



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

DPTO. INGENIERÍA EN MADERAS Y SUS BIOMATERIALES

RENDIMIENTO EN LA SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE
***Eucalyptus globulus Labill*, SOMETIDO A UN PRETRATAMIENTO**
BIOLOGICO, PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

CAROLINA ALEJANDRA VICUÑA VASQUEZ

Profesor Guía: Sr. Rene Carmona C. Ingeniero Forestal,
Sr. Ricardo Silva S. Ingeniero Forestal

Santiago, Chile

2012

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

RENDIMIENTO EN LA SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE
***Eucalyptus globulus* Labill, SOMETIDO A UN PRETRATAMIENTO**
BIOLOGICO, PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

CAROLINA ALEJANDRA VICUÑA VASQUEZ

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Sr. Rene Carmona C.	...6,7...
Prof. Guía Sr. Ricardo Silva S.	...6,6...
Prof. Consejero Sra. Maria Oriana Salazar A.	...6,5...
Prof. Consejero Sr. Javier González M.	...6,5...

Dedicado a mis padres, les agradezco por el gran apoyo incondicional durante estos años para poder desarrollarme en lo que he querido, y los valores entregados durante toda la vida. Siempre estaré agradecida de los padres que tengo y me siento privilegiada por el cariño, la comprensión y la preocupación que Uds. me han dado.

A mis amigos por el apoyo durante las etapas más complicadas y los momentos inolvidables. Y a mi profesor guía Rene Carmona, por todos los conocimientos entregados y el apoyo constante para el término de este proyecto...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODO.....	9
2. 1 Materiales.....	9
2. 1. 1 Madera.....	9
2. 1. 2 Hongos para el pretratamiento biológico.....	9
2. 1. 3 Enzimas.....	9
2. 1. 4 Equipos y materiales de Laboratorio.....	10
2. 2 Método.....	11
2. 2. 1 Preparación del medio de cultivo.....	12
2.2.1.1 Preparación del medio de cultivo.....	12
2.2.1.2 Esterilización.....	12
2.2.1.3 Inoculación.....	13
2.2.1.4 Incubación.....	13
2.2.2 Medición de Pérdida de Peso.....	13
2.2.3 Hidrólisis Enzimática.....	14
2.2.4 Medición de azúcares reductores.....	14
2.2.5 Medición de Glucosa.....	16
2.2.6 Análisis Estadístico.....	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3. 1 Pretratamiento Biológico-Pérdida de peso.....	18
3. 2 Rendimiento de Azúcares Reductores.....	21
3. 3 Cantidad de Glucosa.....	23
4. CONCLUSIONES.....	30
5. BIBLIOGRAFÍA.....	32
6. APENDICE Y ANEXOS.....	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación Glucosa y AR obtenidos para cada pretratamiento con HPB y tiempo de acción.....	27
Cuadro 2. Resultados ANDEVA Pérdida de Peso.....	39
Cuadro 3. Resultados ANDEVA Azúcares Reductores.....	39
Cuadro 4. Resultados ANDEVA Glucosa.....	40
Cuadro 5. Comparación de Medias DUNCAN para Pérdida de Peso respecto al tiempo de acción.....	40
Cuadro 6. Comparación de Medias DUNCAN para Pérdida de Peso respecto a HPB... ..	41
Cuadro 7. Comparación de Medias DUNCAN para Azúcares Reductores respecto al tiempo de acción.....	41
Cuadro 8. Comparación de Medias DUNCAN para Azúcares Reductores respecto a HPB	42
Cuadro 9. Comparación de Medias DUNCAN para Glucosa respecto al tiempo de acción	42
Cuadro 10. Comparación de Medias DUNCAN para Glucosa respecto a HPB.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura primaria de la celulosa.....	2
Figura 2. Degradación enzimática de la celulosa.....	5
Figura 3. Esquema del cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento.....	6
Figura 4. Porcentaje de pérdida de peso obtenida después del pretratamiento biológico para cada HPB y tiempos de acción	18
Figura 5. Azúcares Reductores promedio observados con cada HPB y tiempos de acción.....	21
Figura 6. Cantidad de Glucosa promedio observada con cada HPB y tiempos de acción	24
Figura 7. Cantidad de glucosa en el total de azúcares reductores.....	26
Figura 8. Curva de Calibración DNS para la determinación de azúcares.....	38

RESUMEN

Una de las fuentes energéticas más importantes en el desarrollo de tecnologías para la obtención de energía son los recursos naturales renovables, específicamente los materiales lignocelulósicos. Existen diferentes tipos de energías obtenibles a partir de éstos materiales, bien sea en forma de calor, de electricidad o bien para su uso en el transporte. De entre ellos, los cultivos energéticos, y en concreto, la obtención de biocombustibles constituye un medio eficaz para ayudar a superar un problema energético (el del transporte en este caso) y otro ambiental (el del dióxido de carbono) en un mismo paso.

Los materiales lignocelulósicos presentan una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad, la lignina. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables y etanol.

Este trabajo constituye la fase preliminar del proyecto “Optimización del proceso de tratamiento de lignocelulosas con miras a la obtención de bioetanol” financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile a través del programa Domeyko de Energía y estudia el efecto de pretratar madera de *Eucalyptus globulus* Labill, con tres cepas de hongos de pudrición blanca (HPB) y tres tiempos de acción, sobre el rendimiento de azúcares fermentables.

La acción de estos hongos permite disminuir la presencia de sustancias que dificultan los procesos, reducir la cristalinidad de la celulosa y disociar la unión lignina-polisacáridos.

El método empleado en el estudio se enfoca en la evaluación de un pretratamiento biológico sobre el rendimiento en azúcares reductores en la hidrólisis enzimática. Los niveles de las variables en estudio corresponden a tres hongos: *Coriolus spp.*,

Peniophora spp y *Lentinus spp.* y tres tiempos de exposición sobre la madera (30, 45 y 60 días). Para evaluar estos tratamientos se realiza un análisis de varianza, a través de un análisis estadístico bifactorial de 3 * 3 de efectos fijos. Donde el primer factor corresponde al hongo de pudrición blanca (en tres niveles) y el segundo factor el tiempo de exposición (en tres niveles), cada uno con tres repeticiones y un testigo (Montgomery, 1991).

Finalizado el pretratamiento biológico, se determina la pérdida de peso producida por la acción fúngica. La hidrólisis enzimática se realiza en un agitador orbital temperatura constante de 50°C por 48 horas a 250rpm. Se adiciona una carga enzimática total de 25FP IU/g de residuos secos, las soluciones se preparan a un 10% p/p. Finalmente, se determina la cantidad de azúcares reductores y de glucosa en ellos. Los resultados preliminares indican que la reducción de peso promedio se correlacionó con el tiempo de incubación con los HPB. Los valores más altos para cada uno de los tiempos probados se registran con *Lentinus edodes*, y *Peniophora spp.*, con 25,76% y 20,05% a los 45 y 60 días respectivamente. Las menores pérdidas de peso se obtienen con *Coriolus versicolor*, en todos los tiempos de acción: 1,18%; 5,33%; 5,98%, a los 30, 45 y 60 días respectivamente. Mientras que en el rendimiento de azúcares los máximos resultados se obtuvieron con el hongo *Lentinus edodes* y *Peniophora gigantea*, con 19,92g/l y 13,59g/l, respectivamente a los 60 días.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el trabajo desarrollado permitió obtener antecedentes cuantificables asociados al efecto causado por estas tres especies de hongo sobre el material lignocelulósico, como un pretratamiento biológico, para la obtención de mejores resultados en el rendimiento en azúcares reductores en la sacarificación enzimática.

Palabras claves: Bioetanol, biocombustibles, sacarificación enzimática, pudrición blanca, Eucaliptos.

ABSTRACT

One of the most important energy sources in developing technologies for the production of energy are renewable natural resources, specifically lignocellulosic materials. There are different types of energy obtained from these materials, either as heat, electricity or for use in transport. Of these, energy crops, in particular, the production of biofuels is an effective means to help overcome an energy problem (the transport in this case) and other environmental (the carbon dioxide) in one step.

Lignocellulosic materials have a complex structure, composed of several fractions that must be processed separately to ensure efficient conversion of these materials into ethanol. The major fraction of biomass is cellulose, composed of long chains of glucose linked by β (1-4) which, in turn, are grouped into higher structures of high crystallinity, lignin. This crystal structure is that makes the hydrolysis of cellulose for the production of fermentable sugars and ethanol.

This paper is the preliminary phase of the project "Optimization lignicelulosas treatment process in order to obtain bioethanol" funded by the Vice Presidency for Research and Development at the University of Chile through the program Domeyko Energy and studied the effect of pretreating *Eucalyptus globulus* Labill wood, with three strains of white rot fungi (BPH) and three days of action on the yield of fermentable.

The action of these fungi can reduce the presence of substances that hinder the process, reduce the crystallinity of cellulose and lignin-polysaccharide is dissociated. The method used in the study focuses on the evaluation of a biological pretreatment on the yield of reducing sugars in enzymatic hydrolysis. The levels of the variables under study correspond to three fungi: *Coriolus* spp. *Peniophora* spp and *Lentinus* spp. and three times of exposure on wood (30, 45 and 60 days). bifactorial 3×3 fixed effects. Where the first factor corresponds to the whiterot fungus (three levels), the second exposure time factor (three levels) with three replicates each and a control (Montgomery, 1991).

After the pretreatment biological, determining the weight loss caused by fungal action.

The enzymatic hydrolysis is performed in an orbital shaker maintained at 50 ° C for 48 hours at 250rpm. It adds a total enzyme loading 25FP IU / g dry waste, the solutions are prepared by 10% p / p. Finally, it determines the amount of reducing sugars and glucose in them. Preliminary results indicate that average weight reduction was correlated with time of incubation with BPH. The highest values for each of the tested times are recorded in *Lentinus edodes*, and *Peniophora spp.*, with 25.76% and 20.05% at 45 and 60 days respectively. The lowest weight losses were obtained with *Coriolus versicolor*, at all times of action: 1.18%, 5.33%, 5.98%, at 30, 45 and 60 days respectively. While sugar yield maximum results were obtained with the fungus *Lentinus edodes* and *Peniophora gigantea* with 19.92g/ly 13.59 g / l, respectively at 60 days.

According to the results obtained showed that the work allowed to obtain records associated quantifiable effect caused by these three species of fungi on lignocellulosic material, such as a biological pretreatment, to obtain better performance in reducing sugar enzymatic saccharification.

Keywords: bioethanol, biofuels, enzymatic saccharification, white rot, Eucalyptus.

1. INTRODUCCIÓN

La crisis mundial de los combustibles fósiles ha impactado fuertemente al sector energético de nuestro país, el cual ha debido enfrentar en el último tiempo sostenidas alzas en el precio del petróleo debido a fluctuaciones internacionales y a las políticas de los países productores. En este contexto, diversificar la matriz energética con la incorporación de los biocombustibles, se presenta como una gran alternativa de sustitución al abastecimiento energético de nuestro país, que importa el 95% del petróleo que consume (Parra y Baeza, 2006). Además de cumplir con los compromisos internacionales sobre emisiones de CO₂.

La celulosa es uno de los materiales más utilizados por el hombre y en la actualidad se encuentra comercialmente disponible en una gran variedad de presentaciones, siendo el papel una de las más conocidas. Por varias décadas los esfuerzos de muchos investigadores se han concentrado en buscar alternativas para el uso de este polisacárido como materia prima para obtener glucosa, mediante su hidrólisis, que al utilizarla como sustrato en la industria de fermentaciones permitiría obtener una amplia gama de productos, entre ellos etanol para su uso como biocombustible (Mejía *et al*, 2002).

