

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**DIRECCIÓN DE POSTGRADO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE *Pinus radiata* D. Don**

**POR: EDGARDO ANTONIO ARAQUE VIVAS**

**Tesis para optar al Grado  
Académico de Doctor en  
Ciencias Forestales**

**CONCEPCIÓN – CHILE**  
**2008**

## RESUMEN TESIS

El bioetanol es el biocombustible renovable para automóviles más ampliamente utilizado, es obtenido por fermentación de azúcares, provenientes ya sea, de biomasa azucarada, o de hidrolizados de almidones o materiales lignocelulósicos y su uso es una manera de reducir el consumo de petróleo, así como disminuir la contaminación ambiental.

Las tecnologías para convertir la biomasa lignocelulósica a bioetanol están bajo un intenso desarrollo y aún no han demostrado su potencialidad de comercialización. Para producir bioetanol de biomasa forestal es necesario un pretratamiento de la materia prima de manera de solubilizar la lignina y modificar la estructura de las hemicelulosas, y posteriormente la fracción de celulosa debe ser hidrolizada por ácidos o enzimas en glucosa la que es fermentada a bioetanol.

La selección de madera blanda de *P. radiata* D. Don como materia prima para esta investigación se realizó por dos razones: por poseer un porcentaje mayor de hexosas, azúcares susceptibles de fermentar sin tener que utilizar organismos genéticamente modificados, necesarios para la fermentación de las pentosas, y por ser la especie más plantada en Chile con aproximadamente 1,5 millones de hectáreas las cuales capturan anualmente ~ 13,5 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>. En la presente investigación se optimizó las condiciones del pretratamiento organosolvente usando como variables: tiempo, temperatura, pH y concentración del solvente (acetona:agua). Una vez realizado el pretratamiento de la madera, los sustratos obtenidos fueron lavados con abundante agua y sometidos a un proceso de hidrólisis enzimática (HE), utilizando exo, endo glucanasasas y beta-

glucosidasas a temperaturas de 50°C. Para la fermentación de los hidrolizados es necesario el uso de levaduras que se encargan de transformar los azúcares libres en bioetanol.

En los estudios preliminares de esta investigación se obtuvo bioetanol por sacarificación y fermentación simultánea (SFS) a 35°C utilizando astillas de *P. radiata* (14 años) pretratado por dos procesos diferentes: (a) por explosión a vapor por 5 min. con impregnación en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido a temperaturas entre 190 a 210°C y (b) por cocción en un reactor Parr a 210°C por 5 min. con una mezcla de agua: acetona (80:20 v/v). Los rendimientos en fracción sólida (fs) obtenido por el pretratamiento (a) fueron de 37% base madera seca (b.m.s), mientras que para el pretratamiento (b) fue de 73%. Se llevó a cabo la SFS de las fracciones fs-a y fs-b utilizando enzimas comerciales (Celluclast 1.5L y Novozyme 188) en combinación con levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose un rendimiento de etanol en los procesos (a) y (b) de 11% y 12% b.m.s., respectivamente. El rendimiento de bioetanol aumento de 11% a 28% cuando la fracción fs-a se sometió a una etapa de deslignificación con NaOCl<sub>2</sub> a 70°C antes de la SFS. De estos resultados, se concluyó que las etapas del proceso que deben ser optimizadas son principalmente las del pretratamiento del material, la hidrólisis enzimática de los sustratos, así como contar con un microorganismo que pueda fermentar a temperaturas mayores de 35°C.

Las levaduras *S. cerevisiae* normalmente utilizadas tienen una temperatura óptima de producción de bioetanol entre 25-35°C, contar con cepas adaptadas a temperaturas altas es indispensable cuando se quiere realizar SFS de los sustratos

lignocelulósicos. En esta investigación se realizó un tratamiento térmico de adaptación de las levaduras a temperaturas superiores a 35 °C para la producción de etanol. Se logró obtener una cepa de *S. cerevisiae* (IR2-9a) capaz de crecer y producir bioetanol a 40°C utilizando sustratos lignocelulósicos de *P. radiata*.

