

U N I V E R S I D A D D E C O N C E P C I O N
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
Departamento Silvicultura

DETERMINACION DEL CONTENIDO LIGNOCELULOSICO DE *SALIX*
VIMINALIS PARA PRODUCCION DE BIOENERGIA



MEMORIA PARA OPTAR
AL TITULO DE
INGENIERO FORESTAL

CONCEPCION - CHILE

1998

DETERMINACION DEL CONTENIDO LIGNOCELULOSICO PRESENTE EN
SALIX VIMINALIS PARA PRODUCCION DE BIOENERGIA

Profesor Asesor	<p>Sara Gnecco Donoso ----- Profesora Asociada; Licenciada en Química; Dra. en Ciencias Químicas</p>
Profesor Asesor	<p>Jaime Rodríguez Gutiérrez ----- Profesor Asistente; Químico; Dr. en Química</p>
Director Departamento Silvicultura	<p>Eduardo Peña Fernández ----- Profesor Asistente; Ingeniero Forestal; M.Sc.</p>
Decano Facultad de Ciencias Forestales	<p>Jaime García Sandoval ----- Profesor Asociado; Ingeniero Forestal</p>

Calificación de la memoria de título :

Sara Gnecco Donoso	: Ochenta y ocho
Jaime Rodríguez Gutiérrez	: Ochenta y ocho



Dedicado a:

- Mis padres que siempre me dieron lo mejor y se esmeraron en motivarme a ser un buen estudiante.
- A mis hermanos.
- A mis amigos.
- En forma muy especial a Marisol y a nuestra hija Consuelo.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de mis compañeros de laboratorio, donde encontré un constante apoyo para desarrollar mi Tesis. Por lo tanto quiero agradecer de todo corazón la ayuda recibida.

- A mis profesores asesores Dra. Sara Gnecco por su constante apoyo y tiempo invertido en la realización de este trabajo y al Dr. Jaime Rodríguez, por todas las facilidades entregadas para el trabajo en laboratorio.
- Marta Abalos, INFOR por proporcionar gentilmente las muestras para los análisis.
- Dra. Juanita Freer y Dr. Hector Mansilla; por sus consejos y asesoría en los experimentos.
- A Irina, Paola, Samuel, Cristina, Carola, Yanina, Mauricio, Sussy, Elizabeth y Jessica.
- En forma muy especial a Susana Flores y Anita Mutis, gracias por dedicarme tiempo realmente importante para ustedes.

A todas las personas que hicieron posible este trabajo.

Muchas Gracias.

INDICE DE MATERIAS

CAPITULOS		PAGINA
I	INTRODUCCION.....	1
	1.1 Problemática energética.....	1
	1.2 Fuentes de biomasa.....	2
	1.3 Preocupación ambiental.....	2
	1.4 Disponibilidad de tierras.....	3
	1.5 Ventajas y desventajas de la biomasa como combustible.....	3
	1.6 Conversión de biomasa a combustible.	4
	1.7 Composición química de la madera....	6
	1.7.1 Celulosa.....	6
	1.7.2 Poliosas o hemicelulosas.....	8
	1.7.3 Lignina.....	8
	1.8 Producción de hidrolizados lignocelulósicos.....	9
	1.9 Fermentación de hidrolizados.....	10
	1.9.1 Compuestos inhibidores.....	10
	1.9.2 Fermentación de pentosas.....	11
	1.10 Utilización de <i>Salix viminalis</i> como fuente de energía.....	11
	1.10.1 Características botánicas de <i>Salix viminalis</i>	13
	1.10.2 Hábitat.....	13
	1.10.3 Descripción.....	13
	1.11 Objetivos.....	14
II	MATERIALES Y METODOS.....	15
	2.1 Antecedentes generales.....	15
	2.1.1 Lugar de ensayo.....	15

2.1.2	Obtención de muestras.....	15
2.1.3	Diseño experimental.....	15
2.2	Descripción del estudio.....	16
2.2.1	Preparación.....	16
2.2.2	Método de extracción de madera....	16
2.3	Metodología empleada.....	16
2.3.1	hidrólisis de la madera.....	16
2.3.2	Determinación del material celulósico.....	18
2.3.3	Análisis de azúcares.....	19
a)	Determinación de glucosa y xilanos...	20
b)	Determinación individual de hexosas y pentosas.....	20
2.3.4	Análisis por Cromatografía gaseosa acoplado a espectrómetro de masa (CG/MS).....	22
2.4	Fermentación de los hidrolizados....	23
2.4.1	Análisis de la fermentación.....	24
III	RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
3.1	Material lignocelulósico.....	25
3.1.1	Lignina.....	25
3.1.2	Celulosa.....	28
3.1.3	Hemicelulosa.....	29
3.2	Cuantificación de azúcares.....	29
3.2.1	Glucosa mas xilanos.....	29
3.2.2	Cuantificación individual de azúcares.....	31
3.3	Aporte individual de azúcares al contenido total.....	32
3.4	Compuestos secundarios formados por	

	la hidrólisis ácida.....	34
	3.5 Fermentación de los hidrolizados....	36
	3.5.1 Rendimientos de etanol.....	36
	3.5.2 Eficiencia de la fermentación.....	38
IV	CONCLUSIONES.....	40
	4.1 Proyecciones.....	42
V	RESUMEN.....	43
	SUMMARY.....	45
VI	BIBLIOGRAFIA.....	47
VII	APENDICES.....	53



INDICE DE TABLAS

TABLA N°		
<u>En</u>	<u>el</u>	
<u>texto</u>		
1	Ventajas y desventajas del uso de la biomasa como combustible.....	4
2	Origen y época de recolección de las muestras de <i>S.viminalis</i>	15
3	Condiciones empleadas para las hidrólisis sucesivas de las 4 procedencias de <i>S.viminalis</i>	17
4	Condiciones de fermentación para los azúcares hidrolizados de la madera de procedencia Concepción, <i>Salix viminalis</i> .	23
5	Cantidad de materiales lignocelulósicos presentes en <i>Salix viminalis</i> según procedencia.....	25
6	Rendimiento de la hidrólisis ácida en las muestras de <i>Salix viminalis</i>	34
7	Compuestos orgánicos encontrados en el mosto proveniente de la hidrólisis ácida de la Madera y la Corteza.....	35
8	Condiciones utilizadas y etanol obtenido en la fermentación de hidrolizados de la madera de procedencia concepción, en <i>Salix viminalis</i>	37
9	Porcentaje de azúcares reductores totales (ART) fermentables que fueron convertidos en etanol.....	38

En elapéndice

1A	Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87H) en madera de <i>S.viminalis</i>	53
2A	Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87H) en corteza de <i>S.viminalis</i>	53
3A	Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87P) en madera de <i>S.viminalis</i>	54
4A	Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87P) en corteza de <i>S.viminalis</i>	54
5A	Media y desviación estándar para las muestras de la madera y corteza libre de extraíbles en base seca, de <i>Salix viminalis</i> en todas las procedencias.....	57

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		
<u>En</u>	<u>el</u>	
<u>texto</u>		
1	Tipos de procesos de conversión de biomasa y sus productos finales.....	5
2	Fórmula de Haworth para la celulosa.....	7
3	Diagrama de flujo del proceso de extracción e hidrólisis sucesivas de <i>S.viminalis</i>	18
4	Metodología utilizada para el análisis de celulosa en madera y corteza de <i>S.viminalis</i>	19
5	Cantidad de lignina soluble presente en madera y corteza de <i>S.viminalis</i> según procedencia.....	26
6	Cantidad de lignina Klason presente en <i>S.Viminalis</i> según procedencia.....	27
7	Contenido de Celulosa presente en <i>S.viminalis</i> según procedencia.....	28
8	Contenido de hemicelulosa presente en <i>S.viminalis</i> según procedencia.....	29
9	Cantidad de glucosa obtenidos en hidrolizados de <i>S.viminalis</i> según procedencia.....	30
10	Contenido de xilanos obtenidos en hidrolizados de <i>S.viminalis</i> según procedencia.....	31
11	Contenido de azúcares reductores (ART) totales en hidrolizados de madera y	

	corteza de <i>S.viminalis</i> de procedencia Concepción.....	32
12	Aporte de cada azúcar en forma individual al contenido de pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa, galactosa y manosa).....	33
<u>En el</u>		
<u>apéndice</u>		
1A	Cromatograma de madera en HPLC (HPX-87H) de <i>S.viminalis</i> procedencia Concepción; con los respectivos tiempos de retención para cada azúcar.....	53
2A	Cromatograma de hidrolizados de la corteza en de <i>S.viminalis</i> procedencia Concepción; con los respectivos tiempos de retención para cada azúcar.....	54
3A	Cromatograma de hidrolizados de madera de <i>S.viminalis</i> procedencia Concepción; con los respectivos tiempos de retención para cada azúcar.....	55
4A	Cromatograma de hidrolizados de corteza de <i>S.viminalis</i> procedencia Concepción; con los respectivos tiempos de retención para cada azúcar.....	55
5A	Cromatograma de gases acoplado a espectrómetro de masas, de hidrolizados de madera de <i>S.viminalis</i> , procedencia Concepción.....	56
6A	Cromatograma de gases acoplado a espectrómetro de masas, de hidrolizados	

de corteza de *S.viminalis*, procedencia
Concepción 56



I INTRODUCCION

1.1 Problemática energética

A medida que la población va creciendo, los recursos se hacen cada vez más escasos y los carburantes no escapan a esta realidad. Dentro de ellos, los combustibles fósiles, pilar de la economía mundial, se encuentran en franca extinción. Se estima que dentro de 50 años los combustibles fósiles del planeta desaparecerán, por ello es imprescindible encontrar sustitutos para éstos.

La biomasa es una fuente de energía renovable, con un gran potencial, económicamente viable, que entrega además beneficios sociales y ambientales. La obtención de energía renovable a partir de biomasa, se vislumbra como una de las alternativas más factibles en un futuro cercano, se considera que ésta fuente podría suplir el 10% de la demanda mundial por energía (Zerbe 1991). La participación de esta fuente en la contribución energética es actualmente importante en países desarrollados tales como Finlandia (18%), Suecia (16%), Austria (10%) y USA (4%) (Hall y House 1995).

En Chile aproximadamente el 90% del petróleo que se consume debe importarse, lo que significa un importante gasto de divisas. Por otra parte nuestro país posee características favorables para desarrollar en el futuro la biomasa como fuente energética: grandes áreas de terrenos no utilizados en agricultura convencional, baja densidad poblacional, recursos tecnológicos adecuados y

existencia de especies vegetales con potencial para ser utilizadas como fuentes de energía renovable (Gnecco 1990). Así, es importante seleccionar las especies vegetales con mayor potencial, estudiar sus características químicas y botánicas e implementar las tecnologías que permitan la comercialización de los distintos tipos de energía que ellas generan.

