



Universidad de Chile

# Uso de líquidos iónicos en el pretratamiento de material lignocelulósico para la producción de bioetanol de segunda generación

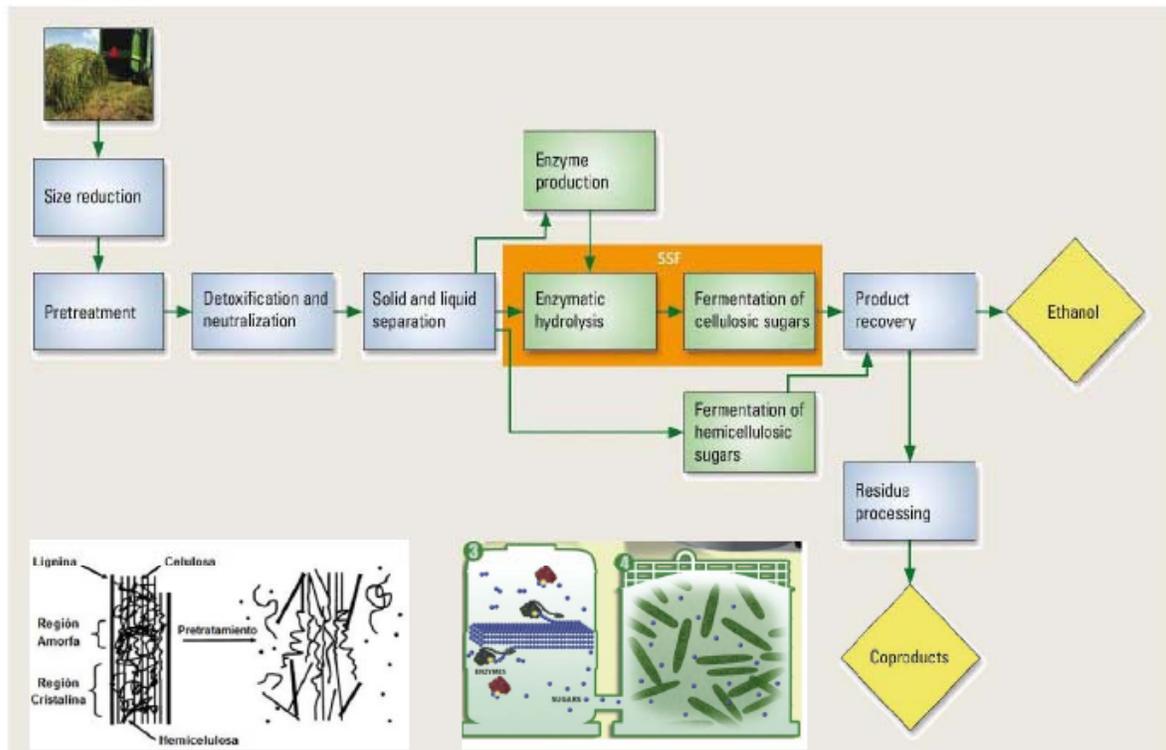
**V. Cortínez<sup>1</sup>, R. Pezoa<sup>1</sup>, O.Salazar<sup>1</sup>, A.García<sup>2</sup>, R. Carmona<sup>3</sup>, M.E. Lienqueo<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología

<sup>2</sup>Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales  
Universidad de Chile

# Producción de bioetanol lignocelulósico



## Líquidos Iónicos (ILs)



- Son sales orgánicas que permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, incluida la temperatura ambiente.
  - [bmin<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]
  - [emin<sup>+</sup>][OAc<sup>-</sup>]
- Las propiedades físicas y químicas son función del tipo del catión y del anión.
- Propiedades:
  - Puntos de fusión < 100°C
  - Presión de vapor baja (no se evaporan y no son inflamables)
  - Estabilidad térmica, en muchos casos supera los 300°C
  - Alta viscosidad en comparación a los solventes orgánicos  
BMIMBF [19,6 cP a258°C] > ethylene glycol [16 cP] > agua [0,9cP] >metanol [0,5cP]
- Anión y catión dan alta especificidad.