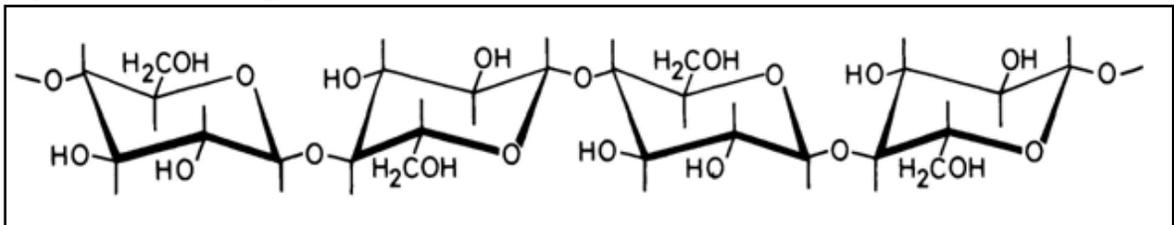
Caña de azúcar, maíz y cereales son las principales materias primas para la obtención de bioetanol. No obstante, si éste debe convertirse en una parte importante de las fuentes de combustible del mundo, sin competir con suelos destinados a la alimentación y conservación de los bosques, su fuente primaria no será el maíz ni las cosechas de azúcar; sino materias primas de base celulósica, más abundantes y eficientes en su cultivo, tales como residuos agrícolas y forestales, así como hierbas y árboles de crecimiento rápido.

En la zona centro-sur de nuestro país se dan recursos de este tipo, tanto primarios (bosques), como secundarios (desechos forestales, agroindustriales y urbanos) que podrían sustentar, además de los ya existentes, para obtener madera y papel, procesos como el descrito para la obtención de etanol.

Los principales componentes de estos recursos son la celulosa, hemicelulosa y lignina. Los dos primeros están constituidos por azúcares susceptibles a ser fermentadas a alcohol (Parra y Baeza, 2006).

Para este fin, es esencial la degradación de la celulosa hasta glucosa, pero las características estructurales de este polisacárido y su asociación con hemicelulosa y lignina, dificultan su hidrólisis. La celulosa forma parte de las paredes de las células vegetales en íntima asociación con lignina y hemicelulosa, constituyendo un conjunto denominado lignocelulosa. La proporción de estos polímeros varía según el origen del residuo lignocelulósico considerado (Macarrón, 1992).

Figura 1. Estructura primaria de la celulosa.



Fuente: Macarrón, 1992.

Las cadenas de celulosa se unen mediante puentes de hidrógeno, formando microfibrillas. A su vez, varias microfibrillas se agrupan en fibrillas, cuya agregación da origen a las fibras de celulosa. Aunque no se conoce exactamente la estructura fibrilar de la celulosa, los modelos propuestos coinciden en señalar la existencia de regiones cristalinas, con un alto grado de ordenación, alternadas con regiones amorfas, menos ordenadas. Variando la proporción, según el origen de la celulosa y el tratamiento al cual se someta (Macarrón, 1992).

La hemicelulosa está compuesta de pequeñas cadenas de polisacáridos, cuyo papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa (Negro, 1991), formadas por otros azúcares además de la glucosa.

La lignina, por su parte, es uno de los principales componentes de la materia vegetal, que se encuentra tanto en la madera, como en otros componentes vasculares, llegando a representar del 20% al 30% de la composición química de éstas. La mayor parte de la lignina se encuentra ubicada dentro de las paredes celulares, entremezclada con las hemicelulosas, formando una matriz que rodea las microfibrillas de la celulosa. El papel de la lignina es cementar los polisacáridos de la pared vegetal y actuar como barrera de la degradación microbiana del material lignocelulósico (Kishen Tangnu *et al*, 1981).

La íntima unión de la lignina al armazón vegetal es un impedimento para la hidrólisis de la celulosa, sólo consiguiéndose separar mediante tratamientos energéticos. Su propia hidrólisis requiere severas condiciones debido a su compleja estructura química (Macarrón, 1992).

La hidrólisis es un proceso en el cual, se obtienen monómeros de azúcares elementales (principalmente glucosa y algunas pentosas) provenientes de las fracciones celulósicas y hemicelulósicas de los materiales lignocelulósicos (Negro, 1991). La hidrólisis de la celulosa hasta glucosa puede realizarse enzimática o químicamente. La hidrólisis química o ácida consiste en un proceso que usa catalizadores ácidos, como el ácido clorhídrico, sulfuroso, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico, siendo los ácidos clorhídrico y sulfúrico los únicos utilizados a escala industrial. Estos ácidos son agentes poderosos para la hidrólisis de la celulosa, sin embargo, por su toxicidad y corrosión son peligrosos, por lo cual requieren reactores que sean muy resistentes a la misma. Además, los ácidos deben ser recuperados después de la hidrólisis, para hacer el proceso económicamente más factible (Romano *et al*, 2005).

La hidrólisis enzimática ha sido investigada intensamente en los últimos 20 años (Macarrón, 1992). Es un proceso catalizado por un conjunto de enzimas, denominadas celulasas, producidas por hongos o bacterias. Estas enzimas degradan la celulosa, llevando sus complejas cadenas a sus monómeros elementales. Las celulasas del tipo fúngico son las más estudiadas, debido a la capacidad que presentan estos organismos de generar estas enzimas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando así su remoción de los

medios de cultivo (Negro, 1991). La mayoría de celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*, de la cual se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas (Lynd *et al*, 2002 citado por Sánchez y Cardona, 2005).

El complejo celulolítico (conjunto de enzimas capaces de hidrolizar la celulosa) está conformado por diferentes componentes que proceden sinérgicamente. Este sistema enzimático ha sido agrupado en tres tipos diferentes de actividad, cuya denominación y mecanismos de acción son los siguientes (Montenecourt y Eveleigh, 1979):

- *Endo- β -glucanasas (β -(1,4)-glucanglucanohidrolasa)*, las cuales destruyen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa, produciendo nuevos sitios de ataque complementados por la exoglucanasas, con lo cual, hay una rápida disminución en la longitud de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores.

- *Exo- β -glucanasas (β -(1,4)-glucancelobiohidrolasas, β -(1,4)-glucanglucanohidrolasas)*, que atacan gradualmente las moléculas de celulosa en los terminales no reductores, liberando subunidades de celobiosa, además no son muy activas sobre la celulosa cristalina, pero presentan una gran acción sinérgica cooperativa en presencia de endoglucanasas.

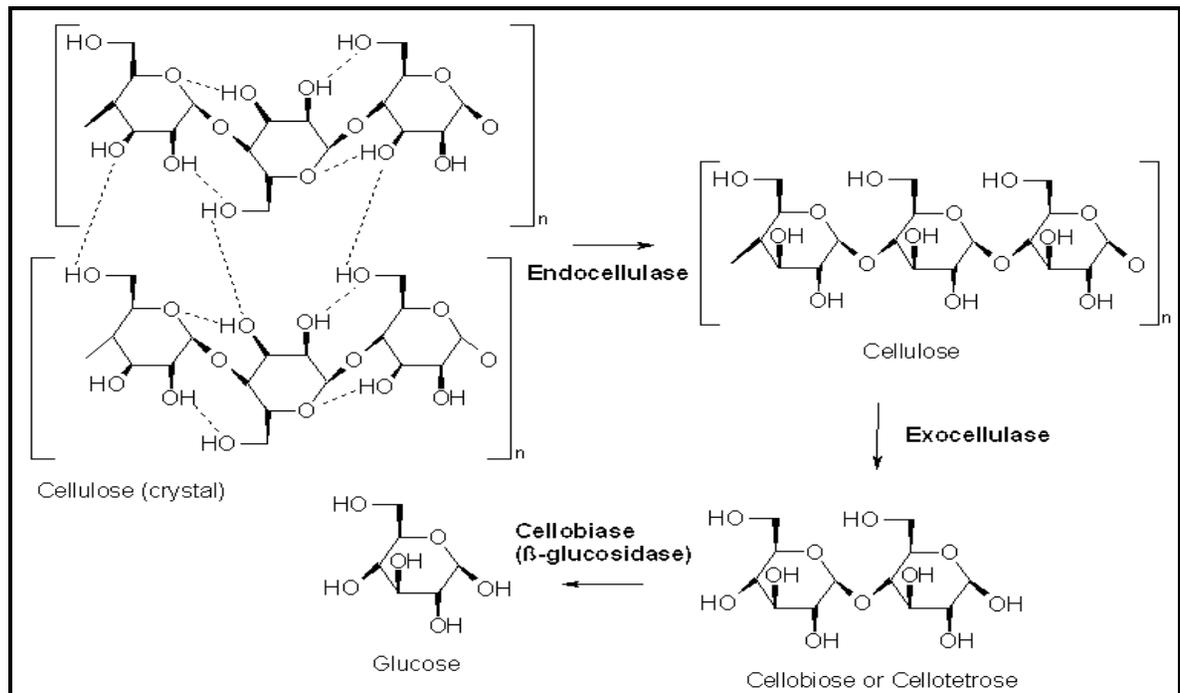
- *B-glucosidasa ó celobiasas*, las cuales hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa. Además son sumamente necesarias para evitar la inhibición que produce la acumulación de celobiosa sobre las endoglucanasas y las exoglucanasas en la reacción.

El sinergismo presente entre estos tres componentes se resume de la siguiente forma: las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de las fibras de celulosa, creando así espacios para que las exoglucanasas puedan dirigirse a las zonas cristalinas de las fibras. Por último las β -glucosidasas realizarían el paso final de la hidrólisis, impidiendo la acumulación de celobiosa, la que inhibiría a las endoglucanasas y exoglucanasas (Béguin, 1990).

La hidrólisis enzimática presenta varias ventajas sobre la hidrólisis ácida, pues es un proceso amigable con el medio ambiente, teniendo la posibilidad de entregar altos rendimientos. Además presenta bajos costos comparados con los procesos ácidos, por lo que la tendencia mundial es a desarrollar este tipo de procesos (Romano *et al*, 2005).

Para que la hidrólisis enzimática sea efectiva debe realizarse un tratamiento previo a los materiales lignocelulósicos, puesto que éstos presentan una estructura compleja, además de exhibir una gran cristalinidad, lo cual dificulta el proceso de hidrólisis. Cabe destacar que para asegurar una conversión eficiente de la celulosa y hemicelulosas a los azúcares, sus fracciones deben ser procesadas por separado (Vilches, 2002).

Figura 2. Degradación enzimática de la celulosa.



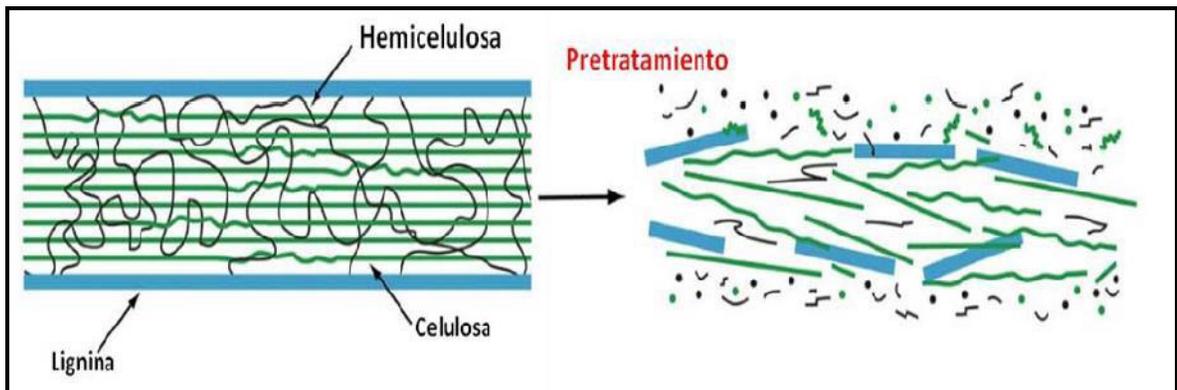
Fuente: Ovando y Chacón, 2005.

