

UCH-FC
Q. Ambiental
095
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AZÚCARES EN MATERIALES
LIGNOCELULÓSICOS DE RESIDUOS AGRÍCOLAS Y FORESTALES
POSIBLES DE USAR PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

Stephanie De Lourdes Oyaneder Parra

Directores de Seminario de Título: Dr. René Carmona Cerda
M. Cs. Sylvia Copaja Castillo



Diciembre de 2010
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

STEPHANIE DE LOURDES OYANEDER PARRA

“DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AZÚCARES EN MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS DE RESIDUOS AGRÍCOLAS Y FORESTALES POSIBLES DE USAR PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Ing. René Carmona Cerda
Director Seminario de Título

Firma manuscrita de René Carmona Cerda en tinta azul sobre una línea horizontal.

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo
Director Seminario de Título

Firma manuscrita de Sylvia Copaja Castillo en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Alejandro García
Corrector

Firma manuscrita de Alejandro García en tinta azul sobre una línea horizontal.

M. Cs. Héctor Bravo
Corrector

Firma manuscrita de Héctor Bravo en tinta azul sobre una línea horizontal.





Stephanie Oyaneder ingresó a la carrera de Química Ambiental de la Universidad de Chile el año 2005, con la incertidumbre sobre si dicha carrera satisfacía sus intereses y anhelos profesionales. Sin embargo el transcurrir de los años y la adquisición de nuevos conocimientos, fortalecieron su elección y ratificaron su capacidad como persona y profesional para afrontar problemáticas ambientales desde la perspectiva científica.

Su paso por la Facultad de Ciencias le otorgó una mirada crítica y objetiva sobre la realidad nacional desde el punto de vista ambiental, además de permitirle crear y fortalecer grandes lazos de amistad durante su período como estudiante, los que seguramente se mantendrán después de finalizada esta etapa.

Su vida académica destacó por el creciente interés en el estudio de los plaguicidas en suelos, esto la llevó a realizar su Unidad de Investigación en el Laboratorio de Cromatografía y Química Orgánica que se tituló "*Efectos de la granulometría en el proceso de adsorción en suelo Diguillín de Glifosato*", trabajo que fue presentado en el V Congreso Latinoamericano de Física y Química Ambiental.

Continuando con su área de investigación ahondó en el estudio de biocombustibles, *“Determinación del perfil de azúcares en materiales lignocelulósicos en residuos agrícolas y forestales posibles de usar para la obtención de bioetanol”* como seminario de título, trabajando conjuntamente con el Laboratorio de Química de la Madera de la Facultad de Cs. Forestales y de la Conservación de la Naturaleza y con el Laboratorio de Cromatografía y Química Orgánica de la Facultad de Ciencias.





AGRADECIMIENTOS

Agradezco 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.

En lo académico agradezco a mis profesores guías, profe Sylvia Copaja 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.

Agradezco también a mis profesores correctores, profe Héctor Bravo y profe Alejandro García, por sus recomendaciones, por la paciencia de atenderme cada vez que necesite de su ayuda.

En lo personal quiero agradecer a mi familia por el constante apoyo que me han dado, en especial a mi padre Juan, mi madre Flor, mi hermano Gunther, mis tías Irma y Ana y Alu por ser el pilar fundamental en mi formación personal y profesional.

También agradezco a mis amigos y compañeros, con quienes compartí la vida universitaria.

RESUMEN

En la actualidad la mayor parte de la energía utilizada en el mundo y en nuestro país proviene de los combustibles fósiles, los cuales se caracterizan por ser contaminantes con el medio ambiente y ser recursos no renovables. Por este motivo es de gran interés buscar formas alternativas de energía más limpias tales como: energía nuclear (mediante fisión y fusión) hidroeléctrica, solar, eólica, geotérmica y biomasa entre otras.

Este trabajo se centra en la energía de la biomasa, la cual se obtiene del aprovechamiento de la materia orgánica e inorgánica formada en algún proceso biológico o mecánico, generalmente, de las sustancias que constituyen los seres vivos (plantas, ser humano, animales, entre otros) y restos. El aprovechamiento de este tipo del energía se hace directamente (por ejemplo, por combustión), o por transformación en otras sustancias que pueden ser aprovechadas más tarde como combustibles o alimentos.

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de azúcares (glucosa y xilosa) mediante dos procesos de sacarificación para la obtención de bioetanol: hidrólisis ácida y sacarificación enzimática en muestras de biomasa de residuos agrícolas (maíz, trigo) y forestales (eucalipto, Lenga) pretratadas con hongos.

Las características químicas de las muestras agrícolas y forestales fueron determinadas de acuerdo a métodos descritos por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL), EE.UU. El primer proceso de obtención de bioetanol estudiado fue

la hidrólisis ácida, la cual se realizó con ácido sulfúrico al 72% por 30 minutos a temperatura ambiente, luego este ácido se diluyó al 4 % y se mantuvo por 1 hora a 120°C, a continuación se neutralizaron las muestras con carbonato de sodio hasta pH 6-7 y finalmente en este extracto se determinan las azúcares. Para el segundo proceso de obtención de bioetanol fue la sacarificación enzimática, la cual se usó 35 µL de enzima comercial Celluclast® 1,5L (celulasas de *Trichoderma reesei*), 5 µL de enzima comercial Novozyme® 188 (celobiasa obtenida de *Aspergillus Níger*) y 960 µL de buffer acetato 0,05 M a pH 5. Los tubos de centrifuga se llevaron a un agitador orbital bajo las siguientes condiciones: temperatura de 50° C, pH 5 y agitación de 250 rpm durante 48 horas. El análisis químico del perfil de azúcares fue realizado por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Columna Aminex HPX-87P, Fase Móvil AN/agua 75:25, flujo 1,0 mL/min, horno a 25°C y un detector de índice de refracción.

Los resultados indicaron que el tiempo de incubación de los hongos en el pretratamiento influyó en la cantidad de azúcares obtenida en los distintos procesos de producción de bioetanol, ya que a mayor tiempo de incubación se generó mayor cantidad de azúcares. En las muestras de maíz, trigo, Lenga y eucalipto pretratadas con los siguientes hongos se obtuvo la mayor cantidad de azúcares: *Pleurotus ostreatus* en 60 días, *Trametes versicolor* en 30 días, *Ganoderma applanatum* en 45 días, *Stereum hirsutum* en 45 días, respectivamente. Es así como, la sacarificación enzimática generó la mayor cantidad de azúcares en las muestras agrícolas y forestales, además considerar que este proceso es más amigable con el medio ambiente.

ABSTRACT

Currently most of the energy used in the world and in Chile derives from fossil fuels, which are characterized by polluting the environment and being non-renewable sources. Therefore it is compulsory to find alternative forms of cleaner energy such as nuclear energy (by fission and fusion), hydroelectricity, solar energy, wind energy and biomass among others.

This work focuses on biomass energy, which is obtained from the use of organic and inorganic matter formed in a biological or mechanical process, generally, substances which are living things (plants, humans, animals, others) and debris. The use of this type of energy is made directly (eg by combustion), or by conversion into other substances that can be exploited later as a fuel or food.

This study was focused on the determination of sugars profiles (glucose and xylose) in lignocellulosic residues derived from agricultural crops (corn stover and wheat straw) and from forestry (Eucalyptus and *Nothofagus pumilio*) that were previously treated using fungal bioaugmentation and two saccharification methods: enzymatic hydrolysis and acid hydrolysis.

The chemical characteristics of the samples were determined according to methods previously described by the National Renewable Energies Laboratory (NREL), USA. The first bioethanol production process studied was the Acid hydrolysis, which

was performed with 72% sulfuric acid for 30 minutes at room temperature, then the acid was diluted to 4% and was maintained for 1 hour at 120 °C and finally the samples were neutralized with sodium carbonate to pH 6-7 and finally determined in this extract sugars. For the second bio-ethanol process was enzymatic saccharification, which was used 35 ml of commercial enzyme Celluclast (cellulase from *Trichoderma reesei*), 5 ml of the commercial Novozym ® 188 (cellobiase from *Aspergillus niger*) and 960 ml of acetate buffer 0.05 M at pH 5. The centrifuge tubes were introduced in a shaker operating under 50°C, pH 5 and 250 rpm during 48 hours. Sugars profiles were obtained by HPLC using: an Aminex HPX-87P column; mobile phase AN/water 75:25; flow 1 mL/min; oven at 25°C and a refractive index detector.

The results indicated that the incubation time of the fungi in the pretreatment influenced the amount of sugars obtained in the different processes of ethanol production, since the longer the incubation was generated greater amounts of sugars. In samples of corn, wheat, Lenga and eucalyptus pretreated with the following fungi had the highest amount of sugars: *Pleurotus ostreatus* in 60 days, *Trametes versicolor* in 30 days, *Ganoderma applanatum* in 45 days, *Stereum hirsutum* in 45 days, respectively. Thus, the saccharification enzyme produced the highest amount of sugars in agricultural and forest samples; also consider that this process is more environmentally friendly.

INDICE DE CONTENIDOS

I-INTRODUCCION	1
1.1 Matriz energética internacional.....	1
1.2 Situación del bioetanol a nivel mundial.	11
1.3 Bioetanol en Chile.....	12
1.4 Material lignocelulósico.	13
1.4.1 Polisacáridos	13
1.4.2 Lignina	16
1.5 Descripción de las Especies en estudio.	19
1.5.1 Muestras Forestales.....	19
1.5.1.1 Lenga	19
1.5.1.2 Eucalipto.....	20
1.5.1.3 Disponibilidad de desechos de la Industria forestal en Chile.....	21
1.5.2 Muestras Agrícolas.	23
1.5.2.1 Maíz.....	23
1.5.2.2 Trigo	24
1.5.2.3 Disponibilidad de cultivos agrícolas en Chile	25
1.6 Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos.....	26
1.6.1. Físicos	26
1.6.2. Físico-químicos.....	27

1.6.3. Químicos.....	29
1.6.4. Biológicos	29
1.7 Procesos de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.	30
1.7.1 Hidrólisis Ácida.....	31
1.7.2 Hidrólisis Enzimática.....	33
1.8 Estimación de la cantidad teórica de bioetanol factible de producir.	36
1.9 Hipótesis	37
1.10. Objetivos.....	37
1.10.1 Objetivo general.....	37
1.10.2 Objetivos específicos	37
II.- MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Materiales.....	38
- Reactivos	38
- Material biológico	38
- Materiales de vidrios y otros.	39
- Equipos	39
2.2 Procedimiento Experimental.....	40
2.2.1 Muestras lignocelulósicas.....	40
2.3 Preparación de hongos y pretratamiento biológico.	40
2.3.1 Reproducción de hongos de pudrición blanca (HPB).....	40
2.3.2 Pretratamiento biológico.....	42
2.4 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa.	45

2.4.1 Determinación del contenido de humedad de las muestras.	45
2.4.2 Preparación de muestra para la hidrólisis ácida.	46
2.4.3 Determinación de la lignina insoluble de las muestras.	47
2.4.4 Preparación de las muestras para el proceso de sacarificación.	48
2.5 Análisis de glucosa y xilosa.	50
2.6 Análisis químico.	51
2.6.1. Preparación de estándares de glucosa y xilosa.	51
2.6.2 Recuperación de estándares de azúcares.	52
2.6.3 Determinación del límite de detección y límite de cuantificación.	52
III. RESULTADOS Y DISCUSION.	53
3.1 Análisis químico del perfil de azúcares.	53
3.2 Límite de detección y límite de cuantificación de las azúcares analizadas.	54
3.3 Recuperación de estándares de las distintas azúcares.	56
3.4 Contenido de azúcares en las muestras.	58
3.4.1 Muestras Agrícolas.	58
3.4.2 Muestras Forestales.	64
3.5 Discusión general del tratamiento de las muestras.	70
3.6 Determinación rendimiento teórico de etanol a partir de los distintos procesos de sacarificación.	72
3.6.1 Muestras Agrícolas.	72
3.6.2 Muestras forestales.	75
IV. CONCLUSIONES.	79

V. RECOMENDACIONES	81
VI. REFERENCIAS	82
VII. ANEXOS	86

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de la producción mundial de carbón.....	5
Tabla 2. Listado de países con mayor producción de gas natural en 2007.	7
Tabla 3. Consumo energético mundial año 2004.	8
Tabla 4. Reservas existentes de combustibles fósiles a nivel mundial.....	8
Tabla 5. Distribución del recurso forestal por especie	22
Tabla 6. Distribución de la superficie por región y por tipo de cereal sembrado.....	25
Tabla 7. Hongos aplicados a las muestras y tiempo de incubación.....	44
Tabla 8. Estándares de los azúcares para curva de calibración baja.	51
Tabla 9. Límite de detección y límite de cuantificación de glucosa y xilosa.	56
Tabla 10. Resumen recuperación de estándares para xilosa.....	57
Tabla 11. Resumen recuperación de estándares para glucosa.	57
Tabla 12. Contenido de azúcares en las muestras de maíz obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.	59
Tabla 13. Contenido de azúcares en las muestras de trigo obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.	62
Tabla 14. Contenido de azúcares en las muestras de Lenga obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.	65
Tabla 15. Contenido de azúcares en las muestras de eucalipto obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.	68
Tabla 16. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de maíz.....	72
Tabla 17. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de trigo.	74
Tabla 18. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de Lenga.	75
Tabla 19. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de eucalipto.....	76

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Diagrama de torre de destilación.	2
Figura 2. Estructura primaria de la celulosa (Cuamatzi, 2004).	14
Figura 3. Célula unitaria de celulosa nativa, postulada por Meyer – Misch (1937).	15
Figura 4. A) Estructura de xilano (Lavarack y col., 2000) y B) Estructura de glucomanano (Scientific Physich, 2010).	16
Figura 5. A) Estructura radical guayacilo, B) Estructura radical siringilo y C) Estructura radical p-hidroxifenilo	17
Figura 6. Estructura de la lignina	18
Figura 7. Nothofagus pumilio, Lengua. Bosque en Aysén, Chile.	20
Figura 8. Árboles de Eucalyptus globulus.	21
Figura 9. Cultivo de Maíz.	23
Figura 10. Cultivo de trigo.	24
Figura 11. Ataque de los hongos: Pudrición blanca (1) y Pudrición café (2).	30
Figura 12. A) Estructura furfural (Furfural, 2010) y B) Estructura 5-hidroximetilfurfural (HMF, 2010).	33
Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de los diferentes tipos de actividad de las celulasas.	35
Figura 14. Muestras con granulometría “pin chips”	43
Figura 15. Esquema experimental de la hidrólisis ácida y lignina insoluble	48
Figura 16. Esquema general de la metodología experimental.	50
Figura 17. A) Estructura D-glucosa, B) Estructura D-manosa, C) Estructura D-galactosa, D) Estructura D-xilosa y E) Estructura D-arabinosa (Scientific Physich, 2010).	53
Figura 18. Cromatograma HPLC de estándares de azúcares.	54

Figura 19. Cromatograma HPLC de muestra de Lenga.	54
Figura 20. Comparación de contenido de Glucosa en los distintos procesos estudiados en maíz.....	60
Figura 21. Comparación de contenido de Xilosa en los distintos procesos estudiados en maíz.....	60
Figura 22. Comparación de contenido de glucosa en los distintos procesos estudiados en trigo.....	63
Figura 23. Comparación de contenido de xilosa en los distintos procesos estudiados en trigo.....	63
Figura 24. Comparación de contenido de glucosa en los distintos procesos estudiados en Lenga.	66
Figura 25. Comparación de contenido de xilosa en los distintos procesos estudiados en Lenga.	66
Figura 26. Comparación de contenido de glucosa en los distintos procesos estudiados en eucalipto.....	69
Figura 27. Comparación de contenido de xilosa en los distintos procesos estudiados en eucalipto.....	69

ANEXOS

A. VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	87
A.1 Curvas de calibración de azúcares.	87
A.1.1 Tabla Curva de calibración Glucosa sin hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL)	87
A.1.2 Tabla Curva de calibración Glucosa sin hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)	88
A.1.3 Tabla Curva de calibración Glucosa con hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL)	89
A.1.4 Tabla Curva de calibración Glucosa con hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)	90
A.1.5 Tabla Curva de calibración Xilosa sin hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL) ...	91
A.1.6 Tabla Curva de calibración Xilosa sin hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)	92
A.1.7 Tabla Curva de calibración Xilosa con hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL) ..	93
A.1.8 Tabla Curva de calibración Xilosa con hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)	94
A.2 Recuperación de los estándares de azúcares.....	95
A.2.1 Tabla de porcentaje de recuperación para Glucosa.	95
A.2.2 Tabla de porcentaje de recuperación para Xilosa.	95
A.3 Limite de Detección y limite de Cuantificación de azúcares	96
A.3.1 Tabla Resumen para curva de calibración Glucosa.	96
A.3.2 Tabla Resumen para curva de calibración Xilosa.....	98
B.1.Cantidad de masa utilizada en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en los distintos tipos de sustratos.	100
B.1.1 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Maíz.....	100
B.1.2 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Trigo.....	101

B.1.3 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Lenga.....	102
B.1.4 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Eucalipto.	103
B.2 Contenido de humedad en los distintos procesos estudiados en los diferentes sustratos.....	104
B.2.1 Datos del contenido de humedad (FH) en los procesos estudiados en maíz.	104
B.2.2 Datos del contenido de humedad (FH) en los procesos estudiados en trigo.	105
B.2.3 Datos del contenido de humedad en el proceso de hidrólisis ácida en Lenga.	106
B.2.4 Datos del contenido de humedad en el proceso de hidrólisis ácida en eucalipto.	107
C. CONTENIDO DE AZÚCARES EN LOS DISTINTOS SUSTRATOS ESTUDIADOS.	108
C.1 Contenido de azúcares en el proceso de hidrólisis acida.	108
C.1.1 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte I).....	108
C.1.2 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte II)	109
C.1.3 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte I)	110
C.1.4 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte II)	111
C.1.5 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte I).....	112
C.1.6 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte II).....	113
C.1.7 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte I).....	114
C.1.8 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte II)	115
C.1.9 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lenga. (Parte I)	116
C.1.10 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lenga. (Parte II)	117

C.1.11 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte I).....	118
C.1.12 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte II).....	119
C.1.13 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte I).....	120
C.1.14 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte II) ...	121
C.1.15 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte I)	122
C.1.16 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte II)	123
C.2 Contenido de azúcares en el proceso de sacarificación.....	124
C.2.1 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte I).....	124
C.2.2 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte II)	125
C.2.3 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte I)	126
C.2.4 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte II)	127
C.2.5 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte I).....	128
C.2.6 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte II).....	129
C.2.7 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte I).....	130
C.2.8 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte II)	131
C.2.9 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lengua. (Parte I)	132
C.2.10 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lengua. (Parte II)	133
C.2.11 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte I)	134
C.2.12 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte II).....	135
C.2.13 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte I).....	136
C.2.14 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte II) ...	137
C.2.15 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte I)	138

C.2.16 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte II) 139

D.1 Rendimiento Teórico de etanol en los distintos procesos estudiados en los diferentes sustratos..... 140

D.1.1 Resumen del rendimiento teórico de etanol en muestras de maíz. 140

D.1.2 Resumen del rendimiento teórico de etanol en muestras de trigo. 141

D.1.3 Resumen del rendimiento teórico de etanol en muestras de Lenga. 142

D.1.4 Resumen de contenido etanol teórico en muestras de eucalipto..... 143

I.-INTRODUCCION

1.1 Matriz energética internacional

En la actualidad la mayor parte de la energía utilizada en el mundo proviene principalmente de los combustibles fósiles, que se usan para el transporte, generar electricidad, calentar ambientes, para la cocina y otros. Los combustibles fósiles se pueden dividir en tres: petróleo, carbón y gas natural, éstos se formaron hace millones de años a partir de restos orgánicos de plantas y animales muertos (Robertson, 1979).

- **Petróleo:** es una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, principalmente de hidrocarburos insolubles en agua, que son compuestos de hidrógeno y carbono, en su mayoría parafinas, naftenos y aromáticos. Junto con cantidades variables de derivados saturados homólogos del metano (CH_4). También es conocido como petróleo crudo o simplemente crudo. Es de origen fósil, fruto de la transformación de materia orgánica procedente de zooplancton y algas que, depositadas en grandes cantidades en fondos anóxicos de mares o zonas lacustres del pasado geológico, fue posteriormente enterrada bajo pesadas capas de sedimentos. En condiciones normales es un líquido bituminoso que puede presentar gran variación en diversos parámetros como color y viscosidad (desde amarillentos y poco viscosos como la gasolina hasta líquidos negros tan viscosos que apenas fluyen), densidad (entre 0,75 g/L y 0,95 g/mL), capacidad calorífica, etc. Estas variaciones se deben a la diversidad de concentraciones de los hidrocarburos que

componen la mezcla. Es un recurso natural no renovable y actualmente también es la principal fuente de energía en los países desarrollados.

El petróleo se extrae mediante la perforación de un pozo sobre el yacimiento. Si la presión de los fluidos es suficiente, forzaré la salida natural del petróleo a través del pozo que se conecta mediante una red de oleoductos hacia su tratamiento primario, donde se deshidrata y estabiliza eliminando los compuestos más volátiles. De él se extraen diferentes productos, entre otros: propano, butano, gasolina, keroseno, gasóleo, aceites lubricantes, asfaltos, carbón de coque, etc. Todos estos productos, de baja solubilidad, se obtienen en el orden indicado (figura 1), de arriba abajo, en las torres de fraccionamiento (Combustible fósil, 2010).

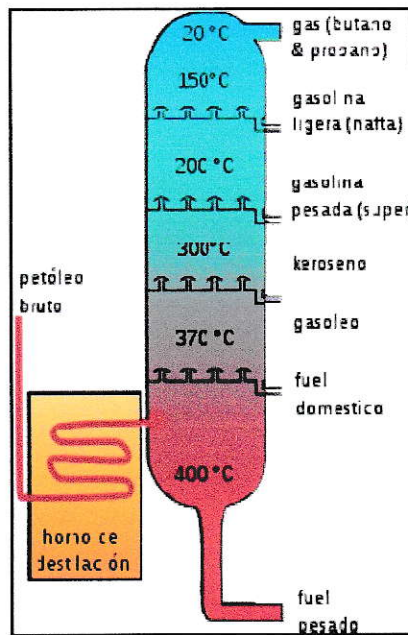


Figura 1. Diagrama de torre de destilación.

Por tanto, las reservas de crudo se calculan entre 0,97 y 1,003 billones de barriles de petróleo.