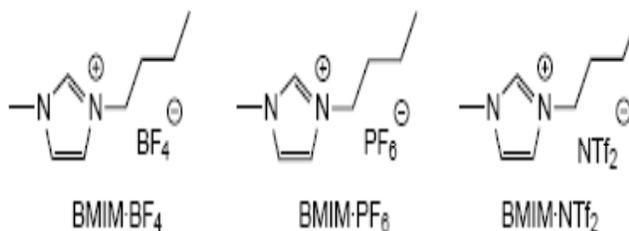
# Composición y propiedades de los IL

## Constitución

- Iones asimétricos
- Gran tamaño
- **Cationes** orgánicos
  - Derivados del imidazol, piridina, iones amonio o fosfonio
- **Aniones** son orgánicos e inorgánicos.
  - tetrafluoroborato (BF<sub>4</sub>-),
  - hexafluorofosfato (PF<sub>6</sub>-) o hexafluoroarseniato
  - Trifluoroacetato
  - Trifluorosulfonato o triflato
  - Bis- trifluorosulfonilimida o bistriflimida

## ANIONES TÍPICOS DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CF <sub>3</sub> -COO <sup>-</sup>
PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	CF <sub>3</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (Triflato)
AsF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	(CF <sub>3</sub> -SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sup>-</sup> (Bistriflimida)



Current Opinion in Biotechnology

# Composición y propiedades de los IL

Los IL son solubles e insolubles en agua

Los IL son polares

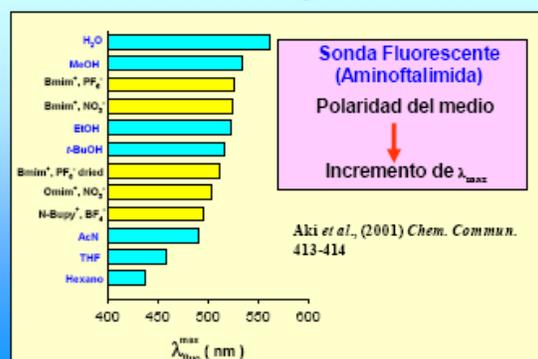
## SOLUBILIDAD DEL H<sub>2</sub>O EN LÍQUIDOS IÓNICOS A 20 °C (% w/w)

CATION	ANIÓN	
	Triflato <sup>-</sup>	Bistriflimida <sup>-</sup>
1-Me-3-Me-Im <sup>+</sup> (Mmim <sup>+</sup> )	Miscible	2,5
1-Et-3-Me-Im <sup>+</sup> (Emim <sup>+</sup> )	Miscible	1,4
1-Bu-3-Me-Im <sup>+</sup> (Bmim <sup>+</sup> )	Miscible	1,3
1-Et-3-Et-Im <sup>+</sup> (Eeim <sup>+</sup> )	Miscible	2,0
1-Bu-3-Et-Im <sup>+</sup> (Beim <sup>+</sup> )	--	1,3