El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa es hidrolizada durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse, aspecto o acción muy importante, ya que esta representa una barrera no sólo física que impide el acceso a la celulosa, sino también inhibe la acción de las enzimas.

Los pretratamientos permiten aumentar la tasa de producción, debido a que permiten la liberación de una mayor cantidad de azúcares para la etapa de hidrólisis (Talebnia *et al*,

2010). El mecanismo de los pretratamientos es variado, pero su principal función es la de aumentar el área de contacto entre las enzimas celulolíticas y la celulosa, rompiendo la estructura cristalina de la celulosa, depolimerizandola parcialmente y solubilizando la lignina y/o hemicelulosa (Castro *et al*, 2004), como se muestra en la siguiente Figura:

Figura 3. Esquema del cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento.



Fuente: Castro *et al* (2004).

Los pretratamientos, en general, para que sean viables deben cumplir con una serie de condiciones, tales como bajo consumo energético, bajos costos de inversión y utilización de reactivos baratos fácilmente recuperables, y deben ser aplicables a diversos sustratos (Sánchez y Cardona, 2005).

Por su naturaleza, los pretratamientos se clasifican en tres grupos generales: químicos, físicos y biológicos. La evaluación de la efectividad de los mismos se hace en base al rendimiento de hidrólisis posterior del material pretratado, en función del cual se determinan experimentalmente las condiciones óptimas de operación en cada caso.

En los pretratamientos biológicos el material lignocelulósico se somete a la acción de hongos de pudrición blanca, blanda o marrón, los cuales atacan la lignina y las hemicelulosas, ayudando así a despejar las barreras que protegen a la celulosa y haciendo más fácil el acceso de las enzimas en el proceso de hidrólisis (Fan *et al*, 1987). Las ventajas que presenta el pretratamiento biológico son el bajo requerimiento energético y el bajo

impacto sobre el medio ambiente. Como inconveniente se señala que éste pretratamiento es lento, por lo cual aumentarían los costos del proceso (Hamelinck *et al*, 2003). También el costo de las enzimas lo hace menos viable económicamente.

Los hongos de pudrición blanca (HPB) son capaces de desarrollarse utilizando preferentemente la lignina como fuente de energía; su inclusión como tratamiento inicial del complejo lignocelulósico permitiría evitar reducciones significativas en el rendimiento en azúcares en las etapas posteriores para la obtención de etanol. (Fengel y Wegener, 1984; Jarpa, 1988). Además, la alteración provocada al complejo lignocelulósico por los hongos de pudrición reduce la energía necesaria para el astillado (molienda) y mejora el acceso de productos químicos al mismo, reduciendo los tiempos de tratamiento (Tapia *et al*, 2000).

En este tipo de pretratamiento se destruyen las estructuras protectoras de la celulosa y haciéndola, en consecuencia, más accesible al ataque hidrolítico (Jarpa, 1988), pero existe un problema dentro de los microorganismos, ya que poseen también actividad celulolítica, consumiendo la celulosa preferentemente a la lignina. Es por esta razón que se propone en el estudio utilizar un tipo de hongo específico, Hongos de Pudrición Blanca (HPB), ya que corresponden a los basidiomicetos más efectivos para pretratamiento biológico en materiales lignocelulósicos, produciendo enzimas degradadoras de la lignina, que atacan en menor medida a la celulosa, en comparación con otros tipos de hongos (Fan *et al*, 1987). Tienen un sistema de enzimas celulasas y ligninasas que les permiten degradar todos los componentes de las paredes celulares de la madera, removiendo la lignina y polisacáridos casi al mismo tiempo.

El pretratamiento biológico de sustratos lignocelulósicos utilizando HPB ha sido utilizado en paja de arroz (Taniguchi *et al*, 2005), paja de trigo (Hatakka, 1983) y madera de latifoliadas (Sun y Cheng, 2002; Ballesteros, 1999). Cabe destacar a las especies latifoliadas (por ejemplo: *Eucalyptus globulus* Labill), ya que se cree que éstas son mucho más susceptibles al ataque de HPB en comparación a las coníferas (Kim y Singh, 2000 citado por Ruiz, 2004).

El objetivo general de este estudio fue determinar el rendimiento en azúcares reductores en la sacarificación enzimática de madera sometida a pretratamiento biológico con Hongos de Pudrición Blanca (HPB) (*Coriolus versicolor*, *Peniophora gigantea* y *Lentinus edodes*) y 3 tiempos de acción (30, 45 y 60 días), con miras al desafío planteado anteriormente: la obtención de Bioetanol o etanol celulósico.

2. MATERIALES Y MÉTODO

2. 1 Materiales

2. 1. 1 Madera

El material lignocelulósico a utilizar en el estudio consistirá de pin-chips de madera de *Eucalyptus globulus* Labill., residuo procedente de una Planta de Astillado ubicado en la comuna de San Antonio, V Región. Este subproducto del proceso de astillado corresponde a partículas de madera con dimensiones aproximadas de 1mm de espesor, 1mm a 3mm de ancho y 5mm de largo, con una densidad aparente de 156kg/m^3 , con un 15% de contenido de humedad. Los residuos forestales utilizados provienen de árboles juveniles de aproximadamente 8 a 12 años, los cuales, por sus dimensiones, son más susceptibles a la acción de hongos.

2. 1. 2 Hongos para el pretratamiento biológico

Los hongos utilizados fueron obtenidos de la micoteca del Laboratorio de Biodeterioro y Preservación, del Departamento de Ingeniería de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile. Las cepas de los hongos correspondieron a *Coriolus versicolor* (162), *Peniophora gigantea* (127-G) y *Lentinus edodes* (156-E), los tres de pudrición blanca.

2. 1. 3 Enzimas

Para el proceso de hidrólisis enzimática se utilizó un conjunto de celulasas comercial, éste complejo está compuesto por: endo- β -glucanasas, exo- β -glucanasas y β -glucosidasa.

Las celulasas de este complejo enzimático actúan sinérgicamente, correspondiendo tres tipos de actividades diferentes:

i) *Endo- β -glucanasas:*

- a. β -(1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.4.)
- ii) *Exo- β -glucanasas*:
 - a. β -(1,4)-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.) Celobiohidrolasa (CBH)
 - b. β -(1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.74.) Glucohidrolasa (GGH)
- iii) *β -glucosidasa* (EC 3.2.1.21.)

Además se agregó la enzima glucosidasa para evitar el efecto inhibitor de la celobiosa generada por la acción de las enzimas del primer complejo.

Las enzimas fueron adquiridas en el laboratorio SIGMA-ALDRICH® con el nombre comercial Celluclast® 1.5L (C2730), celulasa líquida producida por fermentación del hongo *Trichoderma reesei*, con una actividad enzimática de 70IU/ml y Novozyme® 188 (C6105), celulasa obtenida de la fermentación del hongo *Aspergillus niger* con una actividad enzimática de 800IU/ml.

2. 1. 4 Equipos y materiales de Laboratorio

Los equipos y materiales utilizados en el pretratamiento biológico, en el proceso de hidrólisis enzimática y en la medición de azúcares reductores y glucosa, fueron los siguientes:

Equipos:

- Autoclave Baird & Tatlock
- Balanza digital Adventurer OHAUS
- Cámara de incubación WTB Binder
- Campana de flujo laminar Microflow (Laminar Flow Workstation)
- Estufa de secado Thelco Model 8
- Agitador – Incubador orbital AMILAB
- Estufa de Secado Thelco Model 18
- Medidor de pH de mesa RETECA Precisión pH/MV/°C METER
- Centrífuga Eppendorf Modelo 5804 R

- Espectrofotómetro (UV-visible) Ultrospec Modelo 3000
- Lector de placas Anthos Modelo 2010

Materiales:

- Agar-Agar
- Agua destilada
- Alcohol
- Asas de platino
- Extracto de malta
- Frascos kolle
- Materiales menores (algodón, tijeras, parafilm, etc.)
- Tubos de ensayo
- Compuesto DNS
- Glucosa
- Kit Glucosa (Glucose Gluc-Pap) de RANDOX®
- Pipetas
- Tubos Eppendorf

Reactivos y Materiales:

- Acetato de Sodio
- Acido Acético
- Materiales menores
- Tubos Falcon de 50ml

2. 2 Método

El método a empleado en el estudio se enfocó en la evaluación de un pretratamiento biológico sobre el rendimiento en azúcares reductores en la hidrólisis enzimática. Los niveles de las variables en estudio correspondieron a tres hongos: *Coriolus spp.*, *Peniophora spp* y *Lentinus spp.* y tres tiempos de exposición sobre la madera (30, 45 y 60

días). De la combinación de los distintos niveles de las variables indicadas surgieron 9 tratamientos, más un tratamiento control (testigo) consistente de madera sin pretratar con hongos, realizándose tres repeticiones para cada uno de ellos.

Para evaluar estos tratamientos se realizó un análisis de varianza, a través de un análisis estadístico bifactorial de $3 * 3$ de efectos fijos. Donde el primer factor corresponde al hongo de pudrición blanca (en tres niveles) y el segundo factor el tiempo de exposición (en tres niveles), cada uno con tres repeticiones y un testigo (Montgomery, 1991). Resultando las variables respuesta la pérdida de peso, la cantidad de azúcares reductores y de glucosa

Los procedimientos de pretratamiento biológico e hidrólisis enzimática, fueron realizados en el Laboratorio de Biodeterioro y Preservación, del Departamento de Ingeniería de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile. Los procedimientos de medición de azúcares reductores y glucosa fueron realizados en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

2. 2. 1 Preparación del medio de cultivo

2.2.1.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo preparado consistió en una mezcla de Agar-Agar y Extracto de malta al 2% y 3% p/p respectivamente, empleando agua destilada como solvente y dosificada a tubos de ensayo.

2.2.1.2 Esterilización

La esterilización del medio de cultivo fue realizada en autoclave, a una presión de vapor saturado de $1,05\text{Kg/cm}^2$ (120°C) durante 20 minutos.

2.2.1.3 Inoculación

La inoculación del medio de cultivo, se realizó empleando un asa de platino, para lo cual se tomó una muestra de micelio desde donde se encuentra el hongo, contenido en una Placa Petri, la cual se llevó a los tubos de ensayo preparados con el medio de cultivo. Fue necesario que este proceso se desarrollara con las medidas de higiene necesarias para lograr un ambiente aséptico. Terminada la inoculación se procedió a la incubación del hongo en los tubos de ensayo en una cámara de incubación a una temperatura de 25°C y 70% de humedad relativa, durante un tiempo de 10 días. El mismo procedimiento se siguió para los tres hongos.

Una vez pasados los 10 días, se retiraron los tubos de ensayos con los hongos desde la cámara de incubación, con el objetivo de introducir trigo cocido, utilizándolo como medio de contagio entre los residuos de *Eucalyptus globulus* y los hongos. La proporción utilizada fue de 2% p/p de trigo respecto al sustrato por cada tubo de ensayo con hongo. El trigo fue dispuesto en tubos de ensayo vacíos a un 70% de contenido de humedad, para luego ser esterilizado y traspasado a cada tubo con hongo. Posteriormente fueron llevados a la cámara de incubación por otros 10 días.

2.2.1.4 Incubación

Transcurridos los siguientes 10 días, se retiraron de la cámara de incubación los tubos de ensayo con trigo infectado por el hongo, los cuales fueron traspasados a matraces Erlenmeyer de 500ml de capacidad, con 50g de residuos de madera de *Eucalyptus globulus*. Éstos fueron llevados nuevamente a la cámara de incubación a 25°C con un contenido de humedad del 66% durante los periodos de tiempo del tratamiento (30, 45 y 60 días).