Sin embargo el límite de las reservas podría estar más cercano aún, si se tienen en cuenta modelos de previsión con un consumo creciente como ha venido siendo la tendencia desde el siglo pasado. Los nuevos descubrimientos de yacimientos se han reducido drásticamente en las últimas décadas haciendo insostenible por mucho tiempo los elevados niveles de extracción actuales, sin incluir la futura demanda de los consumidores asiáticos. Por otra parte, la mayoría de las principales reservas mundiales han entrado en declive y sólo las de Oriente Medio mantienen un crecimiento sostenido. Se espera que incluso esos yacimientos disminuyan su producción hacia el presente año, lo que provocaría que toda la producción mundial redujera irremediablemente, conduciendo a la mayor crisis energética que haya sufrido el mundo industrializado.

- **Carbón:** es una roca sedimentaria de color negro, muy rica en carbono, utilizada como combustible fósil. Suele localizarse bajo una capa de pizarra y sobre una capa de arena y arcilla. Se cree que la mayor parte del carbón se formó durante el período carbonífero (hace 280 a 345 millones de años). Este combustible fósil se origina por la descomposición de vegetales terrestres, hojas, maderas, cortezas, y esporas, que se acumulan en zonas pantanosas, lagunares o marinas, de poca profundidad. Los vegetales muertos se van acumulando en el fondo de una cuenca. Quedan cubiertos de agua y, por lo tanto, protegidos del aire que los destruiría. Comienza una lenta transformación por la acción de bacterias anaerobias, con el tiempo se produce un enriquecimiento progresivo

en carbono. Posteriormente pueden cubrirse con depósitos arcillosos, lo que contribuirá al mantenimiento del ambiente anaerobio adecuado para que continúe el proceso de carbonización.

Existen diferentes tipos de carbones minerales en función del grado de carbonificación que haya experimentado la materia vegetal que originó el carbón. Estos van desde la turba, que es el menos evolucionado y en que la materia vegetal muestra poca alteración, hasta la antracita que es el carbón mineral con una mayor evolución. Esta evolución depende de la edad del carbón, así como de la profundidad y condiciones de presión, temperatura, entorno, etc. El tipo de un carbón mineral se determina en función de criterios tales como su contenido en materia volátil, contenido en carbono fijo, humedad, poder calorífico, etc. Así, a mayor rango, mayor es el contenido en carbono fijo y mayor el poder calorífico, mientras que disminuyen su humedad natural y la cantidad de materia volátil. Existen varias clasificaciones de los carbones según su rango. Una de las más utilizadas divide a los carbones de mayor a menor rango en:

- Antracita
- Bituminoso bajo en volátiles
- Bituminoso medio en volátiles
- Bituminoso alto en volátiles
- Sub-bituminoso
- Lignito
- Turba

En la tabla 1 se indica como ha variado la producción mundial de carbón en los últimos años:

Tabla 1. Resumen de la producción mundial de carbón.

	Carbón bituminoso y antracita [Mt]	Carbón sub-bituminoso y lignito [Mt]
2007*	5.543	945
2006	5.205	937
2005	4.934	906
2004	4.631	893
2003	4.231	893
2002	3.910	882
2001	3.801	897

Los tres países de mayor producción de carbón bituminoso y antracita en el año 2007 fueron: República Popular China (2.549 Mt), Estados Unidos (981 Mt) e India (452 Mt). Las reservas de carbón se encuentran muy repartidas, con 70 países con yacimientos aprovechables. Al ritmo actual de consumo se calcula que existen reservas seguras de carbón para 133 años, y para 42 y 60 años en el caso del petróleo y el gas, respectivamente. Además, el 67% de las reservas de petróleo y el 66% de las de gas se encuentran en Oriente Medio y Rusia.

Finalmente las principales aplicaciones del carbón son: generación de energía eléctrica , coque (producto de la pirólisis del carbón en ausencia de aire), siderurgia

(productos: hierro y acero), industrias de cemento y de ladrillos, carboquímica (productos: amoníaco, metanol, gasolina y gasóleo) y petróleo sintético (Combustible fósil 2010).

- **Gas natural:** está formada por una mezcla de gases ligeros que se encuentra frecuentemente en yacimientos de petróleo, disuelto o asociado con el petróleo o en depósitos de carbón. Aunque su composición varía en función del yacimiento del que se saca, está compuesto principalmente por metano en cantidades que comúnmente pueden superar el 90 ó 95% y suele contener otros gases como nitrógeno (N_2), dióxido de carbono (CO_2), ácido sulfhídrico (H_2S), helio (He) y mercaptanos. Se obtiene también con procesos de descomposición de restos orgánicos (basuras, vegetales - gas de pantanos) en las plantas de tratamiento de estos restos (depuradoras de aguas residuales urbanas, plantas de procesado de basuras, de alpechines, etc.); el gas obtenido así se llama biogás.

Para uso doméstico, al igual que al butano, se le añaden trazas de compuestos de la familia de los mercaptanos entre ellos el metil-mercaptano, para que sea fácil detectar una fuga de gas y evitar su ignición espontánea.

En la tabla 2 se indica los países de mayor producción de gas natural a nivel mundial.

Tabla 2. Países con mayor producción de gas natural en 2007 (The World Factbook, 2007)

Rango	País/Región	Producción Gas Natural [m³]
1	Rusia	6,54 x 10 ¹¹
2	Estados Unidos	5,46 x 10 ¹¹
2	Unión Europea	1,98 x 10 ¹¹
3	Canadá	1,87 x 10 ¹¹

El consumo energético mundial de los combustibles fósiles desde el advenimiento de la revolución industrial ha crecido de forma continuada. En 1890 el consumo de combustibles fósiles alcanzó al de biomasa utilizada en la industria y en los hogares. En 1900, el consumo energético global supuso 0,7 TW (0,7×10¹² Watts). Durante el siglo veinte se observó un rápido incremento en el uso de los combustibles fósiles que se multiplicaron por veinte. Según las estimaciones en 2006 de la Administración de Información sobre la Energía estadounidense, los 15 TW estimados de consumo energético total para 2004 se dividen como se muestra a continuación, representando los combustibles fósiles el 86% de la energía mundial:

Tabla 3. Consumo energético mundial año 2004 (E.I.A, 2006)

Tipo de combustible	Potencia [TW]	Energía/año [EJ]
Petróleo	5,6	180
Gas	3,5	110
Carbón	3,8	120
Hidroeléctrica	0,9	30
Nuclear	0,9	30
Geotérmica, eólica, solar, biomasa	0,13	4
Total	15	471

En la tabla 4 se indica las reservas de combustibles fósiles a nivel mundial.

Tabla 4. Reservas existentes de combustibles fósiles a nivel mundial (USGS, 2007).

Combustible	Reservas de energía [ZJ]
Carbón	290,0
Petróleo	18,4
Gas	15,7

Cabe destacar que existe una incertidumbre significativa para estos datos. La estimación del combustible fósil remanente en el planeta depende de la comprensión detallada de la corteza terrestre y esta comprensión es aún imperfecta. La reserva del carbón, combustible fósil más abundante, según la Agencia Internacional de la Energía las reservas constatadas de carbón se sitúan en unos 909 mil millones de toneladas, con lo cual podrían mantener el actual ritmo de producción energética durante 155 años. En el caso del petróleo, en un informe de 2005 del Ministerio francés de Economía, Industria y Finanzas sugiere que en el peor escenario podría suceder tan pronto como en 2013 (Porter, 2005).

El proceso de combustión de los combustibles fósiles produce distintos tipos de gases como: dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), hidrocarburos, óxidos de nitrógeno (NO_x) y aerosoles. Algunos de estos gases son conocidos como gases invernadero (CO_2 , NO_x , aerosoles, vapor de agua entre otros), los cuales cumplen una importante función de retener gran parte de la radiación infrarroja que emite el suelo por haber sido calentado por la radiación solar y luego esta energía (radiación infrarroja) es reenviada de nuevo a la tierra, esta acción de equilibrio se llama balance energético de la Tierra y permite mantener la temperatura en un estrecho margen que posibilita la vida. Sin embargo, la quema excesiva de los combustibles fósiles en los últimos años, ha provocado un aumento de los gases invernaderos siendo esta una de las causas del calentamiento global, el cual consiste en el aumento de la temperatura media global del atmosfera terrestre y océanos (Calentamiento global, 2010). Algunos de los efectos del calentamiento global son la reducción de los glaciares de Groenlandia y la Antártida,

acidificación de los océanos, reducción de la circulación del océano que transporta agua caliente al Norte del Atlántico, impacto sobre la agricultura entre otros (Efectos potenciales, 2010).

Los combustibles o recursos antes mencionados se caracterizan por ser no renovables, es decir al usarlos no se pueden reponer además son muy pocos amigables con el medio ambiente. Por este motivo se hace necesario buscar otras formas de energías alternativas, las cuales sean menos contaminantes como la energía nuclear (mediante fisión y fusión), hidroeléctrica, solar, eólica, geotérmica y biomasa, entre otras.

Este trabajo de seminario de título se centra en la energía que se puede obtener de la biomasa, la cual se puede definir como cualquier materia orgánica originada de un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Esta energía renovable actualmente aporta un 10% a la matriz energética mundial (FAO, 2008) y se puede clasificar como: (Oliva Domínguez, 2003)

- ✓ Biomasa natural: es aquella que se produce sin intervención humana.
- ✓ Biomasa residual: subproducto o residuos de las actividades agrícolas, silvícolas y ganaderas, industria agroalimentaria, industria de la transformación de la madera entre otros.
- ✓ Cultivos energéticos: aquellos destinados a los biocombustibles, los cuales se obtienen de la industria alimentaria (cereales, oleaginosas y remolacha), la industria forestal para la producción de bioetanol.

1.2 Situación del bioetanol a nivel mundial.

El bioetanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares presentes en los productos vegetales, los cuales se encuentran combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. El biocombustible obtenido a partir de cultivos energéticos es el bioetanol, el cual se clasifica como de primera y de segunda generación. El bioetanol de primera generación es aquel que utiliza como materias primas la caña de azúcar, la remolacha o amiláceas como el maíz, trigo y papas. Por otro lado el bioetanol de segunda generación se caracteriza por que se obtiene mediante la transformación de residuos de biomasa: celulosa, virutas de madera, residuos agrícolas entre otros.

En la actualidad el bioetanol es 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.

La principal desventaja de la obtención de bioetanol frente a los combustibles derivados del petróleo es el costo de producción, y para ello se necesita reducir el precio de las materias primas, ya que éstas suponen alrededor del 60% del costo final del etanol. Por esto, es necesario desarrollar nuevos cultivos, considerar la biomasa de segunda generación y los residuos orgánicos como recursos complementarios para la producción de biocombustibles. La utilización de biomasa lignocelulósica es, a corto plazo, la opción más prometedora para la obtención de etanol combustible a bajo costo, posibilitando que este producto pueda ser adoptado por la industria (Oliva, 2003).

1.3 Bioetanol en Chile.

Chile se caracteriza por ser muy dependiente de fuentes de energías importadas, donde el 75 % 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, productivo y además cumplir con las exigencias internacionales a nivel medioambiental, Chile debe contar con una matriz energética segura, diversificada e independiente, en lo posible, de importaciones de alto riesgo (ODEPA, 2007).

El gobierno de la presidenta Michelle Bachelet se impulsó 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, autonomía y promover el uso eficiente e inteligente de la energía en favor de las Energías Renovables No Convencionales (ERNC).

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).

1.4 Material lignocelulósico.

Los materiales lignocelulósicos están compuestos por tres componentes: polisacáridos, lignina y otras sustancias que no forman parte de la pared celular.

1.4.1 Polisacáridos

- Celulosa: componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras de madera, es un polímero lineal de β -D-Glucosa. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces β -(1,4), según se muestra en la siguiente figura.

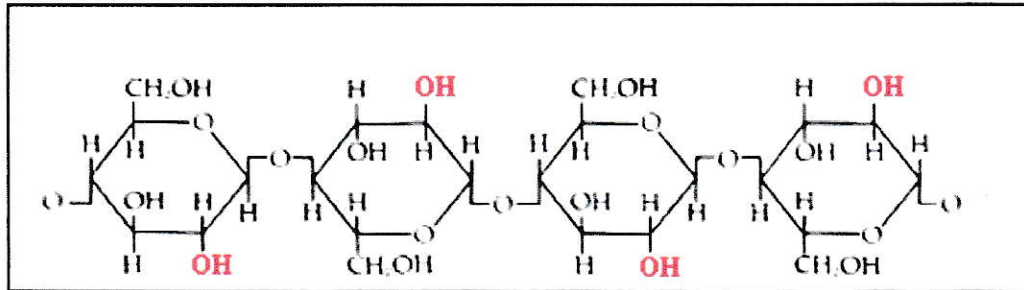


Figura 2. Estructura primaria de la celulosa (Cuamatzi, 2004).

A partir de los análisis de Difractografía de rayos x y métodos basados en la absorción de radiaciones infrarrojas polarizadas, se ha demostrado que las fibras de celulosa están constituidas de regiones cristalinas (altamente ordenadas) y de regiones amorfas (desordenadas). Estas regiones no poseen fronteras bien definidas, pero parece existir una transición de una zona ordenada de las cadenas de celulosa a un estado desordenado o amorfo, en la cual estas cadenas presentan una orientación menor.

En la región cristalina la fibra posee mayor resistencia a la tracción, al alargamiento y a la solvatación. La resistencia a la tracción en la región cristalina es quince veces mayor que el valor presentado en la región amorfa, donde la fibra tiene su mayor flexibilidad.

La celulosa en forma nativa, conforma un sistema ordenado, debido a las interacciones por puentes de hidrógeno, con propiedades similares al cristal.

Actualmente se asume que la celulosa presenta una estructura cristalina monoclinica y se presenta en la siguiente figura.

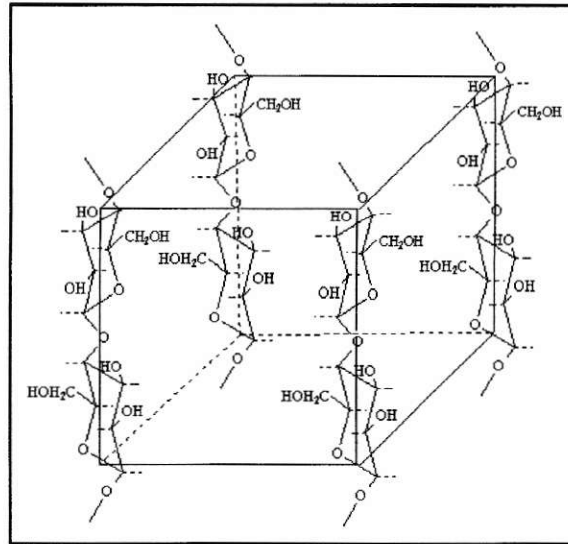


Figura 3. Célula unitaria de celulosa nativa, postulada por Meyer – Misch (1937).

- **Hemicelulosas:** están constituidas por polímeros de unidades de anhidro azúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. Existen dos tipos de hemicelulosas que se encuentran tanto en las maderas duras como en las blandas: los xilanos y los glucomananos. En la siguiente figura se muestra la estructura de estos compuestos.

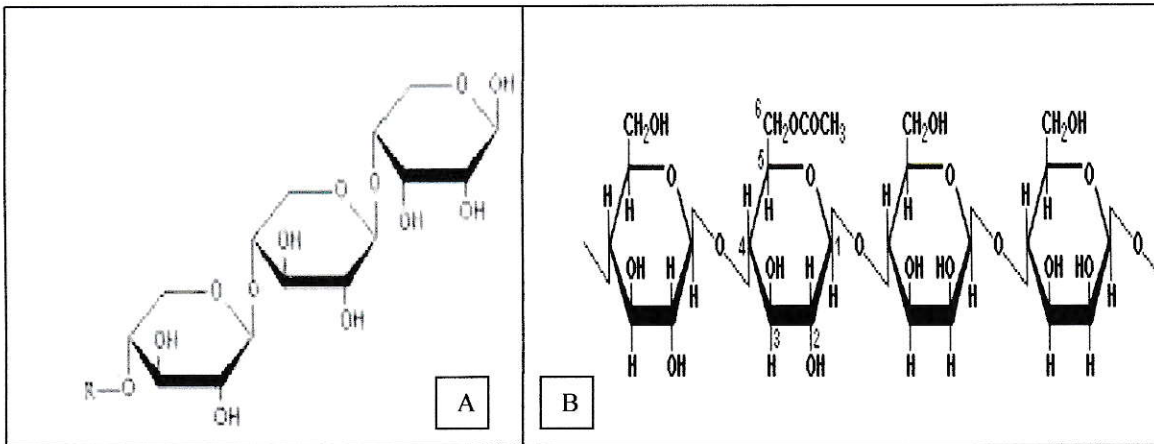


Figura 4. A) Estructura de xilano (Lavarack y col., 2000) y B) Estructura de glucomanano (Scientific Physic, 2010).

1.4.2 Lignina

La lignina es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica, la cual proporciona rigidez a la pared celular, permite que estos materiales resistan el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular. Además existen diferencias entre las ligninas provenientes de clases, ordenes, familias y géneros de plantas, así como, de aquellas provenientes de los diferentes tejidos leñosos, células y aún de las capas de la pared celular de una especie dada.

Desde hace tiempo se sabe que las ligninas de coníferas y latifoliadas difieren en sus contenidos de unidades de guayacil (G), siringil (S) y p-hidroxifenil (H), las cuales se muestran en la siguiente figura.

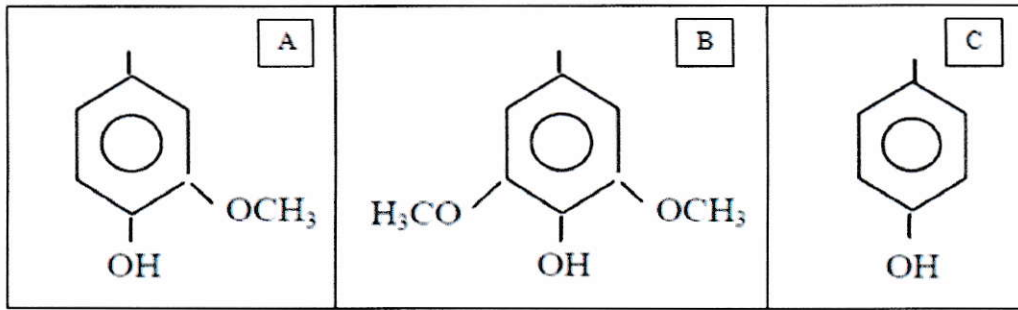


Figura 5. A) Estructura radical guayacilo, B) Estructura radical siringilo y C) Estructura radical p-hidroxifenilo

Como la clasificación en coníferas y latifoliadas no satisface todos los resultados obtenidos de numerosas ligninas, se estableció una clasificación más realista en la cual todas las ligninas son divididas en dos grupos: Las ligninas guayacil (ligninas G) y las guayacil-siringil (ligninas GS). En la siguiente figura se muestra un ejemplo de lignina.

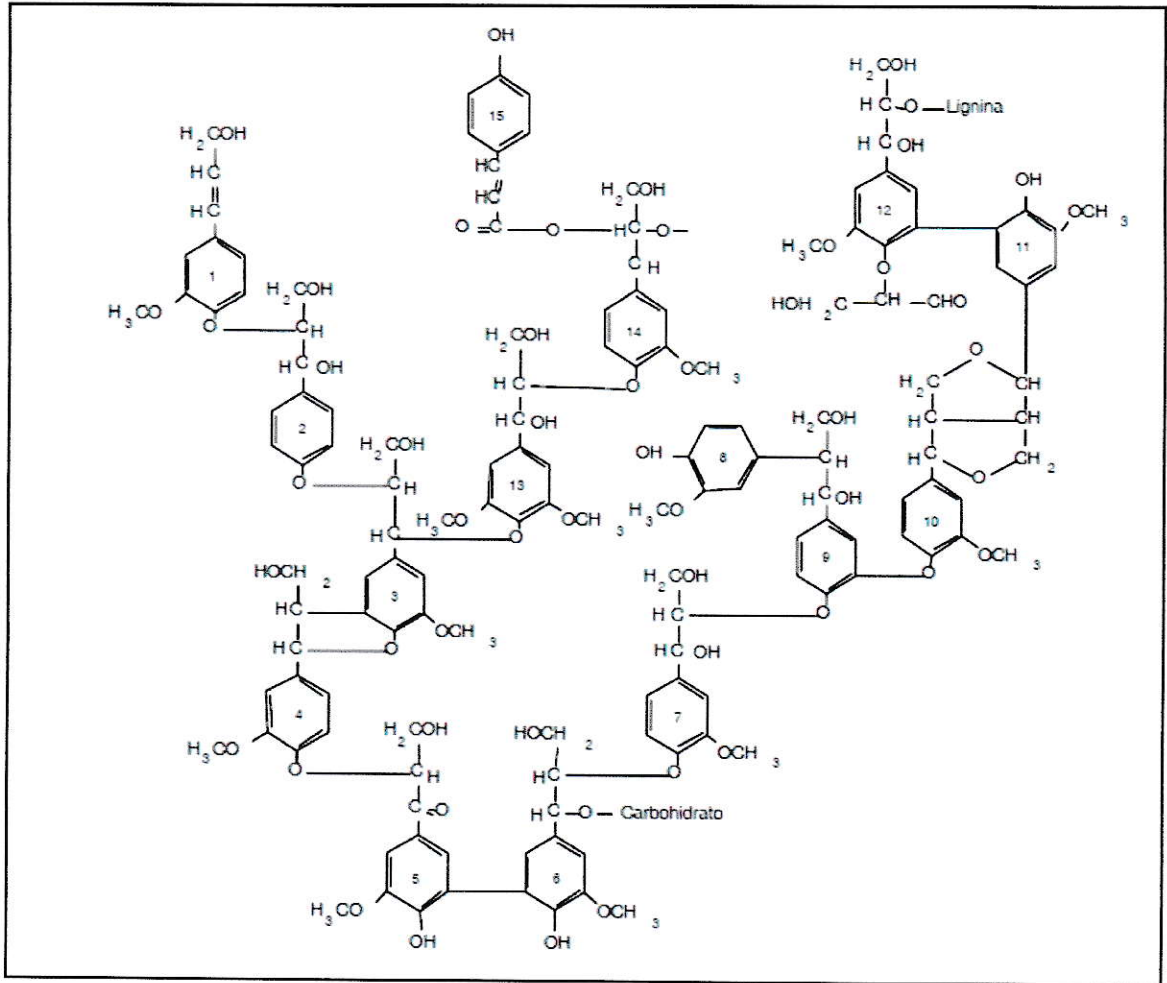


Figura 6. Estructura de la lignina

1.5 Descripción de las Especies en estudio.

1.5.1 Muestras Forestales

1.5.1.1 Lenga

Clasificación Botánica: *Nothofagus pumilio*

Género: Nothofagus

División: Fanerógamas

Subdivisión: Angiospermas

Orden: Fagales

Familia: Fagaceae

Es un árbol de tamaño grande, el cual en la región patagónica alcanza una altura de 18 a 20 m y en la alta cordillera forma espesuras de alrededor de 2 a 3 m de alto. Sus hojas son de color verde claro, tienen entre 2 a 4 cm de largo, especie caduca, es decir, bota las hojas durante la época de receso vegetativo. Se distribuye como especie forestal desde la provincia de Ñuble hasta el Cabo de Hornos, donde estas áreas se caracterizan por las bajas temperaturas, copiosas nevazones invernales, presencia de fuertes vientos y suelos delgados, rocosos, expuestos a la erosión una vez desprovistos de la cubierta arbórea.