Bonhôte *et al.*, (1996). *Inorg. Chem.*, 35, 1168-1178

<http://pb.merck.de/servlet/PB/menu/1430200/index.html>

## POLARIDAD DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

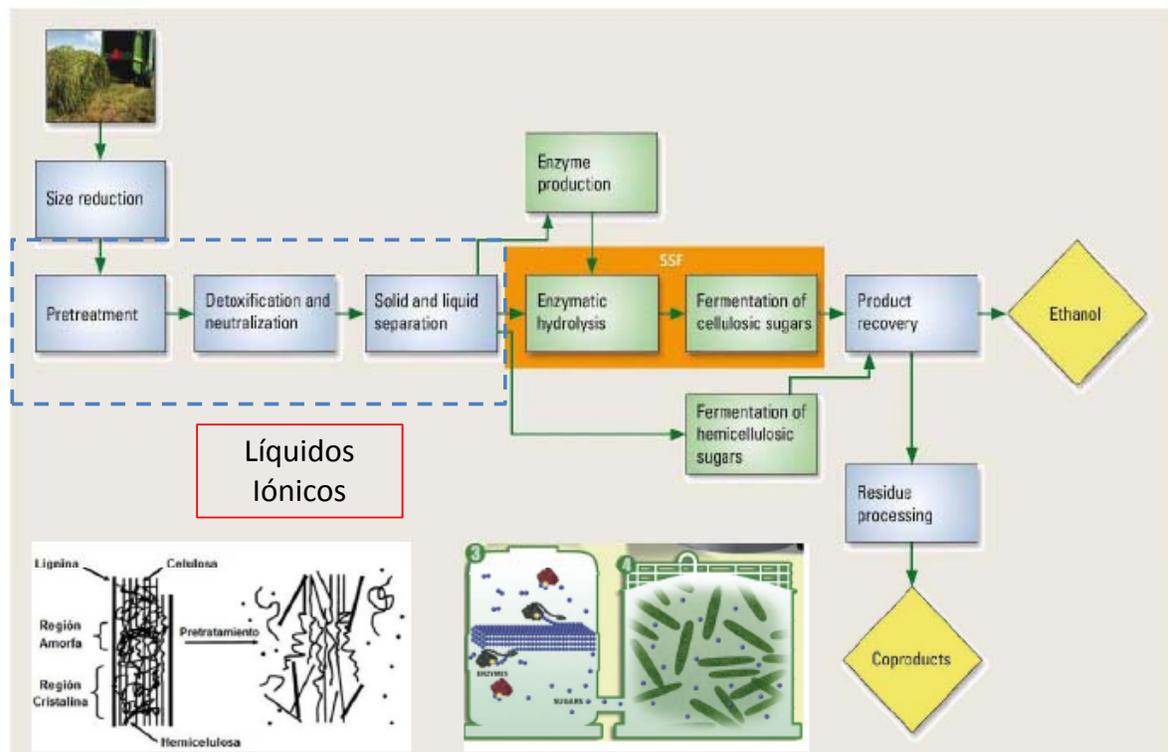


Los IL son polares pero no desactivan las enzimas

## ¿ Por qué nos interesan?

- Utilizados principalmente para catalizar reacciones, aunque también se usan en sistemas de extracción y hasta en astronomía
- **ALTO PODER DISOLVENTE DE DISTINTAS MATERIAS ORGÁNICAS E INORGÁNICAS** (carbón, plásticos y metales)
  - Celulosa altamente soluble en  $[\text{bmin}^+][\text{Cl}^-]$  y  $[\text{emin}^+][\text{OAc}^-]$

## Producción de bioetanol lignocelulósico



## IL y enzimas

### No todos los IL son propicios

- Enzimas son activas con los aniones  $\text{BF}_4$ ,  $\text{BF}_6$ ,  $\text{NTf}_2$
- Enzimas no son activas con  $\text{Cl}$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{CF}_3\text{O}_3$ , trifluoracetato.
- Razón: los puentes de hidrógenos débiles minimizan la interferencia con puentes de hidrógenos internos de la enzima

### Limitaciones: Celulosa

- Celulosa se disuelve en  $[\text{Bmim}]\text{Cl}$  sobre 25% en peso, pero no en  $[\text{Bmim}]\text{BF}_4$  o  $[\text{Bmim}]\text{PF}_6$
- Esto se debe a la formación del puente de hidrógeno entre el cloro y la celulosa y otros carbohidratos a altas temperaturas

## IL y Celulosa

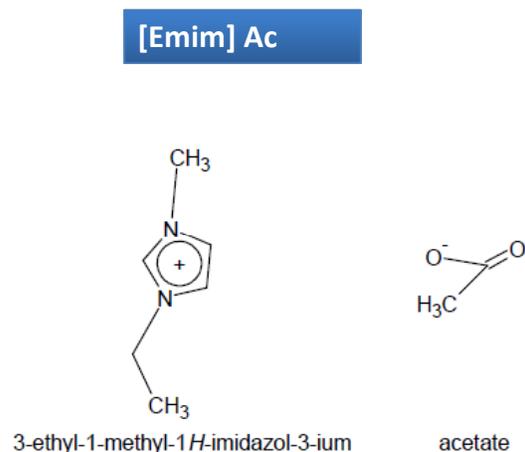
- IL con anión Cl, son capaces de disolver hasta un 10%w/t distintos tipos de celulosa (cristalina y amorfa) bajo calor.
- Investigaciones sugieren una regeneración (lavado) de la celulosa desde soluciones con IL aumentan la sacarificación versus sustratos no tratados. → usar IL como una alternativa de solventes no volátiles para el pretratamiento.