1.2 Fuentes de biomasa

Dentro de las fuentes más adecuadas de biomasa, se cuentan a la agricultura y forestería, que además podrían proporcionar residuos. Por otro lado, utilizando estos desechos se llegaría a una sustentabilidad ambiental. Hipotéticamente el uso de los residuos como fuente de energía podría cubrir el 7% de los requerimientos de la tierra (Hall et al. 1993), lo que se podría llevar a cabo con plantaciones sometidas a mejoramiento.

Para analizar las implicaciones que tiene el uso de la fuente de biomasa elegida, es necesario analizar puntos claves para el desarrollo de ella: 1) Los mercados que se pueden abastecer de este biocombustible; 2) La contribución que genera a la agricultura; 3) Las barreras económicas y el rol de la tecnología en la reducción de ellas; 4) Los efectos ambientales de los cultivos energéticos (Downing et al. 1995).

1.3 Preocupación ambiental

Al implementar grandes plantaciones para bioenergía la preocupación ambiental se debe focalizar en el uso de

monocultivos. Si bien es cierto que éstos son más productivos, las plantaciones con especies mixtas tienen más diversidad biológica, causan menor erosión y requieren menor cantidad de pesticidas y fertilizantes (White y Plaskett 1981).

Es así, como los problemas ambientales son los principales obstáculos percibidos en la implementación de cultivos energéticos, debido a la necesidad de utilizar agroquímicos a gran escala, disponibilidad de tierras y pérdidas de suelo. Sin embargo, estas alcanzan tasas mas altas en cultivos anuales, en comparación a cultivos perennes (Shifflet y Darby 1985).

1.4 Disponibilidad de tierras

La disponibilidad de tierras podría llegar a ser una restricción importante para la producción de biomasa a gran escala. Sin embargo, dada la condición de nuestro país, existen grandes cantidades de tierras degradadas o deforestadas, con un alto potencial y bajo uso. La generación de políticas de desarrollo de áreas rurales, sobre todo con especies de rápido crecimiento, traería como consecuencia una demanda de mano de obra, generaría empleos y frenaría la migración rural-urbana.

1.5 Ventajas y desventajas de la biomasa como combustible

Aparte del rol social que podrían cumplir las plantaciones con fines energéticos, contribuirían a disminuir el efecto de calentamiento global que está sufriendo el planeta. Los proyectos de producción de

biomasa a gran escala reducen la deforestación, ayudan a limpiar la atmósfera y llevan a una posterior reforestación de otras áreas, con la misma u otras especies. Por lo demás, la liberación de carbono por parte de la biomasa se compensa totalmente con lo que absorbe (Hall y House 1993; Wyman y Goodman 1993). A continuación en la Tabla 1 se muestra una comparación de ventajas y desventajas de uso de la biomasa como combustible.

Tabla 1: Ventajas y desventajas del uso de la biomasa como combustible (White y Plaskett 1981).

Ventajas	Desventajas
No incrementa CO ₂ en la atmósfera	Contenido térmico moderado.
Materia prima fácil de obtener y a Precio relativamente bajo.	Alto contenido de humedad, causando pérdidas de energía
Procesos de conversión biológica conservan el componente nitrogenado del suelo.	Baja densidad, debe manejarse en grandes volúmenes.

1.6 Conversión de biomasa a combustibles

Existen diversas tecnologías para aumentar la eficiencia de conversión de materia orgánica, en este caso biomasa, a combustibles de alto valor comercial. Se han implementado métodos para convertir la biomasa mediante procesos termoquímicos, para obtener energía calórica carbón y gas ó mediante procesos bioquímicos para la

obtención de compuestos de bajo peso molecular tales como metano y etanol (Ver figura 1).

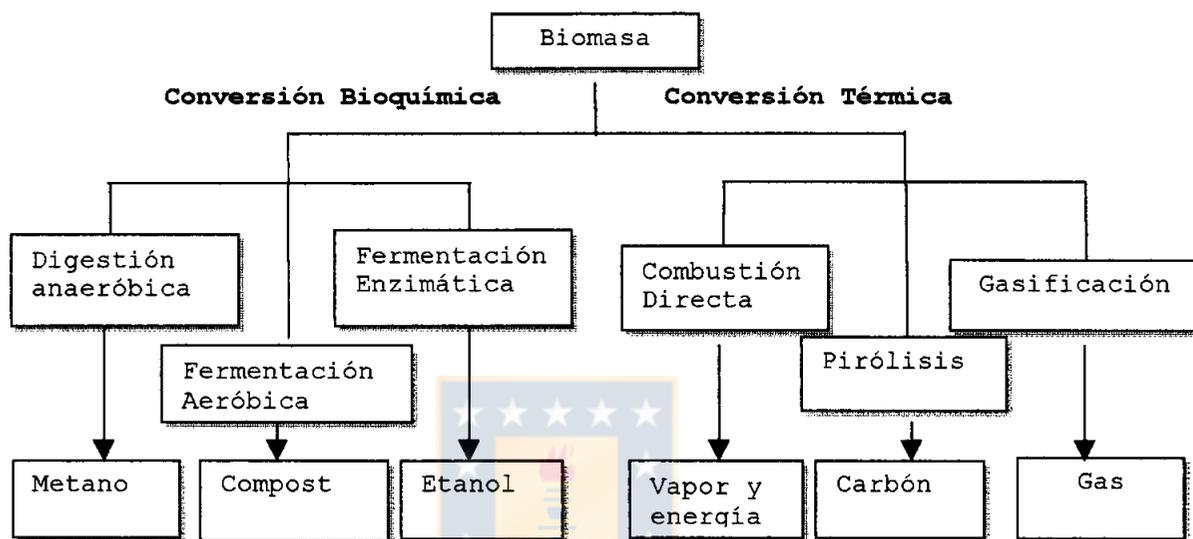


Fig. 1: Tipos de procesos de Conversión de Biomasa y sus productos finales. (Hall y House 1995).

Existe en el mundo gran interés en el uso de etanol como sustituto para derivados del petróleo, tales como la gasolina y diesel. La utilización de etanol en mezcla con gasolina mejora la combustión y reduce las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos, que contribuyen a la formación de ozono y smog (Wyman y Golden 1995). La producción anual de etanol en Estados Unidos alcanza a 1.426 millones de galones por año, de los cuales 1.235 millones son producidos a partir de biomasa (Gist-Brocades 1995).

El etanol puede ser producido desde diferentes tipos de recursos renovables: materiales que contienen azúcares (azúcar de remolacha, caña de azúcar, almidón, papas, maíz, etc.), materiales lignocelulósicos como madera, papel de desecho y cultivos energéticos de rápido crecimiento (Von Sivers et al. 1994). Para obtener etanol es necesario primero realizar una hidrólisis de la madera y luego llevar a cabo una fermentación con microorganismos específicos (Hahn-Hagerdal et al. 1988).

Con el fin de seleccionar los métodos de conversión adecuados para cada tipo de biomasa es imprescindible conocer detalladamente su composición química, ya que la eficiencia de la conversión depende tanto del método utilizado como de la composición del material inicial.

1.7 Composición química de la madera

Los componentes principales de la madera son la celulosa, hemicelulosa y lignina, la proporción de ellas varía según se trate de maderas duras o maderas blandas (Fengel 1989).

1.7.1 Celulosa

La celulosa es un polímero de la glucosa, el cual es formado a partir del dióxido de carbono, el agua y la energía solar a través de la reacción:



La celulosa consiste en una cadena larga de núcleos glucopiranosícos unidos a través de sus carbonos 1 y 4, con enlaces betaglucosídicos, los grupos están invertidos alternadamente para adoptar la posición geométrica que hace posible el enlace, en la forma general de la figura 2.

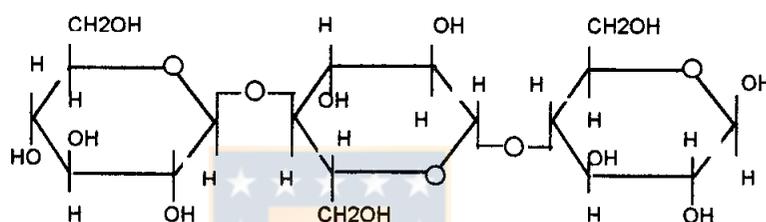


Figura 2: Fórmula de Haworth para la celulosa (Melo 1993).

Las cadenas celulósicas se agrupan formando filamentos, que se unen por los extremos con un cierto traslapeo y se reagrupan formando cordones. En estos cordones se observan zonas cristalinas y amorfas alternadas, que tiene importancia para explicar el comportamiento de la pared celular frente al ataque de reactivos químicos. Se ha encontrado que la zona amorfa es más susceptible de romperse, produciéndose así la destrucción por depolimerización de las cadenas. En las zonas cristalinas las cadenas celulósicas han tomado un ordenamiento perfectamente paralelo, mientras que en las zonas amorfas este ordenamiento se pierde totalmente (Melo 1993). Entre

las reacciones químicas más importantes de la celulosa se cuenta la hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, eterificación y esterificación.

1.7.2 Poliosas o hemicelulosa

En conjunto con la celulosa, en la madera encontramos otros polisacáridos llamados poliosas o hemicelulosa, nombre que fue usado por E.Schulze en 1891 pensando que eran precursores de la celulosa (Melo 1993). A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa está formada por varios azúcares, con cadenas mucho más cortas y ramificadas.

Las unidades que forman las poliosas se pueden dividir en deoxihexosas, ácidos hexurónicos, hexosas y pentosas, siendo estas últimas el mayor problema encontrado en la fermentación de materiales lignocelulósicos (Hahn-Hagerdal et al. 1991).

Dentro de los azúcares principales que encontramos en la hemicelulosa se cuentan la xilosa, glucosa, ácido glucurónico y fucosa que corresponden a pentosas, hexosas, ácidos hexurónicos y deoxihexosas respectivamente.

1.7.3 Lignina

Junto a la celulosa es la sustancia polimérica más importante en las plantas. La lignina aumenta la robustez de los árboles, ya que está presente en la pared celular de ellos. Es un componente químico de los tejidos de las plantas superiores, Gimnospermas y Angiospermas,

apareciendo en el tejido vascular especializado en el transporte de líquidos y en la resistencia mecánica.

La cantidad de lignina presente en las diferentes plantas es muy variable, sus límites están entre un 20 y 30 %, pudiendo ser superior. Su distribución en la pared celular y el contenido en las diferentes partes del árbol no es uniforme. Por ejemplo, se encuentran altos contenidos en la parte inferior, superior y central de fuste. En la mayoría de los casos de utilización de madera, la lignina se usa como parte integrante de ella; solamente en el caso de pulpaje, blanqueo y fermentación es retirada de la madera y representa un potencial enorme de carbón para síntesis y energía (Melo 1993).