La *S. cerevisiae* (IR2-9a) fue obtenida después de un tratamiento térmico de aclimatación progresiva. Esta cepa fue evaluada a 40°C con sustratos optimizados del pretratamiento organosolvente de astillas de madera de *P. radiata* acetona:agua de 50:50% v/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% y usando como parámetro de severidad del proceso el factor H (el cual es la relación de tiempo y temperatura como una sola variable). Los mejores rendimientos de etanol obtenidos fueron a las condiciones de valores de factor H entre 2500 a 3000 (190 a 195°C y 10 a 25 min), tanto para la HE como para SFS. Los rendimientos de bioetanol alcanzados con los mejores sustratos están sobre 98 %, haciendo del *P. radiata* una fuente alternativa renovable para la producción de bioetanol en Chile.

## ABSTRACT

Bioethanol is the most widely used renewable biofuel for automobiles. It is obtained by sugar fermentation, either from sweetened biomass, starch hydrolysates or lignocellulose materials and its use is one way of reducing oil consumption as well as cutting environmental pollution.

The technologies to convert lignocellulose biomass to bioethanol are being intensely developed and have not yet shown their marketing potential. To produce bioethanol from forest biomass, the raw materials need to be pre-treated in order to solubilize the lignin and modify the structure of the hemicelluloses; then the cellulose fraction must be hydrolyzed by acids or enzymes in glucose, which is fermented into bioethanol.

Soft wood from *P. radiata* D. Don as the raw material for this investigation was selected for two reasons: to have a higher percentage of hexoses – sugars capable of fermenting without having to use genetically modified organisms – which are necessary to ferment pentoses, and because it is the most planted species in Chile, with approximately 1.5 million hectares that annually capture ~ 13.5 million tons of CO<sub>2</sub>. In this study, the organosolvent pre-treatment conditions were optimized using time, temperature, pH and solvent concentration (acetone:water) as variables. Once the wood had been pre-treated, the substrates obtained were washed extensively with water and subjected to an enzymatic hydrolysis (EH) process using exo- and endoglucanases and beta-glucosidases at temperatures of 50°C. For the fermentation of the hydrolysates, yeast must be used to transform the free sugars into bioethanol.

In the preliminary studies of this investigation, bioethanol was obtained by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at 35°C using chips of *P. radiata* (14 years) pre-treated by two different processes: (a) vapor explosion for 5 min with impregnation in diluted H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at temperatures between 190 to 210°C and (b) cooking in a Parr reactor at 210°C for 5 min with a water:acetone mixture (80:20 v/v). The yields in solid fraction (sf) obtained by pre-treatment (a) were 37% dry wood base (b.d.w.), while for pre-treatment (b) it was 73%. SSF of the sf-a and sf-b fractions was carried out using commercial enzymes (Celluclast 1.5L and Novozyme 188) in combination with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, achieving an ethanol yield in processes (a) and (b) of 11% and 12% b.d.w., respectively. The bioethanol yield increased from 11% to 28% when the sf-a fraction was subjected to a delignification stage with NaOCl<sub>2</sub> at 70°C prior to SSF. From these results, it was concluded that the stages of the process that must be optimized are mainly those of the pre-treatment of the material, the enzymatic hydrolysis of the substrates and the acquisition of a microorganism that can ferment at temperatures higher than 35°C.

*S. cerevisiae* yeasts used normally have an optimal bioethanol production temperature between 25 and 35°C. Having strains adapted to high temperatures is crucial if SSF of lignocellulose substrates is desired. In this investigation, a heat treatment was performed at temperatures higher than 35°C to adapt the yeasts for ethanol production. A strain of *S. cerevisiae* (IR2-9a) obtained was able to grow and produce bioethanol at 40°C using lignocellulose substrates from *P. radiata*.

The *S. cerevisiae* (IR2-9a) was obtained after a heat treatment of progressive acclimatization. This strain was evaluated at 40°C with optimized substrates of the organosolvent pre-treatment of *P. radiata* wood chips, 50:50% v/v acetone:water, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and using the H factor as a process severity parameter (which is the relation of time and temperature as one single variable). The best ethanol yields obtained were with H factor values between 2500 and 3000 (190 to 195°C and 10 to 25 min), both for EH and SSF. The bioethanol yields achieved with the best substrates are over 98%, thus making *P. radiata* an alternative renewable source for the production of bioethanol in Chile.