## IL y Celulosa

- Estos estudios están limitados a 2 cationes:
  - **([Bmim]Cl) Cloruro de 1-butil-3-metilimidazoli**  
(corrosivo, tóxico)
  - **([Amim]Cl) Cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio**  
(viscoso y reactivo)

## Disolución de celulosa...

- Acetato de 3-etil-1-metilimidazolio
- Conversión > 95% en azúcares reductores, posterior a hidrólisis enzimática (H.E.)
- 2,0 %w/v de celulosa en ILs a 110°C, 15 min.
- Tiempo H.E.: 24 h
  - 6 h >95% conversión



Zhao et al. "Regenerating Cellulose from Ionic Liquids for Accelerated Enzymatic Hydrolysis", 2008

## Hipótesis de trabajo

Ellos pueden ser agente adecuados para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol.

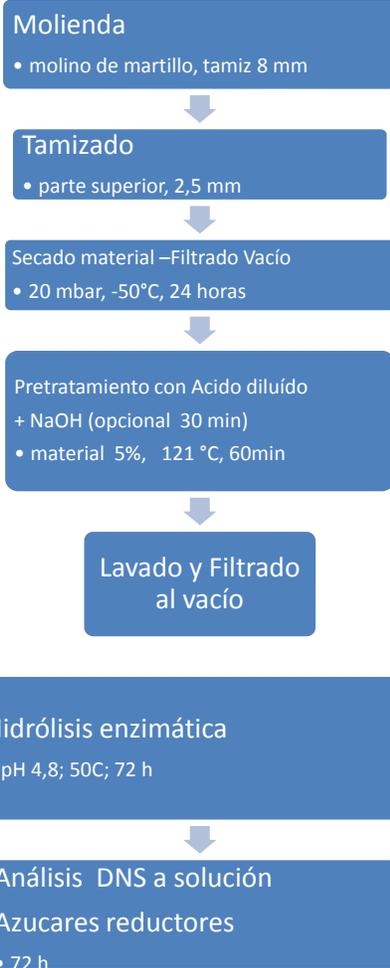
Materiales  
 Y  
 Métodos

# Materiales

- **Materiales lignocelulósicos:**
  - Residuos Lengua (*Nothofagus pumilio*)
  - Residuos de eucalitus
  - Rastrojos de trigo
  - Rastrojos de maíz
- **ILs**
  - IL1 (sin Cl<sup>-</sup>)
  - IL2 (con Cl<sup>-</sup>)
- **Acido diluído**
- **NaOH**
- **Celulasas Comerciales**

## METODOLOGIA

Metodología con Acido Diluido 0,75% + NaOH (opcional) y medición de azúcares por ensayos de DNS