1.8 Producción de hidrolizados lignocelulósicos

La producción de hidrolizados lignocelulósicos a menudo requiere de 2 pasos; primero una prehidrólisis, en que la estructura de la hemicelulosa es rota y segundo una hidrólisis de la fracción de celulosa, en que sólo la lignina quedará como producto sólido. Durante la degradación de la estructura lignocelulósica, no sólo los azúcares fermentables son liberados, sino un amplio rango de compuestos secundarios, algunos de los que pueden comportarse como inhibidores de microorganismos de fermentación (Paszner 1992; Olsson y Hahn-Hagerdal 1996).

El proceso de prehidrólisis puede llevarse a cabo por métodos físicos, químicos o biológicos, como pretratamiento de vapor, tratamiento con ácidos (ácido

hidroclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, dióxido de azufre), tratamiento alcalino (hidróxido de sodio, amonio), tratamientos con solventes orgánicos (etanol, etilen-glicol) o tratamiento con hongos de pudrición blanca. Usualmente la hidrólisis de la celulosa es llevada a cabo por ácidos débiles o enzimas (Olsson y Hahn-Hagerdal 1996).

1.9 Fermentación de los hidrolizados

La fermentación de los hidrolizados consiste en transformar los azúcares en alcohol. Para desarrollar este proceso se deben considerar aspectos tan importantes como las propiedades cinéticas de crecimiento del microorganismo, además de los aspectos económicos del proceso.

Como los hidrolizados contienen diversos tipos de monosacáridos, el co-cultivo de dos microorganismos ha sido sugerido ya que un microorganismo no puede fermentar todos los substratos óptimamente. Para la fermentación, dos aspectos deben ser considerados: la presencia de inhibidores y la fermentación de las pentosas (Olsson y Hahn-Haegerdal 1996).

1.9.1 Compuestos inhibidores

La cantidad y naturaleza de compuestos inhibidores, depende de la materia prima, los métodos de prehidrólisis e hidrólisis y de la extensión de la recirculación del proceso. Los inhibidores pueden ser: compuestos liberados durante el pretratamiento (ej: ácido acético), productos

de degradación de azúcar (ej:furfural), productos de degradación de lignina (ej:aldehídos aromáticos), productos de la fermentación y metales. El conocimiento de los compuestos inhibidores y de cómo minimizar sus efectos es de vital importancia para la fermentación eficiente en procesos reales.

1.9.2 Fermentación de pentosas

La fracción correspondiente a pentosas, corresponde generalmente a xilosa. *Saccharomyces cerevisiae* es el organismo más usado para la fermentación de hexosas, tiene altos rendimientos y tolerancia al etanol. Sin embargo, esta levadura es incapaz de fermentar pentosas, por lo que han sido producidas nuevas cepas, genéticamente mejoradas.

1.10 Utilización de *Salix viminalis* como fuente de energía

Salix viminalis, además de ser una especie de rápido crecimiento, puede cumplir roles fundamentales en la producción de bioenergía para obtención de etanol. Por otra parte puede tener otros usos, ya que posee la capacidad de absorber metales pesados, además de ser utilizado en la ya conocida cestería y en la recuperación de riberas de ríos (Recabarren 1997; Matthei 1997).

Esta especie ha llegado a cumplir un papel fundamental en suplir las demandas de energía en zonas que no cuentan con un abastecimiento total de energías fósiles. Dentro de estas naciones podemos citar a Suecia, la cual cumple

un rol importante a nivel mundial en el desarrollo de estas plantaciones energéticas. Los argumentos que sustentan este proyecto bionergético en dicho país son la falta de carbón, petróleo o gas; no poseer fuentes de energía hidroeléctrica o nuclear y desincentivar la sobreproducción agropecuaria.

S.viminalis es un arbusto de rápido crecimiento, con rotaciones de 3-5 años y una buena producción de materia seca a lo largo de su ciclo. En Suecia, en una plantación común de esta especie, la densidad alcanza a las 18.000 estacas por hectárea. Los valores de crecimiento van desde 1.000 Kg/ha en un primer año de lento desarrollo, pasando a incrementos entre 9.000 - 12.000 kg/ha/año después del primer año, se ha encontrado que esta producción se sostiene por un período de 25 - 35 años. Por otra parte el sistema radicular tiene una duración de 25 años y transcurrido este período debe replantarse (Christersson 1997). En Chile los rendimientos por hectárea son muy similares a los obtenidos en Suecia, alcanzando valores de 12.000 kg/ha/año (Recabarren 1997). Debemos tomar en cuenta que estos valores se alcanzan para plantaciones con fines de cestería, por lo que una silvicultura intensiva en plantaciones energéticas del cultivo debería mejorar sustancialmente estos rendimientos.

Dado que las plantaciones energéticas de *Salix viminalis* son regadas directamente con aguas servidas, de las cuales estas toman el nitrógeno y el fósforo necesario

para desarrollarse de buena forma, éstas solucionan problemas tan nuestros también como son los problemas ambientales de aguas servidas domiciliarias e industriales (Christersson 1997).

1.10.1 Características botánicas de *Salix viminalis*

S.viminalis es una Angiosperma de la familia de las Salicáceas, cuya característica primordial es que son especies higrófilas (FAO 1980), es decir, crecen en suelos húmedos. Etimológicamente el nombre dado a esta especie en particular (sauce mimbre) se refiere a una serie de ramificaciones, de las cuales se obtiene como materia prima el mimbre. Tanto por la calidad como por cantidad, el mimbre obtenido de *S.viminalis* se utiliza en cestería artesanal dando origen a productos como canastos, cestos y muebles; incluso en otros países se ha llegado a una comercialización industrial de éstos (Lanzara y Pizzeti 1979).

1.10.2 Hábitat

Esta especie se extiende en toda Europa y algunas zonas de Asia, encontrándose también como una especie introducida para fines ornamentales y de confección de artesanía, además de la utilización en la recuperación de riberas de ríos (Matthei 1997).

1.10.3 Descripción

Arbusto que alcanza 4 - 5m de altura, pero en ocasiones puede llegar hasta 10m, con ramas largas y flexibles, cubiertas de corteza amarilla. Las hojas pueden ser

estrechamente lanceoladas o lineales, con márgenes irregulares y nervadura central amarillenta; son caducas alternas con pecíolo corto de color verde en la cara superior y plateada en la inferior, debido a la presencia de abundante tomento. Las flores se reúnen en gruesos amentos y poseen estambres libres. Los frutos son cápsulas sésiles cubiertas de pilosidad, nada o muy poco ramificado y adecuado para ser empleado conjuntamente con la corteza. Su propagación se realiza mediante semillas, esquejes o propágulos¹.

1.11 Objetivos

Sobre la base de los antecedentes expuestos, el presente trabajo tiene como objetivos:

- Realizar un estudio detallado de la composición química de material lignocelulósico de la especie *Salix viminalis* en 4 procedencias distintas.
- Llevar a cabo la hidrólisis ácida de madera y corteza extraída, analizar y cuantificar los azúcares obtenidos.
- Fermentar los azúcares obtenidos en el proceso anterior en condiciones experimentales preestablecidas, analizar y cuantificar los rendimientos de etanol.

¹ Propágulo: Rama con brote, al entrar en contacto con el suelo produce raíces.

II MATERIALES Y METODOS

2.1 Antecedentes generales

2.1.1 Lugar de ensayo

El estudio se realizó en el Laboratorio de Recursos Renovables, Facultad de Ciencias químicas de la Universidad de Concepción, en Concepción.

2.1.2 Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas de diferentes procedencias como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Origen y época de recolección de las muestras de *S.viminalis*.

Sector	Zona de distribución	Recolección
Norte	Chimbarongo (CHIM), VI región	Primavera
Centro-Norte	Concepción (CCP), VIII región	Otoño
Centro-Sur	Angol (ANG), IX región	Primavera
Sur	Coyhaique (COY), XI región	Primavera

2.1.3 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado corresponde a un diseño completamente aleatorio, con 3 repeticiones para cada determinación química, obteniéndose cada resultado como promedio de las repeticiones (Ver apéndice Tabla 5A).

2.2 Descripción del estudio

2.2.1 Preparación

Las muestras se dividieron en ramas (madera) y corteza, las ramas fueron seccionadas utilizando para ello medios mecánicos. Las muestras fueron secadas hasta obtener peso constante mediante un horno a temperatura de 50°C. Tanto la madera como la corteza fueron reducidas a un tamaño igual a 250 μm empleando para ello un molino de cuchillos.

2.2.2 Método de extracción de madera

Para el estudio de la composición química de la madera o corteza es necesario realizar una eliminación de los extraíbles de ellas. Los extraíbles son materiales solubles en solventes neutros y no están generalmente considerados como una parte de la madera. La cuantificación y caracterización de los extraíbles se realizó en un trabajo paralelo a éste (Durán 1997), utilizando para la extracción el método estándar de análisis ANSI/ASTM D 1105-56 (ASTM 1979).

2.3 Metodología Empleada

2.3.1 Hidrólisis de la madera

La determinación de la lignina y los azúcares de la madera se llevó a cabo mediante la realización de 2 hidrólisis sucesivas, las condiciones dadas en la Tabla 3. Estas tienen por objeto separar la lignina y romper las moléculas de polisacáridos para transformarlas en monosacáridos.

Tabla 3: Condiciones empleadas para las Hidrólisis sucesivas de las 4 procedencias de *S.viminalis*.

	Concentración de Ácido	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
Primera Hidrólisis	H ₂ SO ₄ (72%)	30	60
Segunda Hidrólisis	H ₂ SO ₄ (2,7%)	125	60

El hidrolizado se llevó a una dilución conocida, se filtró y el sólido se llevó a estufa a 105°C hasta peso constante, determinándose el contenido de lignina Klason (insoluble) gravimétricamente. El líquido filtrado, llamado mosto, contiene los azúcares y la lignina soluble. Los primeros fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), mientras que la lignina soluble fue cuantificada por espectrofotometría a una longitud de onda de 250 *nm*. Esta metodología de determinación de lignina Klason y lignina soluble ha sido descrita por Genco (1990), donde se emplearon normas estándares de determinación y cuantificación de lignocelulósicos.

Esquemáticamente las hidrólisis sucesivas y sus posteriores procesos se realizaron de acuerdo a lo mostrado en la figura 3.