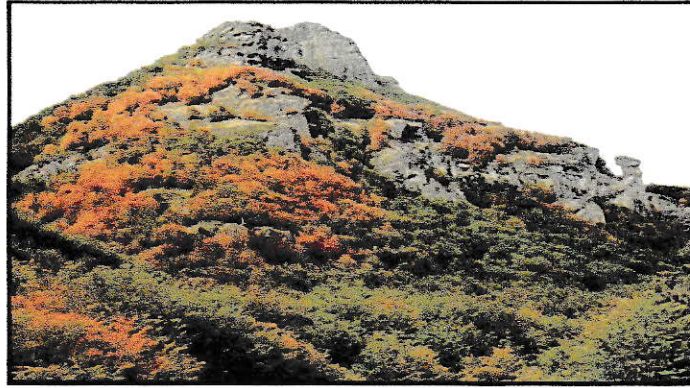


Figura 7. *Nothofagus pumilio*, Lenga. Bosque en Aysén, Chile.

La foto corresponde al período otoñal y las Lengas están de color rojizo.

1.5.1.2 Eucalipto

Clasificación Botánica: *Eucalyptus globulus*

Género: *Eucalyptus*

División: Magnoliophyta

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Los eucaliptos son árboles perennes, los cuales pueden llegar a medir más de 60 m de altura, su corteza exterior (ritidoma) es marrón clara con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o parduscas sobre la corteza interior, más lisa. Los bosques de eucaliptos pueden crear problemas de incendios incontrolables debido a

la gran altura que alcanzan estos árboles en poco tiempo de crecimiento y a la fácil combustión de su madera.



Figura 8. Árboles de *Eucalyptus globulus*.

1.5.1.3 Disponibilidad de desechos de la Industria forestal en Chile.

El recurso forestal está compuesto por bosques nativos y plantaciones forestales a lo largo del país con 15,6 millones de hectáreas, 13,5 millones de ha de bosque nativo y 2,0 millones de ha correspondientes a plantaciones forestales. En la tabla 5 se indica el recurso forestal distribuido por especie y superficie que abarca (Carlos Pontt, 2008).

Tabla 5. Distribución del recurso forestal por especie (INFOR, 2006).

Recurso Forestal	Superficie [ha]	Porcentaje [%]
Bosque Nativo	13.457.140	100
Siempre verde	4.138.536	30,8
Lenga	3.391.421	25,2
Coihue de Magallanes	1.791.860	13,3
Plantaciones Forestales	2.078.646	100
Pino Radiata	1.408.430	67,8
Eucalipto	489.603	23,6
Atriplex	58.501	2,8
Total Recurso Forestal	15.535.786	

El 91% de las plantaciones forestales están concentradas en Pino Radiata y Eucalipto. El bosque nativo, el 69% está concentrado en tres especies: Siempreverde, Lenga y Coihue de Magallanes.

A partir de la Información del Instituto Forestal (INFOR), “Superficie de Plantaciones Forestales IV y XI Región”, actualizada a Diciembre 2006, se detecta que el 83% del bosque nativo está concentrado entre la X y XII Región, el 86% de las plantaciones forestales se concentran entre las VII y X región. Respecto al total estas regiones acumulan el 48% del recurso forestal existente en el país.

1.5.2 Muestras Agrícolas.

1.5.2.1 Maíz

El maíz, millo o elote (*Zea mais*) es una planta gramínea anual originaria de América introducida en Europa en el siglo XVI, es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando al trigo y el arroz. En la mayor parte de los países de América, el maíz constituye la base histórica de la alimentación regional y uno de los aspectos centrales de las culturas mesoamericana y andina.

En la actualidad a nivel mundial se cultivan 158,9 millones de hectáreas (temporada 2007/08) con maíz, con una producción que alcanzó los 790.9 millones de toneladas, con un rendimiento de 4.9 t/ha. Los principales países productores son Estados Unidos, China, Brasil e India.



Figura 9. Cultivo de Maíz.

1.5.2.2 Trigo

El trigo (*Triticum aestivum*) es una planta gramínea anual, de la familia poaceae, con espigas de cuyos granos molidos se saca la harina. Este cereal se cultiva en todo el mundo, desde los límites del Ártico hasta cerca del Ecuador, aunque la cosecha es más productiva entre los 30 y 60° de latitud Norte y entre 27 y 40° de latitud Sur. Las altitudes varían desde el nivel del mar a los 3.050 m en Kenya y 4.572 m en el Tíbet.

El mejor cultivo del trigo se consigue en terreno con abundante limo y arcilla. El incremento de cosecha, compensa las fuertes dosis de fertilizante nitrogenado, además éste prospera en climas sub-tropicales, moderadamente templados y moderadamente fríos. Lo más apropiado es una pluviosidad anual de 229-762 mm, más abundante en primavera que en verano. La temperatura media óptima debe ser entre 10 °C y 25 °C (Ruíz, 1981).



Figura 10. Cultivo de trigo.

1.5.2.3 Disponibilidad de cultivos agrícolas en Chile

La superficie sembrada con cereales (grano seco) al año 2006, de acuerdo al INE totalizaba 594.962 ha, principalmente compuesta por trigo 314720 ha, avena 90.190 ha, cebada 29.060 ha, arroz 27.980 ha, maíz 123.560 ha y centeno y otros cereales con 9.452 ha. En la tabla 6 indica la distribución de la superficie y tipo de cereal sembrado por región (Carlos Pontt, 2008).

Tabla 6. Distribución de la superficie por región y por tipo de cereal sembrado (INE, 2006).

Superficie sembradas con cereales [ha]								
Región	Trigo	Avena	Cebada	Arroz	Maíz	Otros	Total	%
IV	2.460	40	40	-	630	-	3.170	1
V	5.600	80	310	-	1.870	-	7.860	1
VI	20.210	100	20	1.640	73.400	346	95.716	16
VII	43.610	1.380	990	21.760	27.830	124	95.694	16
VIII	90.070	24.860	4.660	4.580	5.440	317	129.927	22
IX	122.000	47.680	15.430	-	270	6.383	191.763	32
X	23.680	14.040	7.490	-	-	2.089	47.299	8
RM	6.090	60	80	-	13.630	-	19.860	3
Resto	1.000	1.950	40	-	490	183	13.663	1
Total	314.720	90.190	29.060	27.980	123.560	9.442	594.952	100
%	53	15	5	5	21	2	100	

Se aprecia que el trigo representa el 51% de la superficie sembrada, seguida del maíz con 21% y la avena con 15%, representando el 89% de la superficie total sembrada en el país, concentrando más del 70% distribuida en la VII Región con 16%, VIII Región con 22% y IX Región con 32% de la superficie total.

1.6 Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos.

Los objetivos fundamentales del pretratamiento van encaminados a: reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis. Además, un pretratamiento eficaz debe reunir otras características como: bajo consumo energético, bajos costos de inversión, utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables y debe ser aplicable a diversos sustratos (Oliva, 2003).

Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos:

1.6.1. Físicos

Mediante este pretratamiento se busca reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la superficie específica y la densidad aparente, facilitando la hidrólisis posterior. Un ejemplo de pretratamiento físico es la trituración mecánica, en la cual existen diferentes tipos de moliendas (molino de bolas, martillos, cuchillas, rodillos). Los molinos de bolas vibratorias se han mostrado más efectivos que los molinos de bolas ordinarios en la reducción de la cristalinidad y aumento de digestibilidad de astillas de abeto y álamo (Millet y col., 1976). Este tipo de pretratamiento tiene el inconveniente de su alto consumo energético que depende, tanto del tamaño final de partícula al que se muele el material, como del tipo de material a pretratar (Cadoche y López, 1989).

Finalmente otro tipo de pretratamiento físico es la radiación de alta energía, la cual consiste en romper los enlaces β -glucosídicos y los enlaces entre la hemicelulosa y la lignina (Khan y col., 1986). Sin embargo, este tipo de pretratamiento es de difícil aplicación técnica debido a la baja densidad de los materiales a tratar y las altas dosis requeridas que obligan al diseño de instalaciones muy complejas y de alto costo económico.

1.6.2. Físico-químicos

El efecto de este tipo de pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces). El efecto físico está causado por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando unas fuerzas de cizalladura que producen la separación de las fibras, principalmente de las regiones más débiles (celulosa amorfa). El efecto químico se debe a la hidrólisis de los restos acetilos de las hemicelulosas produciendo ácido acético, que a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (auto hidrólisis). Durante el tratamiento se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato. Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. Ejemplos de este tipo de pretratamiento son:

- **Explosión de vapor:** consiste en someter el material lignocelulósicos a temperaturas entre 190-230 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, durante un intervalo

de tiempo entre 1 y 10 minutos. Tras el tiempo de tratamiento, se somete el material a una rápida despresurización.

- **Explosión de vapor con amoníaco (AFEX):** es un proceso similar al anterior, el material es impregnado con amoníaco líquido (1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca) a una temperatura en torno a los 90 °C, y un tiempo aproximado de 30 minutos. Transcurrido este tiempo el material es sometido a una rápida descompresión (Sun y Cheng, 2002). Las ventajas del proceso pueden citarse que no se producen inhibidores que puedan afectar a las posteriores etapas del proceso de producción de etanol y no requiere pequeños tamaños de partícula para aumentar su eficiencia. Con objeto de reducir costos y como medida protectora del medioambiente, el amoníaco debe ser reciclado después del pretratamiento.

- **Explosión de vapor CO₂:** La explosión con dióxido de carbono se basa en el hecho que el CO₂ forma ácido carbónico, lo que aumenta la tasa de hidrólisis (Dale y Moreira, 1982). Aunque los rendimientos obtenidos son relativamente bajos comparados con la explosión por vapor y el proceso AFEX los estudios realizados con bagazo de caña y papel reciclado, demostraron que este proceso es más barato que la explosión con amoníaco y no origina los compuestos inhibitorios que se originan durante la explosión por vapor (Zheng y col., 1998).

1.6.3. Químicos

El objetivo de estos pretratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de la celulosa facilitando la acción de las enzimas, como ejemplo de este tipo de pretratamientos son: agua caliente líquida, oxidación húmeda, ozono, álcalis, ácidos, solventes orgánicos y agentes oxidantes.

1.6.4. Biológicos

Este pretratamiento consiste en someter el material lignocelulósico a la acción de determinados microorganismos, como los hongos de pudrición blanca y café. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático. Las ventajas del pretratamiento biológico son el bajo requerimiento energético y las suaves condiciones ambientales en la que se produce el proceso. Como inconveniente debe citarse que la tasa de hidrólisis es demasiado lenta.

Los hongos de la pudrición de la madera constituyen el grupo de organismos xilófagos propiamente dichos que, por su dotación de enzimas capaces de destruir los componentes elementales del esqueleto leñoso de la madera, produciendo un daño que se conoce vulgarmente como “pudrición”. La pudrición afecta notablemente a las propiedades mecánicas de la madera y en particular a la resistencia estática y dinámica encontrándose pérdidas importantes de las mismas incluso en ataques aparentemente ligeros. Cuando aparecen los primeros síntomas de pudrición, la madera ha perdido el

20% de su densidad y por consiguiente de todas sus propiedades relacionadas con ella (SEDESA, 2010).

Las pudriciones se pueden clasificar en dos clases:

- Pudrición blanca o fibrosa: ataca preferentemente la lignina.
- Pudrición café o cúbica: ataca principalmente celulosa.

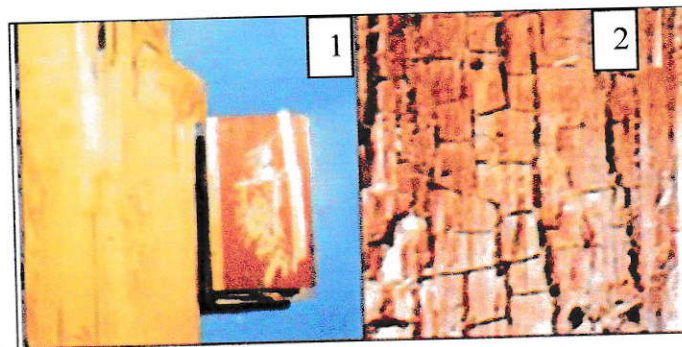


Figura 11. Ataque de los hongos: Pudrición blanca (1) y Pudrición café (2).

Finalmente cabe destacar que los hongos de la pudrición blanca se han mostrado como los más efectivos en el tratamiento biológico de los materiales lignocelulósicos que los otros tipos de hongos anteriormente nombrados (Fan y col., 1987).

1.7 Procesos de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.

La biomasa lignocelulósica presenta 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. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables. La hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante procesos ácidos o enzimáticos.

1.7.1 Hidrólisis Ácida.

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales (Larsson, 2000). Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Galbe y Zacchi, 2002). Sin embargo, sólo los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial.

Los procesos industriales de hidrólisis ácida pueden agruparse en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y los que utilizan ácidos diluidos.

Los procesos que implican ácidos concentrados operan a baja temperatura inferior a 80 °C, pudiendo obtenerse altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90% de la glucosa potencial). A pesar de esto, la gran cantidad de ácido empleado en la impregnación del material a tratar y lo costoso de su recuperación, unido a los efectos corrosivos de los mismos obliga a altas inversiones en los equipamientos que hacen que el proceso no sea rentable. Además, tiene el problema asociado de que es necesario una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación (Keller, 1996).

Los procesos que emplean ácidos diluidos tienen su principal ventaja en su bajo consumo de este tipo de reactivos. Sin embargo, se requieren temperaturas superiores a los 200 °C para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa.

El máximo rendimiento en glucosa se consigue a altas temperaturas y tiempos de residencia cortos. Las temperaturas que se emplean en estos procesos originan, por un lado, una mayor corrosión de los equipos empleados y, por otro lado, aumenta la tasa de degradación de los azúcares hemicelulósicos los cuales pueden afectar a la posterior etapa de fermentación.

El proceso de hidrólisis ácida aplicado en este trabajo, con objeto de disminuir la degradación de los azúcares originados en la hidrólisis, se utilizó un proceso en dos etapas. En la primera etapa y bajo condiciones más suaves (30 minutos, temperatura ambiente y ácido sulfúrico 72%), se produce la hidrólisis de la hemicelulosa, que por su estructura resulta más fácilmente hidrolizable. Esto permite que, durante la segunda etapa, y bajo condiciones más severas de temperatura (1 hora, temperatura 120°C y ácido sulfúrico 4%) se produzca la hidrólisis de la celulosa, disminuyendo la degradación de los azúcares hemicelulósicos producidos en la primera etapa. Pero las altas temperaturas que se requieren para la hidrólisis de la celulosa hacen que se originen productos de degradación de los azúcares principalmente de la hemicelulosa, originando dos compuestos derivados del furano: el furfural ($C_5H_4O_2$), formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el HMF o 5-hidroximetilfurfural ($C_6H_6O_3$), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa,

manosa y galactosa). Ambos, además de disminuir el rendimiento del proceso, pueden afectar la etapa de fermentación posterior. En la figura 12 se muestra los compuestos derivados del furano.

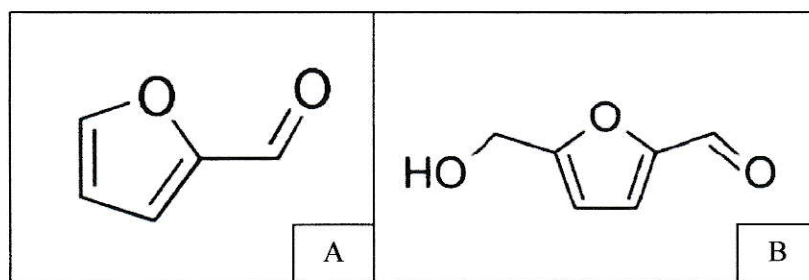


Figura 12. A) Estructura furfural (Furfural, 2010) y B) Estructura 5-hidroximetilfurfural (HMF, 2010).

1.7.2 Hidrólisis Enzimática.

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce 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):

1. Endo- β -glucanasas (EG)

β - (1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.4.)

2. Exo- β -glucanasas.

- a. β -(1,4)-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.), Celobiohidrolasa (CBH)
 - b. β -(1,4)-glucanglucanohidrolasas (EC 3.2.1.74.), Glucohidrolasa (GGH)
3. β - glucosidasa (EC 3.2.1.21.)

La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β -(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 β -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 β -glucosidasa hidroliza la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.

En la siguiente figura se muestra un resumen de la degradación enzimática de los polisacáridos.

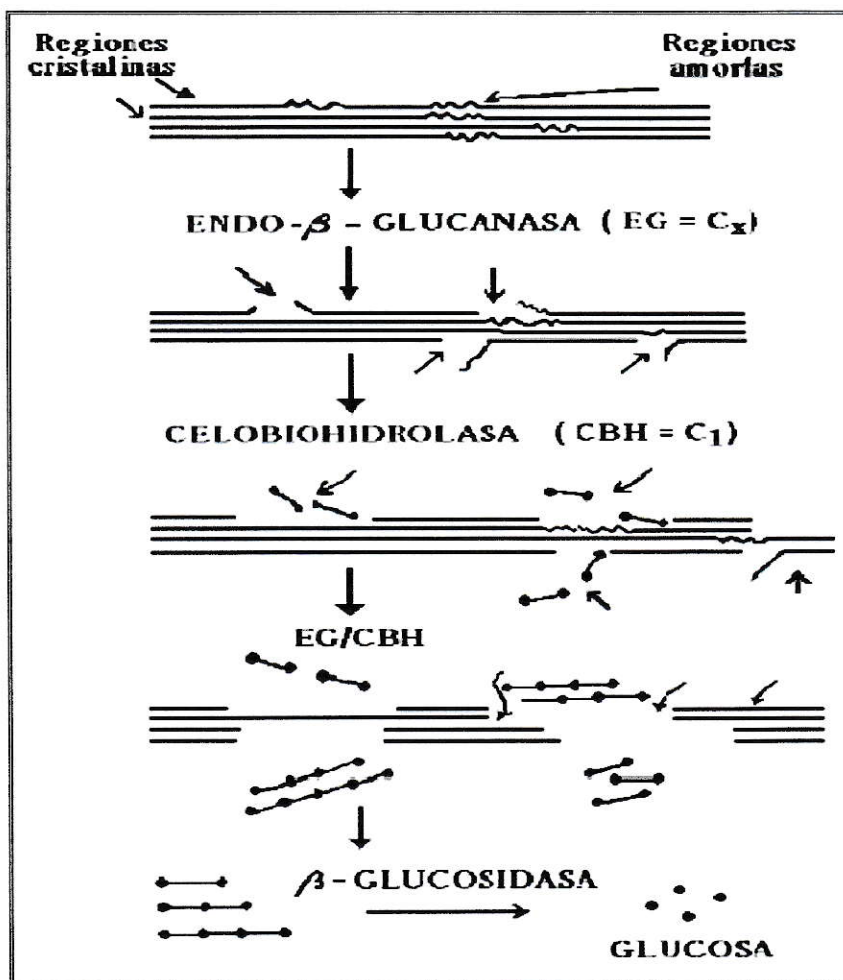
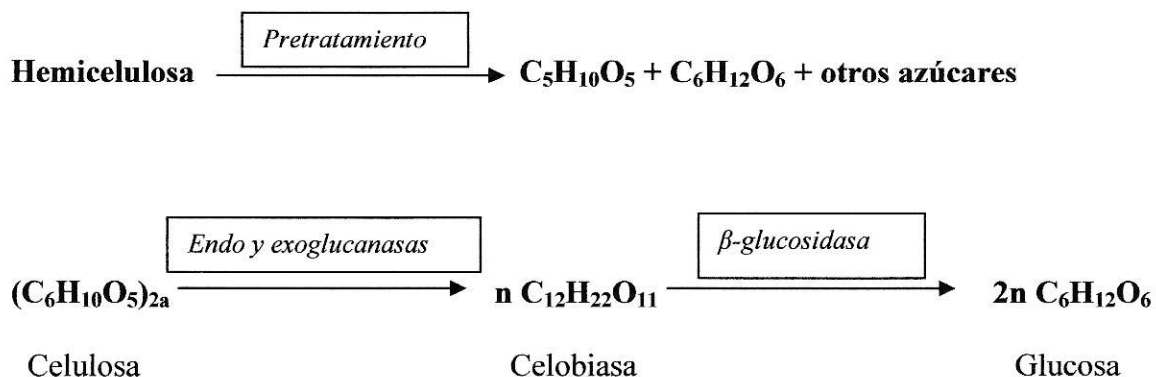


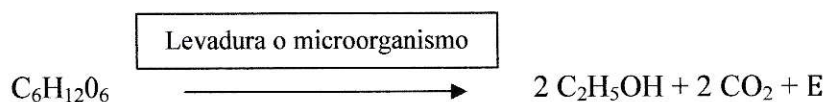
Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de los diferentes tipos de actividad de las celulasas.

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

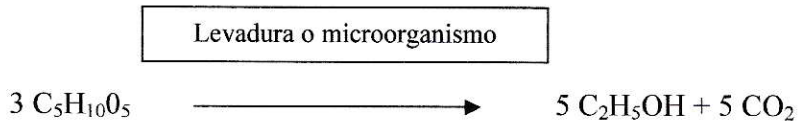


1.8 Estimación de la cantidad teórica de bioetanol factible de producir.

La estimación de la cantidad teórica de bioetanol producida a partir de muestras pretratados con hongos de pudrición blanca (HPB). Se basó en rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, que corresponde a 0,511 g de etanol y 0,489 g de CO₂ por cada gramo de glucosa, según a la siguiente ecuación:



Para el caso de la xilosa, el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de dicha azúcar en etanol, corresponde a 0,511 g de etanol por cada gramo de xilosa, según a la siguiente ecuación:



1.9 Hipótesis

El perfil de azúcares (glucosa y xilosa) en muestras forestales y agrícolas dependerá de la cantidad de lignina, del pretratamiento seleccionado y el tratamiento realizado (hidrólisis ácida y sacarificación enzimática) para la obtención de bioetanol.