2. 2. 2 Medición de Pérdida de Peso

Transcurridos los periodos de tiempos sobre los hongos, se realizó la medición de pérdida de peso de los residuos de *Eucalyptus globulus*. La determinación de la pérdida de peso se realizó tres veces, obteniéndose los resultados expresados en porcentaje, a través de la siguiente relación matemática:

$$\%Pp = (Po1 - Po2) / Po1 * 100 \text{ (ecuación n}^\circ\text{1)}$$

Donde: %Pp: Porcentaje de pérdida de peso
 Po1: Peso anhidro inicial, antes del pretratamiento biológico
 Po2: Peso anhidro final, después del pretratamiento biológico

2. 2. 3 Hidrólisis Enzimática

En la etapa de hidrólisis enzimática se utilizaron dos enzimas comerciales, Celluclast® 1.5 L y Novozyme®188, cada una con una actividad enzimática aproximada de 70FP IU/ml y 800IU/ml respectivamente. Las enzimas se emplearon de forma combinada en el proceso de hidrólisis.

Para el proceso se adicionó una carga enzimática total de 25FP IU/g de residuos secos (0,36 ml Celluclast y 0,05ml Novozym) y las soluciones se prepararon a un 10% p/p. Para ello, previo a la hidrólisis, se determinó la humedad de los residuos en estufa a $103 \pm 2^\circ \text{ C}$, durante 24 horas.

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, se utilizó el equivalente a 1g seco de residuos de eucaliptus, solución enzimática y buffer acetato (hasta completar 10ml) 50mM y pH 5,0. La mezcla se realizó en tubos Falcon de 50ml. Además se incluyeron dos tubos Falcon como blancos, uno conteniendo solamente enzima y buffer (blanco de enzima) para detectar la liberación de azúcares provenientes de la enzima, y un segundo tubo conteniendo residuos y buffer, sin enzimas, para detectar la liberación de azúcares por acción fúngica (blanco residuos).

La reacción se realizó en un agitador orbital (shaker) durante 48 horas, a una temperatura de 50° C , pH 5 y con una agitación de 250rpm.

2.2.4 Medición de Azúcares Reductores

La medición de azúcares reductores comenzó una vez transcurridas las 48 horas de hidrólisis enzimática. Para medir la cantidad de azúcares reductores se utilizó el método de

DNS (del ácido dinitrosalicílico) (detallado en el Anexo I), (Miller, 1959), adaptado al formato de microplacas de 96 pocillos (Salazar *et al.*, 2006). Las determinaciones de azúcares reductores fueron realizadas en triplicado.

De cada tubo Falcon fue extraída una alícuota de 400µL de la fracción líquida de cada muestra. Cada alícuota fue llevada a tubos Eppendorf los cuales fueron centrifugados a 3000rpm por 2 minutos para que el sustrato se mantuviera concentrado en el fondo del tubo.

De cada alícuota se extrajeron 50µL de muestra y se combinaron con 50µL de DNS, los cuales fueron llevados a incubación en pocillos de placas termo-resistentes por 10 minutos a 100°C, para posteriormente ser enfriadas en hielo (para detener la reacción) y realizar la medición.

La medición se realizó en un medidor de placas, cuyo objetivo es medir la absorbancia de la reacción producida entre las muestras y el reactivo DNS con la temperatura. Las muestras fueron diluidas a razón de 1/20 y la absorbancia fue medida a 550nm.

Para traducir los valores de absorbancia a valores de concentración de azúcares reductores se realizó una curva de calibración en base a cantidades conocidas de D(+)-glucosa, en unidades de g/L. La curva de calibración convierte un valor conocido de absorbancia a una cantidad interpolada de azúcares reductores. La linealidad de la curva de calibración se mantiene entre los valores 0,06 y 1,3g/L donde se obtuvo un coeficiente de correlación del 99%. La curva de calibración se encuentra detallada en el Apéndice I.

La formula de cálculo utilizada fue la siguiente:

$$\text{Azúcares Reductores (g/l)} = (\text{Absorbancia Muestra} + a) / b \text{ (ecuación n}^\circ\text{2)}$$

Donde:

A Red: Es la cantidad de azúcares reductores totales obtenidos en la muestra, expresados en g/l y su valor se determina de acuerdo a la siguiente relación.

Abs Muestra: Es la absorbancia obtenida de la muestra a 550nm.

a: Es la intersección de la curva de calibración con el eje X.

b: Es la pendiente de la curva de calibración.

En este caso particular, la expresión utilizada se expresa en la ecuación nº3.

$$\text{Azúcares Reductores (g/l)} = (\text{Absorbancia Muestra}) / 1,9087 \text{ (ecuación nº3)}$$

2.2.5 Medición de Glucosa

La medición de glucosa fue realizada mediante un kit de glucosa comercial (Glucose Gluc-Pap) de RANDOX®, usando el protocolo indicado por el proveedor. Las determinaciones de glucosa se realizaron tres veces.

Se incubaron dos muestras controles, una blanco reactivo y otra blanco de glucosa según lo expuesto en el protocolo del kit, el cual se encuentra detallado en el Anexo II.

Terminada la incubación de la mezcla, se llevó al espectrofotómetro, el cual midió la absorbancia de la reacción producida. Las muestras fueron diluidas a razón 1/20 y la absorbancia fue medida a 500nm.

La formula de cálculo para traducir los valores de absorbancia a concentración de glucosa es la siguiente:

$$\text{Concertación de Glucosa (g/l)} = \text{Abs muestra} / \text{Abs estándar} \text{ (ecuación nº 4)}$$

Donde:

Abs muestra: Es la observancia registrada para la muestra.

Abs estándar: Es la observancia registrada de la mezcla de reactivo A y B medido a 500nm.

2.2.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico utilizado para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (HPB y tiempos de acción) fue un análisis de varianza con un diseño bifactorial de efectos fijos. En los casos en que efectivamente existieron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación de medias de Duncan.

El modelo estadístico empleado en el análisis de varianza fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \text{ (ecuación n°5)}$$

Donde:

Y_{ijk} : k-ésima observación para el tratamiento (ij)

μ : media global

α_i : efecto del i-ésimo nivel del factor α (hongo)

β_j : efecto del j-ésimo nivel del factor β (tiempo)

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

ε_{ijk} : efecto del k-ésimo error aleatorio en el tratamiento ij

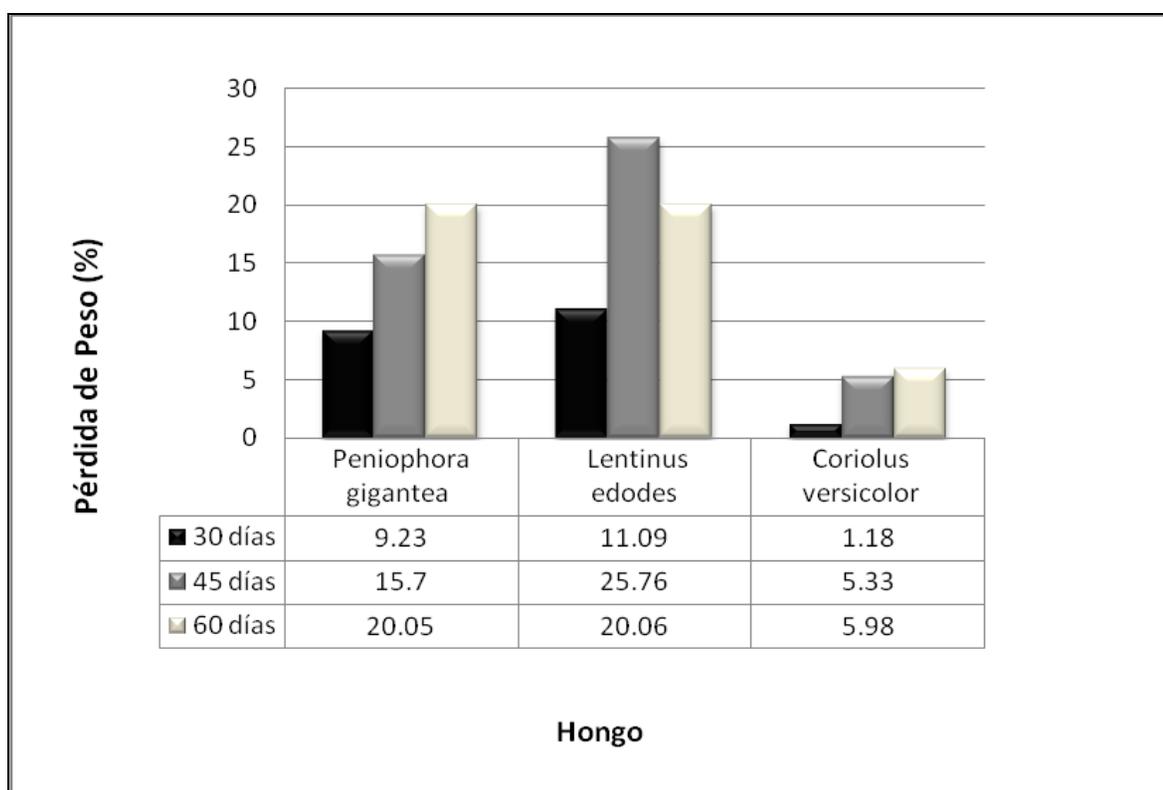
El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis estadístico se utilizaron como variables respuesta la pérdida de peso obtenida tras el ataque de los HPB con sus respectivos tiempos de acción (30, 45 y 60 días) y la cantidad de azúcares reductores y glucosa obtenida después de la hidrólisis enzimática realizada a los materiales lignocelulósicos.

3.1 Pretratamiento Biológico-Pérdida de peso

Figura 4. Porcentaje de pérdida de peso obtenido después del pretratamiento biológico para cada HPB y tiempo de acción.



Como se observa en la Figura 4, en general, se obtuvo una mayor pérdida de peso al aumentar el tiempo de acción de los distintos hongos sobre el sustrato leñoso, lo cual puede sugerir que mientras existan las condiciones básicas para el crecimiento, los HPB pueden seguir con su desarrollo y degradando el sustrato leñoso. No obstante existe una excepción

para el HPB *Lentinus edodes*, ya que alcanza los mayores valores de pérdida de peso a los 45 días, disminuyendo posteriormente a los 60 días. La disminución de la acción del hongo en este caso se puede deber a que algunas de las condiciones ambientales, como por ejemplo la humedad, no hayan sido suficientes para el desarrollo y crecimiento del hongo, produciéndose una debilitación de éste y por ende su efecto sobre el material leñoso; o también al envejecimiento del hongo.

Los valores más altos se obtuvieron con el hongo *Lentinus edodes* con máximo de 25,76% de pérdida de peso a los 45 días, y mínimo de 11,09% a los 30 días. El hongo menos agresivo correspondió a *Coriolus versicolor*, con pérdida de peso máxima a los 60 días de 5,98% y mínima de 1,18% a los 30 días de acción.

Al comparar resultados entre los tres HPB estudiados se puede verificar que *Lentinus edodes* y *Peniophora gigantea* obtuvieron un 89,35% y 87,21% de pérdida de peso respectivamente, por sobre los resultados obtenidos con el hongo menos agresivo *Coriolus versicolor* a los 30 días, a mayor tiempo acción los porcentajes se reducen, pero siempre existe una diferencia de al menos un 60% menos de pérdida de peso en comparación con los hongos más agresivos.

En relación al análisis de medias de Duncan, se observa, con un nivel de confiabilidad del 99% (Cuadro 6, Apéndice II), que existen diferencias estadísticamente significativas entre los hongos *Coriolus versicolor* y *Lentinus edodes*, y entre *Coriolus versicolor* y *Peniophora gigantea*, lo que significa que no es estadísticamente equivalente utilizar un hongo u otro. No así entre los hongos que alcanzan los mayores valores de pérdida de peso: *Lentinus edodes* y *Peniophora gigantea*.