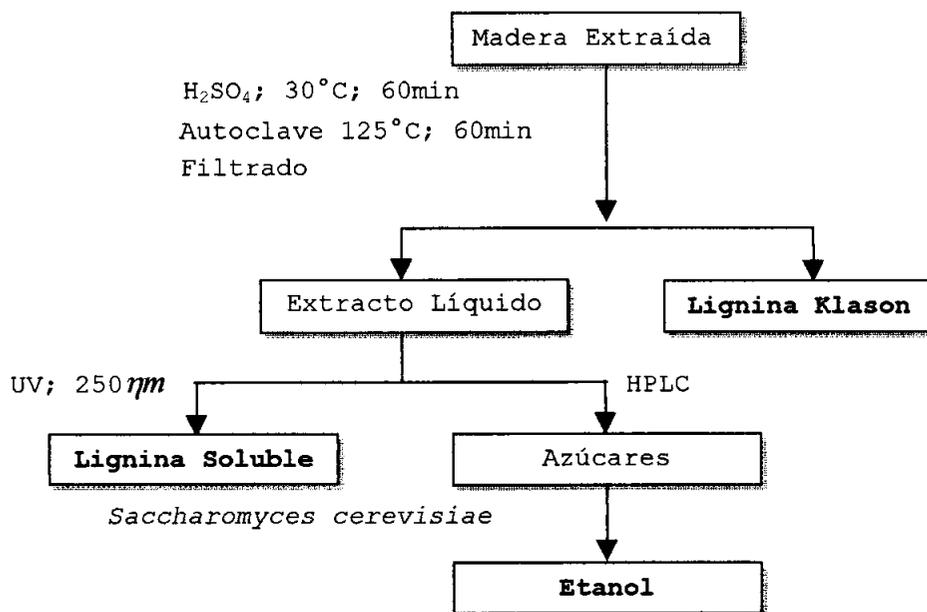


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de extracción e hidrólisis sucesivas de *S.viminalis*.

2.3.2 Determinación del material Celulósico

La determinación del material celulósico presente en la madera y en la corteza (celulosas y hemicelulosas), se realizó siguiendo la metodología descrita por Pereira y Sardinha (1984).

El proceso seguido para ello se describe como sigue: A una cantidad de 100 mg de muestra se le agregó una mezcla de 90 ml de ácido nítrico con 12 ml de ácido acético, la cual es puesta en un baño a 90°C por un período de 25 min. El contenido es filtrado en crisol previamente tarado y el sólido (celulosa) es puesto en estufa a 105°C hasta peso constante, luego en un desecador al vacío a temperatura ambiente por 3 horas. El contenido de

celulosa entonces es cuantificado como porcentaje del peso inicial de la muestra utilizada (ver figura 4).

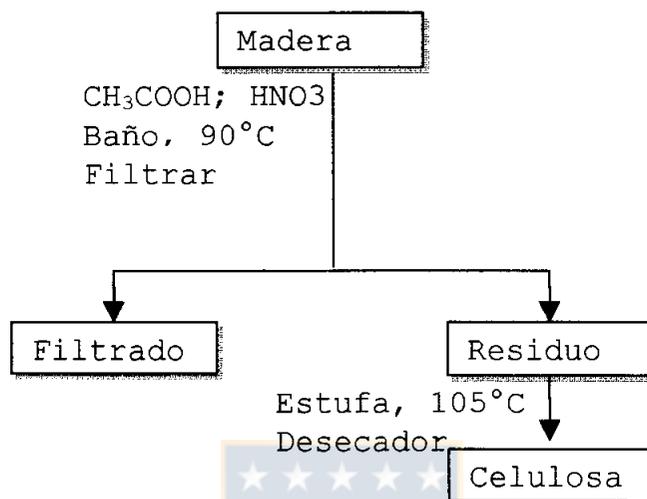


Figura 4: Metodología utilizada para el análisis de Celulosa en madera y corteza de *S.viminalis*.

El contenido de hemicelulosas se obtuvo como diferencia entre celulosa, lignina y el total de muestra utilizada.

2.3.3 Análisis de azúcares

Los componentes azucarados de los polisacáridos, fueron identificados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual es una manera segura y eficiente de identificar y cuantificar los 5 azúcares presentes en los hidrolizados de madera: glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa (Flores 1993).

a) Determinación de glucosa y xilanos

Para la determinación de glucosa y xilanos se utilizó un sistema HPLC, con las siguientes características:

- *Columna: Bio-Rad Aminex HPX-87H 300*7.8mm*
- *Temperatura de Columnas: 25°C*
- *Fase móvil: H₂SO₄ ; 0,008M*
- *Loop: 20ml*
- *Volumen de inyección: 100µl*
- *Detector Índice de refracción: Knauer*
- *Integrador: Spectra-Physics*
- *Bomba: Knauer*
- *Calentador de Columnas: Bio-Rad*

Se tomaron alícuotas del mosto obtenido de la hidrólisis ácida, que se inyectaron en el equipo por un intervalo de tiempo no superior a los 25 minutos. Los cromatogramas obtenidos dados en función del tiempo de retención² de la muestra en la columna se muestran en el apéndice Figuras 1A, 2A y Tablas 1A, 2A.

b) Determinación individual de hexosas y pentosas

Se eligió una muestra (Concepción) para realizar tanto en la madera como en la corteza la determinación individual de azúcares por HPLC, utilizando una columna distinta a

² Cada compuesto químico, en este caso las azúcares tienen una afinidad con la columna. Debido a esta afinidad, los azúcares quedarán retenidos por un tiempo definido. Por comparación, de este tiempo y los tiempos de retención de estándares de azúcares se pueden identificar y cuantificar los azúcares que aparecen en el cromatograma.

la anterior, que identifica y cuantifica todos los azúcares por separado.

Las características del sistema HPLC utilizado para este efecto se resumen a continuación:

- *Columna: Bio-Rad HPX-87P 300*7.8mm*
- *Temperatura de Columnas: 85°C*
- *Fase móvil: H₂O HPLC*
- *Loop: 20mm*
- *Volumen de inyección: 100µl*
- *Detector Índice de refracción: Knauer*
- *Integrador: Spectra-Physics*
- *Bomba: Knauer*
- *Calentador de Columnas: Bio-Rad*

Las muestras se neutralizaron con hidróxido de bario hasta un pH de 5,5, luego se tomaron 2 alícuotas de 3 ml y 12 ml las que fueron rotuladas con los distintivos A y B respectivamente. Estas muestras se concentraron en evaporador rotatorio a presión reducida hasta eliminar la totalidad de la fase líquida quedando solo los azúcares como residuo sólido. Se les agregó un pequeño volumen de agua bidestilada para diluirlas, quedando la muestra B en forma concentrada y la muestra A en menor concentración. Ambas se inyectaron en HPLC identificándose y cuantificándose los azúcares presentes; esta metodología se siguió tanto para los hidrolizados de madera como para los hidrolizados de corteza de la muestra de Concepción.

Los cromatogramas de los análisis se encuentran en el apéndice figuras 3A, 4A y Tablas 3A, 4A.

2.3.4 Análisis por cromatografía gaseosa acoplado a espectrómetro de masa (CG/MS)

Para identificar los compuestos orgánicos que se forman durante la hidrólisis por la degradación de azúcares, se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas.

Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

- *Cromatógrafo: HP 5890 Serie II*
- *Detector selectivo de Masas: HP 5972 MSD*
- *Columna: HP5-MS 30m/0.25mm id/0.25 μ m films*
- *Programa de Temperatura: 70°C*3min >10°C/min
>270°C*10min*
- *Temperatura Interfase: 280°C*
- *Rango de masas: 33-550 uma*
- *Volumen de Inyección: 1 μ l*
- *Solvente: Dietil eter*

100 ml de solución acuosa de azúcares, se extrajeron 2 veces 30 ml de éter, a fin de captar los compuestos solubles en este solvente orgánico. La fase etérea se concentró hasta un volumen de aproximadamente 250 μ l. Se inyectaron las muestras en el analizador de masa, y los resultados obtenidos de estos compuestos son informados en la tabla 5.

2.4 Fermentación de los hidrolizados

La fermentación de los hidrolizados se realizó utilizando *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones experimentales dadas en la Tabla 4. Para ello se tomaron 50 ml de muestras de hidrolizados que se encontraban a una concentración inicial conocida, a los cuales se les agregaron 10 ml de medio Wyckerman (MYGP: malta 3 g/l, extracto de levadura 3 g/l, glucosa 10 g/l y peptona 5 g/l), los cuales contenían la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de 10^8 células por cada ml de medio. Esta concentración fue medida en cámara Nebauer, luego de lo cual, fueron activadas por 24 horas en estufa a 30°C, a fin de entregarles las condiciones óptimas de crecimiento.

Tabla 4: Condiciones de fermentación para los azúcares hidrolizados de la madera de procedencia Concepción, en *Salix viminalis*.

Muestras	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
1	4,0	18	84
2	4,5	18	84
3	5,0	18	84
4	5,5	18	84
5	4,5	25	72
6	5,0	25	72
7	4,5	35	72
8	5,0	35	72

2.4.1 Análisis de la fermentación

El análisis de la fermentación se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia en la columna (HPX-87H); a las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente; identificándose la presencia de etanol de acuerdo al cromatograma entregado.

Las primeras 4 muestras fueron filtradas e inyectadas directamente en la columna, las restantes muestras fueron liofilizadas por 48 horas, quedando el etanol en el residuo sólido, el cual fue diluido con un pequeño volumen de agua bidestilada, para luego inyectar en la columna, el volumen de inyección fue de 100 μ m en cada inyección.



III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Material lignocelulósico

La composición de materiales lignocelulósicos presente en las muestras de *S.viminalis*, obtenida de 4 procedencias diferentes, se resume a continuación en la Tabla 5. Las cantidades de cada uno de los componentes se dan sobre la base de porcentaje con respecto a peso seco

Tabla 5: Cantidad de materiales lignocelulósicos presentes en *Salix viminalis* según procedencia.

Procedencias de la Especie.								
Componentes	Chimbarongo		Concepción		Angol		Coyhaique	
	Contenido (%)		Contenido (%)		Contenido (%)		Contenido (%)	
	Corteza	Madera	Corteza	Madera	Corteza	Madera	Corteza	Madera
Lignina Soluble	2,4	3,3	1,9	2,6	2,2	3,0	2,1	2,2
Lignina Klason	14,7	12,9	15,2	14,2	15,3	15,7	16,7	15,6
Total	17,1	15,2	17,1	16,8	17,5	18,7	18,8	17,8
Lignina Hemicelulosa	21,2	26,9	21,4	27,5	20,4	28,0	22,8	26,3
Celulosa	24,7	46,4	24,5	46,3	25,2	46,9	21,4	43,8

* La cantidad promedio de extraíbles alcanza al 38% y 10% aprox. en corteza y madera respectivamente (Durán 1997)

3.1.2 Lignina

La cantidad de lignina soluble presente en la especie, es siempre mayor en la madera que en la corteza. También observamos que las influencias de la latitud en que crece

la especie se expresan en una disminución de la cantidad de lignina soluble presente en la corteza y la madera mientras más al Sur se encuentre ésta (figura 5).