1.10. Objetivos

1.10.1 Objetivo general

- ✓ Determinar el perfil de las azúcares en materiales lignocelulósicos de residuos agrícolas (Maíz, Trigo) y forestales (Lenga, Eucalipto) pretratados con hongos de pudrición blanca, sacarificados con enzimas y ácidos para la obtención de Bioetanol.

1.10.2 Objetivos específicos

- ✓ Establecer las condiciones experimentales para el análisis de la concentración de azúcares por HPLC.
- ✓ Determinar el perfil de azúcares en rastrojos de los siguientes cultivos agrícolas: Maíz (*Zea mais*) y Trigo (*Triticum aestivum*).
- ✓ Determinar el perfil de azúcares en residuos forestales de: Lenga (*Nothofagus pumilio*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

- ✓ Estudiar la efectividad de los procesos de hidrólisis para la obtención de Bioetanol: sacarificación ácida y sacarificación enzimática.
- ✓ Analizar los resultados y extrapolar cantidad potencial de etanol que se obtendría.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

- Reactivos

- Agua Milli – Q Water (Millipore)
- Acido sulfúrico (Merck, HPLC)
- Acetonitrilo (Merck, HPLC)
- Carbonato de sodio (Merck, p.a)
- Acetato de sodio (Merck, p.a)
- Glucosa (Merck, p.a)
- Xilosa (Merck, p.a)
- Enzima comercial Celluclast® 1,5L (celulasas de *Trichoderma reesei*)
- Enzima comercial Novozyme® 188 (celobiasa obtenida de *Aspergillus Niger*)

- Material biológico

- Residuos forestales de Lenga y eucalipto
- Muestras pretratadas con hongos de Lenga y eucalipto
- Rastrojos agrícolas de trigo y maíz

- Muestras pretratadas con hongos de trigo y maíz

- Materiales de vidrios y otros.

- Malla tamiz de 60 μm
- Frascos plásticos de 100 mL y de 250 mL para guardar las muestras
- Crisoles de vidrio con filtro poroso
- Gotarios
- Embudos analíticos
- Micropipeta
- Guantes
- Vasos precipitados de 10 mL, 50 mL, 100 mL, 150 mL, 250 mL (Clase A)
- Tubos Eppendorf
- Espátulas
- Probetas de vidrio 1000 mL
- Matraces erlenmeyer 25 mL, 50 mL, 250 mL, 500 mL y 1 L (Clase A)
- Varillas de agitación
- Jeringas desechables de 5 mL
- Filtros gruesos de 1,25 mm
- Filtros Millex de 0,45 μm
- Soporte de madera para embudos

- Equipos

- Equipo cromatográfico HPLC Waters 1515

- Detector de Índice de refracción Waters 2414
- Centrifuga (BOECO GERMANY U-320)
- Conductivímetro pH-/EC/TDS HI9813-0 (HANNA INSTRUMENTS)
- Agitador orbital LAB. ROTATOR (ALREADY ENTERPRISE INC. 5FL-2)
- Balanza analítica (SHIMADZU AUX220)
- Balanza de precisión (ACCULAB V-600)
- Estufa de esterilización y secado (Jinghong DHG 9147 A)
- Autoclave (Equilab CH-AP0202)
- Cámara de incubación (BOXCULT 1381,72 EUR)

2.2 Procedimiento Experimental

2.2.1 Muestras lignocelulósicas.

Se masó 5 gramos de residuo de trigo testigo, posteriormente se procedió agregar la muestra de forma paulatina por el molino con un tamiz de 60 μm siendo recibida por un vaso precipitado. Finalmente se dejó guardada en pocillos de aluminio previamente rotulados.

Este procedimiento se repitió tanto para las muestras testigos de maíz, Lenga, eucalipto y las distintas muestras pretratadas con hongos.

2.3 Preparación de hongos y pretratamiento biológico.

2.3.1 Reproducción de hongos de pudrición blanca (HPB).

a) 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. (Fritz, 2008).

b) 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. (Fritz, 2008).

c) 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 de la Facultad de Cs. Forestales y de la Conservación de la Naturaleza), 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 (lavarse bien las manos con jabón antibacterial, uso de guantes, desinfectar el área de trabajo y la cabina de flujo laminar con etanol entre otras). 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. (Fritz, 2008).

d) Incubación: Finalizado el proceso de inoculación, los hongos (*Ganoderma applanatum*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Peniophora gigante*, *Postia placenta* y *Aurantioporus albidus*) crecieron en la cámara de incubación

por un período de 10 días, con temperatura controlada a 25° C y humedad relativa del 60%. (Fritz, 2008).

2.3.2 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. Para ésto se utilizaron granos de trigo en una proporción de 3% p/p con respecto al sustrato. De esta forma se aseguró la propagación homogéneamente del hongo 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.



Figura 14. Muestras con granulometría “pin chips”.

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

a) 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 2.3.1. (Reproducción de los HPB).

b) Preparación del sustrato: Se utilizó una cantidad de “pin chips” de Lenga equivalente a 50 g (seco a 105 °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.

c) 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.

d) 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.

Finalmente todo el procedimiento anterior se aplicó a las distintas muestras estudiadas (Fritz, 2008). En la tabla 7 se indica qué tipos de hongos se seleccionaron para las distintas muestras a analizar:

Tabla 7. Hongos aplicados a las muestras y tiempo de incubación.

Muestra	Hongo	Tiempo de incubación [días]
Maíz	<i>Trametes versicolor</i>	30
	<i>Auranteoporus albidus</i>	30
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	60
Trigo	<i>Trametes versicolor</i>	30
	<i>Ganoderma applanatum</i>	30
	<i>Postia placenta</i>	45
Lenga	<i>Ganoderma applanatum</i>	30
	<i>Peniophora gigante</i>	45
	<i>Ganoderma applanatum</i>	45
Eucalipto	<i>Stereum hirsutum</i>	30
	<i>Stereum hirsutum</i>	45
	<i>Ganoderma applanatum</i>	45

2.4 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa.

2.4.1 Determinación del contenido de humedad de las muestras.

En primer lugar se colocan pocillos de aluminio a la estufa alrededor de una hora a 105 °C, luego se depositaron en un desecador. Posteriormente se masó el pocillo de aluminio y después se agrega 1 gramo de muestra de trigo, llevándolo a la estufa por 48 horas.

A continuación transcurrido este tiempo se sacó de la estufa y se masó nuevamente la muestra. El contenido de humedad se expresa por la siguiente ecuación:

$$CH = \frac{A - B}{B} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

CH = contenido de humedad [%]

A = Masa muestra antes de la estufa [g]

B = Masa muestra después de la estufa [g]

Este procedimiento se realizó a las muestras testigos y aquellas muestras en que fue aplicado el pretratamiento biológico, puesto que el procedimiento de la hidrólisis ácida sólo se debe realizar en aquellas muestras que tengan un contenido de humedad menor al 10% (NREL, 2010).

2.4.2 Preparación de muestra para la hidrólisis ácida.

En la primera etapa se realizó una hidrólisis ácida (H_2SO_4 72%) y bajo condiciones suaves (temperatura 30°C). En esta condición se produce la ruptura de la hemicelulosa, que por su estructura resulta más fácilmente hidrolizable. Esto permite que, durante la segunda etapa, y bajo unas condiciones más severas de temperatura (H_2SO_4 4% y temperatura 120°C), se produzca la hidrólisis de la celulosa.

Se masó 0,3 gramos de la muestra de trigo (sin ningún tratamiento) y se colocó en un matraz erlenmeyer de 500 mL. Luego se agregó 3 mL de ácido sulfúrico al 72%, se agitó durante unos minutos hasta observar la desintegración de la muestra por la acción del ácido.

Transcurrido 30 minutos a temperatura ambiente con el ácido sulfúrico al 72% se diluyó al 4% la concentración de ácido añadiendo 84 mL de agua desionizada, posteriormente se introdujo en un autoclave por 1 hora a 120°C . A continuación se neutralizó las muestras agregando carbonato de sodio hasta alcanzar un pH entre 6 – 7. El procedimiento antes mencionado se aplicó a todas las muestras testigos y pretratadas con hongos.

Luego se realizó un filtrado grueso a las muestras recién neutralizadas y posteriormente una filtración con filtros de $0,45\ \mu\text{m}$, finalmente se congelaron las muestras hasta ser analizadas por HPLC.

2.4.3 Determinación de la lignina insoluble de las muestras.

En primer lugar se preparó una serie de crisoles, los cuales tienen filtros 5 μm y se rotularon adecuadamente, luego se llevan a la estufa por 4 horas como mínimo.

Posteriormente se llevaron al desecador y se masó cada crisol y luego se hace pasar las muestras obtenidas en el punto 2.4.2 por los crisoles donde el filtrado se guardó en botellas plásticas y los crisoles se lavaron con agua desionizada hasta que las muestras quedaron de color café.

Finalmente los crisoles se llevaron a la estufa por 48 horas, se colocaron en el desecador y por último se masaron en una balanza analítica. La lignina insoluble se determinó según la siguiente expresión:

$$LIs = A - B \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

LIs = lignina insoluble [g]

A= masa del crisol después de la estufa.

B= masa del crisol antes del proceso de filtración.

Finalmente en la figura 16 se muestra un esquema resumen de la metodología experimental de la hidrólisis ácida y lignina insoluble.

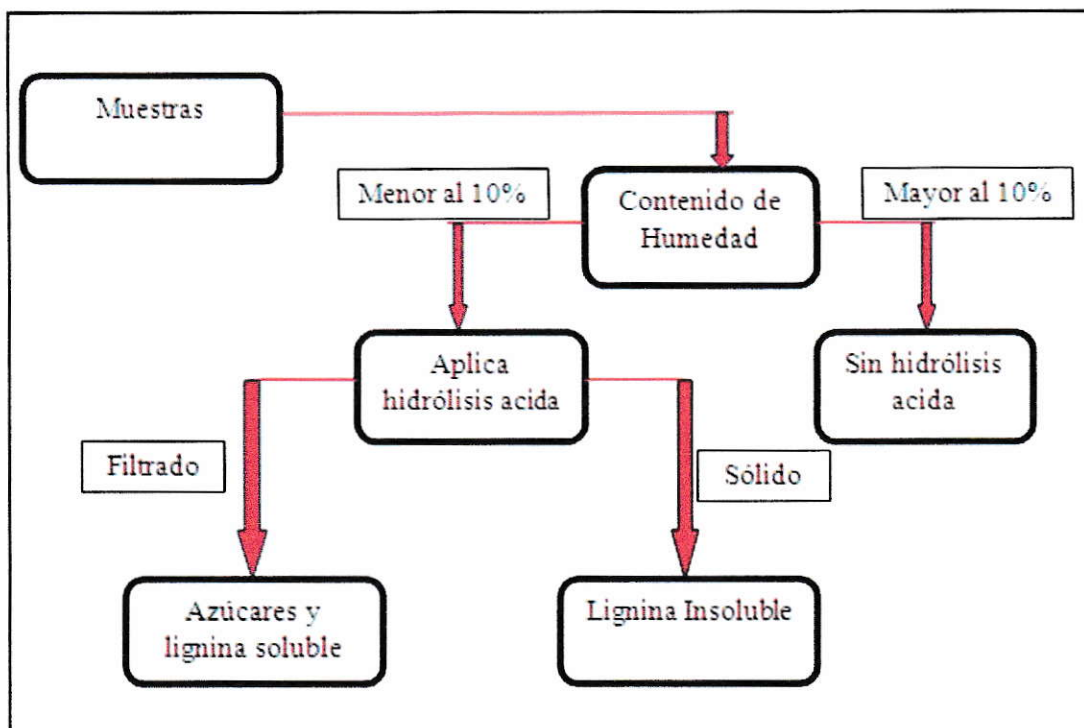


Figura 15. Esquema experimental de la hidrólisis ácida y lignina insoluble

2.4.4 Preparación de las muestras para el proceso de sacarificación.

La hidrólisis enzimática se realizó a las muestras pretratados con los hongos en los tiempos de ataque ya indicados y a los testigos. Para ésto, se colocaron las muestras en la estufa por 48 horas a 30 °C. 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, utilizando las enzimas comerciales Celluclast® 1,5L y Novozyme® 188.

En tubos de centrifuga de 15 mL se agregó 1 g de muestra seca, luego se introdujo 35 μ L de celulasa, 5 μ L de celobiasa y 960 μ L de buffer acetato 0,05 M a pH 5, hasta completar 1 mL. Los tubos centrifugas se llevaron a un agitador orbital (“shaker”) bajo las siguientes condiciones: temperatura de 50° C, pH 5 y agitación de 250 rpm durante 48 horas. Luego se extrajeron las muestras con jeringas y posteriormente se filtraron (0,45 μ m) y se congelaron para su análisis posterior.

Finalmente la metodología utilizada, se muestra en el siguiente esquema.

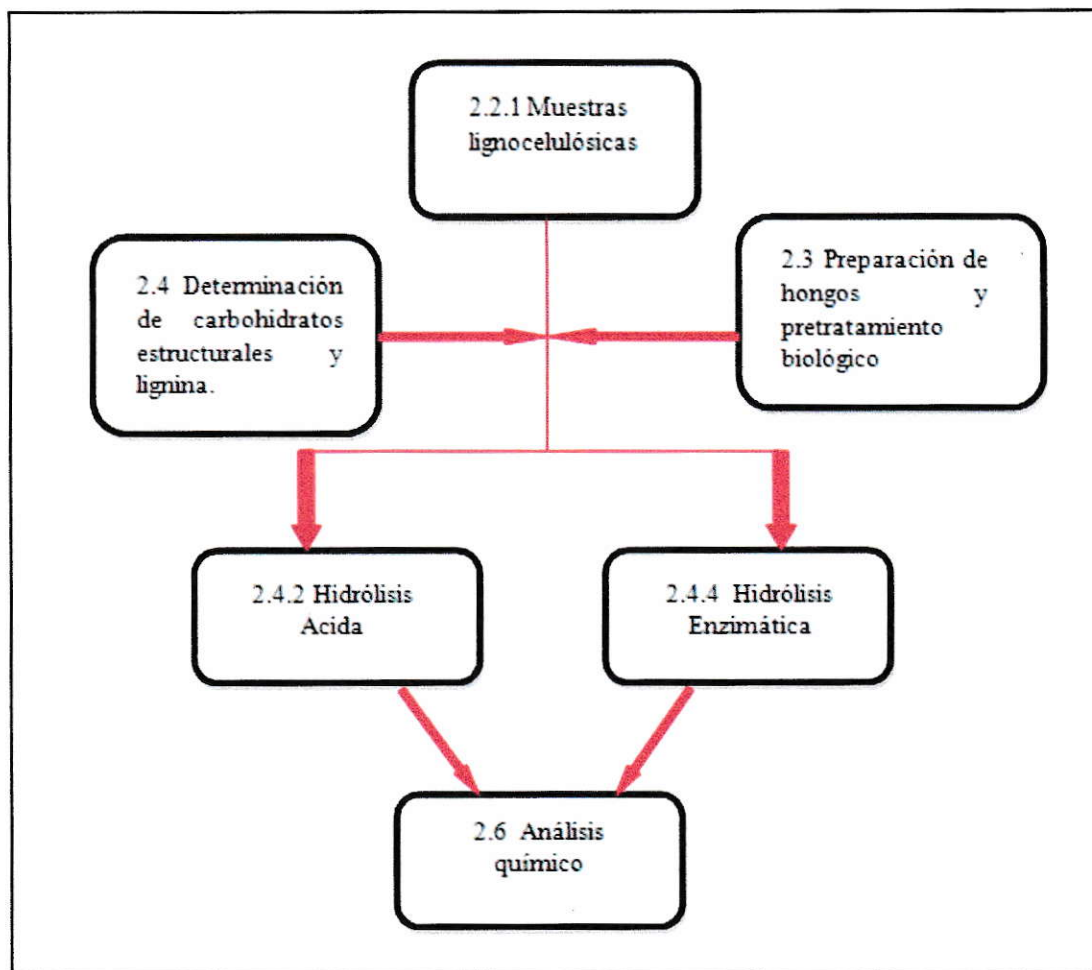


Figura 16. Esquema general de la metodología experimental

2.5 Análisis de glucosa y xilosa

Para preparación de la solución de glucosa y xilosa, se usaron un estándares de estas azúcares en polvo, se masaron 1,5 gramos, aforado con agua desionizada a 25 mL, obteniendo soluciones de 60 mg/mL.

2.6 Análisis químico.

Las muestras fueron analizadas con ayuda de un equipo de HPLC Waters 1515, Columna Aminex HPX-87P, Fase Móvil: Acetonitrilo/agua 75:25, grado HPLC, Velocidad de flujo: 1,0 mL/min, horno a 25°C, se utilizó un detector de índice de refracción Waters 2414, para el procesamiento de datos se utilizó el software Empower.

2.6.1. Preparación de estándares de glucosa y xilosa.

A partir de los estándares preparados en el punto 2.5 tanto de glucosa y xilosa, los cuales tienen una concentración de 60 mg/mL, se realizó una curva de calibración baja dentro del intervalo 0,4-6 mg/mL.

En la tabla 8 se muestra el esquema de los estándares para la curva de calibración para glucosa y xilosa:

Tabla 8. Estándares de los azúcares para curva de calibración baja.

Nº	Alicuota de Glucosa de 60 mg/mL [mL]	Alicuota de Xilosa de 60 mg/mL [mL]	Concentración del estándar [mg/mL]
1	2,5	2,5	6
2	1,67	1,67	4
3	0,83	0,83	2
4	0,42	0,42	1
5	0,33	0,33	0,8
6	0,25	0,25	0,6
7	0,17	0,17	0,4

2.6.2 Recuperación de estándares de azúcares.

En primer lugar se realizó la misma cantidad de estándares indicado en la tabla 4 en matraces de aforo de 25 mL, en cada estándar preparado se les realizó la hidrólisis acida, por este motivo se agrega 870 μ L de ácido sulfúrico al 72%, posteriormente se lleva al autoclave por 1 hora a 120 °C.

Posteriormente se esperó a que se enfriaran los estándares para luego neutralizarlos con carbonato de sodio hasta pH 6-7. Finalmente se congelaron las muestras para su análisis posterior.

2.6.3 Determinación del límite de detección y límite de cuantificación.

Para este proceso se usó los mismos estándares de glucosa y xilosa preparados en el punto 2.6.1, las cuales se inyectaron siete veces. A partir de estas muestras se determinó:

1.-Límite de detección: se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado (Boqué, 2004).

2.- Límite de cuantificación: Corresponde a la cantidad o concentración del analito a partir de la cual es confiable realizar determinaciones cuantitativas (Sogort y col 2004).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Análisis químico del perfil de azúcares.

El método analítico usado en este seminario de título permite identificar y cuantificar todas las azúcares indicadas en la figura 17 (glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa). Cabe destacar cuando se realizó el análisis de las muestras solamente fue posible detectar dos de las azúcares (glucosa y xilosa) ya que las otras tres azúcares (manosa, galactosa y arabinosa) se encuentran a bajo el límite de detección de 0,05 mg/mL.

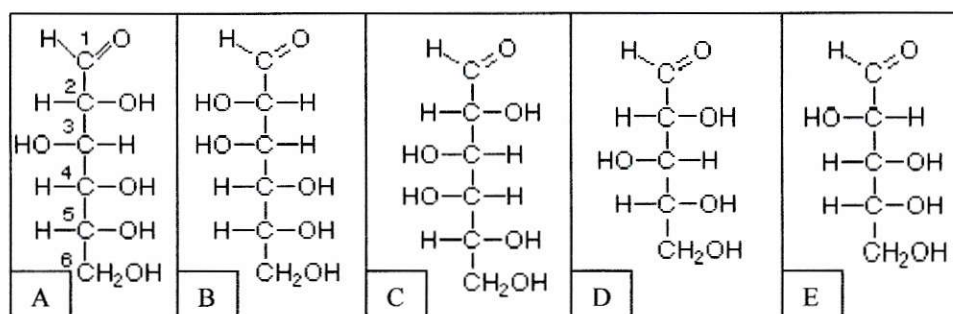


Figura 17. A) Estructura D-glucosa, B) Estructura D-manosa, C) Estructura D-galactosa, D) Estructura D-xilosa y E) Estructura D-arabinosa (Scientific Physich, 2010).

La figura 18 corresponde al cromatograma de los estándares de azúcares, se determinó que el primer pico como xilosa y el siguiente glucosa. La Figura 19 corresponde al cromatograma para la muestra de Lengua se aprecia con claridad solamente dos picos cromatográficos, los cuales fueron identificados por coincidencia del tiempo de retención (t_R). Cabe destacar que en todas las muestras inyectadas sólo se observaron dos componentes.

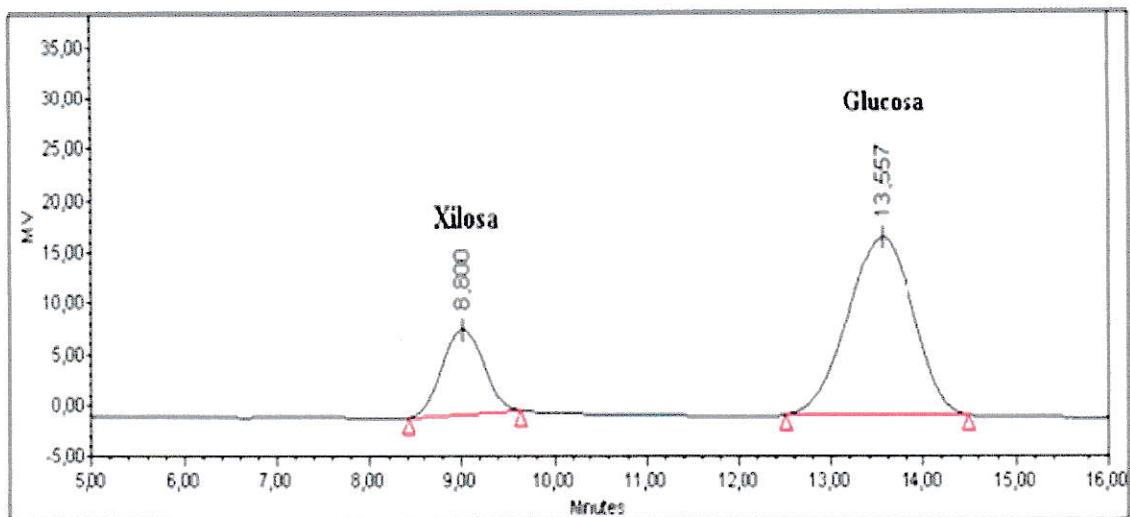


Figura 18. Cromatograma HPLC de estándares de azúcares.