Metodología con **IL 1** y  
medición de azúcares por  
ensayos de DNS

**Molienda**  
• molino de martillo, tamiz 8 mm (partículas tamaño inf)

**Tamizado**  
• parte superior, 2,5 mm

**Secado material –Filtrado Vacío**  
• 20 mbar, -50°C, 24 horas

**Pretratamiento con ILs**  
• material 5% , 121 °C, 60min

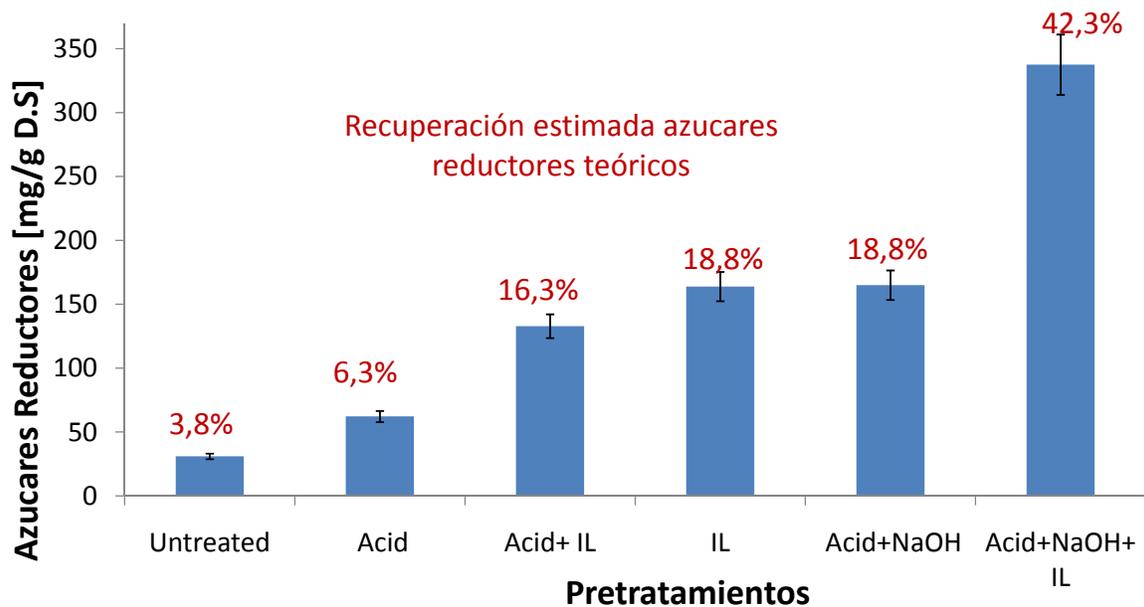
**Lavado y Filtrado  
al vacío**

**Hidrólisis enzimática**  
• pH 4,8; 50C; 72 h

**Análisis DNS a solución  
Azúcares reductores**  
• 72 h

# RESULTADOS

## Comparación de pretratamientos para Lenga después de la Hidrólisis Enzimática



T: 121°C, 60 min acido , 30 min NaOH, 60 min ILs

Metodología con **IL2 (con Cl<sup>-</sup>)**  
y medición de azúcares por  
GC

**Molienda**

- molino de martillo, tamiz 8 mm (partículas tamaño inf)

**Tamizado**

- parte superior, 2,5 mm

**Secado material –Filtrado Vacío**

- 20 mbar, -50°C, 24 horas

**Pretrat. LI**

- material 5,0% p/p, T1 121 y T3, 30 y 60 min

**Lavado y Filtrado al vacío**

**Hidrólisis enzimática**

- pH 4,8; 46°C; 72 h
- celulasa: 0,36 mL/g material inicial
- celobiasa: 0,05 mL/g material inicial

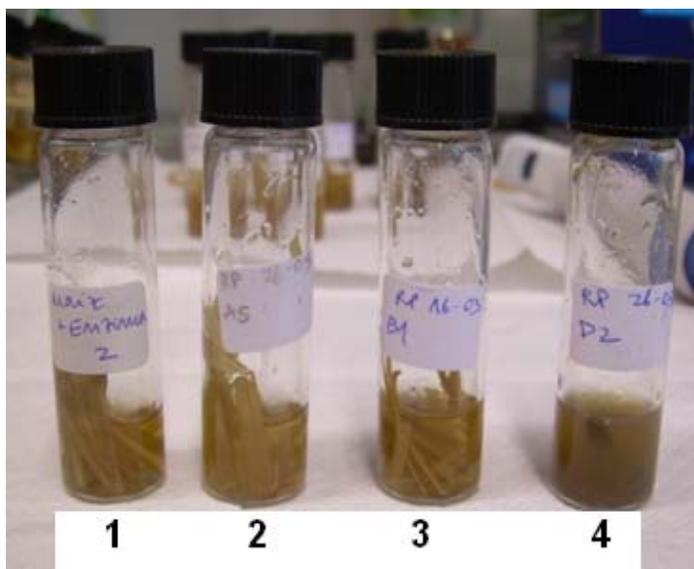
**Análisis GC a solución**

- 6, 24, 48 y 72 h
- sililación de las muestras, peaks azúcares

Sililación: se reemplazan los grupos hidroxilos de los azúcares por esteres, haciendo que estos se volatilicen a más bajas temperaturas