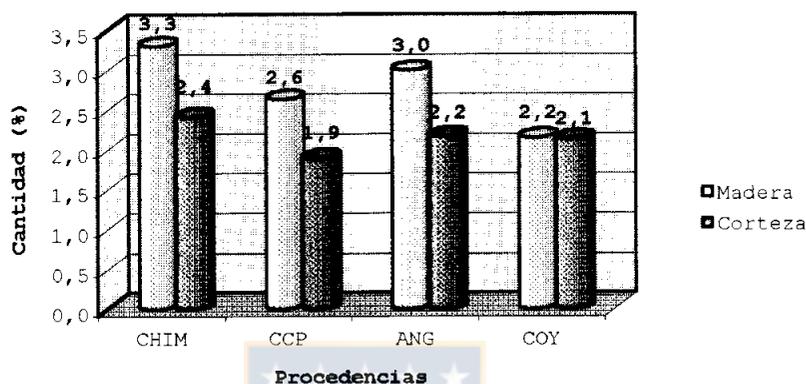


Figura 5: Cantidad de lignina soluble presente en madera y corteza de *S.viminalis* según procedencia.

Aún cuando la procedencia Centro-Sur parece no seguir una clara tendencia a bajar en contenido, en las otras procedencias se observa claramente que así ocurre. La baja de la lignina soluble bajo influencia del crecimiento más austral de la especie, se ve compensado en el aumento de la lignina Klason en la misma latitud (ver figura 6). Este aumento se debe a las condiciones ambientales que presenta esta zona (Coyhaique), requiriendo tallos más lignificados para soportar las inclemencias de clima allí imperante; otorgando un mayor soporte mecánico para la especie (Melo 1993). Estos resultados se comparan a los entregados por Fengel (1989), para especies de *Salix sp.* del hemisferio Norte y

Populus.sp del mismo; ambas Salicáceas, siendo los contenidos de celulosa levemente superiores.

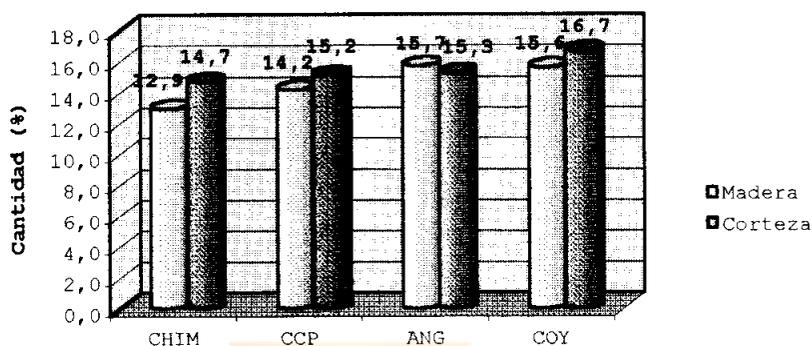


Figura 6: Cantidad de lignina Klason presente en *S.Viminalis* según procedencia.

Al contrario de lo que ocurre con la lignina soluble, el contenido de lignina Klason aumenta hacia el Sur, alcanzando variaciones porcentuales de un 3% mayor en comparación a sus pares de Chimbarongo, donde las condiciones de clima y suelos son más afables para el desarrollo de la especie. Estas variaciones porcentuales deberían considerarse en el caso de llegar a utilizar la especie masivamente para producción de etanol, ya que la eliminación de la lignina podría ser uno de los importantes problemas a encontrar. Así, eligiendo zonas climáticas adecuadas, se lograrían mayores rendimientos

en la extracción de azúcares necesaria para la producción del alcohol.

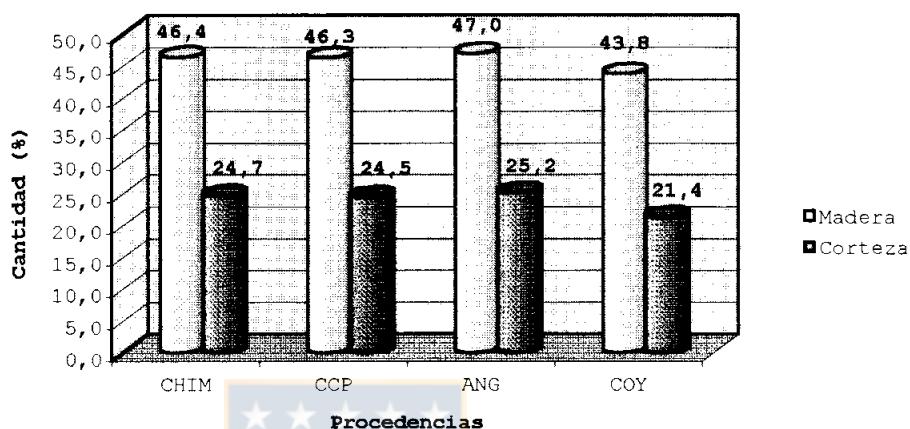


Figura 7: Contenido de celulosa presente en *S.viminalis* según procedencia.

3.1.2 Celulosa

En la figura 7 se observa que el contenido de celulosa tiende a mantenerse casi constante en la madera de las 4 muestras. No se observan mayores influencias de las condiciones de por lo que se puede afirmar que los factores ambientales no tienen una incidencia relevante en el contenido de celulosa en madera. En el caso de la corteza se observan diferencias mayores a 3% en el contenido de celulosa entre la zona Norte y la zona Sur, comportándose de la misma manera las restantes procedencias.

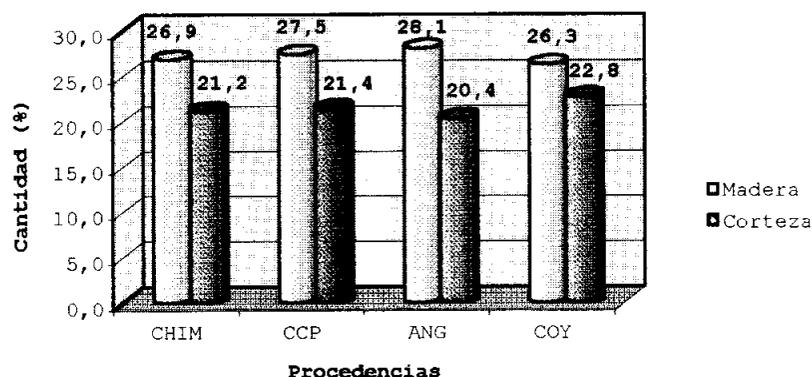


Figura 8: Contenido de hemicelulosa presente en *S.viminalis* según procedencia.

3.1.3 Hemicelulosa

En la figura 8 se observa que el contenido de hemicelulosas en la madera tiende a aumentar hacia la zona Central, para luego descender en cantidad al llegar a la zona Sur. En las muestras de Corteza no se aprecia un aumento en el contenido hacia alguna latitud determinada, debido probablemente al aumento de la lignina y celulosa hacia algunas de las latitudes.

3.2 Cuantificación de azúcares

3.2.1 Glucosa más xilanos

La columna utilizada HPLC (HPX-87H) tiene la ventaja de trabajar directamente con una fase móvil de H_2SO_4 , sin necesidad de neutralizarla, y la desventaja de no cuantificar por separado la xilosa (pentosa), de la

galactosa y manosa³ (hexosas). Por lo tanto los resultados para lo referido a estos compuestos son expresados como "xilanos" de la madera. Esta opción fue elegida ya que en maderas duras la presencia de xilosa alcanza a una cantidad superior al 90% del total de estos 3 azúcares (Fengel 1989).

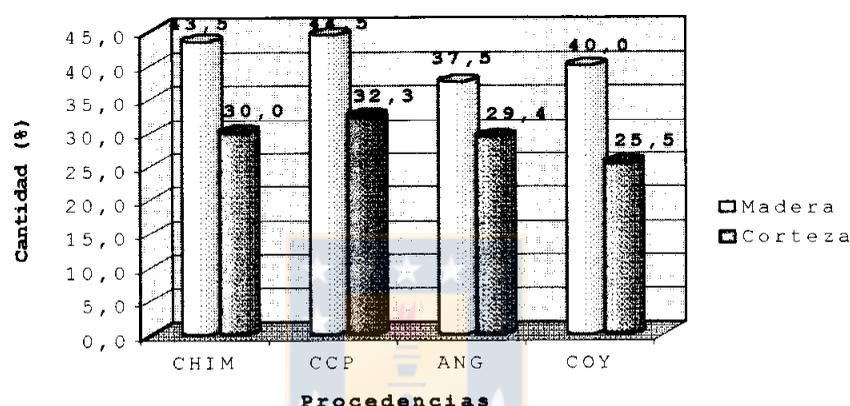


Figura 9: Cantidad de glucosa obtenidos en hidrolizados de *S.viminalis* según procedencia.

La cantidad de glucosa en las muestras decrece hacia el Sur (figura 9), esto podría ser causado por un aumento de la lignina en las mismas muestras, o a una degradación de azúcares. Es posible además que alguna muestra de procedencia determinada haya formado mayor cantidad de productos secundarios de la hidrólisis ácida, como lo son el furfural y el 5-metil furfural, que se forman al hidrolizar poliosas (Ver Tabla 7).

³ Estos compuestos aparecen a igual tiempo de retención² en el

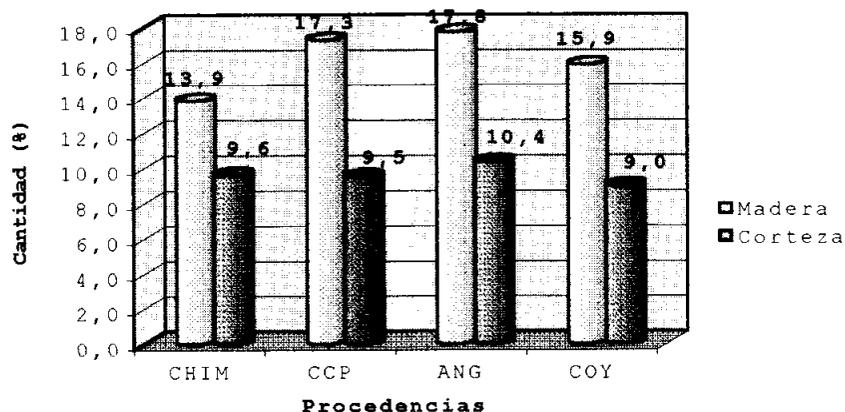


Figura 10: Contenido de xilanos obtenidos de hidrolizados de *S.viminalis* según procedencia.

Los "xilanos" en la madera se encuentran en mayor concentración en la zona Central, mientras que en la zona Norte y en la zona Sur disminuyen en cantidad (figura 10). Estos "xilanos" formados por xilosa, galactosa y manosa se encuentran siempre en mayor cantidad en los hidrolizados de la madera que en los de la corteza. Esto es debido a un sustancial aumento de los extraíbles presentes en esta última, que superan largamente la cantidad que se presenta en madera (Durán 1997).