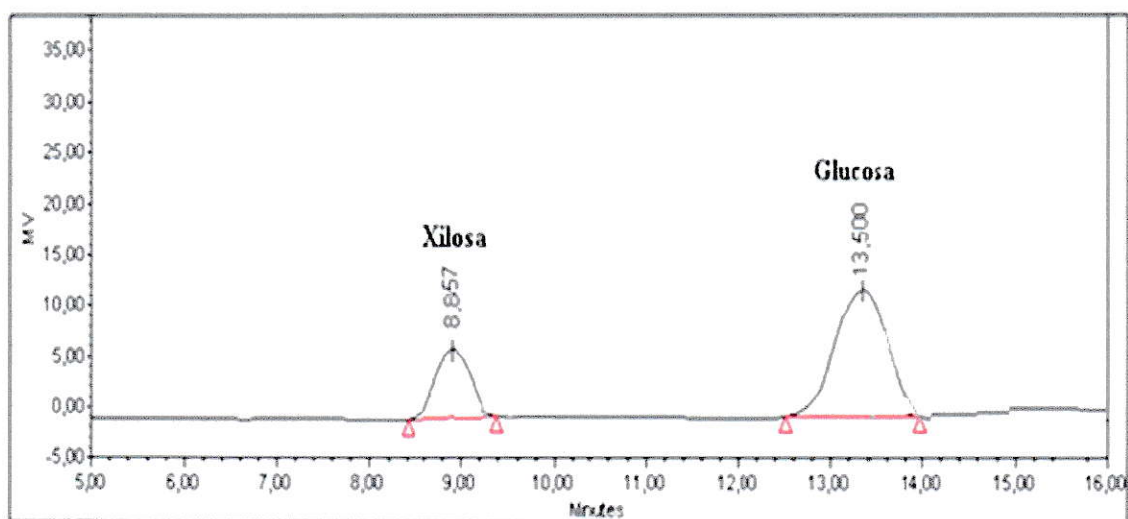


Figura 19. Cromatograma HPLC de muestra de Lengua.

3.2 Límite de detección y límite de cuantificación de las azúcares analizadas.

3.2.1 Límite de detección

La expresión matemática del límite de detección es la siguiente:

En la tabla (tabla 9) se muestra un resumen el límite de detección y cuantificación tanto para glucosa y xilosa.

Tabla 9. Límite de detección y límite de cuantificación de glucosa y xilosa.

Azúcares	Límite de Detección [mg/mL]	Límite de Cuantificación [mg/mL]
Xilosa	0,050 ± 0,003	0,109 ± 0,003
Glucosa	0,247 ± 0,002	0,262 ± 0,002

El límite de cuantificación para el método analítico usado fue de 0,109 y 0,262 mg/mL para xilosa y glucosa respectivamente, a partir de concentraciones superiores o iguales a dicho valor es confiable realizar determinaciones cuantitativas. Si las concentraciones de las muestras son inferiores a las antes mencionadas se podrá detectar pero las determinaciones cuantitativas no serán confiables, por lo cual será necesario utilizar otro método mucho más sensible.

3.3 Recuperación de estándares de las distintas azúcares.

En la tablas 10 y 11 se indica la recuperación de estándares para xilosa (tabla 10) y glucosa (tabla 11), respectivamente.

Tabla 10. Resumen recuperación de estándares para xilosa.

Concentración Inicial Sin Hidrólisis (CsH) [mg/mL]	Concentración Con Hidrólisis (CcH) [mg/mL]	CcH/CsH	Recuperación [%]
0,4	0,37	0,925	92
0,6	0,59	0,987	99
0,8	0,69	0,861	86
1	0,95	0,950	95
2	1,96	0,982	98
4	3,57	0,893	89
6	5,77	0,962	96

Tabla 11. Resumen recuperación de estándares para glucosa.

Concentración Inicial Sin Hidrólisis (CsH) [mg/mL]	Concentración Con Hidrólisis (CcH) [mg/mL]	CcH/CsH	Recuperación [%]
0,4	0,40	0,988	99
0,6	0,58	0,974	97
0,8	0,67	0,834	83
1	0,86	0,862	86
2	1,76	0,879	88
4	3,57	0,893	89
6	5,74	0,957	96

Analizando las recuperaciones de estándares de xilosa y glucosa se observó que éstas alcanzaron sobre el 80 % en las distintas concentraciones de la curva de calibración y además el coeficiente de varianza es inferior al 10% (Anexo punto A), lo cual significa que el método analítico seleccionado fue adecuado para analizar estas dos azúcares. Una posible causa de error en la recuperación de estándares sería la manipulación de las muestras, como ejemplo trasvasijar a los matraces erlenmeyer para el proceso de hidrólisis en autoclave.

3.4 Contenido de azúcares en las muestras.

3.4.1 Muestras Agrícolas.

En la tabla 12 se indica la cantidad de glucosa y xilosa obtenida a partir de procesos de hidrólisis ácida y enzimática en las muestras de maíz.

Tabla 12. Contenido de azúcares en las muestras de maíz obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Xilosa ¹ [g/L]	Xilosa ² [g/L]	Glucosa ¹ [g/L]	Glucosa ² [g/L]
Maíz testigo	0	0,52	0,63	0,97	1,03
<i>Trametes versicolor</i> 1	30	0,56	0,65	1,05	1,13
<i>Trametes versicolor</i> 2	30	0,61	0,72	1,27	1,36
<i>Aurantioporus albidus</i> 1	30	0,83	0,94	1,66	1,81
<i>Aurantioporus albidus</i> 2	30	1,09	1,23	2,43	2,65
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1	60	2,08	2,33	3,36	4,33
<i>Pleurotus ostreatus</i> 2	60	1,43	1,61	3,26	4,19

- 1) Proceso de Hidrólisis Ácida
- 2) Proceso de Hidrólisis Enzimática.

En la figura 20 y figura 21, corresponden a una comparación del contenido promedio de glucosa y xilosa respectivamente, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de maíz.

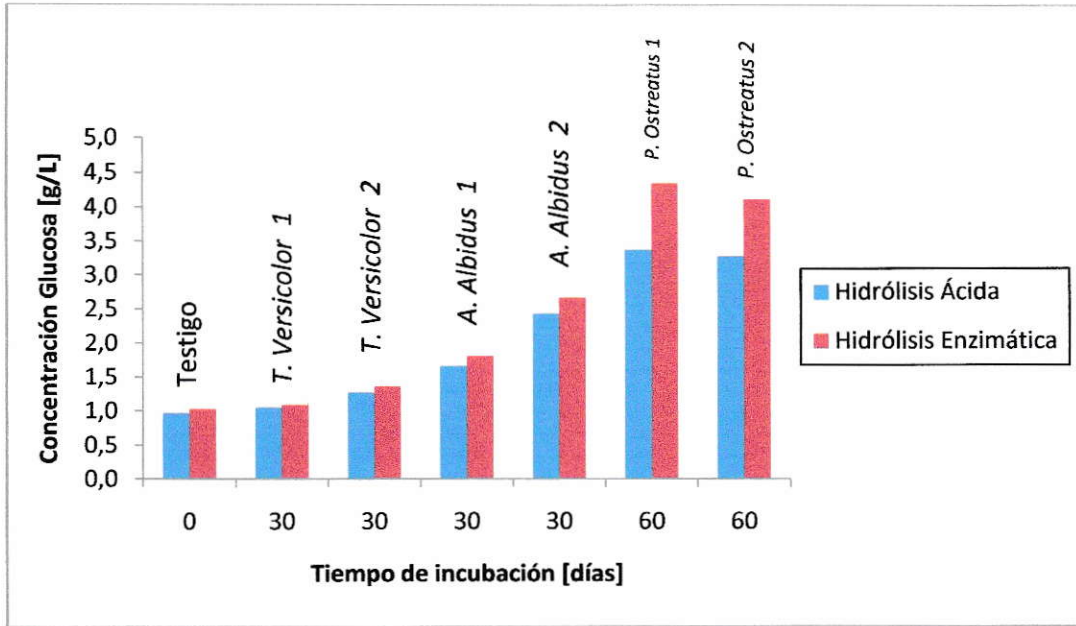


Figura 20. Comparación de contenido de Glucosa en los distintos procesos estudiados en maíz.

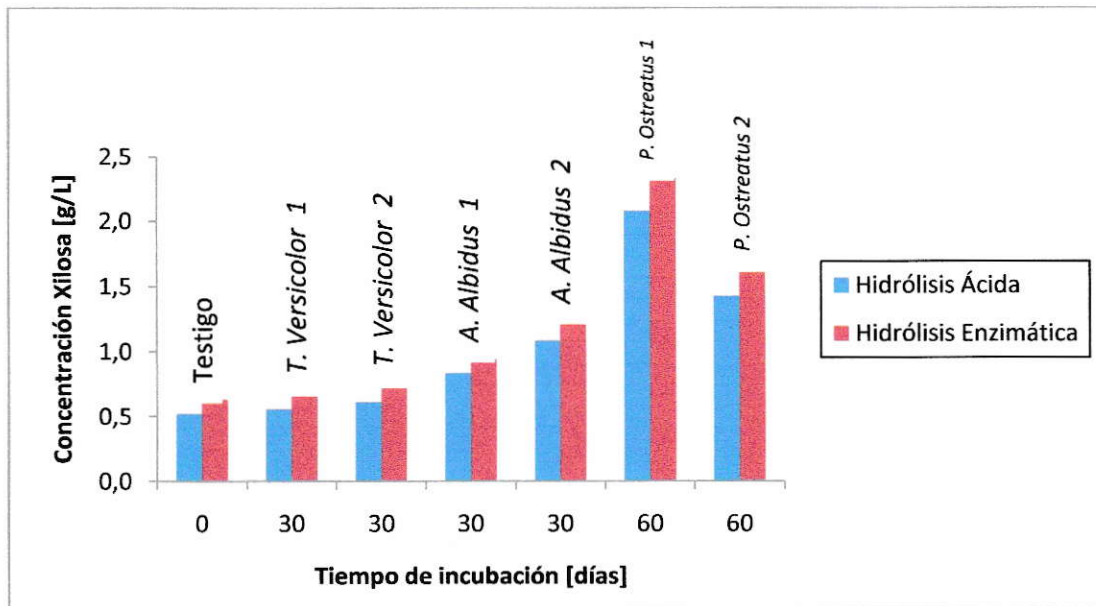


Figura 21. Comparación de contenido de Xilosa en los distintos procesos estudiados en maíz.

La muestra testigo de maíz corresponde a una muestra de este sustrato, la cual no se le ha aplicado un pretratamiento biológico (hongos). En la muestra de maíz al utilizar como opción de pretratamiento al hongo *Pleurotus ostreatus* con 60 días, se obtuvo la mayor cantidad de azúcares con los distintos procesos de obtención de bioetanol. Cabe destacar que todos los pretratamientos biológicos utilizados (hongos) en maíz son de pudrición blanca.

En la tabla 13 se indica la cantidad de glucosa y xilosa en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de trigo.

Tabla 13. Contenido de azúcares en las muestras de trigo obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Xilosa ¹ [g/L]	Xilosa ² [g/L]	Glucosa ¹ [g/L]	Glucosa ² [g/L]
Trigo Testigo	0	0,53	0,58	0,67	0,71
<i>Trametes versicolor</i> 1	30	0,93	1,06	3,00	3,27
<i>Trametes versicolor</i> 2	30	1,08	1,22	3,38	4,24
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	30	0,78	0,91	1,07	1,21
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	30	0,87	1,00	1,54	1,67
<i>Postia placenta</i> 1	45	0,59	0,67	0,84	0,90
<i>Postia placenta</i> 2	45	0,56	0,66	0,76	1,15

- 1) Proceso de Hidrólisis Ácida
- 2) Proceso de Hidrólisis Enzimática.

En la figura 22 y figura 23, corresponden a una comparación del contenido promedio de glucosa y xilosa respectivamente, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de trigo.

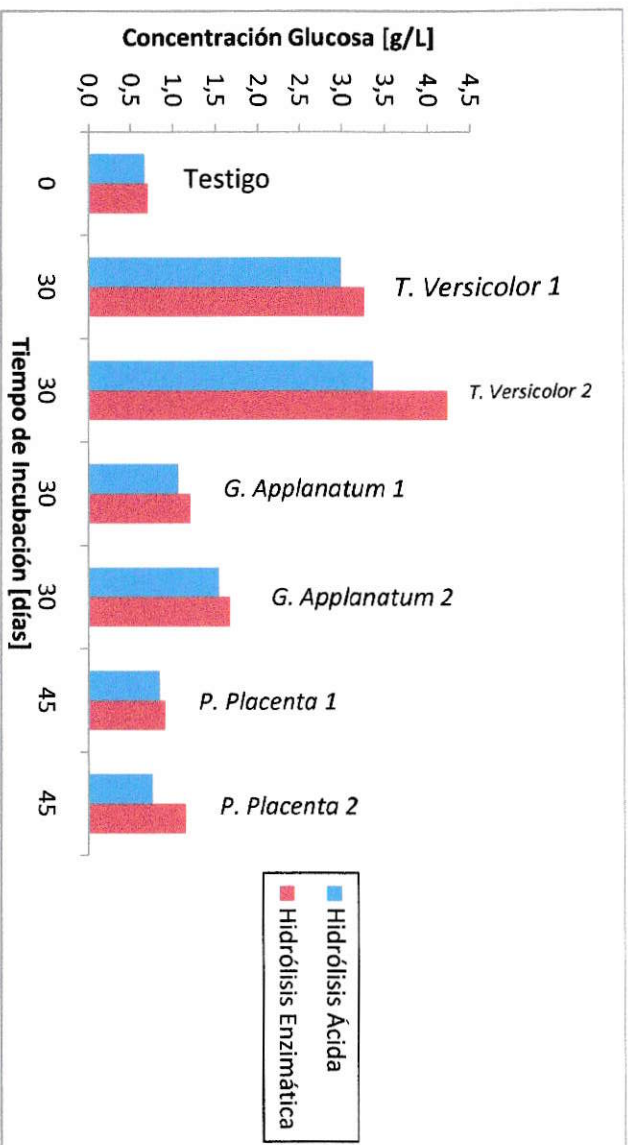


Figura 22. Comparación de contenido de glucosa en los distintos procesos estudiados en trigo.

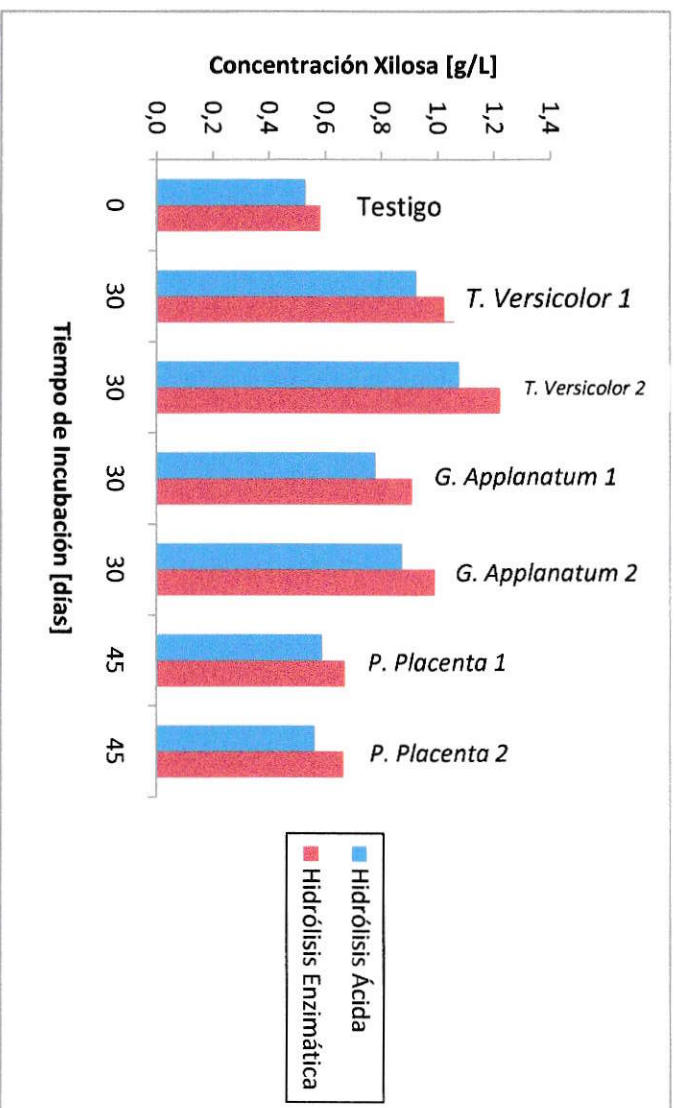


Figura 23. Comparación de contenido de xilosa en los distintos procesos estudiados en trigo.

La muestra testigo de trigo corresponde a una muestra de este sustrato, la cual no se le ha aplicado un pretratamiento biológico (hongos). En la muestra de trigo al utilizar como opción de pretratamiento al hongo *Trametes versicolor* con 30 días, se obtuvo la mayor cantidad de azúcares con los distintos procesos de obtención de bioetanol. Cabe destacar que el hongo *Postia placenta* con 45 días, es de pudrición café y los otros pretratamientos biológicos (hongos) aplicado a este sustrato son de pudrición blanca.

3.4.2 Muestras Forestales.

En la tabla 14 se indica la cantidad de glucosa y xilosa en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de Lengua.

Tabla 14. Contenido de azúcares en las muestras de Lenga obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Xilosa ¹ [g/L]	Xilosa ² [g/L]	Glucosa ¹ [g/L]	Glucosa ² [g/L]
Lenga testigo	0	0,52	0,58	0,73	0,77
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	30	0,65	0,74	2,11	2,30
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	30	0,72	0,83	3,25	3,55
<i>P. gigante</i> 1	45	0,87	1,01	3,77	4,13
<i>P. gigante</i> 2	45	1,04	1,18	4,26	4,68
<i>G. applanatum</i> 1	45	1,70	1,91	4,32	4,72
<i>G. applanatum</i> 2	45	2,85	3,39	4,87	5,34

- 1) Proceso de Hidrólisis Ácida
- 2) Proceso de Hidrólisis Enzimática.

En la figura 24 y figura 25, corresponden a una comparación del contenido promedio de glucosa y xilosa respectivamente, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de Lenga.

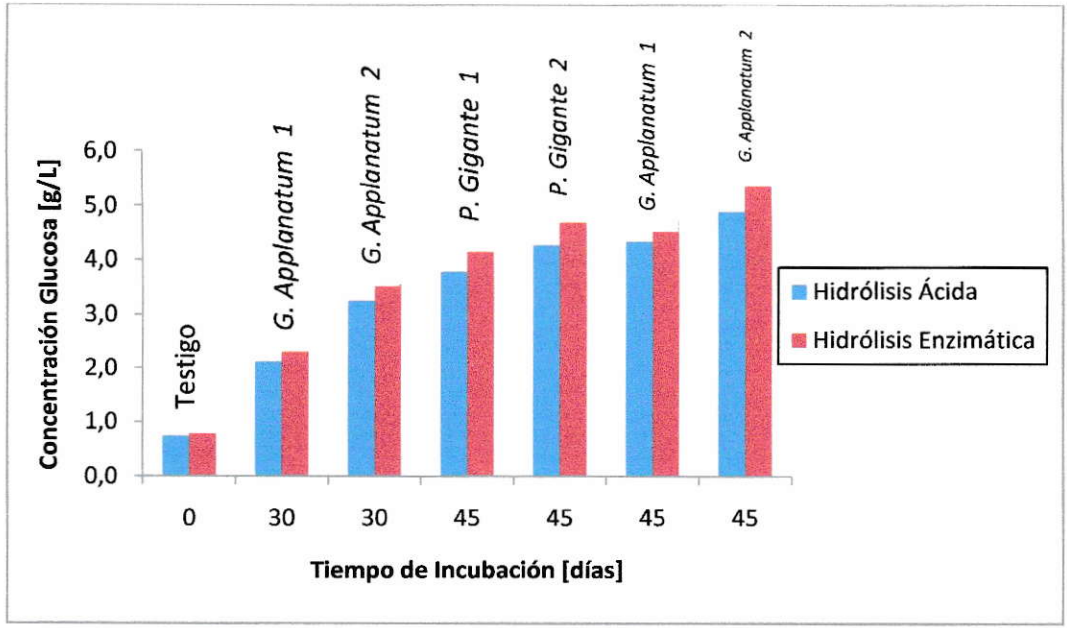


Figura 24. Comparación de contenido de glucosa en los distintos procesos estudiados en Lengua.

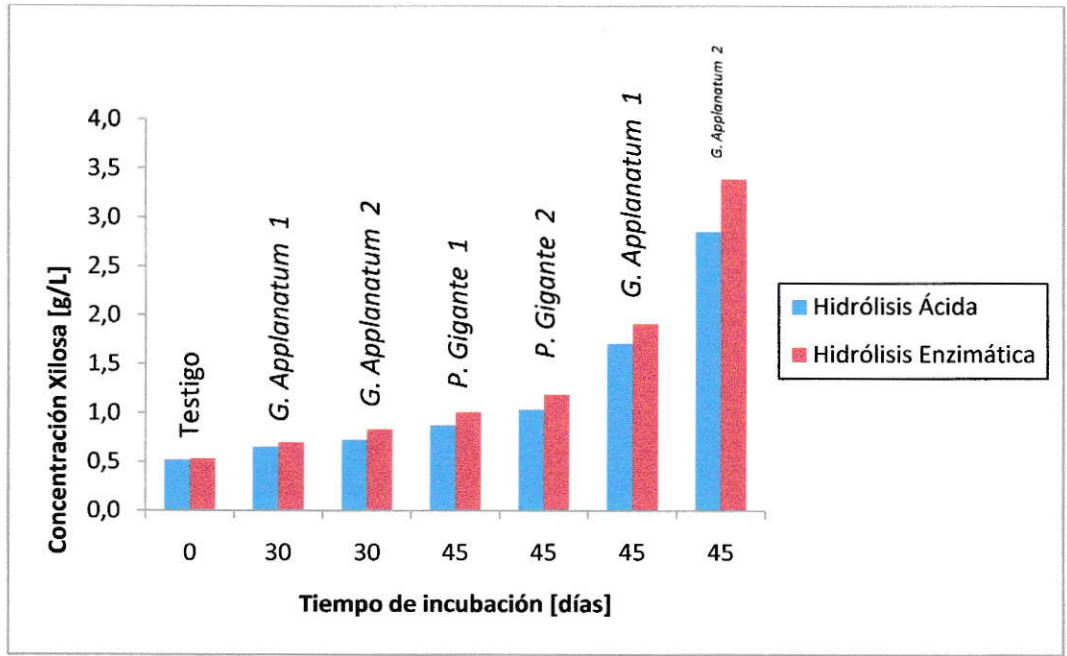


Figura 25. Comparación de contenido de xilosa en los distintos procesos estudiados en Lengua.

