendo en la digestibilidad de los residuos por parte de las celulasas empleadas, saturando el medio de reacción y disminuyendo la tasa de hidrólisis.

La concentración de sustrato tiene mayor influencia cuando la hidrólisis y la fermentación se realizan mediante el proceso SSF. Sin embargo, una alta concentración de sustrato puede ocasionar una inhibición de la enzima con la consiguiente disminución de la tasa de hidrólisis. Según se indica en el Anexo VII, el rango de concentración de sólidos (o de sustrato) varía entre 6% y 12%, siendo frecuente la utilización de un 10% p/v. Chen *et al.* (2007) concluyeron que la concentración óptima de sustrato corresponde al 10% p/v, y determinaron que el aumento en la concentración involucra un aumento en la cantidad de azúcares reductores, pero la productividad de la hidrólisis disminuye. Hoyer *et al.* (2008) también obtuvieron el mejor rendimiento de etanol utilizando un 10% de sustrato, en contraste con Kristensen *et al.* (2009), quienes obtuvieron el mejor rendimiento de etanol al usar una concentración de 5%. Por consiguiente, la concentración utilizada en ese estudio pareciera ser la apropiada, ya que los investigadores antes mencionados no recomiendan más de un 12%. Sin embargo, es aconsejable estudiar concentraciones de sustrato más bajas, con el fin de disminuir la carga enzimática y disminuir los costos asociados a este ítem.

En el presente estudio, se adecuaron las astillas de madera de lenga a una granulometría determinada, sin embargo, en diversos estudios es común el uso de partículas aún más pequeñas. Esto tiene directa relación con la obtención de azúcares, ya que se ha demostrado que mientras menor sea el tamaño de la partícula, mejor es el acceso de las celulasas (Taherzadeh y Karimi, 2008). No obstante, al incluir un proceso de molienda, se está incluyendo también un tipo de pretratamiento físico.

El tiempo de duración de la hidrólisis, así como la velocidad de la agitación, son variables que deben ser investigadas. La primera influye en el área superficial de las partículas del sustrato, ya que ésta cambia durante el proceso, siendo la tasa de hidrólisis alta al principio para luego disminuir conforme transcurre el tiempo (Taherzadeh y Karimi, 2008). Chen *et al.* (2008) obtuvieron un aumento en la cantidad de azúcares reductores conforme el tiempo varía desde 12 a 60 horas, sin embargo, la máxima producción de etanol se alcanzó a las 18 hr, ya que al aumentar el tiempo aparecían inhibidores en la etapa de fermentación. En cuanto a la velocidad de agitación, medida en rpm, en el presente estudio se utilizaron 250 rpm. Hoyer *et al.* (2008) determinaron que al aumentar la velocidad de agitación desde 200 rpm a 700 rpm, se aumenta la producción de etanol desde un 84,6% a 95,8%.

Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, no sólo se obtienen los azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa, sino que se originan además una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores

potenciales de la hidrólisis y posterior fermentación (Pérez *et al.*, 2002; Oliva, 2003; Sánchez y Cardona, 2005; Taherzadeh y Karimi, 2008; Kristensen *et al.*, 2009). De acuerdo a lo anterior, es posible que los inhibidores afectarán el rendimiento de azúcares, con la consiguiente baja en la cantidad de azúcares obtenidos en este estudio (Figuras 3 y 4).

Los posibles inhibidores generados por el pretratamiento son ácidos alifáticos, productos de degradación de azúcares y compuestos aromáticos de la degradación de la lignina (Lopretti *et al.*, 2007) originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Se trata de un grupo de compuestos muy heterogéneo, que se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros y polímeros con una gran variedad de sustituyentes. Entre ellos, se encuentran ácidos, aldehídos y alcoholes aromáticos (Larsson, 2000, citado por Oliva, 2003).

Por otra parte, la hidrólisis de la hemicelulosa genera azúcares monoméricos y ácido acético (Pérez *et al.*, 2002), sin embargo, no se encontró evidencia bibliográfica que indique que el ácido acético influye en la digestibilidad de las enzimas (Nigam, 2001). Además no se sabe si en el presente estudio existió o no una hidrólisis de la hemicelulosa, por lo que el efecto inhibitor de este componente estructural no está claro.

Se ha demostrado que los extraíbles, a pesar de su baja concentración, también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en el pretratamiento biológico y posterior fermentación de los hidrolizados procedentes de materiales lignocelulósicos (Oliva, 2003). La determinación de estos componentes debería realizarse antes y después del pretratamiento biológico y luego de la sacarificación de manera de conocer la degradación que sufren y su posible efecto inhibitor.

Existen estudios contradictorios en cuanto a la inhibición de ciertas sustancias. Hoyer *et al.* (2008) señalan, en su estudio con *Picea* sp, que los inhibidores de la hidrólisis enzimática y fermentación forman un proceso complejo que involucra principalmente derivados furano, tales como furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), y los ácidos fórmico y levulínico, al contrario, Mes-Hartree y Saddler (1983) demostraron que el furfural no es un inhibidor de la hidrólisis enzimática. Por otra parte, Mes-Hartree y Sadler (1983), y Dekker (1988), encontraron que la enzima  $\beta$ -glucosidasa de *Trichoderma reesei* es inhibida por algunas sustancias presentes en el material luego del pretratamiento, probablemente por productos de la degradación de la lignina. Además, Dekker (1988) determinó que tal inhibición puede evitarse mediante la adición de Novozyme 188, lo que significa que el efecto de esta inhibición no ocurrió en el presente estudio. A su vez, el mismo autor determinó que las celulasas no son inhibidas durante la hidrólisis enzimática.

Los inhibidores parecieran ser un tema no menor, por lo que su estudio es muy importante (Lopretti *et al.*, 2007). Según las condiciones utilizadas en este estudio, no es posible conocer el efecto real que pueden estar provocando dichos componentes.

Por otro parte, la hemicelulosa se presenta como una barrera física que rodea a las fibras celulósicas y puede protegerlas del ataque enzimático. El pretratamiento fúngico tiene por objetivo remover la lignina, pero no se sabe qué ocurre con la hemicelulosa, por lo que los HPB utilizados podrían no estar siendo totalmente efectivos en la degradación de ese componente, a pesar de que los patrones morfológicos de degradación descritos

anteriormente suponen una degradación de ésta. En un estudio realizado sobre madera de *Picea* sp, Itoh *et al.* (2003) concluyeron que el pretratamiento fúngico permite la liberación de la xilosa presente en la hemicelulosa.

Así como en la etapa de hidrólisis de la celulosa se generan principalmente unidades de D-glucosa, en la hidrólisis de la hemicelulosa se producen una mezcla de azúcares que son básicamente unidades de D-xilosa (generalmente el azúcar más abundante), D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido D-galacturónico, ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurónico y también algunos productos oxidativos como los acetatos (Pérez *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2008 y Kumar *et al.*, 2009). La xilosa se presenta más abundante en latifoliadas que en coníferas (Tahezadeh y Karimi, 2008), por lo tanto, se esperaría que en los residuos de lenga pretratados exista dicho componente.

Existen estudios que indican que la hemicelulosa es un polímero fácilmente hidrolizable (Kumar *et al.*, 2009), ya que presentaría sólo regiones amorfas (Pereira *et al.*, 2008), pero que se requieren enzimas específicas para su depolimerización, tales como xilano esterasas, ferúlico y p-cumárico esterasas,  $\alpha$ -l-arabinofuranosidasas, y  $\alpha$ -4-O-metilglucuronosidasas, que actúen sinérgicamente de manera de hidrolizarla eficientemente (Pérez *et al.*, 2002).

Según Pereira *et al.* (2008), las celulasas comerciales utilizadas en el presente estudio y obtenidas del hongo *Trichoderma reesei* poseen baja actividad sobre hemicelulosa, por lo que no existiría una completa y adecuada conversión a azúcares monoméricos. Esto explicaría el casi 53% de azúcares reductores desconocidos que se obtienen al pretratar los residuos de lenga con *Ganoderma applanatum* durante 60 días (Figura 5).

Debido a que en el presente estudio sólo se determinó la cantidad de glucosa contenida en el hidrolizado de los residuos de lenga, sería conveniente averiguar qué ocurre con la xilosa, a través de un análisis químico de los azúcares, antes y después de la hidrólisis enzimática, además de cuantificar la cantidad de xilosa liberada tanto en la etapa de pretratamiento como en la hidrólisis y comprobar lo descrito anteriormente utilizando enzimas comerciales capaces de hidrolizar la hemicelulosa de manera más completa. De esta forma se incrementarían los rendimientos de azúcares fermentables y los residuos de lenga se convertirían en un material más atractivo para la producción de bioetanol de segunda generación en el país.

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos y discutidos en el presente estudio se derivan las siguientes conclusiones:

El pretratamiento fúngico mejora la obtención de azúcares reductores y de glucosa a partir de residuos de lenga, en comparación con las muestras sin pretratar.