Respecto a los tiempos de acción se concluye, con un nivel de confiabilidad del 99% (Cuadro 5, Apéndice III), que existen diferencias estadísticamente significativas entre los 30 y 45 días, y entre los 30 y 60 días, mientras que para los tiempos 45 y 60 días, no existe una diferencia significativa, por tanto es estadísticamente equivalente los resultados para estos tiempos de acción.

La pérdida de peso se considera como un indicador del biodeterioro de la madera, el cual se puede asociar a la pérdida de contenido de polisacáridos, lignina y de extraíbles, que afecta a la madera sometida a hongos de pudrición blanca, los cuales atacan preferentemente la pared celular de ésta, reduciendo su resistencia y dejándola más susceptible para el ataque enzimático (Kuhad *et al.*, 1997).

En un estudio realizado por Zaid (2004) donde se evaluó el deterioro de la madera de *Eucalyptus globulus* Labill., ocasionado por hongos de pudrición blanca a diferentes condiciones de temperatura, humedad y tiempos de acción, el hongo *Coriolus versicolor* obtuvo una pérdida de peso de 5,3% a una temperatura de 25°C, CH 40% y dos meses de acción, comparado con *Peniophora gigantea* que sólo alcanzó un valor de 4,51%, resultados inferiores a los resultados obtenidos en este estudio, aunque cabe señalar que el material utilizado por Zaid (2004) presenta mayores dimensiones que las utilizadas en esta investigación.

En otro estudio realizado por Leandro (2002) en donde se determinó la resistencia a la pudrición de madera de melina bajo la acción de *Coriolus versicolor*, se lograron pérdidas de peso promedio de 30% en un período de tiempo de cuatro meses, lo cual ratifica la agresividad de esta especie de hongo, a mayores tiempos de acción, permitiéndonos sugerir aplicar mayores tiempos de acción para este hongo, con el objetivo de obtener mejores resultados en pérdida de peso.

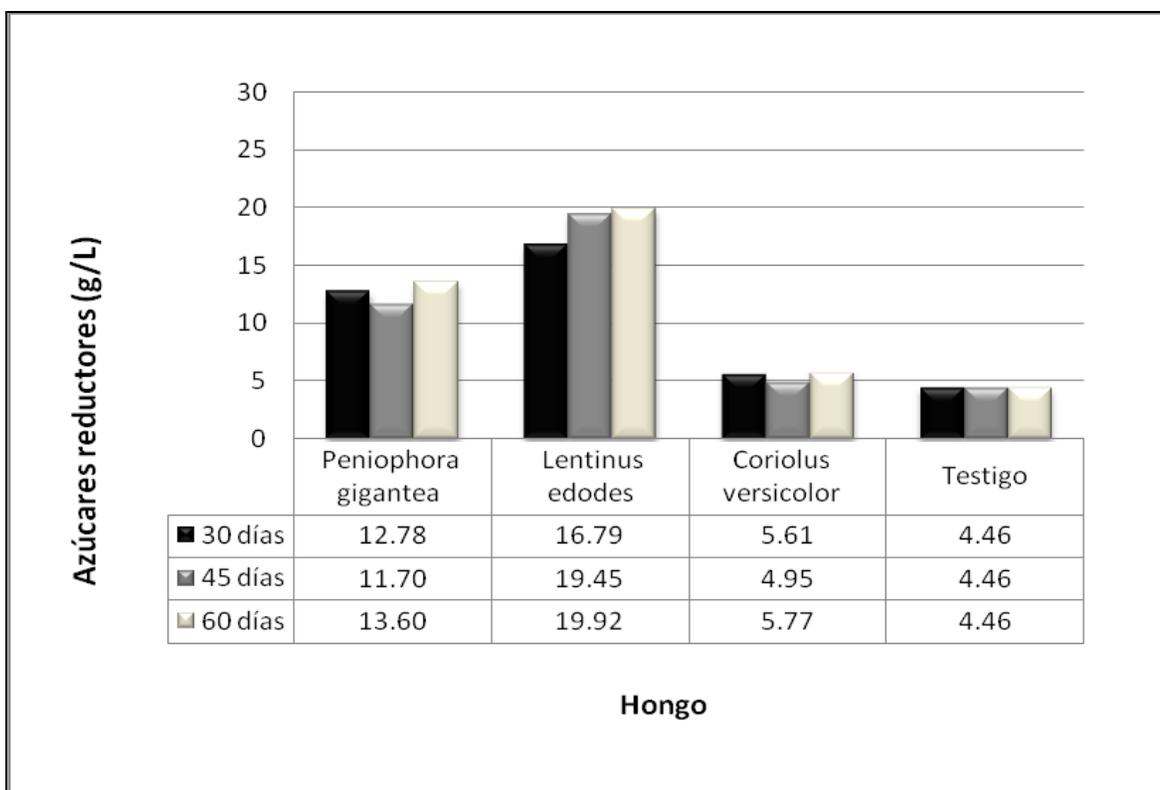
Si comparamos los resultados obtenidos en un estudio realizado por Del Río (2010), en donde se evaluó la acción de HPB sobre la composición química de una mezcla de maderas de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*, los hongos *Lentinus edodes* y *Peniophora gigantea* obtuvieron una pérdida de peso de 4,97% y 5,11%, respectivamente a los 30 días de acción. Valores más bajos a los obtenidos para cada uno de los hongos en este estudio, lo que podría deberse a que la cepa utilizada es diferente, además considerando que el sustrato leñoso corresponde a astillas de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*.

3.2 Rendimiento de Azúcares Reductores

De los tres hongos probados en el pretratamiento de la madera, se midió la cantidad de azúcares reductores (AR), liberados para cada uno de los tratamientos después de la sacarificación enzimática. Los resultados obtenidos, para cada hongo y tiempos de acción, se muestran en la Figura 5.

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

Figura 5. Azúcares Reductores promedio obtenidos con cada HPB y tiempo de acción.



Como se puede observar en la figura anterior, la mayor cantidad de azúcares reductores se obtuvo de la hidrólisis a los residuos pretratados con *Lentinus edodes* alcanzándose valores de 16,79g/L, 19,45g/L y 19,92g/L a los 30, 45 y 60 días de acción, respectivamente.

Además esta cepa fúngica presentó las mayores pérdidas de peso (Figura 4), por lo tanto, su deslignificación parece ser selectiva con respecto a la degradación de lignina.

Peniophora gigantea fue la segunda cepa fúngica más exitosa en la obtención de azúcares reductores, obteniéndose 12,78g/L, 11,70g/L y 13,60g/L a los 30, 45 y 60 días, respectivamente.

El resultado menos satisfactorio se obtuvo con *Coriolus versicolor* a los 45 días de acción, con una concentración de 4,95g/L.

El rendimiento en azúcares reductores muestra un aumento con la duración del tratamiento con los HPB, observándose un fuerte incremento entre los 30 y 45 días para los tres hongos estudiados, mientras que entre los 45 y 60 días sólo *Peniophora gigantea* muestra aumentos en el rendimiento.

Al comparar la pérdida de peso con el rendimiento en azúcares reductores, se puede apreciar que en general existe una relación directa, puesto que a medida que aumenta el porcentaje de pérdida de peso también aumenta la concentración de azúcares reductores. La misma tendencia se observa en un estudio similar realizado por Fritz (2009) donde evalúa diferentes hongos de pudrición blanca en residuos de lenga.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de medias de Duncan, con un nivel de confiabilidad del 99% (Cuadro 8, Apéndice II), se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres HPB evaluados en el estudio. Aunque se puede apreciar en cada hongo un incremento en el rendimiento de azúcares reductores a medida que el tiempo de acción aumenta, este es marginal y no significativo estadísticamente (Cuadro 7, Apéndice II).

Estableciendo una comparación con la muestra testigo, el aumento en la liberación de azúcares reductores que se observa con el mejor tratamiento, es decir, *Lentinus edodes* a los 60 días de acción, es 4,5 veces mayor. Estableciendo la misma comparación con el

tratamiento menos satisfactorio, es decir, *Coriolus versicolor* a los 45 días de acción, la relación es 1,1 veces mayor. *Peniophora gigantea* por su parte, a los 60 días de acción, muestra una relación de 3 veces mayor, respecto al testigo. Lo anterior pone en evidencia que el pretratamiento fúngico aumenta la cantidad de azúcares reductores, específicamente *Lentinus edodes* genera un rendimiento significativamente superior en la liberación de azúcares reductores.

La misma tendencia se observa en un estudio realizado por Villaseñor (2010) donde *Coriolus versicolor* se comporta con similares rendimientos al ser comparado con la muestra testigo y los dos restantes HPB evaluados *Pleurotus ostreatus* y *Stereum hirsutum*. Alcanzando *Coriolus versicolor* rendimientos de 1,82 veces mayor que el testigo, mientras que los valores más altos se obtuvieron con *Stereum hirsutum* 27,72g/L, aumentando la liberación de azúcares en 6,22 veces a los 60 días, respecto a la muestra testigo.

Hacemos referencia a la cantidad de veces, como medida de comparación entre valores obtenidos con testigo, sin pretratamiento y con pretratamiento biológico con HPB, para visualizar con mayor claridad las diferencias entre ellos, teniendo como parámetro base AR (g/L).

Cabe señalar que el testigo es el tratamiento de residuos de madera sometidos a hidrólisis enzimática sin la acción previa de hongos y corresponde al promedio de tres repeticiones.

3.3 Cantidad de Glucosa

Al realizar el análisis estadístico, de la cantidad de glucosa liberada en la hidrólisis enzimática de los residuos de madera provenientes de los diferentes tratamientos fúngicos, se concluyó que existen diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los hongos utilizados, pero no para los tiempos de acción, no presentándose interacción entre estos factores al considerar un nivel de confiabilidad del 99%.

En relación al análisis de medias de Duncan, se observa, con un nivel de confiabilidad del 99% (Cuadro 10, Apéndice II), que existen diferencias estadísticamente significativas entre los hongos *Coriolus versicolor* y *Lentinus edodes*, y entre *Coriolus versicolor* y *Peniophora gigantea*, lo que significa que no es estadísticamente equivalente utilizar un hongo u otro. No así entre los hongos *Lentinus edodes* y *Peniophora gigantea*.