La muestra testigo de Lenga corresponde a una muestra de este sustrato, la cual no se le ha aplicado un pretratamiento biológico (hongos). En la muestra de Lenga al utilizar como opción de pretratamiento al hongo *Ganoderma applanatum* con 45 días, se obtuvo la mayor cantidad de azúcares con los distintos procesos de obtención de bioetanol. Cabe destacar que todos los pretratamientos biológicos utilizados (hongos) en maíz son de pudrición blanca.

En la tabla 15 se indica la cantidad de glucosa y xilosa en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de eucalipto.

Tabla 15. Contenido de azúcares en las muestras de eucalipto obtenidos a distintos procesos de obtención de bioetanol.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Xilosa ¹ [g/L]	Xilosa ² [g/L]	Glucosa ¹ [g/L]	Glucosa ² [g/L]
Eucalipto testigo	0	0,84	0,92	0,95	1,08
<i>Stereum hirsutum</i> 1	30	1,02	1,17	2,78	3,04
<i>Stereum hirsutum</i> 2	30	0,96	1,11	2,15	2,35
<i>Stereum hirsutum</i> 1	45	2,50	2,79	4,28	4,69
<i>Stereum hirsutum</i> 2	45	2,67	3,39	5,16	5,67
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	45	1,56	1,76	3,72	4,08
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	45	1,24	1,43	3,33	3,64

1) Proceso de Hidrólisis Ácida

2) Proceso de Sacarificación.

En la figura 26 y figura 27, corresponden a una comparación del contenido promedio de glucosa y xilosa respectivamente, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática en las muestras de eucalipto.

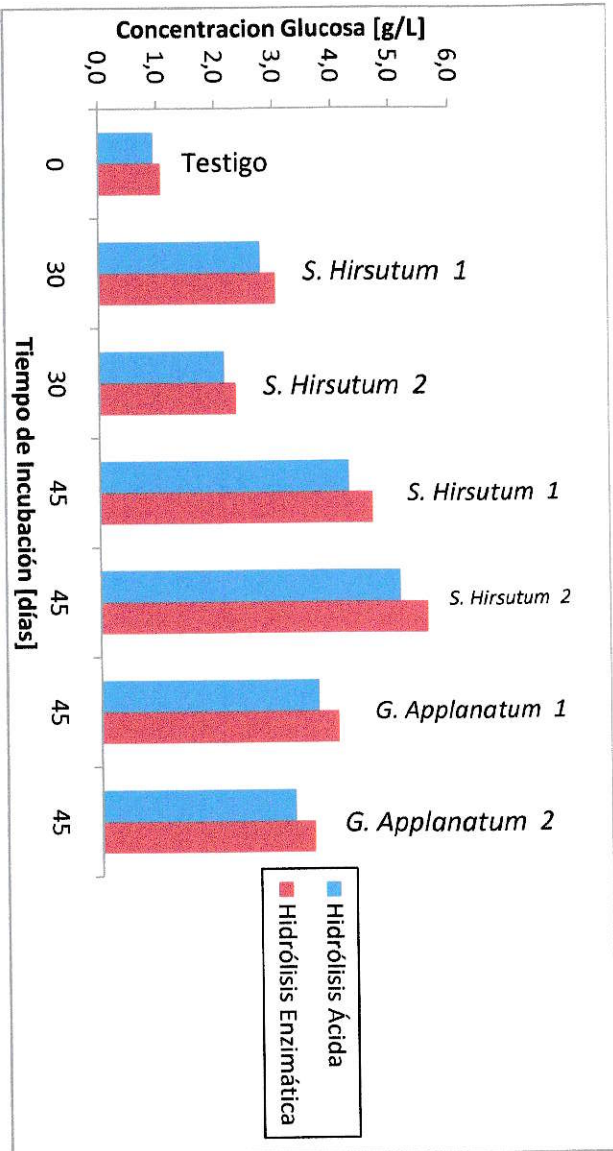


Figura 26. Comparación de contenido de glucosa en los distintos procesos estudiados en eucalipto.

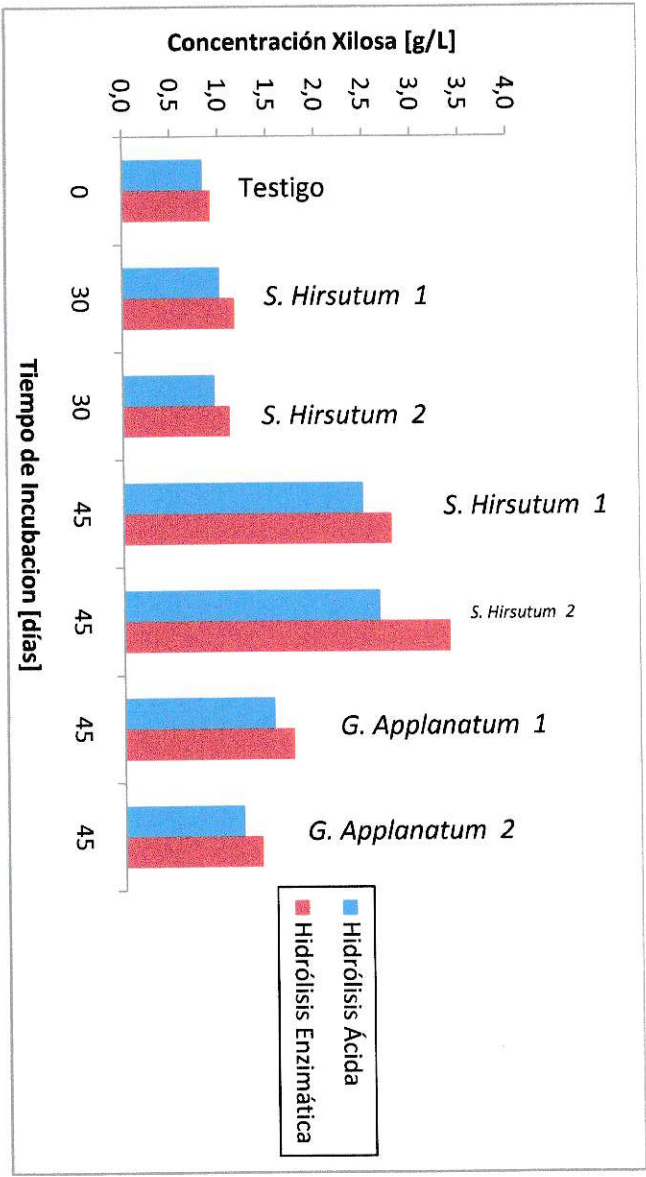


Figura 27. Comparación de contenido de xilosa en los distintos procesos estudiados en eucalipto.

La muestra testigo de eucalipto corresponde a una muestra de este sustrato, la cual no se le ha aplicado un pretratamiento biológico (hongos). En la muestra de eucalipto al utilizar como opción de pretratamiento al hongo *Stereum hirsutum* con 45 días, se obtuvo la mayor cantidad de azúcares con los distintos procesos de obtención de bioetanol. Cabe destacar que todos los pretratamientos biológicos utilizados (hongos) en maíz son de pudrición blanca.

3.5 Discusión general del tratamiento de las muestras.

En el presente seminario, se adecuaron las muestras a una granulometría determinada de 60 μm . Esto tiene directa relación con la obtención de azúcares, ya que se ha demostrado que mientras menor sea el tamaño de la partícula como es este caso, mejor es el acceso de las enzimas y ácido sobre las muestras, obteniendo mayor cantidad de azúcares (Taherzadeh y col, 2008).

Independientemente del tipo de hongo usado de la aplicación del tratamiento biológico, favorece el contenido de azúcares en las muestras agrícolas y forestales. Cabe destacar que con los hongos de pudrición blanca se alcanza una mayor cantidad de azúcares que con hongos de pudrición café debido a que, los de pudrición blanca atacan la lignina rompiendo esta barrera natural permitiendo que la acción de las hidrólisis (ácida o enzimática) sea directa en los polisacáridos. (Blanchette, 1991; Kirk y Cullen, 1998; Martínez y col, 2005).

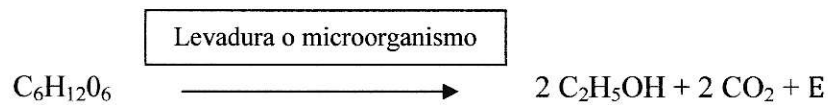
Además se apreció que a mayor tiempo de incubación del pretratamiento se obtuvo una mayor cantidad de azúcares. Se debe considerar que el pretratamiento biológico tiene una limitación, ya que el ataque del hongo en las muestras no es totalmente homogéneo, por este motivo puede que se sobreestime o subestime un valor, puesto que solo se utiliza una pequeña cantidad de muestra. Esto queda demostrado con los valores obtenidos en las muestras realizadas como ejemplo en Lenga pretratadas con *Ganoderma applanatum* 30 días, se obtiene una desviación estándar de 0,43 para glucosa y una desviación estándar de 1,05 para xilosa.

Finalmente en todas las muestras analizadas tanto agrícolas como forestales se obtuvo una mayor cantidad de azúcares en el proceso de hidrólisis enzimática con respecto a hidrólisis ácida. Esto se debe a que el procesos de hidrólisis enzimática tiene una mayor producción de monosacáridos, debido a que las enzimas son específicas para convertir la celulosa a azúcares sin las reacciones de degradación de estos (Gómez, 2008). En el proceso de hidrólisis ácida hay una menor cantidad de azúcares debido probablemente a una degradación de azúcares mayores debido a las temperaturas alcanzadas o pérdida de muestra por la manipulación de las muestras.

3.6 Determinación rendimiento teórico de etanol a partir de los distintos procesos de sacarificación.

3.6.1 Muestras Agrícolas

En la siguiente tabla 16 se muestra un resumen del rendimiento teórico de etanol que se obtendría con el proceso de hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida en muestras de maíz. Se usó la relación de 0,511 g de etanol por 1 g de las respectivas azúcares (glucosa y xilosa). Para glucosa se usó la siguiente ecuación:



Para xilosa se usó la siguiente ecuación:

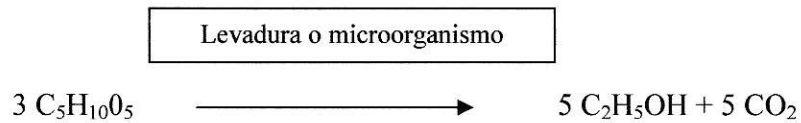


Tabla 16. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de maíz.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Maíz testigo	0	282	11
<i>Trametes versicolor</i> 1	30	306	11
<i>Trametes versicolor</i> 2	30	347	13
<i>Aurantioporus albidus</i> 1	30	475	17
<i>Aurantioporus albidus</i> 2	30	664	24
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1	60	1025	43
<i>P. ostreatus</i> 2	60	884	37

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

Se obtuvo el mayor rendimiento teórico total de etanol a partir de *Pleurotus ostreatus* con un tiempo de incubación de 60 días con 1025 y 43 litros de etanol por tonelada de residuo de maíz seco, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática respectivamente.

En la siguiente tabla 17 se muestra un resumen del rendimiento teórico de etanol que se obtuvo con los procesos estudiados en las muestras de trigo.

Tabla 17. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de trigo.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Trigo Testigo	0	224	8
<i>Trametes versicolor</i> 1	30	750	28
<i>Trametes versicolor</i> 2	30	849	34
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	30	344	13
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	30	457	16
<i>Postia placenta</i> 1	45	269	10
<i>Postia placenta</i> 2	45	247	12

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

Se obtuvo el mayor rendimiento teórico total de etanol a partir de *Trametes Versicolor* con un tiempo de incubación de 30 días con 849 y 33 litros por tonelada de residuos de trigo seco, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática respectivamente.

3.6.2 Muestras forestales

En la siguiente tabla 18 se muestra un resumen del rendimiento teórico de etanol que se obtuvo con los procesos estudiados en las muestras de Lengua.

Tabla 18. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de Lengua.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Lengua testigo	0	233	8
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	30	520	19
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	30	755	27
<i>Peniophora gigante</i> 1	45	884	34
<i>Peniophora gigante</i> 2	45	1013	39
<i>G. applanatum</i> 1	45	1117	42
<i>G. applanatum</i> 2	45	1456	54

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

Se obtuvo el mayor rendimiento teórico total de etanol a partir de *Ganoderma applanatum* con un tiempo de incubación de 45 días con 1456 y 54 litros de etanol por

tonelada de residuos de Lengua seco, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática respectivamente.

En la siguiente tabla 19 se muestra un resumen del rendimiento teórico de etanol que se obtuvo con los procesos estudiados en las muestras de eucalipto.

Tabla 19. Rendimiento teórico de etanol en las muestras de eucalipto.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Eucalipto testigo	0	337	12
<i>Stereum hirsutum</i> 1	30	718	27
<i>Stereum hirsutum</i> 2	30	588	22
<i>Stereum hirsutum</i> 1	45	1292	46
<i>Stereum hirsutum</i> 2	45	1498	56
<i>G. applanatum</i> 1	45	1008	36
<i>G. applanatum</i> 2	45	877	31

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

Se obtuvo el mayor rendimiento teórico total de etanol a partir de *Stereum hirsutum* con un tiempo de incubación de 45 días con 1498 y 56 litros de etanol por tonelada de residuos de eucalipto seco, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática respectivamente.

Se observa que el rendimiento teórico total (glucosa + xilosa) en las distintas muestras es mayor al aplicar el proceso de hidrólisis ácida que la hidrólisis enzimática, a pesar que este último proceso se obtuvo la mayor cantidad de azúcares y esto se debe a que los volúmenes usados en los distintos procesos de sacarificación (hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática) son distintos causando dicha diferencia. Al realizar la comparación con el mismo volumen se obtiene para maíz pretratada con *Trametes versicolor* en 30 días 306 y 984 litros de etanol por tonelada de residuo seco, en los procesos de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática, respectivamente. Así realizando una comparación con el mismo volumen se obtiene un mayor rendimiento teórico total de etanol con el proceso de hidrólisis enzimática. Cabe destacar que una limitación para realizar esta comparación de un mismo volumen es que se hace necesario utilizar una mayor cantidad de enzimas, las cuales tienen un costo económico alto y además se debe cumplir el requerimiento que el proceso de hidrólisis enzimática sea al 10 % (Fritz, 2008).

En términos de producción experimental de bioetanol, Fritz (2008) obtuvo 53 litros de etanol por tonelada de residuo de Lenga seca a partir de la concentración de glucosa, utilizando como proceso la hidrólisis enzimática, mientras que en este estudio

sólo se logró una concentración de 32 litros de etanol por tonelada de residuo de Lengua seca. Esta gran diferencia se puede deber al método utilizado en la determinación de glucosa, ya que en Fritz (2008) se realizó por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), tal vez que la actividad enzimática de las enzimas usadas sean diferentes o que la porción de muestra seleccionada no fue atacada de la misma forma por los hongos en la etapa del pretratamiento.

Finalmente el rendimiento teórico total de etanol obtenido debe ser comprobado experimentalmente. Como ya se ha discutido durante el proceso de hidrólisis se producen muchos productos de degradación los cuales afectan de diversas formas a los microorganismo utilizados para la fermentación alcohólica. Algunos efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos son: reducción de la tasa específica de crecimiento (Azhar y col., 1981; Navarro, 1994); disminución de la productividad volumétrica de etanol (Navarro, 1994; Larsson y col., 1999b); descenso de la productividad específica de etanol (Palmqvist y col., 1999b; Taherzadeh y col., 2000b) y disminución de la producción de biomasa (Palmqvist y col., 1999b). Los efectos producidos por el HMF aunque menores ya que la toxicidad mostrada por este compuesto sobre los microorganismos es menor que la del furfural (Taherzadeh y col., 2000 a; Larsson, 2000).

IV. CONCLUSIONES

- El método analítico usado permite identificar, cuantificar glucosa y xilosa, las cuales son fundamentales su determinación, ya que estas componen mayoritariamente las distintas muestras estudiadas influyendo considerablemente en el contenido de etanol final.
- En el caso de galactosa, manosa y arabinosa el método analítico usado permite identificarlas y cuantificarlas pero su ausencia aparente se debe a que en este tipo de muestras, se encuentran en muy bajas concentraciones (Francisco Gómez, 2008) inferior al límite de detección del método analítico. Por lo cual, para cuantificarlos sería necesario utilizar otros métodos analíticos como la Cromatografía Gaseosa acoplada con masa, con la que se puede llegar a límites de detección inferiores.
- La aplicación de un pretratamiento, en este caso biológico, aumenta la cantidad de azúcares presentes en las muestras en comparación con los testigos.
- En general, a mayor tiempo de incubación se obtiene una mayor cantidad de azúcares.
- El proceso de hidrólisis enzimática obtuvo la mayor cantidad de azúcares y se caracteriza por ser más amigable con el medio ambiente en comparación con la hidrólisis ácida.

- Según el tipo de muestras estudiadas se obtuvo la mayor cantidad de azúcares al utilizar como pretratamiento los siguientes hongos:
 - ✓ Maíz pretratado con *Pleurotus ostreatus* en 60 días.
 - ✓ Trigo pretratado con *Trametes Versicolor* en 30 días.
 - ✓ Lengua pretratado con *Ganoderma applanatum* en 45 días.
 - ✓ Eucalipto pretratado con *Stereum hirsutum* en 45 días.

V. RECOMENDACIONES

- ✓ Verificar que al aplicar el pretratamiento biológico este sea homogéneo sobre las muestras y no sea afectado por la aparición de otro tipo de hongo.
- ✓ Utilizar otro método analítico como la Cromatografía Gaseosa acoplada con masa para cuantificar los azúcares no cuantificados (galactosa, manosa y arabinosa) pero se debe destacar que el uso de esta técnica es más compleja, puesto que se hace necesario realizar un mayor tratamiento a las muestras y un costo económico. Además, estas azúcares al estar en pequeñas concentraciones su contribución en la producción de etanol total sería menor o casi nula.
- ✓ Identificar y cuantificar experimentalmente los inhibidores en los procesos de sacarificación (hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática) y fermentación para comprobar si estos influyen considerablemente en la concentración final de etanol.

VI. REFERENCIAS

ALONSO RUBIO, MARÍA VIRGINIA. “Formulación y curado de resinas fenol – formaldehído tipo “Resol” con sustitución parcial del fenol por lignosulfonatos modificados”. 2002.

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 phyt pathology*, 29: 381-398.

BOQUÉ RICARD, “El límite de detección de un método analítico”, 2004.

CALENTAMIENTO GLOBAL. Revisado el 13 de Octubre 2010. http://es.wikipedia.org/wiki/calentamiento_global.

CONSUELO ZENAIDA FRITZ FUENTES, 2009. “Rendimiento de azúcares reductores a partir de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser sometido a un pretratamiento biológico para la producción de etanol”.

COMBUSTIBLE FÓSIL. Revisado 17 Junio 2010. http://es.wikipedia.org/wiki/Combustible_f%C3%B3sil.

CUAMATZI TAPIA OSCAR, “Bioquímica de los procesos metabólicos”, 2004, Pagina 62.

DIETRICH FENGEL, Gerd Wegener, “Wood, Chemistry, Ultra structure, Reactions”, Walter de Gruyter, 1984.

EERO SJOSTROM, “Wood Chemistry, Fundamentals and Applications”, second edition, Academic Press, 1993.

EFFECTOS POTENCIALES, Revisado 12 de Octubre 2010. http://es.wikipedia.org/wiki/Efectos_potenciales_del_calentamiento_global.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (EIA), US Department of Energy. World Consumption of Primary Energy by Energy type and selected country groups, 1980-2004.

FURFURAL. Revisado 1 de Noviembre 2010. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fufural>.

GÓMEZ FRANCISCO, 2008. “Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano”.

JOSÉ MIGUEL OLIVA DOMÍNGUEZ, “Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces Marxianus*, Universidad Complutense de Madrid, 2003.

HMF. Revisado 4 de Noviembre 2010. <http://es.wikipedia.org/wiki/HMF>.

I. BALLESTEROS, J.M. Oliva, M.J. Negro, P. Manzanares y M. Ballesteros, “Proceso de sacarificación y fermentación simultaneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol”, *Grasas y Aceites, Facs.3*, 2002, 282-288.

M. BALLESTEROS, J.M Oliva, M.J Negro, P. Manzanares, I. Ballesteros, “Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875”, September 2003.

MÉTODOS ANALÍTICOS ESTÁNDARES DE BIOMASA PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS DE LABORATORIO DEL NREL (National Renewable Energies Laboratory, USA). Revisado 26/02/2010.

LARSSON S., Reimann A., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J. (1999a) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79: 91-103.

LARSSON S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., & Zacchi G. N. N. O. (1999b) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microbiol. Technol.* 24: 151-159.

LARSSON S. (2000) Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral. Lund. Suecia.

LARSSON S., Quintana-Sáinz A., Reimann A., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J. (2000) The influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 617-632.

LAVARACK B. P, Griffin G. J y Rodman, 2000. “Measured Kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. *Catalysisoday*. Vol. 63: p 257-265.

PARVEEN KUMAR, Diane M. Barret, Michael J. Delwiche, Pieter Stroeve, “Methods for Pretreatment of lignocellulosic Biomass for efficient Hydrolysis and Biofuel Production”, University of California Davis, 2009.

PONTT, CARLOS, 2008. “Potencial de biomasa en Chile”. <http://www.neim.utfsm.cl/arch/20080808-02-Biomasa.pdf>.

ROBERTSON, E.E, “Biocombustibles: Biosphere, biomasse, bioconversion, Biocombustibles”, editions SCM, 1979.

SCIENTIFIC PYSCHIC, Revisado 21 de Octubre 2010. www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html.

SCIENTIFIC PYSCHIC, Revisado 28 de Octubre 2010. www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos.html.

SOGORB SÁNCHEZ, MIGUEL ANGEL, “Técnicas analíticas de contaminantes químicos, Aplicaciones, 2004.

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.

RUIZ CAMACHO, RUBÉN (1981). Cultivo de trigo y la cebada. Temas de orientación Agropecuaria, Bogotá. Paginas: 19-20.

SEDESA. http://www.sedesa.com/es_pudricion_de_madera.html Revisado 15 de junio 2010.

WOOLEY R. J., Ruth M. F., Glassner D., & Sheenan J. (1999) Process desing and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnol. Prog.* 15: 794-803.

WYMAN C. E. (1996). Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. Wyman, C. E. 1-18. Bristol, Taylor and Francis. Handbook on bioethanol: production and utilization.