3.2.2 Cuantificación individual de azúcares

El principal componente de los azúcares reductores totales (ART), provenientes de la hidrólisis ácida de la madera, es la glucosa (glu) encontrándose además cantidades menores de xilosa (xil), arabinosa (ara),

cromatograma.

manosa (man) y galactosa (gal). La cuantificación de ART que se realizó para la procedencia Concepción, entregó los resultados de la composición total de azúcares que presentan éstos y se dan en la figura 11.

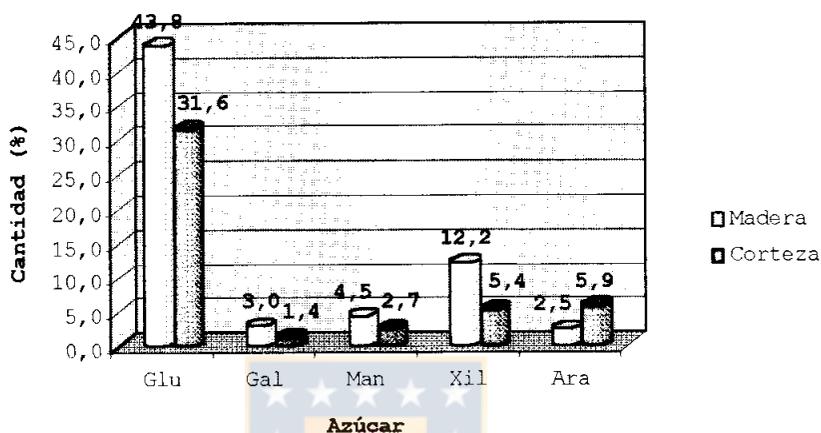


Figura 11: Contenido de azúcares reductores (ART) totales en hidrolizados de madera y corteza de *S.viminalis* de procedencia Concepción.

3.3 Aporte individual de azúcares al contenido total

La composición de azúcares de *S.viminalis* es bastante interesante. La cantidad de pentosas (xilosa y arabinosa) alcanza a 14,8% en la madera y 11,4% en la corteza. De estos contenidos, en la madera un 83% corresponde a xilosa y un 17% a arabinosa; en la corteza un 48% corresponde a xilosa y un 52% a arabinosa. Muchos de los microorganismos que se comportan de manera eficiente en la fermentación de azúcares (hexosas) de la madera ven dificultada su acción al no poder fermentar las pentosas, específicamente xilosa (Hahn-hagerdal et al. 1991). Es

por tanto importante al realizar una fermentación considerar los contenidos de éstas en madera, ya que alcanzan al 83% de pentosas en los hidrolizados de ésta, es decir, al 12,2% del contenido total de azúcares presentes.

Por otra parte las hexosas (glucosa, galactosa y manosa) en la especie alcanzan al 51,4% en madera y 35,7% en corteza; de las cuales en la madera glucosa aporta con un 85% al total de hexosas, galactosa a un 6% y manosa a un 9%. En el caso de la corteza la situación no varió mucho, encontrándose un aporte de glucosa 88%, galactosa 4% y manosa 8% del total (figura 12).

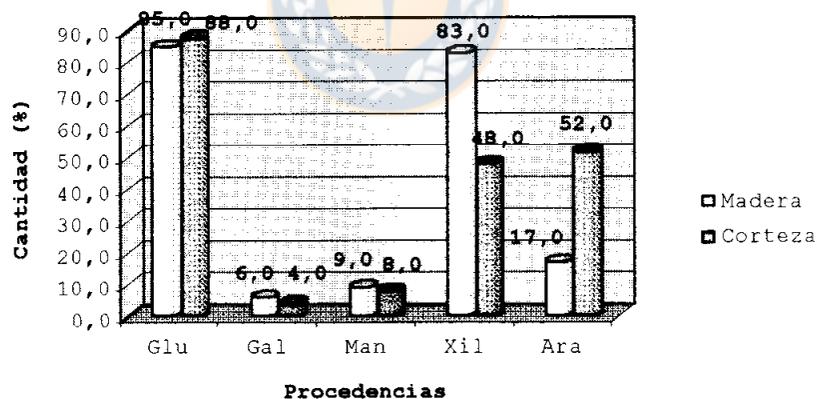


Figura 12: Aporte de cada azúcar en forma individual al contenido de pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa, galactosa y manosa).

3.4 Compuestos secundarios formados por la hidrólisis ácida

En los métodos de hidrólisis ácida de la madera siempre existe una pérdida importante de azúcares que reaccionan con el ácido formando otros compuestos secundarios, las pérdidas pueden superar el 20% o más de los azúcares de la madera (Agblevor et al. 1997). La formación de estos compuestos secundarios es un proceso normal e inevitable de transformación química de recursos naturales, como lo es la biomasa (Gandini 1992).

Previo al proceso de fermentación es necesario identificar los compuestos formados, estos compuestos son informados en la Tabla 7, los cromatogramas del análisis CG/MS se informan en el apéndice, Figuras 5A y 6A.

Tabla 6: Rendimiento de la hidrólisis ácida en las muestras de *Salix viminalis*.

Procedencias de la Especie.									
Componentes	Chimbarongo		Concepción		Angol		Coyhaique		
(%)	Corteza	Madera	Corteza	Madera	Corteza	Madera	Corteza	Madera	
Celulosa									
y									
hemicelulosa	45,9	73,1	45,9	73,8	45,6	74,9	44,2	70,1	
Glucosa									
y									
xilanos	39,7	57,4	41,9	61,8	39,7	56,3	34,5	55,8	
%azúcares									
obtenidos	86,5	78,5	91,3	83,7	87,1	75,2	78,1	79,6	

En este estudio se obtuvieron valores cercanos al 14% de degradación de polisacáridos en la corteza y 20% en madera, obteniéndose así rendimientos de azúcares transformados cercanos al 80% del total de azúcares presentes en la madera. Esto refleja que, la necesidad de búsqueda de métodos eficientes en la conversión de los polisacáridos a azúcares fermentables, es clave para hacer el proceso rentable (Hahn-hagerdal et al. 1991). Un proceso de sacarificación simultánea podría ser una alternativa al proceso (Eklund 1995).

El análisis de CG/MS entrega el peso molecular de los compuestos orgánicos formados a raíz de la degradación de azúcares durante el proceso. Con este antecedente, el CG/MS identifica casi la totalidad de los compuestos encontrados y detecta en el cromatograma la presencia de otros compuestos no identificados. Los resultados de los análisis realizados se dan en la Tabla 7.

Tabla 7: Compuestos orgánicos encontrados en el mosto proveniente de la hidrólisis ácida de Madera y Corteza.

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de retención² (min.)</i>	<i>Hidrólisis de madera</i>	<i>Hidrólisis de corteza</i>
2- Furancarboxaldehído	3.93	X	X
5-metil-2-furancarboxaldehído	5.74	X	
1-(2 furanil)-1-Propanona	6.56	X	
Acetofenona	7.65	X	X

5-(Hidroximetil)-2-furanocarboxaldehído	10.50	X	X
Vanilina	13.11	X	
Metil ester del ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	14.72	X	
Etil ester del ácido 4-etoxibenzoico	14.77	X	

Tanto en los hidrolizados de la corteza como en los la madera se presentan además otros compuestos que no pudieron ser identificados, aunque se encontraban en menor cantidad. Se observa además que la formación de compuestos es mayor en los hidrolizados de la madera que en los de la corteza, esto se debe a que la presencia de azúcares en esta última es sustancialmente menor a la madera, por lo que la cantidad de azúcares que se pueden degradar es menor.

3.5 Fermentación de los hidrolizados

3.5.1 Rendimientos de etanol

Entre todas las variables que afectan el rendimiento en una fermentación: pH, temperatura, concentración de azúcares, tiempo, tipo y concentración de levaduras, se eligió estudiar el efecto de dos variables; pH y temperatura. La cuantificación de etanol, realizada por cromatografía líquida de alta eficiencia, entrego los resultados que se señalan en la Tabla 8.

Tabla 8: Condiciones utilizadas y etanol obtenido en la fermentación de hidrolizados de la madera de procedencia concepción, en *Salix viminalis*.

Muestras	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (hrs)	Etanol ^a (gramos)	Etanol ^a (litros)
1	4,0	18	84	301,4	0,382
2	4,5	18	84	290,9	0,368
3	5,0	18	84	289,0	0,366
4	5,5	18	84	295,9	0,375
5	4,5	25	72	4,2	n.s*
6	5,0	25	72	n.s*	n.s*
7	4,5	35	72	3,5	n.s*
8	5,0	35	72	n.s*	n.s*

* no satisfactorio.

^a El porcentaje de etanol se da en gramos y litros de etanol formados a partir de 1000 g de madera libre de extraíbles en base seca.

En el análisis no se encontró una influencia del pH en la producción de etanol en las primeras 4 muestras. Por otra parte se aprecia una influencia de la temperatura en las fermentaciones, ya que en las muestras 5 a 8, cuya fermentación se realizó a temperaturas de 25°C ó 35°C, la producción de etanol fue inferior a 1% en todo el rango de pH utilizado.

Por lo tanto, en el caso del microorganismo utilizado *Saccharomyces cerevisiae*, la temperatura óptima de fermentación se encontró a los 18°C en el rango comprendido entre los pH 4,0 y 5,5.

La cepa utilizada fue proporcionada por la Compañía de Cervecerías Unidas (CCU) Concepción, donde se utiliza

como condición normal de fermentación una temperatura de 18°C.

3.5.2 Eficiencia de la fermentación

El porcentaje de eficiencia se expresa con respecto a la máxima capacidad teórica de fermentar glucosa a etanol, la cual alcanza a 0,46 g a partir de 1 g de glucosa, resumiéndose en la siguiente ecuación (Montecinos 1989).

1 g glucosa → 0,46 g etanol + 0,44 g CO₂ + 0,1 g de nuevas células

Tabla 9: Porcentaje de azúcares reductores totales (ART) fermentables que fueron convertidos en etanol.

Muestras	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (hrs)	Eficiencia (%)
1	4,0	18	84	65,2
2	4,5	18	84	63,2
3	5,0	18	84	62,8
4	5,5	18	84	64,3
5	4,5	25	72	0,9
6	5,0	25	72	n.s
7	4,5	35	72	0,8
8	5,0	35	72	n.s

La eficiencia del sistema en la transformación de azúcares fermentables (glucosa y manosa) alcanzó en promedio al 65%, en las condiciones de temperatura de 18°C a todos los pH estudiados.