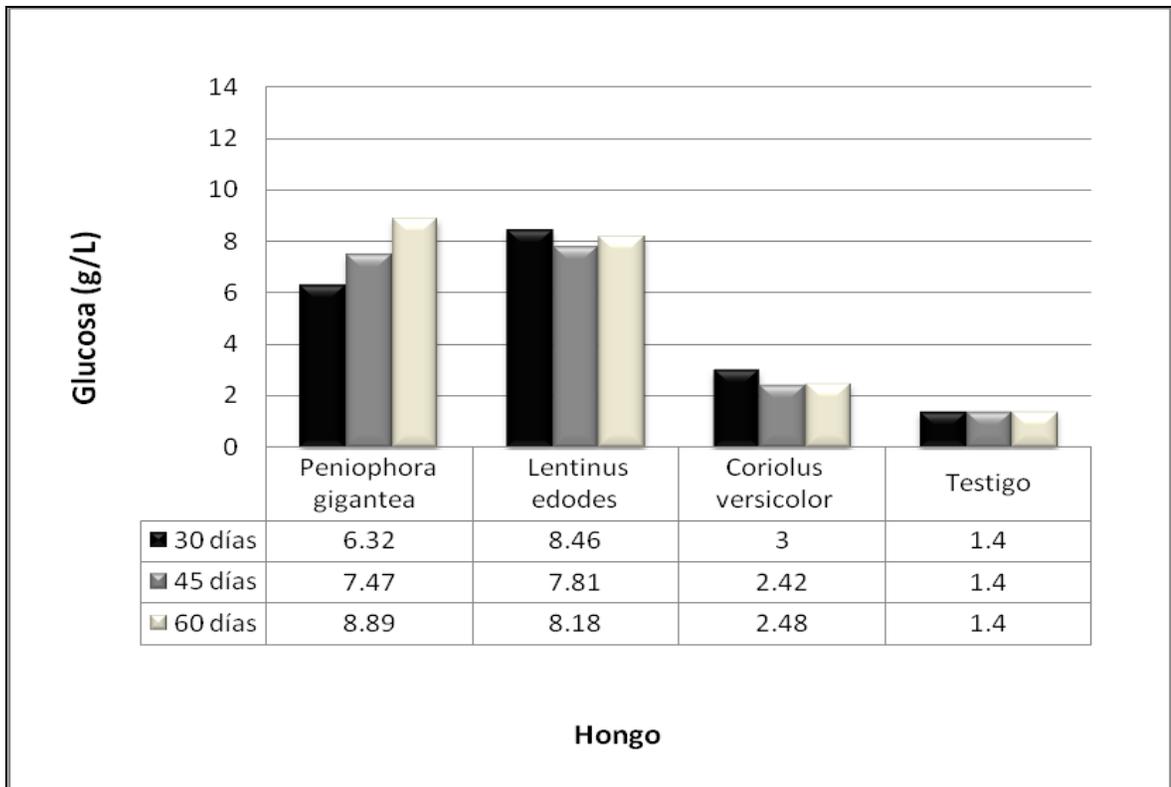
En la Figura 6, se muestra la glucosa liberada, en unidades de gramos de glucosa por litro, producida por la hidrólisis enzimática para las tres diferentes cepas de hongo y los tres tiempos de acción. Los valores son promedios de tres repeticiones.

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 eucalipto pretratados.

Se observa que la mayor concentración de glucosa se obtiene con el hongo *Peniophora gigantea* a los 60 días de tiempo de acción con 8,89g/L, mientras que el menor rendimiento en glucosa se obtuvo con *Coriolus versicolor* a los 45 días de acción con 2,42g/L.

Por su parte *Lentinus edodes* obtuvo el segundo mejor rendimiento en glucosa, con concentración de 8,46g/L a los 30 días de acción, 7,81g/L a los 45 días y 8,18g/L a los 60 días.

Figura 6. Cantidad de Glucosa promedio obtenida con cada HPB y tiempo de acción.



Como se observa, los mayores valores de glucosa no se encuentran siempre a los 60 días, sino que dependen de cada HPB. Esto rompe la tendencia observada en los resultados de pérdida de peso y azúcares reductores, donde la mayor pérdida de peso y la mayor cantidad de azúcares reductores se obtuvieron, en general, a los 60 días. Esto puede explicarse, porque la glucosa disponible empieza a ser consumida por los hongos, a una mayor tasa a medida que éstos se desarrollan, por lo cual, a mayor tiempo de desarrollo de ellos, la disponibilidad de glucosa podría decrecer. Sin embargo, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los tiempos de acción, tanto para azúcares reductores como para glucosa.

Al analizar la cantidad de glucosa liberada en el proceso de hidrólisis enzimática, de los residuos de madera provenientes de los tratamientos fúngicos realizados, se concluyó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los hongos utilizados, pero no para los tiempos de acción, no presentándose interacción entre estos factores al considerar un nivel de confianza del 99% (Cuadros 9 y 10, Apéndice II). Sin embargo para *Peniophora*

gigantea la tendencia es a aumentar el rendimiento en glucosa a mayor tiempo de acción, mientras que *Lentinus edodes* y *Coriolus versicolor* alcanzan el mayor rendimiento a los 30 días de acción.

La concentración en g/L, expresa la cantidad en gramos de soluto que hay por cada litro de disolución. Hacemos referencia a la cantidad de veces, como medida de comparación entre valores obtenidos con testigo, sin pretratamiento y con pretratamiento biológico con HPB, para visualizar con mayor claridad las diferencias entre ellos, teniendo como parámetro base glucosa y AR (g/L).

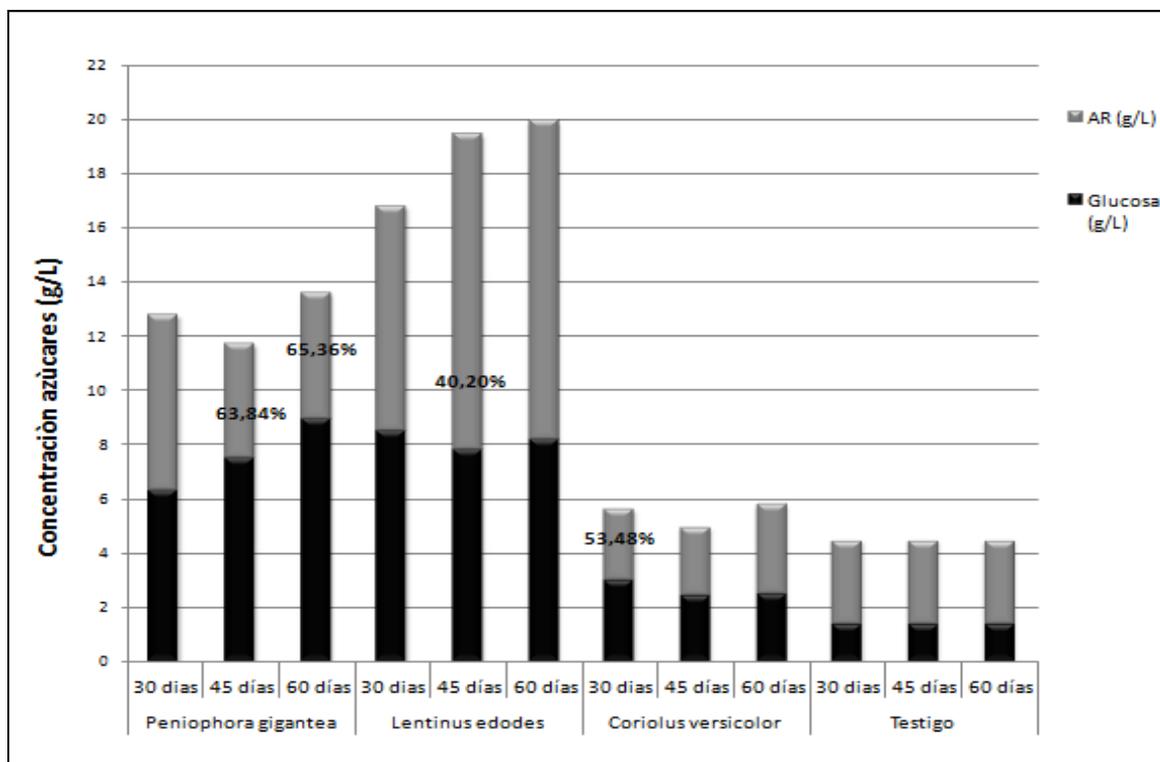
Si comparamos los tratamientos de HPB con el testigo, se puede observar que la cantidad de glucosa obtenida en el pretratamiento con *Peniophora gigantea*, es 6,4 veces mayor que el testigo a los 60 días, mientras que para 45 y 30 días fue 5,3 y 4,5 veces mayor, respectivamente.

Lentinus edodes fue el segundo mejor hongo con 6 veces mayor que el testigo a los 30 días, mientras que para 60 y 45 días fue 5,8 y 5,6 veces, respectivamente.

Coriolus versicolor por su parte siguió presentando los menores valores, fue 2,1 veces mayor para 30 días, 1,8 y 1,7 veces mayor que el testigo a los 60 y 45 días respectivamente.

Como se puede apreciar, la utilización del pretratamiento fúngico mejora sustantivamente la cantidad de glucosa que se libera en la hidrólisis enzimática.

Figura 7. Cantidad de glucosa obtenida en el total de azúcares reductores.



Como se puede apreciar en la figura anterior, *Peniophora gigantea*, produce el mayor porcentaje de glucosa respecto al total de azúcares reductores, con un 65,36% a los 60 días de acción del hongo, un 63,84% y 49,44%, a los 45 y 30 días de acción, respectivamente. *Coriolus versicolor* obtiene un 53,48% a los 30 días, un 48,89% a los 45 días y 42,98% a los 60 días de acción. *Lentinus edodes* es el hongo que presenta los menores porcentajes de glucosa respecto al total de azúcares reductores, con un 50,39% a los 30 días de acción, 41,07% a los 60 días y 40,20% a los 45 días de acción.

Cuadro 1. Comparación Glucosa y AR obtenidos para cada pretratamiento con HPB y tiempo de acción.

HPB	<i>Peniophora gigantea</i>			<i>Lentinus edodes</i>			<i>Coriolus versicolor</i>			Testigo
Tiempo acción	30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días	30 días	45 días	60 días	
AR (g/L)	12.78	11.70	13.60	16.79	19.43	19.92	5.61	4.95	5.77	4.46
Glucosa (g/L)	6.32	7.47	8.89	8.46	7.81	8.18	3.00	2.42	2.48	1.4

En el Cuadro 1 se observa que la cantidad de glucosa disponible en promedio para los tres hongos aumenta a mayor tiempo de acción, obteniéndose en promedio 6,52g/L, 5,90g/L y 5,93g/L para 60, 45 y 30 días de acción, respectivamente. La cantidad de azúcares reductores disponibles en promedio para los tres hongos también aumenta a mayor tiempo de acción, obteniéndose en promedio 13,10g/L, 12,03g/L y 11,73g/L para 60, 45 y 30 días de acción, respectivamente. Se puede evidenciar la eficacia del pretratamiento biológico en liberar glucosa y azúcares reductores, al comparar resultados obtenidos respecto al testigo, puesto que mejoran notablemente los rendimientos tanto de azúcares reductores como de glucosa y por ende, permiten aumentar el rendimiento de etanol por unidad de materia seca.

Para la estimación de la cantidad teórica de bioetanol producida a partir de residuos de eucalipto pretratados con HPB, se realizó considerando el mejor pretratamiento. El mejor pretratamiento correspondió al pretratamiento con *Peniophora gigantea*, a los 60 días, obteniéndose aproximadamente 89 gramos de glucosa por cada kilogramo de residuos secos pretratados, equivalentes aproximadamente a 57,5 litros de bioetanol puro por cada tonelada seca de residuos de eucalipto. Utilizando el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, que corresponde a 0,511g de etanol y 0,489g de CO₂ por cada 1g de glucosa (Anexo III).

Fritz (2009) estudió el rendimiento de azúcares reductores y glucosa a partir de Lenga, utilizando como pretratamiento hongos de pudrición blanca, obteniendo un rendimiento máximo de 11,8 g/L de glucosa a los 60 días de acción, utilizando el hongo *Ganoderma applanatum*, valor comparable a los 8,89 g/L obtenidos como máximo en este estudio con el hongo *Peniophora gigantea* a los 60 días de acción, estas diferencias se deben a el material leñoso utilizado en cada estudio.

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. Existen estudios que combinan

pretratamientos biológicos con otro, obteniéndose así mejores rendimientos y reducción de energía, por lo tanto se esperaría que los rendimientos obtenidos mejoraran. Esto fue demostrado por Itoh et al (2003) investigación que logró aumentar la productividad de etanol al utilizar un pretratamiento biológico de 4 semanas, seguido por un proceso de etanólisis, en donde el objetivo 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%.

Yu *et al* (2009) concluyeron en su investigación que los rendimientos en la tasa de hidrólisis enzimática se mejoran al combinar un pretratamiento biológico con uno físico y químico. Otro estudio realizado por Lee *et al* (2007) estudió el efecto del pretratamiento biológico en madera de *Pinus densiflora*, sometido al ataque con *Sterreum hirsutum* durante 8 semanas, logrando aumentar el rendimiento de azúcares en un 21% con respecto a la muestra control.