La mayor cantidad de azúcares reductores y de glucosa se obtiene al pretratar los residuos de lenga durante 60 días con el hongo *Ganoderma applanatum*, obteniéndose un rendimiento del 12%.

*Ganoderma applanatum* mejora la obtención de azúcares reductores en 4 veces a los 30 días, en 4,5 veces a los 45 días y 4,8 veces a los 60 días, en comparación con la muestra control. Además, la obtención de glucosa mejoró en 3,7 veces a los 30 días, 4,8 veces a los 45 días y casi 7,0 veces a los 60 días, en comparación con la muestra control.

Con *Aurantioporus albidus* se alcanza un máximo de 2,8 veces para azúcares reductores a los 60 días, en comparación con la muestra control. Se mejora, además la obtención de glucosa en 3,8 veces a los 60 días, en comparación con la muestra control.

Con el hongo *Stereum hirsutum* se obtienen los rendimientos más bajos, alcanzándose un máximo de 2,5 veces para los azúcares reductores y 3,3 veces para la glucosa a los 60 días, en comparación con la muestra control.

Según el análisis estadístico, la cepa fúngica presenta diferencias significativas para las variables respuesta pérdida de peso, concentración de azúcares reductores y concentración de glucosa. Los tiempos estudiados influyen en la pérdida de peso y en la concentración de glucosa. Además, la pérdida de peso se correlaciona positivamente con la concentración de azúcares reductores y glucosa. Es decir, a mayor tiempo de ataque mayor fue la pérdida de peso y mayor fue la cantidad de glucosa obtenible.

De acuerdo a las variables y condiciones utilizadas en este estudio, la estimación de la producción de bioetanol a partir de residuos de lenga, indica que podrían obtenerse casi 78 litros de etanol puro por cada tonelada de material seco pretratado.

Al considerar como residuos disponibles para la producción de bioetanol de segunda generación los residuos generados durante los procesos productivos de lenga del año 2007, sería posible producir 19,8 millones de litros de etanol de segunda generación, satisfaciendo un 33% de la gasolina que debe ser reemplazada en Chile (2%).

El pretratamiento utilizado mejora la obtención de bioetanol, sin embargo las concentraciones son inferiores a las obtenidas con otros pretratamientos.

## 6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a lo discutido se hacen algunas recomendaciones derivadas del presente estudio.

Es necesario realizar un análisis químico que permita conocer de qué manera se ven modificados los residuos de lenga en las etapas de pretratamiento fúngico e hidrólisis enzimática.

Las variables del estudio, tales como, la carga enzimática, la concentración de sustrato, el tiempo y temperatura de agitación, pH y tamaño de la partícula, deben ser analizadas a través diferentes niveles para cada una de ellas, optimizando el pretratamiento.

Se debe cuantificar la cantidad de xilosa presente en el hidrolizado, ya que así se aumentarían los rendimientos, proporcionándole mayor atractivo a la industria del bioetanol de segunda generación.

La etapa de fermentación debe realizarse de manera simultánea o por separado, de modo de obtener experimentalmente la cantidad de bioetanol resultante y analizar qué ocurre con los inhibidores de esa etapa y el efecto que tuvieron los de la etapa anterior.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, E. 2006. Bioenergía y medioambiente. Un círculo virtuoso. En: ACEVEDO, E. Agroenergía, un desafío para Chile. Santiago, Universidad de Chile, Serie Ciencias Agronómicas N° 11. pp. 63-72.

Almada, M. 2006. Análisis de la producción de materias primas para la elaboración de bioetanol y biodiésel y de estos biocombustibles presente y esperada hasta 2020 en países potencialmente proveedores de Chile [en línea]. Santiago, Chile.  
<<http://www.odepa.gob.cl/>> [consulta: 3 marzo 2008].

Armijo, F. 2006. Etanol. En: ACEVEDO, E. Agroenergía, un desafío para Chile. Santiago, Universidad de Chile, Serie Ciencias Agronómicas N° 11. pp. 63-72.

Ballesteros, M.; Oliva, J.M.; Negro, M.J.; Manzanares, P. y Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry. 39: 1843-1848.

Blanchette, R. 1984. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. Applied and Environmental Microbiology. 647-653.

Blanchette, R. 1991. Delignification by Wood decay fungi. Annual review phytopathology, 29: 381-398.

Bobadilla, E.; Pereyra, O.; Silva, F. y Stehr A. 2005. Durabilidad natural de la madera de dos especies aptas para la industria de la construcción [en línea]  
<<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/viewFile/5192/3904>> [consulta: 20 mayo 2009].

Canavos, G. 1988. Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y métodos. México, McGraw-Hill. 651p.

Chávez, R. 2002. Rendimiento de trozas y crecimiento en un renoval raleado de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser) en Tierra del Fuego XII Región. Memoria Ingeniería Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.

Chen, M.; Xia, L. y Xue, P. 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. International Biodeterioration and Biodegradation, 59: 85-89.

Chile se expone a sanciones comerciales si elevan emisiones de CO<sub>2</sub>. Estrategia, Santiago, Chile, 13 enero, 2009.

CNE, 2008. Anuario “Estadísticas Sector Energía en Chile” [en línea] <<http://www.cne.cl/>> [Consulta: 6 enero 2009].

Cruz, P.; Honeyman, P.; Pezo, A. y Schulze, C. 2007. Análisis de crecimiento de árboles maduros de lenga (*Nothofagus pumilio*) en bosque de la XII región, Chile. *Bosque* 28(1): 18-24.

Dekker, R. 1988. Inhibitors of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase activity derived from autohydrolysis-exploded *Eucalyptus regnans*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 29: 593-598.

Donoso, S. y Caldentey, J. 1996. Rendimiento de lenga (*Nothofagus pumilio*) en el aserradero y su relación con las características de los árboles. *Ciencias forestales*, 11(1-2).  
FAO, 2008. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2008. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades [en línea]. Roma, Italia. <<http://www.fao.org>> [consulta: 10 octubre 2008].

García, A.; Hyvärinen, S.; Carmona, R.; Lienqueo, M. y Salazar, O. 2009. Enfoque cromatográfico aplicado al pretratamiento de lignocelulosas para prospectar la producción de bioetanol. En: II Congreso Latinoamericano de Bio-refinerías, mayo 2009, Concepción, Chile.

Ghose T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59 (2): 257-268.

Hackenberg, N. 2008. Biocombustibles de Segunda Generación. *Revista Virtual* [en línea] <<http://revistavirtual.redesma.org/vol4/articulo3.php?id=c1>> [Consulta: 6 enero 2009].

Hoyer, K.; Galbe, M. y Zacchi, G. 2008. Production of fuel ethanol from softwood by simultaneous saccharification and fermentation at high dry matter content. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, 84: 570-577.

INFOR, 2004. Propuesta de una metodología para el estudio de la demanda de leña en Coyhaique y Puerto Aysén. Santiago, Chile.

INFOR. 2008a. Anuario Forestal 2008. Boletín estadístico 121. Santiago, Chile.

INFOR, 2008b. El sector forestal chileno 2008. Santiago, Chile.

Itoh, H.; Wada, M.; Honda, Y.; Kuwahara, M. y Watanabe, T. 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 103: 273-280.

Kirk, T.K. y Cullen, D.1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En: YOUNG, R. y AKHTAR, M. (Eds.). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley & Sons, Inc. 1998. pp. 273-307.

Knoll, K.; West, B.; Clark, W.; Graves, R.; Orban, J.; Przesmitzki, S. y Theiss, T. 2009. Effects of intermediate ethanol blends on legacy vehicles and small non-road engines, Report 1 – Updated [en línea]<<http://www.nrel.gov>> [consulta: 20 marzo, 2009]

Kristensen, J.; Felby, C. y Jorgensen, H. 2009. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology and biofuels*, 2(11):1-10.

Kumar, P.; Barrett, D.; Delwiche, M. y Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosics biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Engineering Chemistry Resource* 48: 3713-3729.

Labarthê, F. 2005. Efecto de la tasa de crecimiento en las propiedades mecánicas de lenga en un renoval en Tierra del Fuego. Memoria Ingeniería de la Madera. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.

Lee, J.; Gwak, K.; Park, J.; Park, M.; Choi, D.; Kwon, M. y Choi, I. 2007. Biological Pretreatment of Softwood *Pinus densiflora* by Three White Rot Fungi. *The Journal of Microbiology* 45(6): 485-491.

Lopretti, M.; López, A.; Rey, F.; Ottati, C. y Damboriarena, A. 2007. Implementación de una línea de evaluación para subproductos agroindustriales como sustrato para la producción de bioetanol. Presacarificación-sacarificación/fermentación simultánea [en línea]. Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay 2: 15-18  
<[http://latu21.latu.org.uy/es/docs/revista\\_inntec\\_2\\_2007.pdf](http://latu21.latu.org.uy/es/docs/revista_inntec_2_2007.pdf)> [Consulta: 20 enero 2009].