Al realizar un escalamiento de los resultados para *S.viminlalis*, considerando un crecimiento de 12 Ton/ha/año (Recabarren 1997) y asumiendo que en promedio un 10%

corresponde a extraíbles de la madera (Durán 1997), se tendría una producción inicial de 3,3 Ton/ha/año de etanol. Estos resultados son inferiores a los encontrados en Suecia, donde la producción alcanza 3,8-4,7 Ton/ha/año de combustible en plantaciones con crecimientos similares a los de nuestro país, aunque las condiciones de manejo y silvicultura aplicadas a ellas (ej: regadío, plantación y cosechas mecanizadas, manejo de híbridos), superan ampliamente a las utilizadas en Chile. Podemos afirmar entonces que buscando nuevos procesos de hidrólisis y fermentación, además de la implementación de una silvicultura intensiva, los rendimientos pueden llegar a ser notablemente superiores.



IV CONCLUSIONES

Basándose en los resultados del estudio se puede concluir que:

- Los porcentajes de lignocelulósicos presentes en madera y corteza son similares a los entregados para otras especies de Salicáceas del hemisferio norte.

- Los porcentajes de lignocelulósicos en madera superan ampliamente a los porcentajes obtenidos en corteza, debido a la mayor presencia de extraíbles en esta última.

- Los contenidos de lignina en madera tienden a aumentar hacia el sur, mientras los de lignina en corteza tienden a mantenerse constantes.

- Los contenidos de celulosa son notablemente mayores en madera que en corteza, llegando incluso a doblar los contenidos de corteza en la procedencia Coyhaique.

- Los contenidos de Hemicelulosas en corteza son levemente inferiores a los contenidos de la misma en madera, en la zona Centro-Norte y Centro-Sur del país tienden a ser superiores a los encontrados en las zonas Norte y Sur.

- Los contenidos de glucosa en los hidrolizados son superiores en las zonas Norte y Centro-Norte, en comparación a las zonas Sur y Centro-Sur, por su parte la

cantidad de xilanos es mayor en la zona Centro-Sur y Centro-Norte.

- El aporte de hexosas al total de azúcares presentes en los hidrolizados de la madera alcanzó a 51,4%, superando ampliamente el contenido de hexosas en hidrolizados de la corteza que llegó a 35,7% donde glucosa aporta en más de un 85% al total de ellas y el restante se lo reparten galactosa y manosa.

- El aporte de pentosas al total de azúcares presentes en los hidrolizados de madera y corteza alcanzó a 14,8% y 11,4% respectivamente. Aún cuando no es una diferencia cuantitativamente apreciable, en los hidrolizados de la madera un 83% de las pentosas correspondió a xilosa y el restante a arabinosa; no así en corteza donde esta última superó el 50% dejando a xilosa con un aporte de sólo el 48%.

- El aporte menos importante en la constitución de azúcares en la madera corrió por cuenta de galactosa (hexosa) que no superó el 3% en madera y fue levemente superior a 1% en corteza, seguida de manosa (hexosa) con un 4,5% y 2,7% respectivamente y arabinosa con un 2,5% y 5,9% respectivamente, aunque esta última sólo fue importante en corteza, ya que en madera difícilmente superó el 2%.

- No se observó una influencia del pH en las fermentaciones a una temperatura de 18°C, por lo que los rendimientos de etanol fueron muy similares.

- A temperaturas de 25°C y 35°C, se inhibieron casi por completo las fermentaciones a pH 4,5 y en su totalidad a pH 5,0.

- La producción de etanol, alcanzó un promedio de 0,38 l de combustible por kg de madera libre de extraíbles en base seca.

- Las producciones teóricas de etanol son similares a las entregadas para la misma especie en Suecia.

4.1 Proyecciones

Tomando en cuenta la rapidez de desarrollo de la especie y la adaptación de la misma en nuestro país, los rendimientos de material azucarado, facilidad de establecimiento, manejo e información y estudios con que se cuentan en el ámbito mundial; se vislumbra como una buena alternativa energética para la producción de etanol, en nuestro país.

Es necesario continuar con los estudios de fermentación con el fin de encontrar las condiciones óptimas de pH, temperatura, concentración de azúcar, tiempo y concentración de levaduras. Además se podría utilizar cepas mejoradas genéticamente en la fermentación de pentosas.

V RESUMEN

En un mundo en que las demandas por energía van en constante aumento, y las fuentes de energía fósiles se están agotando, la búsqueda de energías alternativas limpias y económicamente viables es una necesidad. La biomasa cumple con todos estos requisitos pero tiene la desventaja de ser una fuente energética no tradicional. La necesidad de estudiar la composición lignocelulósica de las especies promisorias es una obligación, para una implementación futura de esta fuente renovable de energía.

El estudio llevó a cabo un análisis exhaustivo de la composición lignocelulósica de *Salix viminalis*, de 4 regiones de Chile, a fin de determinar los contenidos de lignina, celulosa y hemicelulosa. Además se determinó la composición de azúcares presentes en los hidrolizados de las muestras. Los rendimientos del material lignocelulósico se asemejaron a otros estudios con *Salicáceas*, dentro de los componentes azucarados las cantidades de hexosas fueron muy interesantes alcanzando al 51,4% y 31,7% en madera y corteza respectivamente, del total de material lignocelulósico presente en la especie. Las pentosas rondaron valores cercanos al 14,8% y 11,4% respectivamente para las mismas muestras. Para el caso de producción de bioenergía esta alcanzó, en escala de laboratorio, un rendimiento de 0,38 l de etanol por kg de madera en base seca, libre de extraíbles.

Estos resultados se consideraron alentadores, en comparación a países que utilizan esta especie con fines energéticos.



SUMMARY

In a world where the demand of energy increases and the fossil fuels are in depletion, the search of alternative renewable, clean and economically viable sources of energy is necessary. The biomass fulfills all this requirements but it has the disadvantage of being a non-traditional source of energy, finding resistance in their large-scale establishment. The necessity of studying the lignocellulosic composition of the promising species and searching appropriate methods for their conversion to fuels it is imperative in order to implement in the future this renewable source of energy.

This study carried out an thoroughly analysis of the lignocellulosic composition of *Salix viminalis* from 4 regions in Chile, in order to determine the contents of lignin, cellulose and hemicellulose. The results were similar to that reporter for other Salicaceas. Also the composition of the sugars in the hydrolysate obtained from the wood and the bark of this species was obtained. The relative yield of hexoses reached 51.4% and 31.7% of the total lignocellulosic material respectively. The pentoses yield were around 14.8% and 11.4% for the same samples. Finally the fermentation of the hydrolysates was carried out and a yield of 328 g of ethanol for 1000 g of the hydrolysate in dry weight basis was obtained.

These results were promising in comparison with those reported previously for other countries, which use this species for energetic purposes.



VI BIBLIOGRAFIA

1. Agblevor, F; Evans, R and Johnson, K. 1997. *Molecular-Beam Mass-Spectrometric Analysis of Lignocellulosic Materials: I Herbaceous Biomass*. National Renewable Energy Laboratory, 1617 Cole Boulevard Golden, CO 80401. United States
2. American Society for Testing and Materials. 1979. *Standard methods for preparation of extractive-free wood*. ASTM D1105-56. Pp. 367-368. Philadelphia, United States.
3. Christersson, 1997. *Comunicación Personal*. Professor, Head of the Department. Ph D in plant physiology. Department of short rotation Forestry. Swedish University. Uppsala, Sweden.
4. Downing, M; WALSH, M; S, McLAUGHLIN. 1995. *Perennial Grasses for Energy and Conservation: Evaluating Some Ecological, Agricultural, and Economic Issues*. Environmental Enhancement Through Agriculture: Proceedings of a Conference, Boston, Massachusetts, November 15-17, 1995, Center for Agriculture, Food and Environment, Tufts University, Medford, MA. United States.
5. Durán, C. 1997. *Caracterización de SALIX VIMINALIS acorde a su contenido de extraíbles y capacidad energética total*. Tesis para optar al título de

- Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales.
Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
6. Eklund, R. and G, Zacchi. 1995. *Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow*. *Enzyme and Microbial Technology* 17:255-259
 7. FAO. 1980. *Los álamos y los Sauces*. Roma, Italia.
 8. Fengel, D and G, Wegner. 1989. *Wood: Chemistry, ultrastructure and reactions*. Editorial Walter de Gruyter. London, England.
 9. Flores, S. 1993. *Obtención y caracterización de Lignina Formica de Pinus radiata D. Don*. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con Mención en Química. Escuela de Graduados. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
 10. Gandini, A. 1992. *Polymers from renewable resources*. In: *Comprehensive Polymer Science, First Supplement*. Aggarwal, S and S. Russo (eds). Pergamon Press, Oxford. 19:527-573
 11. Genco, J.; Busayasakul, N.; Medhora, H.; and W, Robbins. 1990. *Hemicellulose retention during Kraft pulping*. *Tappi Journal*.
 12. Gist-brocades. 1995. *United States ethanol capacity*. Gist-brocades BSD B.V., Charlotte, North Carolina.

13. Gnecco, S. 1990. *Potencial de especies vegetales de zonas áridas como recurso energético para Chile*. Primer Congreso Nacional de Energía-Chile: Energía y Desarrollo, 1-6 de Abril. Santiago, Chile.
14. Hahn-hagerdal, B.; T, Linden.; T, Senac and K, Skoog. 1991. *Ethanollic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates*. E, Greenbaum. (ed.); C, Wyman. (ed.). Twelfth symposium on biotechnology fuels and chemicals, CONF-900512, 7-11 May. Humana Press, Clifton. Gatlinburg, NJ, United States. Clifton, NJ, United States.
15. Hahn-Hagerdal, B.; F, Tjerneld and G, Zacchi. 1988. *Production of ethanol from lignocellulosic materials*. *Animal Feed Science and Technology* 21:175-282
16. Hall, D. and J, House. 1995. *Biomass energy development and Carbon Dioxide mitigation options*. pp.134-156. In: National actions mitigate global change. Proceedings of the International Conference, UNEP Collaboring centre of energy and Enviroment. Copenhagen, Denmark.
17. Hall, D.; Rosillo-Calle, F.; Williams, H.; and J. Wood. 1993. *Biomass for energy supply prospects*. pp.593-652. In: Renewable Energy: Sources for fuel and electricity. Johansson et al., Island Press, (ed). Washington (DC), United States.