Respecto a la producción experimental de bioetanol, Ballesteros *et al* (2004) obtuvieron 17g/L y 19g/L de etanol a partir de eucaliptus y álamo, respectivamente, utilizando un pretratamiento de explosión a vapor y el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), mientras que en este estudio se logró una concentración máxima teórica de 4,54g/L. Con la acción combinada de dos hongos (*Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*) sobre aserrín durante 45 días, Lopretti *et al* (2007), obtuvieron 13g/L de azúcares reductores.

Al consultar investigaciones en donde se utilizaron pretratamientos físicos y químicos, es posible afirmar que ellos 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 45,7g/L, equivalente al 94% del teórico. Además actualmente las investigaciones a nivel mundial van dirigidas a combinar distintos tipos de pretratamientos y utilizar procesos SSF, aumentándose así los rendimientos (Fritz, 2009).

4. CONCLUSIONES

El pretratamiento fúngico mejora la obtención de azúcares reductores y de glucosa a partir de astillas de *Eucalyptus globulus* Labill., en comparación con las muestras sin pretratar.

La mayor cantidad de azúcares reductores y de glucosa se obtiene al pretratar el material durante 60 días con el hongo *Peniophora gigantea*, obteniéndose un rendimiento del 8,9%.

Peniophora gigantea mejora la obtención de azúcares reductores en 3 veces a los 60 días, en 2,6 veces a los 45 días y 2,9 veces a los 30 días, en comparación con la muestra control. Respecto a la obtención de glucosa, mejoró en 6,4 veces a los 60 días, 5,3 veces a los 45 días y 4,5 veces a los 30 días, en comparación con la muestra control.

Con *Lentinus edodes* se alcanza un máximo de 4,5 veces para azúcares reductores a los 60 días, en comparación con la muestra control. Además se mejora la obtención de glucosa en 6 veces a los 30 días, en comparación con la muestra control.

Con el hongo *Coriolus versicolor* se obtienen los rendimientos más bajos, alcanzándose un máximo de 1,3 veces para los azúcares reductores a los 60 días y 2,1 veces para la glucosa a los 30 días, en comparación con la muestra control.

Existe un significativo aumento en el rendimiento de azúcares reductores producto del pretratamiento con Hongos de Pudrición Blanca. El tipo de HPB y el tiempo de acción de cada uno, son variables que inciden en la pérdida de peso y en el rendimiento de azúcares reductores, en comparación con las muestras sin pretratar. Concluyendo que existe eficiencia del pretratamiento biológico, aumentando el rendimiento de etanol por unidad de materia seca.

Los resultados obtenidos al evaluar la participación de glucosa sobre el total de azúcares reductores nos 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 en este estudio, los cuales pueden ser fermentados, aumentando así el rendimiento de la hidrólisis.

Sería importante conocer con mayor exactitud cada uno de los azúcares que componen el grupo de azúcares reductores. Para ello se recomienda realizar estudios que permitan identificarlos y cuantificarlos, manera tal de poder estimar con mayor exactitud el rendimiento de etanol posible de obtener.

De acuerdo a las variables y condiciones utilizadas en este estudio, la estimación de la producción de bioetanol a partir de pin-chips de *Eucalyptus globulus* Labill., indica que podrían obtenerse aproximadamente 57,5 litros de etanol puro por cada tonelada de material seco pretratado.

El pretratamiento utilizado en este estudio si bien mejora la obtención de bioetanol, las concentraciones obtenidas son inferiores a las obtenidas con otros pretratamientos.

Se recomienda también desarrollar experiencias a nivel piloto donde se incluya la etapa de fermentación de los azúcares reductores, para la elaboración de etanol a partir de madera pretratada con hongos de pudrición blanca.

Para seguir en la línea de este estudio, se recomienda además ampliar el número de hongos de pudrición blanca a evaluar, además de estudiar el efecto de estos hongos sobre otros sustratos que sean de interés para la producción de bioetanol.

5. BIBLIOGRAFÍA

- BALLESTEROS, I. 1999. Desarrollo rural y energías renovables, biomasa y biocombustibles. Proyecto biocombustibles líquidos. Ciemat (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas). Ministerio de Ciencia y Tecnología. Madrid 33 p.
- 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.
- BÉGUIN, P. 1990. Molecular Biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol 44. pp. 219-248.
- C. CASTRO, M. VALVERDE, O. PAREDES. 2004. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y Procesos de producción. CONCYTEG, Año 4, Núm. 54, 1246-1269.
- DEL RIO, R. 2010. Acción de tres hongos de pudrición blanca sobre la composición química de una mezcla de maderas de *Eucalyptus globulus Labill* y *Eucalyptus nitens* (Deane & Maid) Maid. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la naturaleza.
- KISHEN TANGNU, S., BLANCH, H.W., WILKE, C.R. 1981. Enhanced production of cellulose, hemicellulase and B-glucosidase by *Trichoderma reesi*. Biotechnol Bioeng, 1837-1849. 23p.
- DALE, B. E. 1987. Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology. Trends Biotechnol, 5. pp. 287-291.

- FAN, L., GHARPURAY, M., LEE, Y. 1987. Cellulose hydrolysis biotechnology monographs 57. Springer, Berlin.
- FENGEL, D. y WEGENER, G. 1984. Wood. Chemistry, ultrastructure and reactions. Walter de Gruyter & Co. Berlin. Alemania. 613 p.
- FRITZ, 2009. Rendimiento de azúcares reductores a partir de *Nothofagus pumilo* Krasser sometido a un pretratamiento biológico para la producción de etanol. Memoria Ingeniería de la Madera. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la naturaleza.
- GILBERT, I. G y TSAO, G. T. 1983. Interaction between solid substrate and cellulose enzymes in cellulose hydrolysis. Annu. Rep. Ferm. Process, 6. pp. 323-358.
- HAMELINCK, C., HOOIJDONK, G., FAAIJ, A. 2003. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno economic performance as development progresses. [en línea] Universiteit Utrecht Copernicus institute Science Technology Society. Holanda. <http://www.senternovem.nl/mmfiles/149043_tcm24124362.pdf> [Consulta 12 de septiembre del 2006].
- HATAKKA, A. I. 1983. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol, 18. pp. 350-357.
- 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.
- JARPA, S. 1988. Sacarificación de sustratos lignocelulósicos por HPB (Saccharification of lignocellulosic substrates by brown-not-fungi). Tesis (Magíster en Nutrición Humana). Universidad de Chile. 98 p.

- JURI, S. 2011. Sacarificación y Fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. Memoria Ingeniería Civil en Biotecnología Madera. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias físicas y Matemáticas. 66p.
- KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. 1997. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Microorganisms and their Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls. p: 45-125.
- LEANDRO, L. 2002. Las maderas de plantaciones forestales. Resistencia a la pudrición de la madera de melina de dos zonas de Costa Rica, utilizando el hongo *Trametes versicolor*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de investigación en integración bosque industria. Año 2, N° 2. p:4. [en línea] Disponible en el sitio <<http://www.itcr.ac.cr/profesores/rmoya/melinateca/boletin%20las%20maderas%20de%20plantaciones%20bolestales/boletin%204.pdf>>. [Consulta 12 de septiembre del 2008].
- 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; LOPEZ, A; REY, F; OTTATIC 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>. [Consulta 10 de enero del 2009].
- MACARRÓN, M. 1992. Purificación y Caracterización de Endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* QM9414. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid. 106 p.

- MEJÍA, T., MUJICA, F., GONZÁLEZ, A., ORTEGA, J. 2002. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avance y Perspectiva, 21. pp. 267-271.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31. pp. 426-428.
- MONTENECOURT, B., EVELEIGH, D. 1979. Production and characterization of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annual Meeting Proceeding, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta. pp. 101-108.
- MONTGOMERY, D. C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, México. 585 p
- NEGRO, MJ. 1991. Degradación Enzimática de la Biomasa de *Onopordum nervosum* bois. Memoria para optar al Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. Madrid. 311 pp. (Documento pdf). [En línea] <<http://www.ucm.es/eprints/3599>>, [consulta: 8 de septiembre del 2006].
- PARRA, C y BAEZA, J. 2006. Chile experimenta con energía verde. Universidad de Concepción. Ministerio de Educación. Revista de Educación. Edición N° 323. pp. 32- 34.
- OVANDO-CHACON S. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia 42: 113-122. [En línea] <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=15404206>>, [consulta: 8 de septiembre del 2006].
- ROMANO, S., GONZALEZ, E Y LABORDE, M. 2005. Combustibles Alternativos. Red CYTED: Nuevas Tecnologías para la obtención de Biocombustibles. Ediciones Cooperativas. Buenos Aires, Argentina. 189 p.

- RUIZ, J. 2004. Determinación de factores ambientales para el crecimiento de dos hongos (*Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum*) y su acción biodegradante sobre la madera de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus*. Memoria Ingeniería de la Madera. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. 90 p.
- SALAZAR, M., RAMOS, R., JIMENEZ, H. 2006. Physical, chemical and microscopic characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its comparison. *Carbohydrate Polymers*. pp. 07-035.
- SÁNCHEZ, O Y CARDONA, A. 2005. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante II: Integración de Procesos. En *Interciencia*, Noviembre, vol. 30, número 011, 679-686 Caracas, Venezuela. 9 p. [En línea]<<http://www.redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/339/33911004.pdf>, [consulta: 8 de septiembre del 2006].
- SUN, Y., CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83. pp. 1-11.
- F. TALEBNIA; D. KARAKASHEV Y I. ANGELIDAKI. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101: 4744 – 4753.
- TANIGUCHI, M.; H. SUZUKI; D. WATANABE; K. SAKAI; K. HOSHINO and T. TANAKA. 2005. Pretreatment evaluation with *Pleurotus ostreatus* in wheat straw enzymatic saccharification. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol.100. pp. 637-643.
- TAPIA, C.; R. CARMONA; N. GÁLVEZ Y J. GONZÁLEZ. 2000. Caracterización del ataque de dos HPB en madera de Pino radiata por lignina Klason y espectroscopia FTIR. I Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo de Productos Forestales. Actas Concepción – Chile.