# Tratamiento residuos Agrícolas

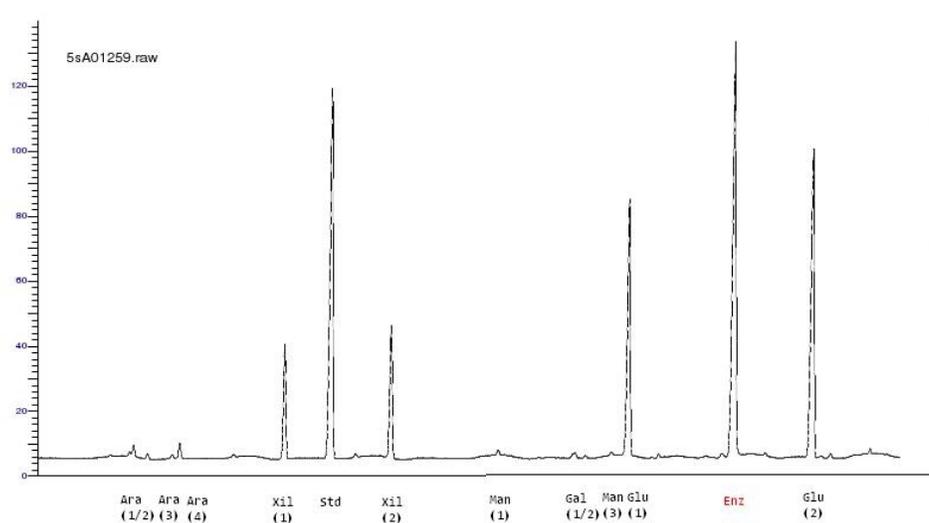
## Hidrólisis de los residuos de Maíz



- 1.- Material + enzimas 72 horas;
- 2 - Material pretratado con IL2 por 1 hora a T1;
- 3.- Material pretratado con IL2 por 1 hora a 121°C;
- 4 - Material pretratado con IL2 por 1 hora a T3.

T1 < 121°C < T3

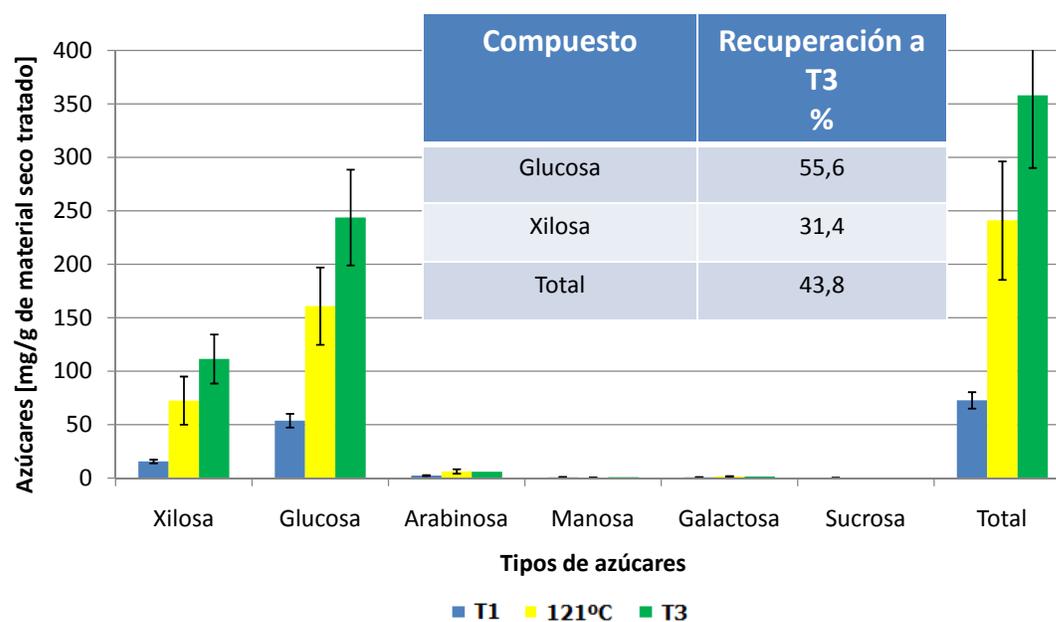
## Cromatograma de los azúcares condiciones a las 72 h