Manosalva, L., 1995. Antecedentes dendrométricos básicos de un rodal de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp et Endl. Krasser), en el sector Cerro la Virgen, XI Región. Memoria de Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. 69 p.

Martínez, A.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M.; Gutiérrez, A. y del Río, J. 2005. Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.

Mes-Hartree, M. y Saddler, JN. 1993. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology Letters*, 5: 531-536.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428, marzo.

Mouso, N.; Diorio, L. y Forchiassin, F. 2007. Acción de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 294-298.

Negro, M. 1991. Degradación enzimática de la biomasa de *Onopordum nervosum* Bois. Tesis doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia [en línea] <<http://www.ucm.es/prints/3599>> [consulta: 15 septiembre 2007].

Nigam, J.N. 2001. Etanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 145-150

ODEPA, 2007. Comité público-privado de Bioenergía, Informe Final. Ministerio de Agricultura. Departamento de Políticas Agrarias, Unidad de Bioenergía [en línea]. Santiago, Chile. <<http://www.odepa.gob.cl/>> [consulta: 3 marzo 2008].

Oliva, J. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión a vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III [en línea] <<http://www.ucm.es/eprints/4804>> [consulta: 10 septiembre 2007].

Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. 2008. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(7): 1-14, mayo.

OPEP. 2007. Annual Statistical Bulletin [en línea]<<http://www.opec.org>> [consulta: 5 enero 2009].

Ostle, B. 1965. Estadística Aplicada: técnicas de la estadística moderna, cuándo y dónde aplicarlas. México, Editorial Limusa, 1965. 629 p.

Pereira, N.; Peixoto, M. y Melo, L. 2008. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Series on Biotechnology vol 2. 1ª edición. Río de Janeiro, Brasil, 47p.

Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T. y Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5: 53-63.

Poniachik, K. 2006. Biocombustibles, un aporte para la seguridad energética. En: SEMINARIO INTERNACIONAL Agroenergía y Biocombustibles: 27 julio de 2006. Santiago, Chile.

Rajchenberg, M. 1996. Los hongos pudridores de *Nothofagus pumilio* (lenga): identificación de los cultivos puros. *Bosque*, 17(2): 87-100.

Renewable Energy World [en línea] <<http://www.renewableenergyworld.com>> [consulta: 10 octubre 2008]

Salazar, O.; Basso, C., Barba, P.; Orellana, C. y Asenjo, J.A. 2006. Improvement of the lytic properties of a Beta-1,3-glucanase by direct evolution. *Molecular Biotechnology*. 33, 211-220.

Sánchez, O. y Cardona, C. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante II: integración de procesos [en línea]. *Interciencia*, 30 (11) <<http://www.scielo.org>> [consulta: 3 marzo 2008].

Schmidt, H. 2008. Manejo silvícola en los bosques de lenga en Magallanes. En: Seminario CORMA, 14 noviembre 2008.

Schmidt, H. y Caldentey, J., 2001. Seguimiento forestal y ambiental del uso de los bosques de lenga XII Región. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. Corporación Nacional Forestal XII Región. Intendencia de la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Santiago, Chile. 92 p.

Schmidt, H.; Caldentey, J. y Gaertig, T. 1992. Análisis silvicultural de los ensayos. XII Región. Informe Lenga 1992. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Corporación Nacional Forestal XII Región. 37 p.

Schmidt, H.; Cruz, G.; Promis, A. y Álvarez, M. 2003. Transformación de los bosques de lenga vírgenes e intervenidos a bosques manejados. Publicaciones misceláneas forestales N° 4. Santiago, Chile

Schmidt, H. y Urzúa, A. 1982. Transformación y manejo de los bosques de lenga en Magallanes. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales, Departamento de Silvicultura y Manejo. Santiago, Chile. Ciencias Agrícolas N° 11. 62 p.

Spitzer, J. y Jungmeier, G. 2006. Greenhouse gas emissions of bioenergy systems. European Conference on Bioenergy Research, Helsinki, 19-20 octubre 2006 [en línea] <[http://ec.europa.eu/research/energy/pdf/gp/gp\\_events/biorefinery/bs4\\_03\\_spitzer\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/research/energy/pdf/gp/gp_events/biorefinery/bs4_03_spitzer_en.pdf)> [Consulta: 6 enero 2009].

Taherzadeh, M. y Karimi, K. 2007. Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* 2(4): 707-738.

Taherzadeh, M. y Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International journal of molecular sciences*, 9: 1621-1651.

Vásquez, H. y Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Investigación y Tecnología*, 8(4): 249-259, mayo, 2007.

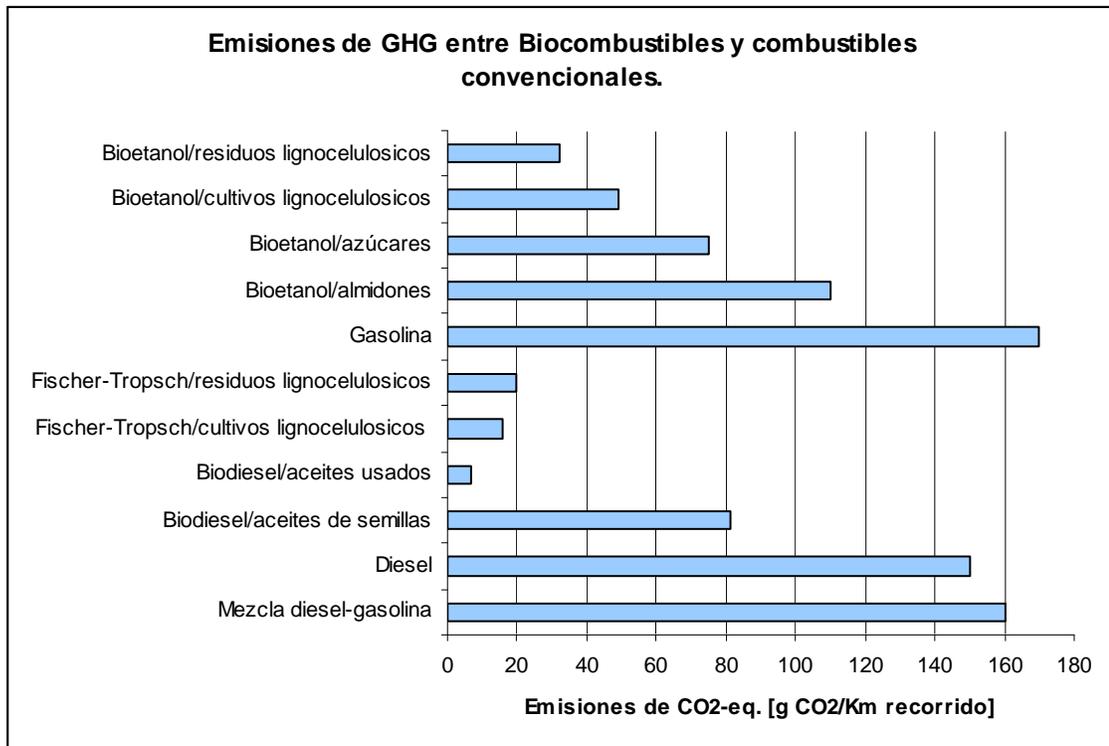
Yu, H.; Guo, G.; Zhang, X.; Yan, K. y Xu, C. 2009. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. *Bioresource Technology*, 100: 5170-5175.

Yu, J.; Zhang, J.; He, J.; Liu, Z. y Yu, Z. 2009. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*, 100: 903-908.

Zaid, L. 2004. Estudio del Biodeterioro en madera de *Eucalyptus globulus* por método gravimétrico. Memoria Ingeniería de la Madera. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.

## ANEXO I.

### Comparación de las emisiones de gases entre biocombustibles y combustibles convencionales.



Fuente: Spitzer, J., Jungmeier, G. 2006. Greenhouse gas emissions of bioenergy systems. European Conference on Bioenergy Research, Helsinki, 19-20 octubre 2006.

## ANEXO II.

### Mecanismo de acción de las celulasas y reacciones estequiométricas del proceso.

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por enzimas denominadas genéricamente celulasas, las cuales corresponden a una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta permite la degradación de la celulosa.

El sistema enzimático posee tres tipos diferentes de actividad, cuya denominación y mecanismo son los siguientes (Montenecourt y Eveleigh, 1979, citado por Oliva, 2003):

#### 1. Endo- $\beta$ -glucanasas (EG)

$\beta$  - (1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.4.)