WYMAN C. E. (1999). Production of low cost sugars from biomass: progress, opportunities and challenges. Overend, R. P. and Chornet, E. 1, 867-872. Pergamon, Oxford, Proceeding of the 4th Biomass Conference of the Americas. Biomass-a growth opportunity in green energy and value-added products.

ZACCHI G. & AXELSSON A. (1989) Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 223-232.

ZALDIVAR J., MARTINEZ A., & Ingram L. O. (1999) Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 24-33.

VII. ANEXOS



A. Validación del método Cromatográfico.

A.1 Curvas de calibración de azúcares.

A.1.1 Tabla Curva de calibración Glucosa sin hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL)

0,4 [mg/mL]		0,6 [mg/mL]		0.8 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
13,576	44584	13,603	95705	13,825	107316	
13,531	44594	13,585	96784	13,750	106544	
13,476	43176	13,700	95443	13,767	107737	
13,233	43184	13,647	96257	13,098	107315	
13,114	43224	13,125	96053	13,093	106433	
13,181	43468	13,117	95939	13,117	106502	
13,131	44592	13,110	95691	13,131	107194	
Promedio	13,320	43831,71	13,412	95981,71	13,397	107005,86
DE	0,20	716,02	0,28	443,03	0,36	509,42
CV [%]	1,50	1,63	2,08	0,46	2,68	0,48

A.1.2 Tabla Curva de calibración Glucosa sin hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)

1 [mg/mL]		2 [mg/mL]		4 [mg/mL]		6 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
13,018	196541	13,205	425747	13,555	832820	13,617	1484573	
13,960	195753	13,152	426777	13,538	832099	13,595	1485454	
13,803	195939	13,097	426181	13,232	833266	13,565	1485646	
13,833	195123	13,592	426716	13,567	833021	13,071	1484808	
13,110	196104	13,547	426358	13,325	833091	12,993	1485125	
13,710	195836	13,450	426025	13,079	832821	13,239	1484723	
13,661	195518	13,406	426407	13,114	833630	13,249	1484991	
Promedio	13,585	195830,57	13,349	426315,86	13,344	832964	13,333	1485045,7
DE	0,37	446,40	0,20	367,25	0,21	473,21	0,26	391,67
CV [%]	2,72	0,23	1,48	0,09	1,57	0,06	1,94	0,03

A.1.3 Tabla Curva de calibración Glucosa con hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL)

0,4 [mg/mL]		0,6 [mg/mL]		0.8 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
13,297	24251	13,767	72158	13,150	93420	
13,507	24507	13,879	71978	13,232	92993	
13,697	24478	13,643	72034	13,083	92039	
13,732	24653	13,900	72305	13,473	93423	
13,853	24203	13,979	72234	13,567	92753	
13,283	25906	13,593	72689	13,050	93952	
13,500	24902	13,899	72003	13,302	92737	
Promedio	13,553	24700	13,809	72200,14	13,265	93045,29
DE	0,22	582,04	0,15	247,90	0,20	619,28
CV [%]	1,61	2,36	1,05	0,34	1,47	0,67

A.1.4 Tabla Curva de calibración Glucosa con hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)

1 [mg/mL]		2 [mg/mL]		4 [mg/mL]		6 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
13,867	141873	13,667	367082	13,800	822931	13,017	1367897	
13,217	141921	13,817	366982	13,833	823060	13,117	1367454	
13,983	142335	13,953	366869	13,800	822825	13,467	1367780	
13,833	142469	13,852	367042	13,800	822613	12,917	1367672	
13,845	142232	13,967	366853	13,833	822825	13,433	1367032	
13,953	142153	13,907	366943	13,854	822827	13,117	1367987	
13,973	141988	13,906	367043	13,767	823123	13,789	1367783	
Promedio	13,810	142138,71	13,867	366973,43	13,812	822886,29	13,265	1367657,86
DE	0,27	222,58	0,10	89,20	0,03	170,26	0,31	323,92
CV [%]	1,95	0,17	0,74	0,02	0,21	0,02	2,32	0,02

A.1.5 Tabla Curva de calibración Xilosa sin hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL)

0,4 [mg/mL]		0,6 [mg/mL]		0.8 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
8,346	21576	8,397	30814	8,441	58219	
8,254	22786	8,167	30396	8,410	57654	
8,342	22789	8,411	29929	8,084	57857	
8,576	21432	8,345	30553	8,284	58544	
8,379	21768	8,892	30691	8,276	57336	
8,231	22456	8,864	29682	8,117	58541	
8,321	22345	8,592	30800	8,226	57844	
Promedio	8,350	22164,57	8,524	30409,29	8,263	57999,29
DE	0,113	567,73	0,27	442,77	0,13	454,97
CV [%]	1,35	2,56	3,19	1,47	1,62	0,78

A.1.6 Tabla Curva de calibración Xilosa sin hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)

1 [mg/mL]		2 [mg/mL]		4 [mg/mL]		6 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
8,145	77212	8,497	122477	8,497	231311	8,679	327948	
8,467	76817	8,017	122142	8,017	231472	8,650	328489	
8,183	77249	8,989	122446	8,989	232098	8,627	328684	
8,083	76957	8,527	122066	8,527	231250	8,009	327927	
8,200	76848	8,513	122278	8,513	232219	8,987	328974	
8,182	76487	8,007	122414	8,007	232057	8,002	328853	
8,200	76563	8,027	123060	8,027	232427	8,071	328768	
Promedio	8,209	76876,14	8,368	122411,86	8,553	231833,43	8,432	328520,43
DE	0,12	270,49	0,37	325,54	0,38	476,96	0,40	425,28
CV [%]	1,48	0,35	4,41	0,27	4,46	0,21	4,72	0,13

A.1.7 Tabla Curva de calibración Xilosa con hidrolizar (rango 0,4 a 0,8 mg/mL)

	0,4 [mg/mL]		0,6 [mg/mL]		0.8 [mg/mL]	
	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área
	8,532	30897	8,513	42139	8,483	46966
	8,367	29542	8,614	42032	8,103	47714
	8,356	30643	8,453	41462	8,150	47543
	8,289	29562	8,354	41953	8,312	46983
	8,123	29352	8,314	41979	8,423	47132
	8,342	30013	8,514	42132	8,543	46893
	8,634	29534	8,314	42052	8,412	47032
Promedio	8,378	29934,71	8,439	41964,14	8,3479	47180,43
DE	0,17	564,05	0,12	232,22	0,17	318,36
CV [%]	1,97	1,88	1,37	0,55	2,00	0,67

A.1.8 Tabla Curva de calibración Xilosa con hidrolizar (rango 1 a 6 mg/mL)

1 [mg/mL]		2 [mg/mL]		4 [mg/mL]		6 [mg/mL]		
Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	Tiempo retención [min]	Área	
8,202	61143	8,032	116678	8,032	203466	8,217	322717	
8,457	60547	8,533	116127	8,533	203199	8,254	321949	
8,317	61243	8,142	115978	8,142	202987	8,196	322334	
8,186	61089	8,097	116242	8,097	203728	8,129	322183	
8,583	61958	8,317	115987	8,317	203531	8,215	321983	
8,032	61543	8,317	115965	8,317	202720	8,154	322428	
8,042	61653	8,283	116073	8,283	202843	8,069	321973	
Promedio	8,260	61310,86	8,246	116150	8,246	203210,57	8,176	322223,86
DE	0,21	457,39	0,17	253,01	0,17	378,93	0,06	287,27
CV [%]	2,49	0,75	2,06	0,22	0,38	0,19	0,77	0,09

A.2 Recuperación de los estándares de azúcares

A.2.1 Tabla de porcentaje de recuperación para Glucosa.

Concentración Inicial Sin Hidrólisis [mg/mL]	Área con Hidrolisis	Concentración Con Hidrólisis [mg/mL]	CcH/CsH	Recuperación [%]
0,4	24700	0,395	0,988	98,79
0,6	72200,14	0,584	0,974	97,36
0,8	93045,29	0,667	0,834	83,39
1	142138,71	0,862	0,862	86,25
2	366973,43	1,757	0,879	87,86
4	822886,29	3,571	0,893	89,29
6	1367657,86	5,739	0,957	95,65

A.2.2 Tabla de porcentaje de recuperación para Xilosa.

Concentración Inicial Sin Hidrólisis [mg/mL]	Área con Hidrolisis	Concentración Con Hidrólisis [mg/mL]	CcH/CsH	Recuperación [%]
0,4	29934,71	0,370	0,925	92,49
0,6	41964,14	0,592	0,987	98,71
0,8	47180,43	0,689	0,861	86,08
1	61310,86	0,950	0,950	94,98
2	116150	1,963	0,982	98,17
4	203210,57	3,572	0,893	89,31
6	322223,86	5,772	0,962	96,20

A.3 Limite de Detección y limite de Cuantificación de azúcares

A.3.1 Tabla Resumen para curva de calibración Glucosa.

Concentración Inicial Sin Hidrólisis [mg/mL]	Área sin Hidrolisis	Desviación Estándar
0,4	43831,71	339,53
0,6	95981,71	716,02
0,8	107005,86	443,03
1	195830,57	509,42
2	426315,86	446,40
4	832964	367,25
6	1495045,71	473,21

A continuación se presenta las graficas de la curva de calibración de Glucosa (0,4 - 2 mg/mL):

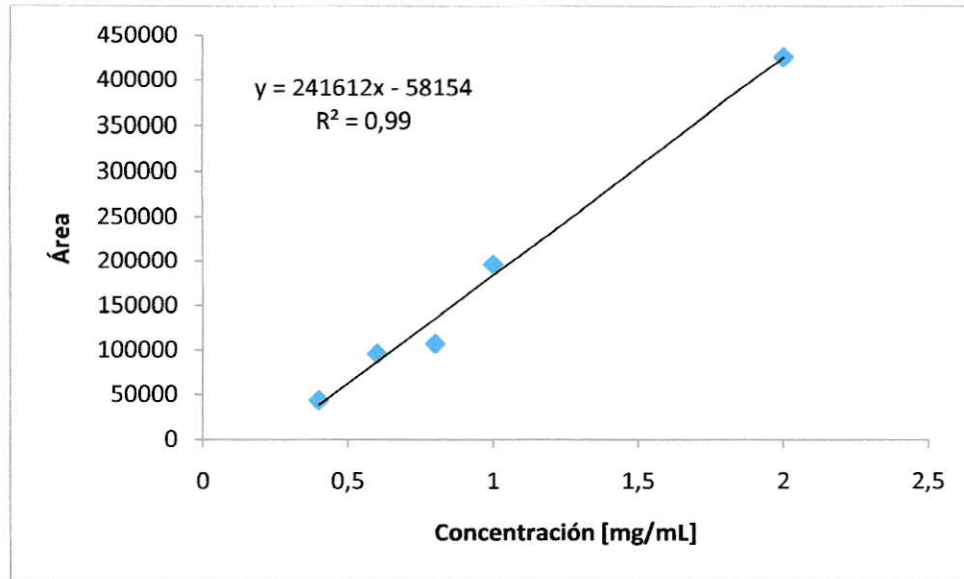


Figura 1. Curva de Calibración Glucosa.

Limite de detección Glucosa: $\frac{58154 + (3 \times 512,01)}{241612} = 0,247 \text{ mg/mL.}$

241612

Limite de Cuantificación Glucosa: $\frac{58154 + (10 \times 512,01)}{241612} = 0,262 \text{ mg/mL.}$

A.3.2 Tabla Resumen para curva de calibración Xilosa.

Concentración Inicial Sin Hidrólisis [mg/mL]	Área sin Hidrolisis	Desviación Estándar
0,4	22164,57	567,73
0,6	30409,29	442,77
0,8	57999,29	454,97
1	76876,14	270,498
2	122411,86	325,54
4	231833,43	476,96
6	328520,43	425,28

A continuación se presenta las graficas de la curva de calibración de Xilosa (0,4 – 2 mg/mL:

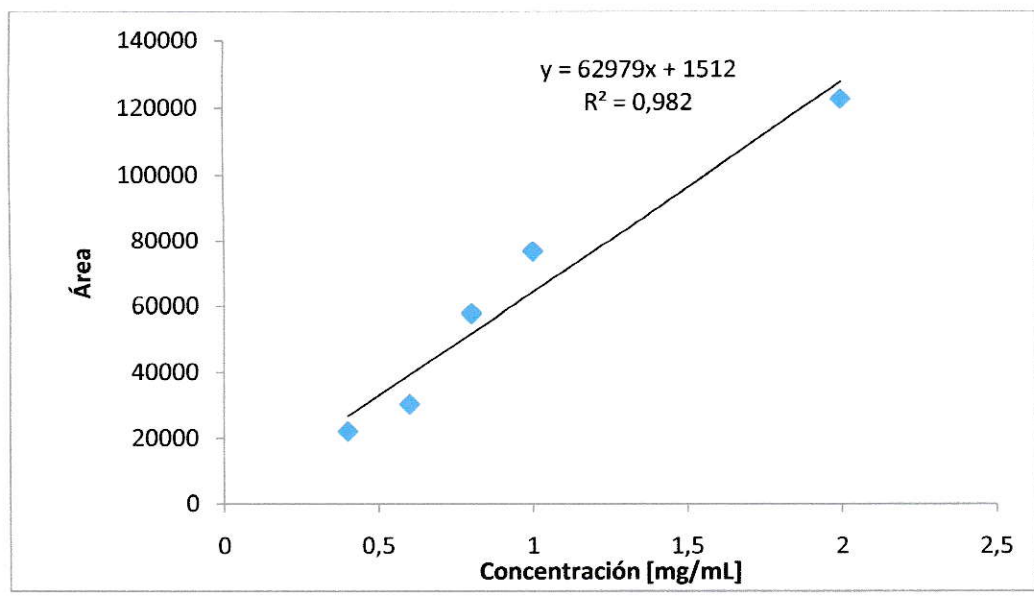


Figura 2. Curva de Calibración Xilosa.

Limite de detección Xilosa: $\frac{1512 + (3 \times 536,47)}{62979} = 0,050 \text{ mg/mL}$.

Limite de Cuantificación Xilosa: $\frac{1512 + (10 \times 536,47)}{54107} = 0,109 \text{ mg/mL}$.

B.1.Cantidad de masa utilizada en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en los distintos tipos de sustratos.

B.1.1 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Maíz.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Masa en Hidrólisis Ácida [g]	Masa en Sacarificación [g]
Maíz testigo 1	0	0,302	0,106
Maíz testigo 2	0	0,304	0,103
<i>Trametes 1</i>	30	0,301	0,103
<i>Trametes 2</i>	30	0,310	0,101
<i>Auranteoporus 1</i>	30	0,301	0,106
<i>Auranteoporus 2</i>	30	0,302	0,107
<i>Pleorotus 1</i>	60	0,304	0,105
<i>Pleorotus 2</i>	60	0,304	0,105

B.1.2 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Trigo.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Masa en Hidrólisis Ácida [g]	Masa en Sacarificación [g]
Trigo testigo 1	0	0,307	0,105
Trigo testigo 2	0	0,307	0,105
<i>Trametes 1</i>	30	0,301	0,103
<i>Trametes 2</i>	30	0,301	0,108
<i>Ganoderma 1</i>	30	0,306	0,107
<i>Ganoderma 2</i>	30	0,302	0,108
<i>Postia 1</i>	45	0,305	0,106
<i>Postia 2</i>	45	0,306	0,105

B.1.3 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Lenga.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Masa en Hidrólisis Ácida [g]	Masa en Sacarificación [g]
Lenga testigo 1	0	0,308	0,107
Lenga testigo 2	0	0,305	0,104
<i>Ganoderma</i> 1	30	0,305	0,106
<i>Ganoderma</i> 2	30	0,301	0,106
<i>Ganoderma</i> 1	45	0,303	0,107
<i>Ganoderma</i> 2	45	0,301	0,105
<i>Peniophoca</i> 1	45	0,307	0,102
<i>Peniophoca</i> 2	45	0,303	0,103

B.1.4 Tabla de la cantidad de masa en el proceso de Hidrólisis Ácida y Sacarificación en muestras de Eucalipto.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Masa en Hidrólisis Ácida [g]	Masa en Sacarificación [g]
Eucalipto testigo 1	0	0,303	0,105
Eucalipto testigo 2	0	0,302	0,105
<i>Stereum 1</i>	45	0,304	0,108
<i>Stereum 2</i>	45	0,303	0,106
<i>Stereum 1</i>	30	0,301	0,103
<i>Stereum 2</i>	30	0,300	0,103
<i>Ganoderma 1</i>	45	0,303	0,107
<i>Ganoderma 2</i>	45	0,300	0,108

B.2 Contenido de humedad en los distintos procesos estudiados en los diferentes sustratos.

B.2.1 Datos del contenido de humedad (FH) en los procesos estudiados en maíz

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Lignina Insoluble Hidrólisis Ácida [g]	FH Hidrólisis Ácida	FH Hidrólisis Enzimática
Maíz testigo 1	0	0,072	1,02	1,04
<i>Trametes 1</i>	30	0,047	1,02	1,01
<i>Trametes 2</i>	30	0,050	1,02	1,01
<i>Auranteoporus 1</i>	30	0,048	1,02	1,02
<i>Auranteoporus 2</i>	30	0,051	1,01	1,04
<i>Pleorotus 1</i>	60	0,049	1,02	1,04
<i>Pleorotus 2</i>	60	0,047	1,02	1,02

B.2.2 Datos del contenido de humedad (FH) en los procesos estudiados en trigo.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Lignina Insoluble Hidrólisis Ácida [g]	FH Hidrólisis Ácida	FH Hidrólisis Enzimática
Trigo testigo 1	0	0,074	1,02	1,01
<i>Trametes 1</i>	30	0,046	1,02	1,03
<i>Trametes 2</i>	30	0,053	1,02	1,02
<i>Ganoderma 1</i>	30	0,055	1,02	1,04
<i>Ganoderma 2</i>	30	0,057	1,01	1,01
<i>Postia 1</i>	45	0,037	1,02	1,02
<i>Postia 2</i>	45	0,030	1,02	1,03

B.2.3 Datos del contenido de humedad en el proceso de hidrólisis ácida en Lenga.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Lignina Insoluble Hidrólisis Ácida [g]	FH Hidrólisis Ácida	FH Hidrólisis Enzimática
Lenga testigo 1	0	0,093	1,02	1,01
<i>Ganoderma</i> 1	30	0,052	1,02	1,04
<i>Ganoderma</i> 2	30	0,051	1,02	1,02
<i>Ganoderma</i> 1	45	0,064	1,02	1,04
<i>Ganoderma</i> 2	45	0,063	1,02	1,04
<i>Peniophoca</i> 1	45	0,048	1,01	1,04
<i>Peniophoca</i> 2	45	0,056	1,01	1,02

B.2.4 Datos del contenido de humedad en el proceso de hidrólisis ácida en eucalipto.

Muestra	Tiempo de Incubación [días]	Lignina Insoluble Hidrólisis Ácida [g]	FH Hidrólisis Ácida	FH Hidrólisis Enzimática
Eucalipto testigo 1	0	0,068	1,01	1,01
<i>Stereum 1</i>	45	0,031	1,02	1,01
<i>Stereum 2</i>	45	0,033	1,02	1,01
<i>Stereum 1</i>	30	0,037	1,02	1,04
<i>Stereum 2</i>	30	0,045	1,02	1,02
<i>Ganoderma 1</i>	45	0,057	1,03	1,02
<i>Ganoderma 2</i>	45	0,052	1,02	1,03

C. Contenido de azúcares en los distintos sustratos estudiados.

C.1 Contenido de azúcares en el proceso de hidrólisis acida.