18. Jackman, E. 1987. *Industrial Alcohol*. pp.309-336 in Academic Press (ed). *Basic Biotechnology*. New York, USA.
19. Lanzara, P. y M, Pizzeti. 1979. *Guía de arboles*. Editorial Grijalbo. Barcelona, España.
20. Matthei, E. 1997. Salicáceas en la recuperación de la navegabilidad del río Bío Bío, Chile. *Noticiero Comisión Nacional del álamo*. 2(4):8.
21. Melo, R. y J, Paz. 1993. *Tecnología de la celulosa y el papel*. Editorial de Facultad de Ciencias Biológicas. Concepción, Chile.
22. Montecinos, 1989. *Obtención de materias primas orgánicas a partir de Euphorbia copiapina*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias con mención en Química. Escuela de Graduados. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
23. Olsson, L.; B, Hanh-Haegerdal. 1996. *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:312-331
24. Paszner, L. 1992. *Liquid fuel production from lignocellulosics by the ACOS process*. Second meeting of the international expert council on the chemistry of vegetable resources. St Petersburg forest Academy, St. Petersburg, Russia Aug 31 - Sept 5. *Bulletin of*

the International expert Council on chemistry of vegetal resources (COCOVER), 1993.

25. Pereira, H and R, Sardinha. 1984. *Chemical composition of Eucalyptus globulus Lab.* Appita. 37(8):661-664
26. Recabarren, M. 16 Abril 1997. *Viejo mimbres se mide ahora con vara mas alta.* El Mercurio. Santiago, Chile. Pp. A1, A12.
27. Shifflet, T.N., and G.M. Darby. 1985. *Forages and soil conservation.* In M.E. Heath, R.F. Barnes, and D.S. Metcalfe (eds.), *Forages: The Science of Grassland Agriculture.* Iowa State University Press, Ames.
28. Vollhardt, P. 1994. *Química Orgánica.* Ediciones Omega. Barcelona, España.
29. Von Sivers, M.; G. Zacchi.; L.Olsson and B, Hahn-Hagerdal. 1994. *Cost Analysis of Ethanol Production from Willow Using Recombinant Escherichia coli.* Biotechnol. Prog. 10:555-560
30. White, L. and L, Plaskett. 1981. *Biomass as fuel.* Academic Press. London, England.

31. Wyman, C. and C, Golden. 1995. *Ethanol production from lignocellulosic biomass*. W, Stine. (ed.); T, Tanaka. (ed.); D, Claridge. (ed.). Energy Society international solar energy conference, CONF-950336, 19-24 Mar. American Society of Mechanical Engineers/Japanese Society of Mechanical Engineers/Japan Solar, Lahaina, LH, United States. New York, United States.
32. Wyman, C. and B, Goodman. 1993. *Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 39:41-59
33. Zerbe, J. *Wood as a material for conservation of energy*. In: Wood product demand and the environment: Proceedings international conference; November 13-14; Vancouver, BC. Madison, WI: Forest Products research society. pp. 223-224

VII APENDICES

Tabla 1A: Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87H) en hidrolizados de la madera de *S.viminalis*

Azúcar	Tiempo de retención (min)	Altura	Aporte al total (%)
Glucosa	8,26	17973	44,5
Xilanos	8,89	5701	17,3
Arabinosa	9,93	n.e	n.e*

* no encontrado

Tabla 2A: Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87H) en hidrolizados de la corteza de *S.viminalis*

Azúcar	Tiempo de retención (min)	Altura	Aporte al total (%)
Glucosa	8,26	10752	32,3
Xilanos	8,89	3036	9,5
Arabinosa	9,93	n.e	n.e*

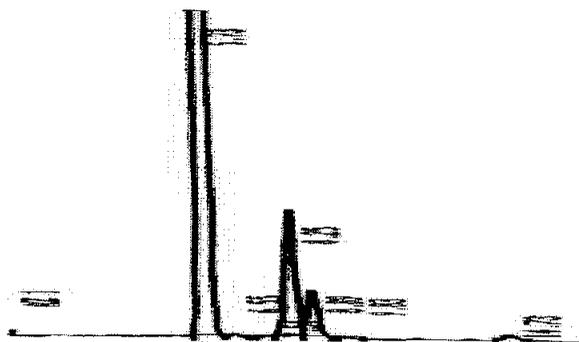


Figura 1A: Cromatograma de hidrolizado de la madera en HPLC (HPX-87H) de *S.viminalis* procedencia Concepción; con los respectivos tiempos de retención para cada azúcar

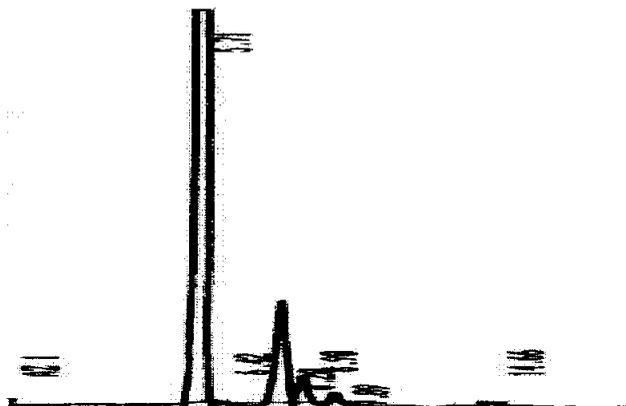


Figura 2A: Cromatograma de hidrolizado de la corteza en HPLC (HPX-87P) de *S.viminalis* procedencia Concepción; con los respectivos tiempos de retención para cada azúcar

Tabla 3A: Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87P) en hidrolizados de la madera de *S.viminalis*

Azúcar	Tiempo de retención (min)	Altura	Aporte al total (%)
Arabinosa	31,05	5645	2,54
Galactosa	28,74	8773	3,04
Glucosa	24,93	7497	43,92
Manosa	33,29	8716	4,48
Xilosa	26,99	1736	12,22

Tabla 4A: Tiempos de retención y concentración para los azúcares encontrados a través de HPLC (HPX 87P) en hidrolizados de la corteza de *S.viminalis*

Azúcar	Tiempo de retención (min)	Altura	Aporte al total (%)
Arabinosa	31,05	1556	5,92
Galactosa	28,74	3965	1,41
Glucosa	24,93	6779	31,63
Manosa	33,29	5012	2,68
Xilosa	26,99	1774	5,44

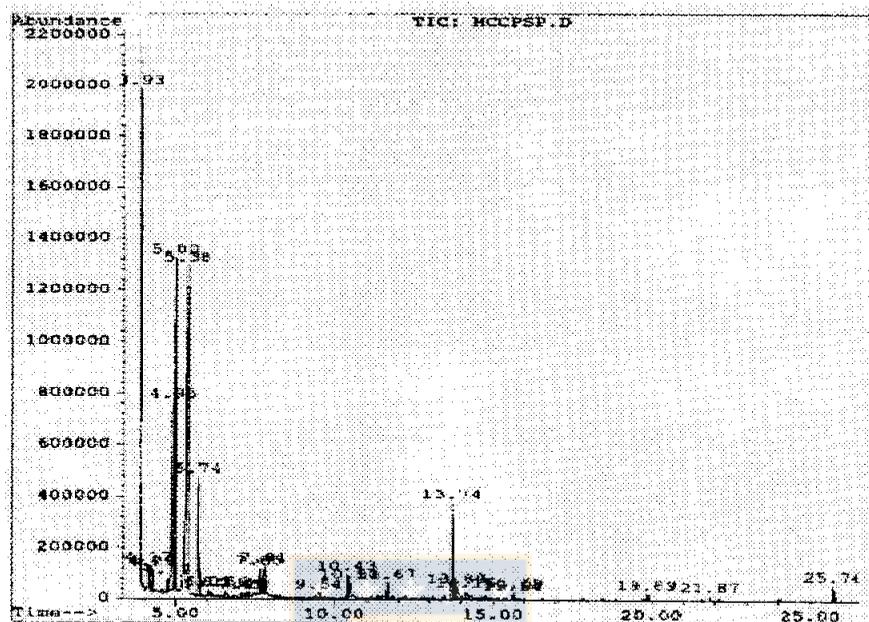


Figura 5A: Cromatograma de gases acoplado a espectrómetro de masas, hidrolizado de la madera de *S.viminalis*, procedencia Concepción

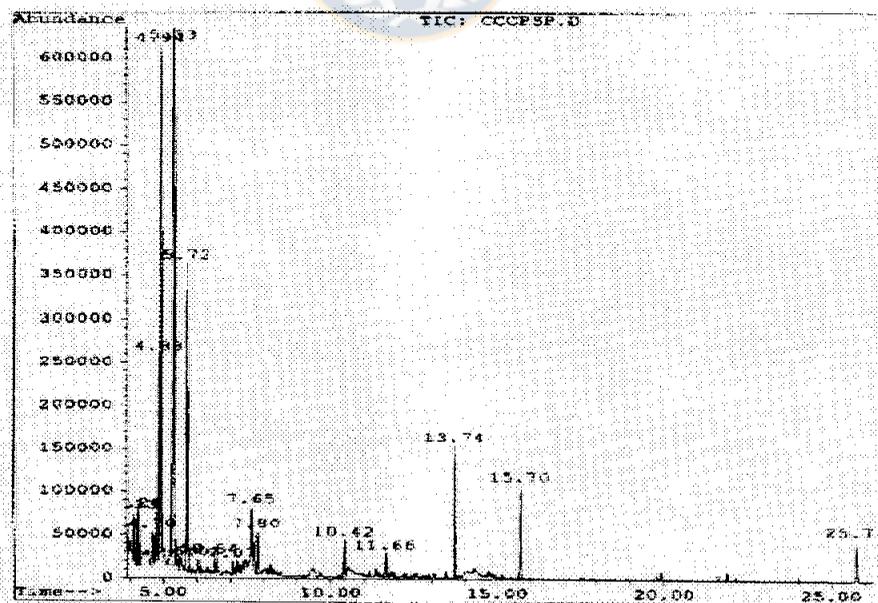


Figura 6A: Cromatograma de gases acoplado a espectrómetro de masas, hidrolizado de la corteza de *S.viminalis*, procedencia Concepción.

Tabla 5A: Media y desviación estándar para las muestras de madera y corteza libre de extraíbles en base seca, de *Salix viminalis* en todas las procedencias.

Procedencias	Lignina Soluble		Lignina Klason		Celulosa	
	\bar{X}	$s_{\bar{x}}$	\bar{X}	$s_{\bar{x}}$	\bar{X}	$s_{\bar{x}}$
CHIM (M)	3,7	0,0682	14,5	0,3042	51,8	0,0682
CHIM (C)	3,8	0,1542	23,4	0,2541	39,1	0,0595
CCP (M)	2,9	0,0675	15,7	0,0901	51,1	0,2899
CCP (C)	3,0	0,0559	24,1	0,3240	38,9	1,5839
ANG (M)	3,2	0,0874	16,8	0,2874	50,1	0,0486
ANG (C)	3,4	0,0486	24,3	0,7541	40,0	0,1547
COY (M)	2,4	0,4066	17,8	0,2131	49,8	1,9798
COY (C)	3,4	0,0439	26,5	0,6316	33,9	0,1909