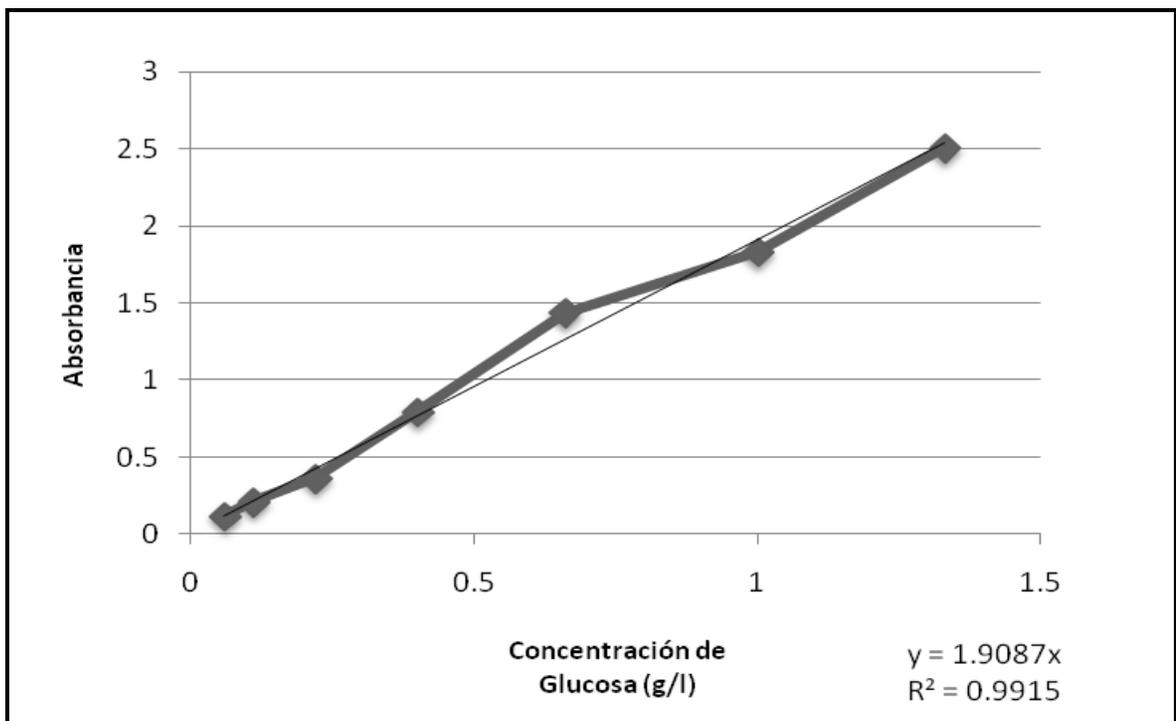
- VÁSQUEZ H Y DACOSTA, O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Investigación y Tecnología*, 8(4): 249-259, Mayo, 2007.
- VILCHES, P. 2002. Determinación de la actividad Exoglucanasa de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Hauraz. Tesis de maestría. UNAM. Facultad de Ciencias Biológicas.
- VILLASEÑOR, F. 2010. Rendimiento en azúcares reductores, obtenidos mediante hidrólisis enzimática en *Eucalyptus globulus*, pretratados con hongos de pudrición blanca. Memoria Ingeniería Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la naturaleza.
- 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* Labill por método gravimétrico. Tesis Ingeniería en la Madera, Escuela de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 65 p.

6. APÉNDICES Y ANEXOS

Apéndice I. Curva de calibración DNS

Se utilizaron siete diluciones de un stock de glucosa de concentración de 2g/L, a 90µL de cada dilución se le agregaron 90µL de solución DNS en una placa termo resistente de 96 pocillos. La placa fue incubada a una temperatura de 100°C durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se enfrió en hielo durante 5 minutos. Se traspasaron 50µL a una micro placa y se leyó la absorbancia en un lector de placas Anthos 2010 a una longitud de onda de 550nm. Los valores de absorbancia se correlacionaron con las diluciones generando la curva de calibración. Con la curva de calibración se pueden traducir valores de absorbancia de la hidrólisis a valores de g/l correspondientes a la concentración de azúcares reductores.

Figura 8. Curva de Calibración DNS para la determinación de azúcares.



Apéndice II. Análisis Estadístico

Cuadro 2. Resultados ANDEVA Pérdida de Peso.

Análisis de la varianza para PERDIDA DE PESO - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Coficiente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A: TIEMPO	0.12644	2	0.63217	18.5	0.00000
B: HPB	0.36802	2	0.18401	53.86	0.00000
INTERACCIONES					
AB	0.01402	4	0.00350469	1.03	0.4207
RESIDUOS	0.0614963	18	0.00341646		

TOTAL CORREGIDO	0.569968	26			

Los coeficientes F están basados en el error cuadrático medio residual					

Fuente: análisis estadístico fue realizado utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 3. Resultados ANDEVA Azúcares Reductores.

Análisis de la varianza para AZUCARES REDUCTORES - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Coficiente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A: TIEMPO	6.19298	2	3.09649	0.77	0.4771
B: HPB	1187.1	2	593.55	147.83	0.0000
INTERACCIONES					
AB	16.84630	4	4.21157	1.05	0.4098
RESIDUOS	72.2733	18	4.01518		

TOTAL CORREGIDO	1282.41	26			

Los coeficientes F están basados en el error cuadrático medio residual					

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 4. Resultados ANDEVA Glucosa.

Análisis de la varianza para GLUCOSA - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Coefficiente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: TIEMPO	4.29398	2	2.14699	1.06	0.3679
B: HPB	36.5167	2	18.2584	8.99	0.0020
INTERACCIONES					
AB	7.47876	4	1.86969	0.92	0.4733
RESIDUOS	36.5398	18	2.02999		

TOTAL CORREGIDO	84.8293	26			

Los coeficientes F están basados en el error cuadrático medio residual

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 5. Comparación de Medias DUNCAN para Pérdida de Peso respecto al tiempo de acción.

Contraste Múltiple de Rangos para PERDIDA DE PESO según TIEMPO				

Método: 99.0 porcentaje Duncan				
TIEMPO	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

60	9	1.18557	0.0194835	X
45	9	1.19051	0.0194835	X
30	9	1.33314	0.0194835	X

Contraste		Diferencias		

30 - 45		*0.142627		
30 - 60		*0.147573		
45 - 60		0.00494594		

* indica una diferencia significativa.

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 6. Comparación de Medias DUNCAN para Pérdida de Peso respecto a HPB.

Contraste Múltiple de Rangos para PERDIDA DE PESO según HPB				

Método: 99.0 porcentaje Duncan				
HPB	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

Lentinus edodes	9	1.12629	0.0194835	X
Peniophora giga	9	1.18492	0.0194835	X
Coriolus versic	9	1.39801	0.0194835	X

Contraste		Diferencias		

Coriolus versicol - Lentinus edodes		*0.271715		
Coriolus versicol - Peniophora gigant		*0.213089		
Lentinus edodes - Peniophora gigant		-0.0586262		

* indica una diferencia significativa.				

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 7. Comparación de Medias DUNCAN para Azúcares Reductores respecto al tiempo de acción.

Contraste Múltiple de Rangos para AZUCARES REDUCTORES según TIEMPO				

Método: 99.0 porcentaje Duncan				
TIEMPO	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

30	9	10.8602	0.667931	X
45	9	11.185	0.667931	X
60	9	11.9989	0.667931	X

Contraste		Diferencias		

30 - 45		-0.324828		
30 - 60		-1.13865		
45 - 60		-0.813817		

* indica una diferencia significativa.				

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 8. Comparación de Medias DUNCAN para Azúcares Reductores respecto a HPB.

Contraste Múltiple de Rangos para AZUCARES REDUCTORES según HPB				

Método: 99.0 porcentaje Duncan				
HPB	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

Coriolus versic9		2.63821	0.667931	X
Peniophora giga9		12.6939	0.667931	X
Lentinus edodes9		18.712	0.667931	X

Contraste		Diferencias		

Coriolus versicol - Lentinus edodes		*-16.0738		
Coriolus versicol - Peniophora gigant		*-10.0557		
Lentinus edodes - Peniophora gigant		*6.01806		

* indica una diferencia significativa.				

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 9. Comparación de Medias DUNCAN para Glucosa respecto al tiempo de acción.

Contraste Múltiple de Rangos para GLUCOSA según TIEMPO				

Método: 99.0 porcentaje Duncan				
TIEMPO	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

45	9	6.74826	0.474926	X
30	9	6.80106	0.474926	X
60	9	7.61939	0.474926	X

Contraste		Diferencias		

30 - 45		0.0527958		
30 - 60		-0.818335		
45 - 60		-0.87113		

* indica una diferencia significativa.				

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Cuadro 10. Comparación de Medias DUNCAN para Glucosa respecto al HPB.

Contraste Múltiple de Rangos para GLUCOSA según HPB				

Método: 99.0 porcentaje Duncan				
HPB	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

Coriolus versic9		5.44756	0.474926	X
Peniophora giga9		7.56419	0.474926	X
Lentinus edodes9		8.15695	0.474926	X

Contraste	Diferencias			

Coriolus versicol - Lentinus edodes	*-2.70938			
Coriolus versicol - Peniophora gigant	*-2.11663			
Lentinus edodes - Peniophora gigant	0.592753			

* indica una diferencia significativa.				

Fuente: análisis estadístico utilizando el programa STATGRAFICS Plus 5.1

Anexo I. Determinación De Azúcares Reductores Por El Método Del Ácido Dinitrosalicílico (DNS).

1. Preparación del Reactivo DNS

Mezclar:

Agua destilada	1416 ml
3,5 ácido dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
Disolver y agregar	
Sal de Rochelle (Na-K)	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.

2. Curva de Calibración:

- A partir de un stock de glucosa de concentración 2 (g/l) se preparan diluciones para realizar la curva de calibración utilizando agua destilada 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.

3. Calculo:

$$A_{\text{Red}} (\text{mg/ml}) = (\text{Abs Muestra} + a) / b$$

Donde:

A_{Red} : Es la cantidad de azúcares reductores totales obtenidos en la muestra expresados en mg/ml.

Abs Muestra: Es la absorbancia obtenida de la muestra a 550 mn.

a: Es la intersección de la curva de calibración con el eje X.

b: Es la pendiente de la curva de calibración.

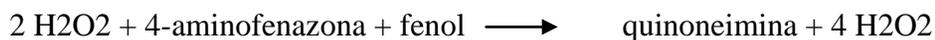
Anexo II. Determinación de glucosa bajo procedimiento estándar.

Corresponde a una prueba enzimática colorimétrica por glucosa según Laboratorio Randox®, bajo el método GLUC-PAP. Ensayo sin desproteinización.

Principio:

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.

1. Reacción



2. Reactivos

Reactivo A

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

Reactivo B

- Glucosa

3. Procedimiento

Longitud de Onda:	500nm
Cubeta:	1 cm longitud
Temperatura:	15 - 25 °C o 37 °C
Medición:	contra blanco reactivo

Pipetear a tubos de ensayo

	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.

4. Cálculo

$$\text{Glucosa} = \text{Abs muestra} / \text{Abs estándar}$$

Donde:

Glucosa: Es la concentración de glucosa total expresada en g/l

Abs muestra: Es la absorbancia de la muestra obtenida a 500 nm.

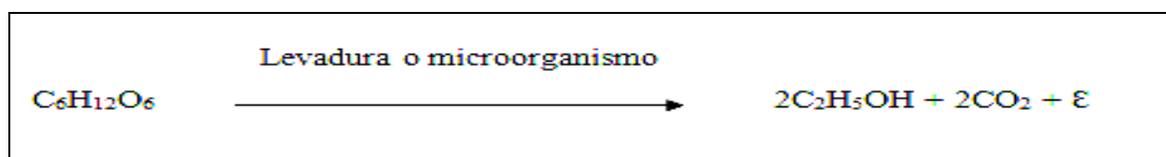
Abs estándar: Es la absorbancia del estándar obtenida a 500 nm.

Anexo III. Estimación de la cantidad teórica de bioetanol factible de producir.

La fermentación alcohólica es una biorrefinación que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono (CO₂). Los principales microorganismos responsables de esta transformación son las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* es la comúnmente utilizada. Pero existen estudios que incorporan hongos y bacterias, aunque presentan una explotación industrial más incipiente (Vásquez y Dacosta, 2007).

La estimación de la cantidad teórica de bioetanol producida a partir de residuos de eucalipto pretratados con HPB, se realizó considerando el mejor tratamiento, aquel que presentó la mayor cantidad de glucosa.

Se utilizó el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, que corresponde a 0,511g de etanol y 0,489g de CO₂ por cada 1g de glucosa, correspondiendo a 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 CO₂ es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse (Vásquez y Dacosta, 2007)

Cuadro 11. Estimación teórica de la producción de bioetanol a partir de residuos de eucalipto pretratados con *Peniophora gigantea* sp durante 60 días.

Pretratamiento fúngico seleccionado	Glucosa (g/kg)	Etanol teórico (g/kg) (1)	Etanol teórico (L/ton) (2)
<i>Peniophora gigantea</i>	88,9	45,42	57,55

(1): 0,511g etanol cada 1g de glucosa

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