C.1.1 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte I)

Maíz Testigo 1			Maíz Testigo 2			<i>Trametes</i> 1(30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,676	168196	0,966	13,800	169320	0,971	13,431	189479	1,051	13,447	243908	1,267	
13,233	167196	0,962	13,753	168523	0,967	13,767	188589	1,047	13,658	242832	1,263	
13,167	168267	0,966	13,483	169277	0,970	13,542	189542	1,051	13,012	243242	1,265	
13,675	167121	0,962	13,356	168456	0,967	13,792	189107	1,050	13,023	243832	1,267	
X	13,438	167695	0,963	13,598	168894	0,968	13,633	189179,25	1,050	13,285	243453,5	1,266

C.1.2 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte II)

<i>Auranteoporus 1(30)</i>			<i>Auranteoporus 2 (30)</i>			<i>Pleorotus 1 (60)</i>			<i>Pleorotus 2 (60)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,931	341938	1,658	13,033	533537	2,432	13,647	766616	3,359	13,750	741954	3,266	
13,952	342341	1,660	13,142	534942	2,428	13,572	765832	3,360	13,810	742483	3,262	
13,987	342042	1,660	13,214	533142	2,426	13,782	767542	3,361	13,742	742532	3,263	
13,973	342171	1,658	13,042	534643	2,432	13,472	766452	3,360	13,734	742742	3,264	
X	13,961	342123	1,661	13,108	534066	2,430	13,618	766610,5	3,360	13,759	742427,75	3,264

C.1.3 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte I)

Maíz Testigo 1			Maíz Testigo 2			<i>Trametes</i> 1 (30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,067	37632	0,512	8,250	39154	0,540	8,878	40645	0,568	8,281	43247	0,616	
8,217	38543	0,529	8,100	38168	0,522	8,875	39242	0,542	8,274	42973	0,611	
8,267	37305	0,506	8,150	39097	0,539	8,742	40892	0,572	8,253	42732	0,606	
8,234	38476	0,528	8,213	38054	0,520	8,842	39137	0,540	8,287	43041	0,612	
X	8,19625	37989	0,519	8,178	38618,25	0,530	8,834	39979	0,556	8,274	42998,25	0,611

C.1.4 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte II)

<i>Auranteoporus</i> 1 (30)			<i>Auranteoporus</i> 2 (30)			<i>Pleorotus</i> 1 (60)			<i>Pleorotus</i> 2 (60)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,207	54887	0,831	8,267	67920	1,072	8,946	122966	2,089	8,136	86822	1,421	
8,213	55342	0,840	8,242	68792	1,088	8,973	121697	2,066	8,172	87242	1,429	
8,227	54232	0,819	8,217	69642	1,104	8,989	122792	2,086	8,182	86945	1,424	
8,231	55482	0,842	8,203	68142	1,076	8,942	121792	2,068	8,232	87897	1,441	
X	8,220	54985,75	0,833	8,232	68624	1,085	8,963	122311,75	2,077	8,181	87226,5	1,429

C.1.5 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte I)

Trigo Testigo 1			Trigo Testigo 2			<i>Trametes 1 (30)</i>			<i>Trametes 2 (30)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,713	92839	0,666	13,942	94545	0,670	13,769	675672	2,996	13,753	770954	3,376	
13,700	93273	0,667	13,847	93893	0,670	13,802	676782	2,990	13,814	770483	3,370	
13,917	93403	0,667	13,201	93642	0,668	13,892	675032	2,993	13,742	770532	3,381	
13,923	92697	0,661	13,132	94542	0,670	13,752	676972	2,991	13,734	770742	3,379	
X	13,813	93053	0,665	13,531	94155,5	0,669	13,804	676114,5	2,998	13,761	770677,75	3,377

C.1.6 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte II)

<i>Ganoderma 1 (30)</i>			<i>Ganoderma 2 (30)</i>			<i>Postia 1 (45)</i>			<i>Postia 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,55	192576	1,063	13,907	312425	1,542	13,533	138506	0,846	13,450	115402	0,754	
13,642	193732	1,068	13,547	313418	1,544	13,513	137742	0,844	13,374	116478	0,759	
13,742	192852	1,064	13,836	312942	1,542	13,412	137642	0,844	13,354	115452	0,754	
13,532	193042	1,065	13,748	312532	1,541	13,642	138042	0,846	13,267	116876	0,762	
X	13,617	193050,5	1,065	13,756	312829,25	1,544	13,525	137983	0,844	13,361	116052	0,757

C.1.7 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte I)

Trigo Testigo 1			Trigo Testigo 2			<i>Trametes</i> 1 (30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,033	38133	0,521	8,142	37743	0,514	8,433	59140	0,910	8,044	68749	1,087	
8,243	39842	0,553	8,742	38953	0,537	8,442	60792	0,940	8,052	67462	1,064	
8,223	38342	0,525	8,232	38842	0,535	8,041	60042	0,926	8,081	67942	1,072	
8,172	39789	0,552	8,342	37642	0,512	8,231	59842	0,923	8,032	68512	1,083	
X	8,168	39026,5	0,538	8,365	38295	0,524	8,287	59954	0,925	8,053	68166,25	1,077

C.1.8 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte II)

<i>Ganoderma 1 (30)</i>			<i>Ganoderma 2 (30)</i>			<i>Postia 1 (45)</i>			<i>Postia 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,014	51555	0,770	8,183	57807	0,885	8,247	42357	0,600	8,432	40486	0,565	
8,052	52142	0,780	8,95	56487	0,861	8,352	41892	0,591	8,321	39794	0,552	
8,142	51832	0,775	8,145	57942	0,888	8,232	42142	0,596	8,345	40569	0,566	
8,132	52542	0,788	8,232	56532	0,862	8,051	41042	0,575	8,456	40978	0,574	
X	8,085	52017,75	0,778	8,378	57192	0,874	8,221	41858,25	0,590	8,389	40456,75	0,564

C.1.9 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lengua. (Parte I)

Lengua Testigo 1			Lengua Testigo 2			<i>Ganoderma</i> 1 (30)			<i>Ganoderma</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,483	108893	0,728	13,933	109915	0,733	13,734	454519	2,110	13,631	739301	3,251	
13,100	108680	0,726	13,857	110598	0,735	13,774	455131	2,111	13,651	738531	3,248	
13,232	109954	0,732	13,103	109873	0,733	13,852	454443	2,109	13,742	739673	3,252	
13,267	109143	0,729	13,232	110124	0,734	13,789	455542	2,114	13,752	738848	3,249	
X	13,271	109167,5	0,729	13,531	110127,5	0,733	13,787	454908,75	2,113	13,694	739088,25	3,250

C.1.10 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lengua. (Parte II)

<i>Peniophoca</i> 1 (45)			<i>Peniophoca</i> 2 (45)			<i>Ganoderma</i> 1 (45)			<i>Ganoderma</i> 2 (45)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,613	874710	3,798	13,607	996706	4,273	13,076	1006870	4,324	13,350	1143833	4,869	
13,874	865001	3,750	13,912	985680	4,234	13,032	1005692	4,316	13,433	1144732	4,872	
13,752	875342	3,789	13,952	996532	4,262	13,047	1006745	4,323	13,432	1143423	4,867	
13,932	864942	3,759	13,542	986682	4,273	13,052	1005896	4,315	13,432	1144564	4,872	
X	13,793	869998,75	3,774	13,754	991400	4,260	13,052	1006300,75	4,320	13,412	1144138	4,871

C.1.11 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte I)

Lengua Testigo 1			Lengua Testigo 2			<i>Ganoderma</i> 1 (30)			<i>Ganoderma</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,150	38246	0,524	8,333	37270	0,506	8,170	44794	0,645	8,036	48823	0,719	
8,369	38442	0,527	8,257	38854	0,535	8,142	45245	0,653	8,052	49421	0,730	
8,252	37354	0,507	8,478	38124	0,521	8,145	45532	0,658	8,048	49743	0,736	
8,667	37280	0,506	8,579	37578	0,511	8,243	45452	0,657	8,032	48373	0,711	
X	8,360	37830,5	0,516	8,412	37956,5	0,518	8,175	45255,75	0,653	8,042	49090	0,724

C.1.12 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte II)

<i>Peniophoca 1 (45)</i>			<i>Peniophoca 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,152	56242	0,856	8,936	66114	1,039	8,398	101931	1,701	8,624	164455	2,856	
8,136	57712	0,883	8,214	66011	1,037	8,478	102542	1,712	8,456	164137	2,850	
8,142	57402	0,878	8,224	65897	1,035	8,442	101695	1,696	8,342	163642	2,841	
8,152	57387	0,877	8,254	65678	1,031	8,207	102247	1,706	8,213	164452	2,856	
X	8,146	57185,75	0,874	8,407	65925	1,035	8,381	102103,75	1,704	8,409	164171,5	2,851

C.1.13 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte I)

Eucalipto Testigo 1			Eucalipto Testigo 2			<i>Stereum</i> 1 (30)			<i>Stereum</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,650	163960	0,948	13,800	163503	0,948	13,653	621135	2,782	13,573	464189	2,152	
13,752	163163	0,946	13,817	164172	0,950	13,748	622951	2,785	13,467	465342	2,155	
13,823	162234	0,942	13,852	164642	0,951	13,745	622893	2,785	13,587	464657	2,153	
13,732	162034	0,942	13,845	163425	0,947	13,815	622792	2,782	13,567	465554	2,155	
X	13,739	162847,75	0,944	13,829	163935,5	0,948	13,740	622442,75	2,783	13,549	464935,5	2,153

C.1.14 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte II)

<i>Stereum 1 (45)</i>			<i>Stereum 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,583	996823	4,282	13,786	1212534	5,154	13,781	858604	3,728	13,907	758082	3,322	
13,026	997887	4,287	13,752	1216142	5,156	13,852	857148	3,720	13,942	758412	3,324	
13,476	997678	4,286	13,792	1215683	5,155	13,849	857242	3,722	13,914	758842	3,333	
13,907	996547	4,281	13,481	1216548	5,158	13,452	857348	3,723	13,842	757602	3,325	
X	13,498	997233,75	4,283	13,703	1215226,75	5,156	13,734	857585,5	3,724	13,901	758234,5	3,327

C.1.15 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte I)

Eucalipto Testigo 1			Eucalipto Testigo 2			<i>Stereum</i> 1 (30)			<i>Stereum</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,033	55341	0,839	8,033	56521	0,861	8,233	65837	1,033	8,042	61492	0,953	
8,102	54732	0,828	8,117	55123	0,835	8,142	64552	1,010	8,054	62342	0,969	
8,042	55143	0,836	8,123	55742	0,847	8,052	64692	1,012	8,032	61675	0,957	
8,042	54042	0,815	9,137	56052	0,853	8,332	64743	1,013	8,045	62154	0,965	
X	8,055	54814,5	0,830	8,353	55859,5	0,849	8,190	64956	1,017	8,043	61915,75	0,961

C.1.16 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte II)

<i>Stereum 1 (45)</i>			<i>Stereum 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,016	145855	2,512	8,231	153710	2,658	8,103	93443	1,544	8,179	77730	1,253	
8,292	144087	2,480	8,217	153480	2,653	8,142	94842	1,570	8,153	76452	1,230	
8,233	145512	2,506	8,242	154942	2,680	8,151	94782	1,568	8,182	77583	1,251	
8,214	144942	2,495	8,232	154789	2,677	8,131	94843	1,570	8,153	76242	1,226	
X	8,189	145099	2,498	8,231	154230,25	2,667	8,135	94477,5	1,563	8,167	77001,75	1,240

C.2 Contenido de azúcares en el proceso de sacarificación.

C.2.1 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte I)

Maíz Testigo 1			Maíz Testigo 2			<i>Trametes</i> 1 (30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,321	181564	1,019	13,765	184321	1,030	13,342	208654	1,127	13,241	267983	1,363	
13,453	182649	1,024	13,345	183245	1,026	13,465	209342	1,130	13,342	266876	1,359	
13,321	182687	1,024	13,564	184533	1,031	13,256	208765	1,128	13,238	266855	1,359	
13,456	181647	1,020	13,231	183564	1,027	13,435	209432	1,130	13,176	267674	1,362	
X	13,388	182136,75	1,022	13,476	183915,75	1,029	13,375	209048,25	1,129	13,249	267347	1,361

C.2.2 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de maíz. (Parte II)

<i>Auranteoporus 1</i> (30)			<i>Auranteoporus 2</i> (30)			<i>Pleorotus 1 (60)</i>			<i>Pleorotus 2 (60)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,231	376834	1,796	13,154	588675	2,649	13,342	1008534	4,330	13,253	975683	4,199	
13,356	378579	1,803	13,267	589634	2,653	13,347	1008972	4,332	13,152	976843	4,204	
13,109	377589	1,799	13,272	589654	2,653	13,213	1009872	4,336	13,106	975392	4,198	
13,231	378654	1,804	13,352	588795	2,650	13,452	1009865	4,335	13,234	965713	4,160	
X	13,232	377914	1,801	13,261	589189,5	2,651	13,339	1009310,75	4,333	13,186	973407,75	4,190

C.2.3 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte I)

Maíz Testigo 1			Maíz Testigo 2			<i>Trametes</i> 1 (30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,342	42456	0,601	8,102	44432	0,638	8,231	45674	0,661	8,089	47658	0,698	
8,543	43678	0,624	8,243	45643	0,6605	8,354	44893	0,646	8,156	48567	0,714	
8,123	43023	0,612	8,321	44897	0,646	8,453	45679	0,661	8,342	47598	0,696	
8,347	42789	0,608	8,121	45342	0,655	8,132	45078	0,650	8,269	48747	0,718	
X	8,339	42986,5	0,611	8,197	45078,5	0,650	8,293	45331	0,654	8,214	48142,5	0,707

C.2.4 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de maíz. (Parte II)

<i>Auranteoporus 1</i> (30)			<i>Auranteoporus 2</i> (30)			<i>Pleorotus 1</i> (60)			<i>Pleorotus 2</i> (60)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,176	60321	0,932	8,145	76598	1,232367346	8,173	135802	2,327	8,143	96745	1,605	
8,247	61123	0,946	8,243	75463	1,211390393	8,334	136430	2,338	8,032	97647	1,621	
8,253	60342	0,932	8,103	76843	1,236895411	8,467	135689	2,324	8,121	96874	1,607	
8,145	61453	0,952	8,234	76893	1,237819506	8,321	136438	2,338	8,032	97564	1,620	
X	8,205	60809,75	0,941	8,181	76449,25	1,230	8,324	136089,75	2,332	8,082	97207,5	1,613

C.2.5 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte I)

Trigo Testigo 1			Trigo Testigo 2			<i>Trametes</i> 1 (30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,453	103679	0,709	13,356	100876	0,698	13,346	744593	3,272	13,261	986742	4,241	
13,546	103568	0,709	13,254	100584	0,697	13,287	745321	3,276	13,163	987301	4,244	
13,213	104675	0,713	13,102	101327	0,700	13,186	744684	3,272	13,291	987001	4,244	
13,453	104865	0,714	13,432	101689	0,702	13,341	745012	3,274	13,295	986352	4,240	
X	13,416	104196,75	0,712	13,286	101119	0,699	13,290	744902,5	3,273	13,253	986849	4,242

C.2.6 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de trigo. (Parte II)

<i>Ganoderma 1 (30)</i>			<i>Ganoderma 1 (30)</i>			<i>Postia 1 (45)</i>			<i>Postia 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,231	227683	1,203	13,342	344786	1,673	13,231	152371	0,903	13,251	213562	1,147	
13,169	228423	1,206	13,241	345023	1,675	13,342	153532	0,907	13,213	214682	1,151	
13,253	227978	1,204	13,142	344796	1,670	13,251	152675	0,904	13,178	213673	1,147	
13,241	228423	1,206	13,235	345231	1,675	13,154	152689	0,904	13,186	214623	1,151	
X	13,224	228126,75	1,205	13,240	344959	1,673	13,245	152816,75	0,904	13,207	214135	1,149

C.2.7 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte I)

TrigoTestigo 1			TrigoTestigo 2			<i>Trametes</i> 1 (30)			<i>Trametes</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,176	41342	0,581	8,456	41543	0,584	8,243	66734	1,050	8,184	75893	1,219	
8,302	40654	0,568	8,342	41450	0,583	8,267	67523	1,065	8,275	76390	1,229	
8,201	41497	0,584	8,463	42547	0,603	8,165	66908	1,053	8,179	75693	1,216	
8,328	40383	0,563	8,254	42324	0,599	8,287	67984	1,073	8,263	76291	1,227	
X	8,252	40969	0,574	8,379	41966	0,592	8,241	67287,25	1,060	8,225	76066,75	1,223

C.2.8 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de trigo. (Parte II)

<i>Ganoderma 1 (30)</i>			<i>Ganoderma 2 (30)</i>			<i>Postia 1 (45)</i>			<i>Postia 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,111	58987	0,9078	8,043	63585	0,992	8,143	46784	0,681	8,254	45496	0,658	
8,275	58685	0,901	8,142	64612	1,011	8,201	45765	0,663	8,158	46152	0,670	
8,099	59078	0,909	8,231	63897	0,998	8,165	46231	0,671	8,274	46553	0,6771	
8,133	59712	0,920	8,083	64362	1,006	8,279	45789	0,663	8,271	45286	0,654	
X	8,155	59115,5	0,909	8,125	64114	1,002	8,197	46142,25	0,669	8,239	45871,75	0,664

C.2.9 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lengua. (Parte I)

Lengua Testigo 1			Lengua Testigo 2			<i>Ganoderma</i> 1 (30)			<i>Ganoderma</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,231	118893	0,767	13,348	119765	0,772	13,244	501432	2,299	13,342	813678	3,549	
13,342	118680	0,765	13,265	120652	0,776	13,154	500675	2,294	13,269	814032	3,552	
13,432	119954	0,772	13,532	119564	0,771	13,327	501245	2,298	13,287	813682	3,549	
13,289	119143	0,770	13,165	120374	0,775	13,245	500342	2,295	13,142	814621	3,553	
X	13,324	119167,5	0,769	13,328	120088,75	0,773	13,243	500923,50	2,297	13,260	814003,25	3,550

C.2.10 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de Lengua. (Parte II)

<i>Peniophoca 1 (45)</i>			<i>Peniophoca 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_r [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_r [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_r [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_r [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,241	958793	4,130	13,245	1097893	4,678	13,231	1106665	4,721	13,213	1259678	5,330	
13,169	959463	4,133	13,152	1088945	4,665	13,347	1107854	4,725	13,163	1260563	5,337	
13,201	958453	4,128	13,157	1096453	4,674	13,165	1107823	4,725	13,269	1267543	5,342	
13,327	959231	4,131	13,153	1098765	4,684	13,341	1106043	4,720	13,145	1256548	5,327	
X	13,235	958985	4,130	13,177	1095514	4,677	13,271	1107096,25	4,723	13,198	1261083	5,339

C.2.11 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte I)

Lengua Testigo 1			Lengua Testigo 2			<i>Ganoderma</i> 1 (30)			<i>Ganoderma</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,234	41253	0,579	8,179	42432	0,601	8,067	49765	0,736	8,123	54345	0,821	
8,123	40214	0,560	8,262	41453	0,583	8,157	50345	0,747	8,152	55012	0,833	
8,342	40537	0,566	8,286	42765	0,607	8,321	49786	0,737	8,231	54689	0,827	
8,0124	41456	0,583	8,264	41647	0,586	8,231	50341	0,747	8,342	55231	0,837	
X	8,178	40865	0,572	8,248	42074,25	0,594	8,194	50059,25	0,742	8,212	54819,25	0,830

C.2.12 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de Lengua. (Parte II)

<i>Peniophoca 1 (45)</i>			<i>Peniophoca 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,078	63845	0,997	8,432	73789	1,180	8,239	113587	1,916	8,234	192786	3,380	
8,254	64892	1,016	8,214	74012	1,185	8,138	112481	1,896	8,153	193543	3,394	
8,362	64908	1,016	8,367	73796	1,181	8,312	113452	1,913	8,265	193743	3,397	
8,241	63845	0,997	8,189	74389	1,192	8,287	112394	1,894	8,321	192453	3,374	
X	8,234	64372,5	1,006	8,301	73996,5	1,184	8,244	112978,5	1,905	8,243	193131,25	3,386

C.2.13 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte I)

Eucalipto Testigo 1			Eucalipto Testigo 2			<i>Stereum</i> 1 (30)			<i>Stereum</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,471	195634	1,075	13,162	196345	1,078	13,472	685987	3,039	13,463	513675	2,348	
13,236	194665	1,072	13,245	195987	1,077	13,389	686723	3,036	13,367	514675	2,352	
13,351	194534	1,071	13,478	196023	1,077	13,456	685674	3,037	13,476	514567	2,352	
13,264	195234	1,074	13,534	195786	1,076	13,372	686456	3,042	13,367	513683	2,348	
X	13,331	195016,75	1,073	13,355	196035,25	1,077	13,422	686210	3,039	13,418	514150	2,350

C.2.14 Datos del contenido de Glucosa en las muestras de eucalipto. (Parte II)

<i>Stereum 1 (45)</i>			<i>Stereum 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
13,246	1097675	4,685	13,146	1336784	5,649	13,463	944478	4,073	13,467	835789	3,636	
13,453	1098537	4,688	13,345	1347892	5,681	13,834	945673	4,077	13,351	836302	3,640	
13,234	1098567	4,688	13,287	1348721	5,684	13,856	945734	4,078	13,534	836321	3,640	
13,432	1097850	4,686	13,296	1339088	5,656	13,431	944632	4,074	13,235	835782	3,636	
X	13,341	1098157,25	4,687	13,269	1343121,25	5,668	13,646	945129,25	4,075	13,397	836048,5	3,638

C.2.15 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte I)

Eucalipto Testigo 1			Eucalipto Testigo 2			<i>Stereum</i> 1 (30)			<i>Stereum</i> 2 (30)			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,462	59895	0,924	8,321	58385	0,896	8,154	72567	1,157866819	8,127	69784	1,106	
8,562	60675	0,938	8,303	59738	0,921	8,267	73245	1,170397546	8,152	70543	1,120	
8,178	59681	0,920	8,012	59657	0,919	8,197	72894	1,1639104	8,231	69782	1,106	
8,256	60781	0,940	8,367	58763	0,903	8,231	73245	1,170397546	8,275	70572	1,121	
X	8,365	60258	0,930	8,251	59135,75	0,910	8,212	72987,75	1,166	8,196	70170,25	1,114

C.2.16 Datos del contenido de Xilosa en las muestras de eucalipto. (Parte II)

<i>Stereum 1 (45)</i>			<i>Stereum 2 (45)</i>			<i>Ganoderma 1 (45)</i>			<i>Ganoderma 2 (45)</i>			
t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	t_R [min]	Área	Concentración [mg/mL]	
8,143	160563	2,784	8,154	192683	3,378	8,256	104783	1,753	8,231	86583	1,417	
8,154	161201	2,796	8,298	193743	3,397	8,165	105673	1,770	8,134	87341	1,431	
8,256	160563	2,784	8,154	192573	3,376	8,203	104673	1,751	8,254	86908	1,423	
8,265	161435	2,800	8,098	193672	3,396	8,342	105672	1,770	8,234	87593	1,436	
X	8,205	160940,5	2,791	8,176	193167,75	3,387	8,242	105200,25	1,761	8,213	87106,25	1,427

D.1 Rendimiento Teórico de etanol en los distintos procesos estudiados en los diferentes sustratos.

D.1.1 Resumen del rendimiento teórico de etanol en muestras de maíz.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Maíz testigo	0	282,04	10,63
<i>Trametes versicolor</i> 1	30	305,62	11,31
<i>Trametes versicolor</i> 2	30	347,25	13,42
<i>Aurantioporus albidus</i> 1	30	475,03	17,02
<i>Aurantioporus albidus</i> 2	30	664,22	24,33
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1	60	1024,75	42,75
<i>P. ostreatus</i> 2	60	884,20	36,57

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

D.1.2 Resumen del rendimiento teórico de etanol en muestras de trigo.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Trigo Testigo	0	223,59	8,01
<i>Trametes versicolor</i> 1	30	749,98	28,03
<i>Trametes versicolor</i> 2	30	849,37	33,49
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	30	344,48	13,34
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	30	456,68	16,20
<i>Postia placenta</i> 1	45	268,94	9,80
<i>Postia placenta</i> 2	45	247,16	11,54

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

D.1.3 Resumen del rendimiento teórico de etanol en muestras de Lengua.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Lengua testigo	0	233,24	8,37
<i>Ganoderma applanatum</i> 1	30	519,64	19,38
<i>Ganoderma applanatum</i> 2	30	755,47	27,24
<i>Peniophora gigante</i> 1	45	884,20	33,83
<i>Peniophora gigante</i> 2	45	1013,18	38,56
<i>G. applanatum</i> 1	45	1116,60	41,62
<i>G. applanatum</i> 2	45	1455,55	53,59

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).

D.1.4 Resumen de contenido etanol teórico en muestras de eucalipto.

Muestras	Tiempo de Incubación [días]	Rendimiento Teórico Total ¹ [L/ton]	Rendimiento Teórico Total ² [L/ton]
Eucalipto testigo	0	336,61	12,42
<i>Stereum hirsutum</i> 1	30	717,85	26,71
<i>Stereum hirsutum</i> 2	30	587,98	22,02
<i>Stereum hirsutum</i> 1	45	1291,81	46,48
<i>Stereum hirsutum</i> 2	45	1497,67	55,55
<i>G. applanatum</i> 1	45	1007,58	35,99
<i>G. applanatum</i> 2	45	877,29	31,45

Rendimiento Teórico Total¹: Por proceso hidrólisis ácida (glucosa+xilosa).

Rendimiento Teórico Total²: Por proceso hidrólisis enzimática (glucosa+xilosa).