#### 2. Exo- $\beta$ -glucanasas.

a.  $\beta$  -(1,4)-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.), Celobiohidrolasa (CBH)

b.  $\beta$  -(1,4)-glucanglucanohidrolasas (EC 3.2.1.74.), Glucohidrolasa (GGH)

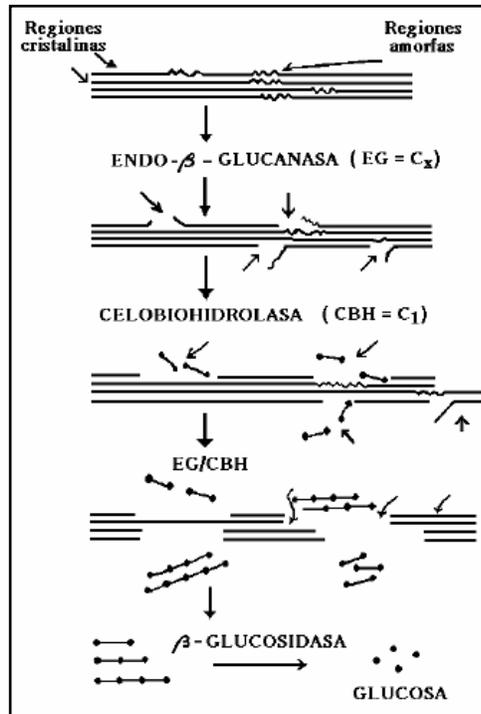
#### 3. $\beta$ - glucosidasa (EC 3.2.1.21.)

La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces  $\beta$ -(1,4) y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar sobre celodextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HMC), así como celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. Supone, aproximadamente un 20% del total de proteínas del complejo.

La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Este enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa, y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Este enzima constituye del 50-80% del complejo celulolítico.

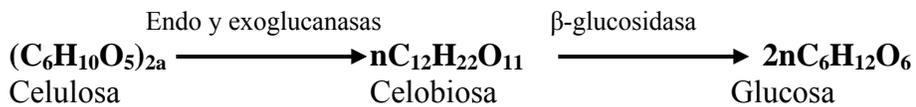
La glucohidrolasa se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celo-oligosacáridos y CMC.

La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que sobre las endo y exoglucanasas produciría la celobiosa si se acumulara en el medio de reacción. La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de acción de los diferentes tipos de actividad de las celulasas.

La acción del pretratamiento y de las celulasas involucra las siguientes reacciones:



### ANEXO III.

#### Determinación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).

##### Preparación del DNS:

Mezclar:	Agua destilada	1416 ml
	3,5-ácido dinitrosalicílico	10,6 g
	NaOH	19,8 g
Disolver bien y agregar:	Sal de Rochelle	306 g
	Fenol (fundido a 50°C)	7,6 ml
	Metabisulfito de sodio	8,3 g

Almacenar en frascos ámbar en lugar frío y seco.

##### Procedimiento para realizar curva de calibración:

- A partir de un stock de glucosa de concentración 4 (g/L) se preparan diluciones para hacer la curva patrón y agua como blanco.
- De cada dilución se toman 50 µL y se agregan 50 µL de DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Incubar a 100° C por 10 minutos.
- Enfriar en abundante hielo
- Leer absorbancia en lector de placas a 550 nm.
- Realizar curva de absorbancia versus concentración. Debe tener un coeficiente de correlación entre 0,991 y 0,999. El blanco se resta de las demás muestras.

##### Cálculo:

La cantidad de azúcares reductores obtenidos se calcula como sigue:

$$\text{Azúcares reductores} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra en estudio}} - c}{m}$$

Donde m es la pendiente de la curva y c es la intersección con el eje x.

## ANEXO IV.

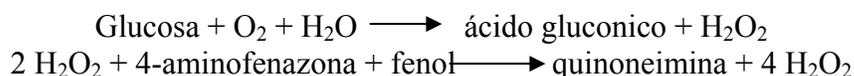
### Determinación de glucosa bajo procedimiento estándar.

Corresponde a una prueba enzimática colorimétrica por glucosa según Laboratorio Randox®, bajo el método GLUC-PAP. Se utiliza el ensayo sin desproteización.

#### Método:

La glucosa se determina después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y 4-aminofenazona formando un complejo rojo-violeta usando la quinoneimina como indicador.

#### Principio de la reacción:



#### Reactivos:

- Reactivo A:
  - Buffer fosfato (pH 7,5)
  - 4-aminofenazona
  - Fenol
  - Glucosa oxidasa
  - Peroxidasa
  - Mutarotasa
  - Estabilizantes

Reactivo B o sólo glucosa

#### Procedimiento:

Se presenta en el siguiente esquema:

	Macro		Semi Micro	
	Estándar o muestra	Blanco reactivo	Estándar o muestra	Blanco reactivo
Estándar o muestra	20 µl	---	10 µl	---
Reactivo A	2000 µl	2000 µl	1000 µl	1000 µl

Mezclar bien, incubar por 25 minutos a 15-25° C o 10 minutos a 37° C.

Medir la absorbancia del estándar y de las muestras contra el blanco del reactivo antes de 60 minutos.

#### Cálculo:

$$[ ] \text{ Glucosa} = \frac{\text{ABS}_{\text{muestra}}}{\text{ABS}_{\text{estándar}}}$$

## ANEXO V.

### Medición de la actividad enzimática de celulasas.

#### Ensayo sobre papel filtro.

##### Reactivos:

- Tira de papel filtro Whatman N° 1 de 1 x 6 cm
- Buffer citrato 0,05 M, pH 4,8
- Reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS
- Solución de glucosa en buffer citrato, concentración de 10 mg/ml

##### Procedimiento:

1. Deben hacerse al menos dos diluciones en buffer citrato de la enzima que se quiere medir. Una dilución debe liberar en el medio de reacción algo menos de 2 mg, mientras que la otra debe liberar algo más de 2 mg (cantidad absoluta) de glucosa (equivalente a azúcares reductores).

2. Los estándares de glucosa se preparan a partir de una solución de glucosa en buffer citrato de 10 mg/ml. Las diluciones realizadas con el mismo buffer citrato deben ser de 1:1,5, 1:2, 1:3 y 1:5 cuyas concentraciones finales corresponden a 3,35 mg, 2,5 mg, 1,65 mg y 1 mg sobre 0,5 ml respectivamente.

3. La reacción enzimática se lleva a cabo en tubos de ensayo de 25 ml de capacidad. A continuación se detallan los volúmenes de reactivos que se incorporan en las distintas muestras:

	Cero	Blanco enzima	Estándar glucosa	Muestra en estudio
Buffer citrato	1,5 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Disolución enzima (al menos 2)	---	0,5 ml	---	0,5 ml
Glucosa	---	---	0,5 ml *	---
Tira de papel	---	---	---	1

\* de la dilución de glucosa correspondiente

4. Las muestras en estudio se atemperan a 50 °C y se agrega una tira de papel filtro, luego se mezcla. Es muy importante que el papel filtro quede sumergido en la solución. Estas muestras se incuban a 50 °C durante 60 minutos.

5. Transcurrido este tiempo, se añaden 3 ml del reactivo DNS a todos los tubos, es decir, a las muestras en estudio, cero, blanco enzima y estándar de glucosa. Se mezcla bien y se

introduce cada tubo en agua hirviendo durante 5 minutos para posteriormente ser enfriados en un baño de agua fría. Se añaden 20 ml de agua destilada a cada tubo y se agitan bien hasta que la mezcla sea uniforme invirtiendo el tubo.

6. Se dejan los tubos reposando durante 20 minutos para que la pulpa del papel se deposite en el fondo. El sobrenadante se utiliza para medir la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. El tubo denominado cero sirve para calibrar el instrumento a absorbancia cero antes de realizar el resto de mediciones. A los valores de absorbancia de las muestras en estudio se les debe restar el valor del blanco de enzima.

Definición de la unidad de papel filtro (UPF o FPU por sus siglas en inglés):

La unidad FPU está basada en la unidad internacional (IU) que corresponde a:

$$\begin{aligned} 1 \text{ UI} &= 1 \mu\text{mol}/\text{min de sustrato convertido, lo que equivale a} \\ &= 1 \mu\text{mol}/\text{min de "glucosa" (azúcares reductores como glucosa) formados} \\ &\quad \text{durante la reacción de hidrólisis, por lo tanto:} \\ &= 0,18 \text{ mg}/\text{min cuando el producto es glucosa} \end{aligned}$$

La cantidad absoluta de glucosa liberada en el ensayo de la unidad FPU como una dilución crítica es 2 mg:

$$2 \text{ mg de glucosa} = 2/0,18 \mu\text{mol}$$

Esta cantidad de glucosa fue producida por 0,5 ml de enzima diluida en 60 minutos, es decir, en la reacción FPU:

$$\begin{aligned} 2 \text{ mg de glucosa} &= 2/0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml} \\ &= 0,37 \mu\text{mol}/\text{min}/ \text{ml (IU/ml)} \end{aligned}$$

Por lo tanto, la cantidad estimada de enzima (equivalente a la concentración crítica de enzima=ml/ml) que libera 2 mg de glucosa en la reacción FPU contiene 0,37 unidades, y:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentración de enzima que libera 2 mg de glucosa}} \quad \text{unidades/ml}$$

Cálculo de la unidad FPU:

1. Construir un gráfico lineal del estándar de glucosa usando las cantidades absolutas de glucosa (mg/0,5 ml).

2. Usando estos estándares, transformar los valores de absorbancias de las muestras (después de la sustracción del blanco de enzima) a glucosa (equivalentes a mg de glucosa producidos durante la reacción).

3. Traducir las diluciones usadas a concentraciones de enzima:

$$\text{concentración} = \frac{1}{\text{dilución}} = \frac{\text{volumen de enzima en dilución}}{\text{volumen total de la dilución}}$$

4. Estimar la concentración de enzima la cual debería liberar exactamente 2 mg de glucosa para graficar la glucosa liberada (2) contra la concentración de enzima (3) sobre un gráfico semilogaritmico.

5. Calcular FPU:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentración de enzima que libera 2 mg de glucosa}} \quad \text{unidades/ml}$$

### **Ensayo de celobiasa**

#### Reactivos:

- Celobiosa
- Buffer citrato 0,05 M, pH 4,8

#### Procedimiento:

1. La solución de celobiosa debe ser preparada diariamente en buffer citrato con una concentración de 15 mM. Deben hacerse al menos dos diluciones en buffer citrato de la enzima celobiasa. Una dilución debe liberar en el medio de reacción algo menos de 1 mg, mientras que la otra debe liberar algo más de 1 mg (cantidad absoluta) de glucosa.

2. La reacción enzimática se lleva a cabo en tubos pequeños. A continuación se detallan los volúmenes de reactivos que se incorporan en las distintas muestras:

	Blanco enzima	Blanco celobiosa	Muestra en estudio
Buffer citrato	1 ml	1 ml	---
Dilución enzima (al menos 2)	1 ml	---	1 ml
Celobiosa 15 mM	---	1 ml	1 ml

3. Las enzimas diluidas son temperadas a 50 °C y se agrega 1 ml de la solución de celobiosa 15 mM. Todos los tubos, es decir, las muestras en estudio, el blanco de enzima y blanco de celobiosa, son incubados durante 30 minutos a 50 °C. Posteriormente se termina la reacción introduciendo los tubos a un baño de agua hirviendo por 5 minutos, luego se transfieren a un baño de agua fría y se determina la glucosa usando un procedimiento estándar (por ejemplo: usando un kit basado en la reacción de glucosa oxidasa).

#### Definición de unidad de celobiasa (CB):

La unidad de celobiasa (CB) está basada en la Unidad Internacional (IU) que corresponde a:

$$\begin{aligned} 1 \text{ IU} &= 1 \mu\text{mol/min de sustrato convertido, lo que equivale a} \\ &= 1 \mu\text{mol/min de glucosa formada en el caso de la reacción de CB} \end{aligned}$$

La cantidad absoluta de glucosa liberada en el ensayo CB como la dilución crítica es 1 mg:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mg glucosa} &= 1/0,18 \text{ } \mu\text{mol glucosa} \\ &= 0,5/0,18 \text{ } \mu\text{mol de celobiosa convertido} \end{aligned}$$

Esta cantidad de celobiosa fue convertida por 1 ml de enzima en 30 minutos, es decir, 1 mg de glucosa =  $0,5/0,18 \times 1 \times 30$   $\mu\text{mol/min/ml}$  de celobiosa fue convertida por 0,0926  $\mu\text{mol/min/ml}$ . Por lo tanto, la cantidad estimada de enzima que libera 1 mg de glucosa en la reacción CB contiene 0,0926 unidades, y:

$$\text{CB} = \frac{0,0926}{\text{concentración de enzima que libera 1 mg glucosa}} \quad \text{unidades/ml}$$

#### Cálculo de la unidad CB:

1. Multiplicar por 2 para convertir las concentraciones de glucosa en cantidades absolutas (mg)

2. Transformar las diluciones a concentraciones mediante:

$$\text{concentración} = \frac{1}{\text{dilución}} = \frac{\text{volumen de enzima en dilución}}{\text{volumen total de la dilución}}$$

3. Estimar la concentración de enzima que liberaría exactamente 1 mg de glucosa mediante la gráfica semilogarítmica de la glucosa liberada (en 1) contra las concentraciones de enzima (en 2).

4. Calcular la actividad de celobiasa como:

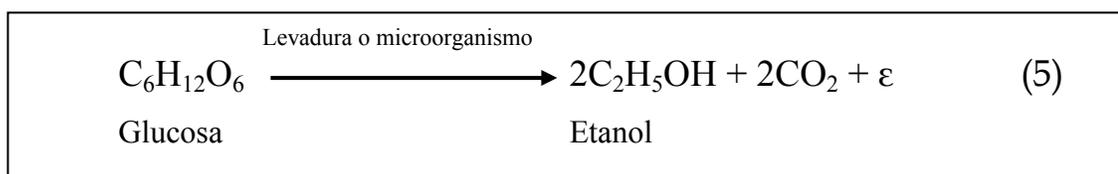
$$\text{CB} = \frac{0,0926}{\text{concentración de enzima que libera 1 mg glucosa}} \quad \text{unidades/ml}$$

## ANEXO VI.

### Fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Los principales microorganismos responsables de esta transformación son las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* es la más comúnmente utilizada. Sin embargo, existen estudios que incorporan hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, aunque presentan una explotación industrial más incipiente (Vásquez y Dacosta, 2007).

La conversión se representa mediante la siguiente ecuación:



A nivel estequiométrico parece una transformación simple, sin embargo, la secuencia de transformaciones para degradar glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de CO<sub>2</sub> es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse (Vásquez y Dacosta, 2007).

En términos de rendimientos, el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0,511 g de etanol y 0,489 g de CO<sub>2</sub> por 1 g de glucosa, valor cuantificado por Gay Lussac y difícil de obtener debido a que la levadura utiliza la glucosa como se dijo anteriormente (Sánchez y Cardona, 2005, Vásquez y Dacosta, 2007). El rendimiento experimental varía entre un 60% y 97% del teórico (Sánchez y Cardona, 2005, Vásquez y Dacosta, 2007, Olofsson *et al.*, 2008)

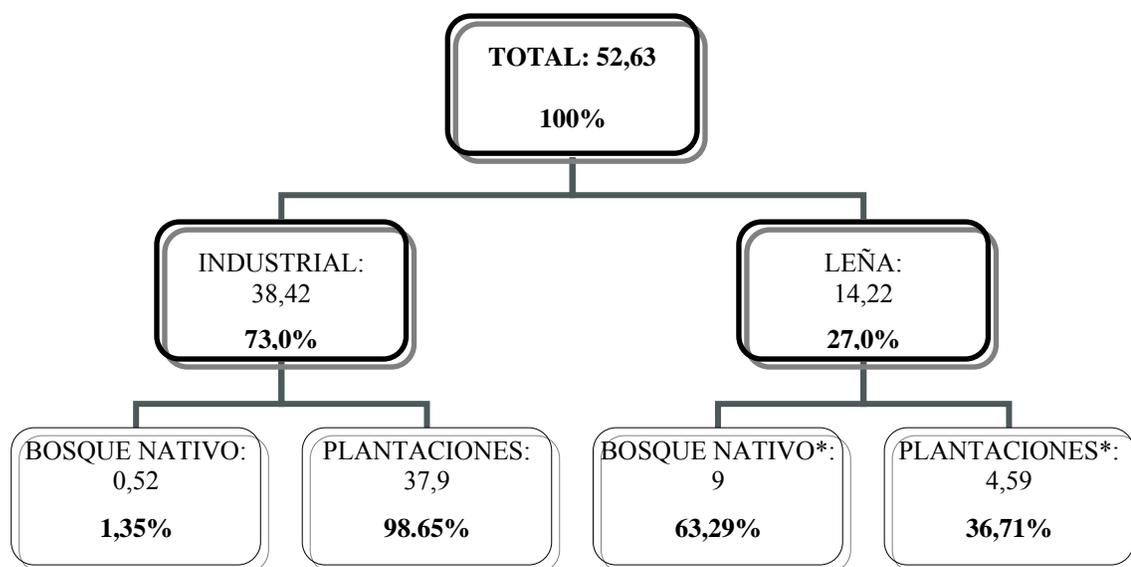
## ANEXO VII.

### Algunos rendimientos experimentales para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Sustrato	Pretratamiento	Cantidad de sólidos p/v	Temperatura (°C)	Cepa	Producción etanol (g/L)	Producción etanol (%)	Proceso	Autor
<i>Picea sp.</i>	Vapor SO2	12%	36	<i>S. cerevisiae</i>		81	SSF	Hoyer, et al
madera latifoliada				<i>S. cerevisiae</i>		91	SSF	South et al
<i>Populus sp.</i>				<i>S. cerevisiae</i>		96	SSF	South et al
<i>Fagus crenata</i>	fúngico+etanólisis	5%	35-40	<i>S. cerevisiae</i>		62	SSF	itoh et al
<i>Fagus crenata</i>	fúngico+etanólisis	5%	35-40	<i>S. cerevisiae</i>		74	SSF	itoh et al
<i>Populus sp.</i>	explosion por vapor	10%	42	<i>K. marxianus</i>	19	71,2	SSF	Ballesteros et al
<i>Eucalyptus sp.</i>	explosion por vapor	10%	42	<i>K. marxianus</i>	17	62,5	SSF	Ballesteros et al
Softwood	explosion por vapor	5%	37	<i>S. cerevisiae</i>		67	SSF	Stenberg et al
Licor negro latifoliada	HSSL			<i>Pichia stipitis</i>	20,2	80,23	SHF	Nigam
<i>Picea sp.</i>	Vapor SO2			<i>S. cerevisiae</i>		90	SSF	Alkasrawi
<i>Salix sp.</i>	Vapor	9%	37	<i>S. cerevisiae</i>	32	76	SSF	Olofsson et al
<i>Salix sp.</i>	Vapor	11%	37	<i>S. cerevisiae</i>	33	62	SSF	Olofsson et al
<i>Picea sp.</i>	Vapor	10%	37	<i>S. cerevisiae</i>	44,5	84	SSF	Olofsson et al
<i>Picea sp.</i>	Vapor	6-10%	37	<i>S. cerevisiae</i>	44,5	84	SSF	Olofsson et al
<i>Populus sp.</i>	Ácido diluido	11,5%	34	<i>Z. mobilis</i>	32,2	54	SSF	Olofsson et al
<i>Salix caprea</i>	Vapor	10%	37	<i>S. cerevisiae</i>	28,7	84,4	SSF	Olofsson et al
<i>Salix caprea</i>	Vapor	10%	37	<i>Z. mobilis</i>	27,9	82,1	SSF	Olofsson et al
<i>Populus sp.</i>	Ácido sulfúrico diluido	7,5%	37	<i>S. cerevisiae</i>	38,3	90*	SSF	Olofsson et al
<i>Populus sp.</i>	Ácido sulfúrico diluido	7,5%	37	<i>S. cerevisiae</i>	36,6	86*	SSF	Olofsson et al
Corncob	Ácido sulfúrico diluido		30	<i>S. cerevisiae</i>	45,7	94	SHF	Chen et al
<i>Picea sp.</i>	Vapor SO2	7%	34	<i>S. cerevisiae</i>		86	SSF	Bertilsson et al
<i>Picea sp.</i>	Vapor SO2	10%	34	<i>S. cerevisiae</i>		85	SSF	Bertilsson et al
<i>Aserrín</i>	Presacarificación fúngica		50	<i>K. marxianus</i>	13		SSF	Lopretti et al
<i>Orujo de uva</i>	Presacarificación fúngica		50	<i>K. marxianus</i>	74		SSF	Lopretti et al
<i>Torta de girasol</i>	Presacarificación fúngica		50	<i>K. marxianus</i>	28		SSF	Lopretti et al

## ANEXO VIII.

Consumo industrial de madera año 2007 (millones de m<sup>3</sup> ssc).



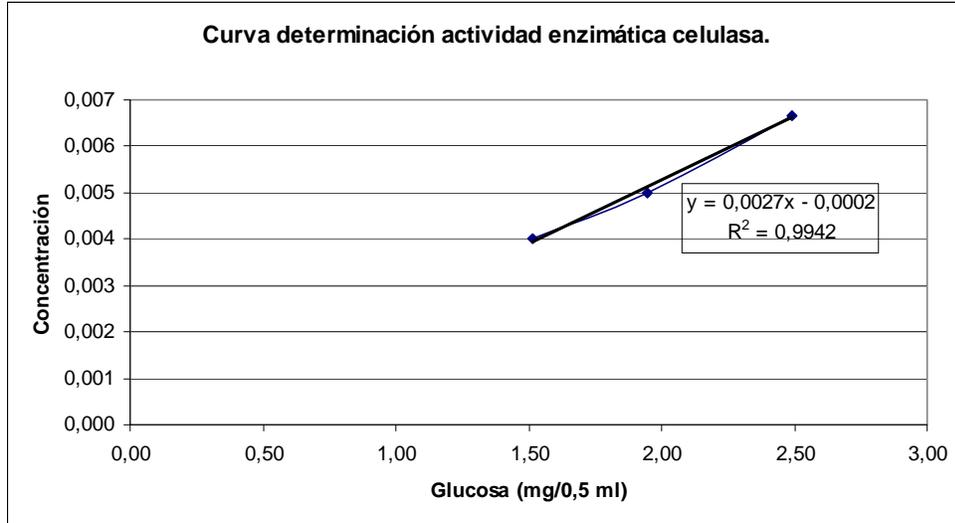
Fuente: INFOR, 2008 y 2004.

(\*) Datos estimados a partir de INFOR 2004.

## APÉNDICE I

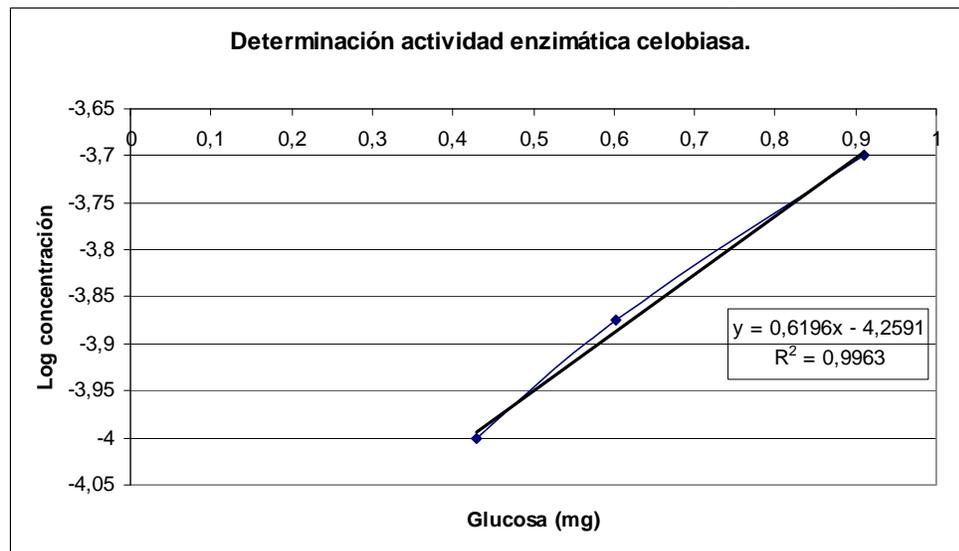
### Determinación de la actividad enzimática

**Figura 7. Curva determinación actividad enzimática para Celluclast® 1,5L.**



<b>Cálculo:</b>	
Glucosa [mg/0,5mL]	2
Concentración libera 2 mg	0,0053
<b>Actividad [FPIU/mL]</b>	<b>70,301</b>

**Figura 8. Curva determinación de actividad enzimática para Novozyme® 188**



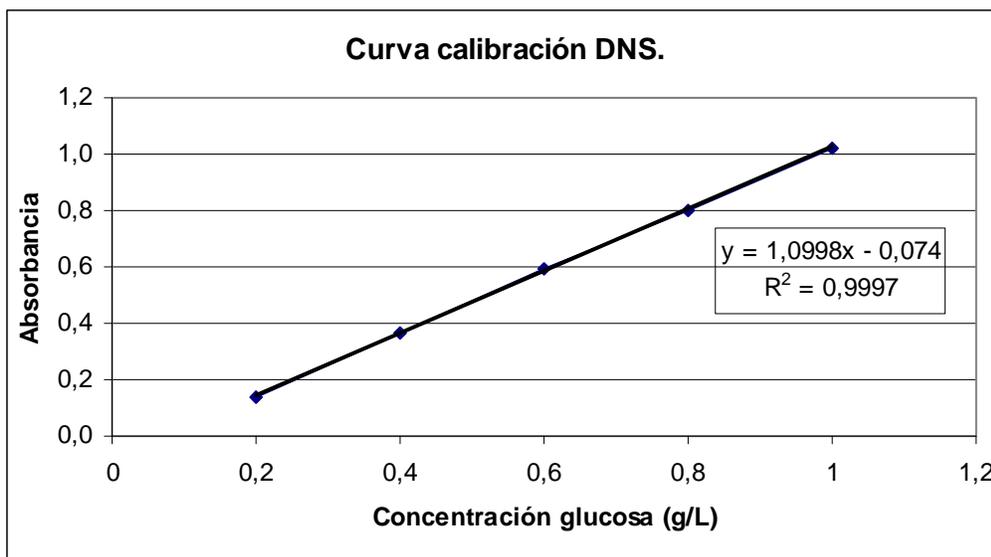
<b>Cálculo:</b>	
pendiente	0,6196
intersección	-4,2591
Concentración libera 1 mg	0,0002
<b>Actividad [CBIU/ml]</b>	<b>807,5080</b>

## APÉNDICE II

### Curva de calibración DNS.

Se utilizaron cinco diluciones de un stock de glucosa de concentración 4 (g/L). A 50  $\mu$ L de cada dilución se les agregaron 50  $\mu$ L de DNS en una placa termoresistentes de 96 pocillos. Se incubó la placa a 100° C durante 10 minutos y luego se enfrió en hielo. Se traspasaron 50  $\mu$ L a una micro placa y se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas Anthos, modelo 2010. Se utiliza agua como blanco y las muestras se realizaron en triplicado.

**Figura 9.** Curva de calibración de DNS para la determinación de azúcares reductores.



Se obtuvo una curva cuya linealidad se mantuvo entre 0,2 (g/L) y 1 (g/L), con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,999.

## APÉNDICE III

### Análisis estadístico para cada variable respuesta.

**Cuadro 9. Tabla ANDEVA para pérdida de peso.**

Análisis de la Varianza para Perdida peso - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Hongo	0,325283	2	0,162641	261,93	0,0000
B:Tiempo	0,087234	2	0,043617	70,25	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0171933	4	0,00429833	6,92	0,0015
RESIDUOS	0,0111767	18	0,000620926		
TOTAL (CORREGIDO)	0,440887	26			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

**Cuadro 10. Tabla ANDEVA simple para pérdida de peso según *Stereum* sp.**

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,037014	2	0,018507	19,11	0,0025
Intra grupos	0,00581	6	0,000968333		
Total (Corr.)	0,042824	8			

**Cuadro 11. Tabla ANDEVA simple para pérdida de peso según *Ganoderma* sp.**

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,0625687	2	0,0312843	121,31	0,0000
Intra grupos	0,00154733	6	0,000257889		
Total (Corr.)	0,064116	8			

**Cuadro 12. Tabla ANDEVA simple para pérdida de peso según *Aurantioporus* sp.**

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,00484467	2	0,00242233	3,81	0,0857
Intra grupos	0,00381933	6	0,000636556		
Total (Corr.)	0,008664	8			

**Cuadro 13. Tabla ANDEVA para azúcares reductores.**

Análisis de la Varianza para Azúcares reductores - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hongo	956,316	2	478,158	31,85	0,0000
B:Tiempo	80,536	2	40,268	2,68	0,0956
INTERACCIONES					
AB	31,7713	4	7,94281	0,53	0,7158
RESIDUOS	270,189	18	15,0105		
TOTAL (CORREGIDO)	1338,81	26			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

**Cuadro 14. Tabla ANDEVA para glucosa.**

Análisis de la Varianza para Glucosa - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hongo	157,681	2	78,8407	16,65	0,0001
B:Tiempo	83,3429	2	41,6714	8,80	0,0022
INTERACCIONES					
AB	4,34976	4	1,08744	0,23	0,9181
RESIDUOS	85,2183	18	4,73435		
TOTAL (CORREGIDO)	330,592	26			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

**Cuadro 15. Comparación de medias para pérdida de peso según hongo**

Contraste Múltiple de Rangos para Perdida peso según Hongo				
-----				
Método: 99,0 porcentaje Duncan				
Hongo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
Aurantioporus	9	0,196	0,00830613	X
Stereum	9	0,235333	0,00830613	X
Ganoderma	9	0,446	0,00830613	X
-----				
Contraste			Diferencias	
-----				
Aurantioporus-Ganoderma			*-0,25	
Aurantioporus-Stereum			*-0,0393333	
Ganoderma-Stereum			*0,210667	
-----				
* indica una diferencia significativa.				

**Cuadro 16. Comparación de medias para pérdida de peso según tiempo.**

Contraste Múltiple de Rangos para Perdida peso según Tiempo				
-----				
Método: 99,0 porcentaje Duncan				
Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
30	9	0,234778	0,00830613	X
45	9	0,272778	0,00830613	X
60	9	0,369778	0,00830613	X
-----				
Contraste			Diferencias	
-----				
30 - 45			*-0,038	
30 - 60			*-0,135	
45 - 60			*-0,097	
-----				
* indica una diferencia significativa.				

**Cuadro 17. Comparación de medias para azúcares reductores según hongo.**

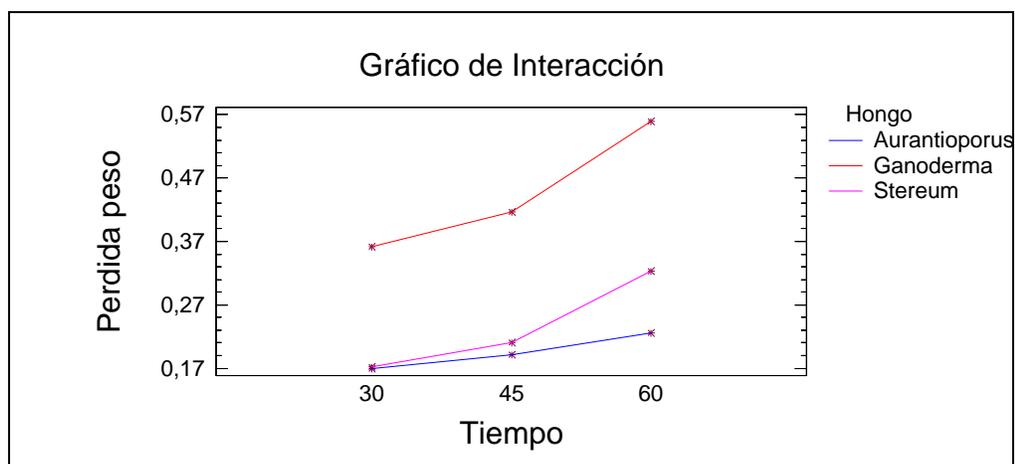
Contraste Múltiple de Rangos para Azucares reductores según Hongo				
-----				
Método: 99,0 porcentaje Duncan				
Hongo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
Stereum	9	8,732	1,29145	X
Aurantioporus	9	13,2181	1,29145	X
Ganoderma	9	22,9872	1,29145	X
-----				
Contraste			Diferencias	
-----				
Aurantioporus-Ganoderma			*-9,76911	
Aurantioporus-Stereum			4,48611	
Ganoderma-Stereum			*14,2552	
-----				
* indica una diferencia significativa.				

**Cuadro 18. Comparación de medias para glucosa según hongo.**

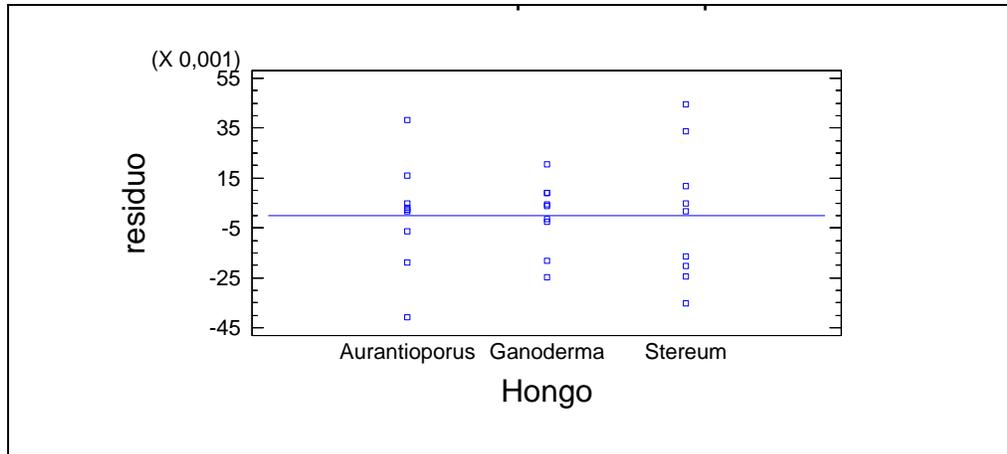
Contraste Múltiple de Rangos para Glucosa según Hongo				
-----				
Método: 99,0 porcentaje Duncan				
Hongo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
Stereum	9	3,28433	0,725285	X
Aurantioporus	9	5,05289	0,725285	X
Ganoderma	9	9,06089	0,725285	X
-----				
Contraste			Diferencias	
-----				
Aurantioporus-Ganoderma			*-4,008	
Aurantioporus-Stereum			1,76856	
Ganoderma- Stereum			*5,77656	
-----				
* indica una diferencia significativa.				

**Cuadro 19. Comparación de medias para glucosa según tiempo.**

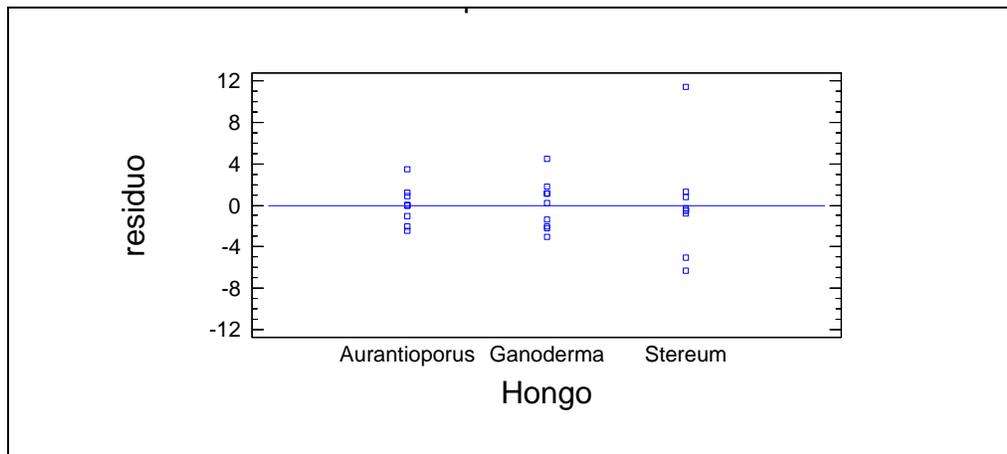
Contraste Múltiple de Rangos para Glucosa según Tiempo				
-----				
Método: 99,0 porcentaje Duncan				
Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-----				
30	9	4,04878	0,725285	X
45	9	5,14767	0,725285	X
60	9	8,20167	0,725285	X
-----				
Contraste			Diferencias	
-----				
30 - 45			-1,09889	
30 - 60			*-4,15289	
45 - 60			*-3,054	
-----				
* indica una diferencia significativa.				



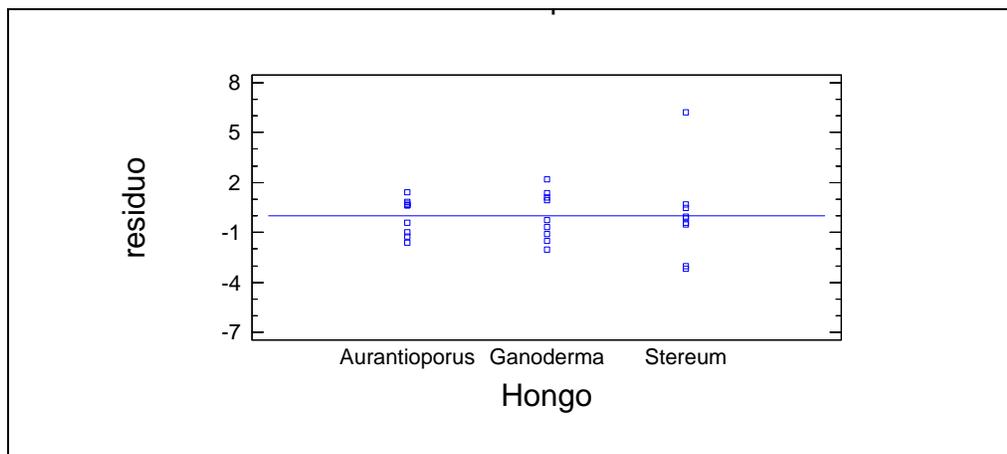
**Figura 10. Gráfico de interacción para pérdida de peso.**



**Figura 11. Gráfico de residuos para Pérdida de peso.**



**Figura 12. Gráfico de residuos para Azúcares reductores.**



**Figura 13. Gráfico de residuos para Glucosa.**

## APÉNDICE IV

### Resultados experimentales del estudio.

**Cuadro 20. Pérdida de peso obtenida con *Stereum hirsutum*.**

Repetición	30 días	45 días	60 días
1	2,30	4,41	9,14
2	2,19	5,83	10,36
3	4,62	3,04	10,81
<b>Promedio</b>	<b>3,03</b>	<b>4,43</b>	<b>10,10</b>
Desv. Estand	1,37	1,40	0,86

**Cuadro 21. Pérdida de peso obtenida con *Ganoderma applanatum*.**

Repetición	30 días	45 días	60 días
1	13,16	16,17	28,55
2	11,37	16,63	25,98
3	13,17	16,26	30,01
<b>Promedio</b>	<b>12,56</b>	<b>16,36</b>	<b>28,18</b>
Desv. Estand	1,04	0,25	2,04

**Cuadro 22. Pérdida de peso obtenida con *Aurantioporus albidus*.**

Repetición	30 días	45 días	60 días
1	3,44	5,20	5,11
2	2,25	2,27	5,24
3	2,97	3,73	4,78
<b>Promedio</b>	<b>2,88</b>	<b>3,73</b>	<b>5,04</b>
Desv. Estand	0,60	1,46	0,24

**Cuadro 23. Pérdida de peso registrada para las muestras testigo**

	30 días	45 días	60 días
1	0,66	0,40	2,28

**Cuadro 24. Azúcares reductores obtenidos con *Stereum hirsutum*.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	7,174	0,600	0,623	6,437	0,729	0,751	6,569	0,729	0,582
2	6,063	0,600	0,542	6,107	0,729	0,778	7,856	0,729	0,672
3	5,865	0,600	0,623	8,230	0,729	0,619	24,287	0,729	1,483
<b>Promedio</b>	<b>6,37</b>	<b>0,60</b>	<b>0,60</b>	<b>6,92</b>	<b>0,73</b>	<b>0,72</b>	<b>12,90</b>	<b>0,73</b>	<b>0,91</b>
Desv. Estand	0,71	0,00	0,05	1,14	0,00	0,09	9,88	0,00	0,50

**Cuadro 25. Azúcares reductores obtenidos con *Ganoderma applanatum*.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	18,535	0,600	2,397	21,956	0,729	2,374	22,891	0,729	2,664
2	21,824	0,600	2,403	20,218	0,729	2,397	26,729	0,729	2,684
3	21,846	0,600	2,440	27,730	0,729	2,654	25,156	0,729	2,580
<b>Promedio</b>	<b>20,73</b>	<b>0,60</b>	<b>2,41</b>	<b>23,30</b>	<b>0,73</b>	<b>2,48</b>	<b>24,93</b>	<b>0,73</b>	<b>2,64</b>
Desv. Estand	1,90	0,00	0,02	3,93	0,00	0,16	1,93	0,00	0,06

**Cuadro 26. Azúcares reductores obtenidos con *Aurantioporus albidus*.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	16,600	0,600	1,351	12,200	0,729	1,660	12,244	0,729	2,588
2	10,649	0,600	2,149	12,233	0,729	1,260	15,511	0,729	1,645
3	12,112	0,600	2,136	12,200	0,729	1,313	15,214	0,729	1,335
<b>Promedio</b>	<b>13,12</b>	<b>0,60</b>	<b>1,88</b>	<b>12,21</b>	<b>0,73</b>	<b>1,41</b>	<b>14,32</b>	<b>0,73</b>	<b>1,86</b>
Desv. Estand	3,10	0,00	0,46	0,02	0,00	0,22	1,81	0,00	0,65

**Cuadro 27. Azúcares reductores obtenidos por las muestras testigo.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	5,167	0,600	1,466	5,975	0,729	0,633	4,358	0,729	0,505

**Cuadro 28. Glucosa obtenida con *Stereum hirsutum*.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	2,092	0,255	0,119	2,448	0,301	0,087	2,769	0,311	0,094
2	1,275	0,255	0,084	2,090	0,301	0,139	2,892	0,311	0,084
3	0,915	0,255	0,068	2,955	0,301	0,097	12,123	0,311	0,110
<b>Promedio</b>	<b>1,43</b>	<b>0,25</b>	<b>0,09</b>	<b>2,50</b>	<b>0,30</b>	<b>0,11</b>	<b>5,93</b>	<b>0,31</b>	<b>0,10</b>
Desv. Estand	0,60	0,00	0,03	0,43	0,00	0,03	5,37	0,00	0,01

**Cuadro 29. Glucosa obtenida con *Ganoderma applanatum*.**

	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	4,673	0,255	0,216	7,970	0,301	0,355	10,708	0,311	0,435
2	7,647	0,255	0,255	7,134	0,301	0,242	13,169	0,311	0,426
3	7,843	0,255	0,265	10,866	0,301	0,516	11,538	0,311	0,448
<b>Promedio</b>	<b>6,72</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>8,66</b>	<b>0,30</b>	<b>0,37</b>	<b>11,81</b>	<b>0,31</b>	<b>0,44</b>
Desv. Estand	1,78	0,00	0,03	1,96	0,00	0,14	1,25	0,00	0,01

**Cuadro 30. Glucosa obtenida con *Aurantioporus albidus*.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	5,425	0,255	0,129	3,045	0,301	0,090	5,262	0,311	0,974
2	3,007	0,255	1,823	4,925	0,301	0,161	7,723	0,311	0,152
3	3,562	0,255	0,184	4,896	0,301	0,103	7,631	0,311	0,110
<b>Promedio</b>	<b>4,00</b>	<b>0,25</b>	<b>0,71</b>	<b>4,29</b>	<b>0,30</b>	<b>0,12</b>	<b>6,87</b>	<b>0,31</b>	<b>0,41</b>
Desv. Estand	1,27	0,00	0,96	1,08	0,00	0,04	1,40	0,00	0,49

**Cuadro 31. Glucosa obtenida por las muestras testigo.**

Nº muestra	30 días			45 días			60 días		
	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.	Totales	Enzima	Pretrat.
1	2,059	0,255	0,118	1,934	0,301	0,110	1,400	0,311	0,071