Residuos de maíz a T3 por 60 min con IL2  
H.E. 72 h

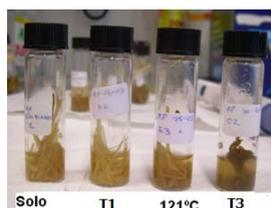
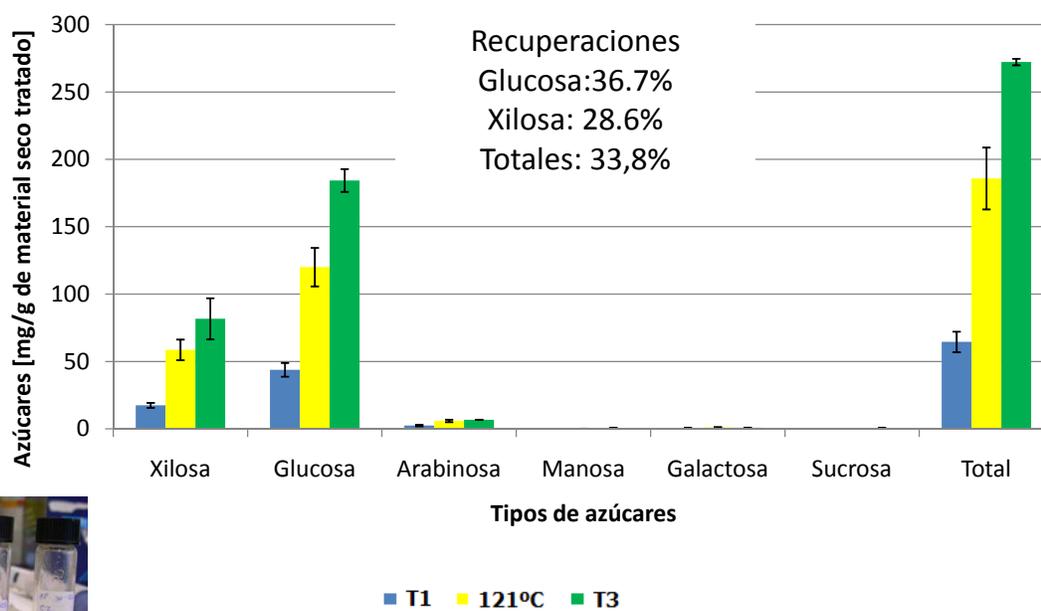
# Pre-tratamiento residuos de Maíz

Azúcares obtenidos para 72 h de hidrólisis enzimática previo tratamiento con IL2 a distintas temperaturas



# Tratamiento residuos de Trigo

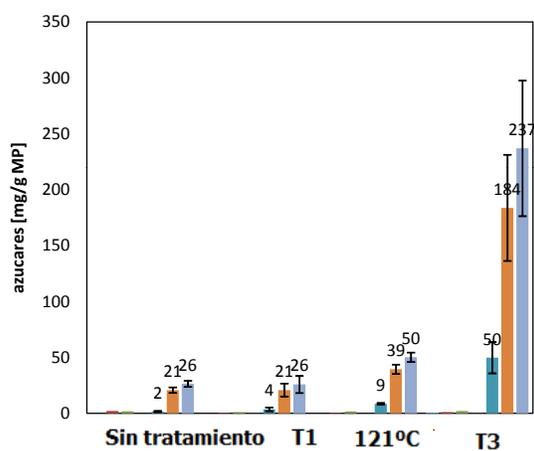
Azúcares obtenidos para 72 h de hidrólisis enzimática previo tratamiento con IL2 a distintas temperaturas por 60 min



# Tratamiento residuos Forestales

# Tratamiento residuos Eucaliptus

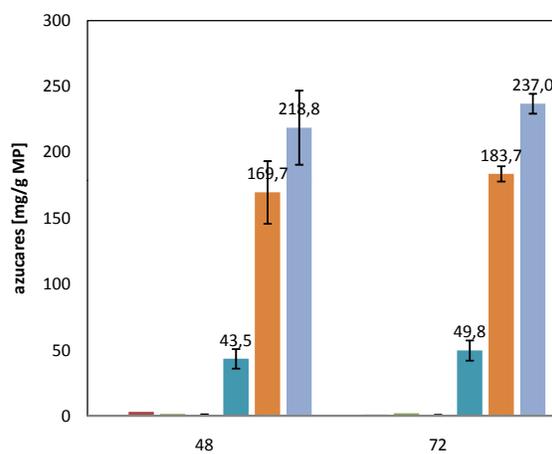
### Hidrólisis enzimática de eucaliptus a 72 horas



Temperatura del tratamiento con H 2

- Fructosa
- Manosa
- Galactosa
- promedio
- Xylosa
- Glucosa
- azucres totales

### Hidrólisis enzimática de eucaliptus a T3

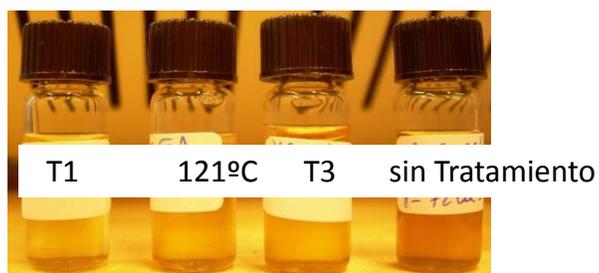


Tiempo Hidrolisis Enzimática [horas]

- Fructosa
- Manosa
- Galactosa
- Sucrosa
- Xylosa
- Glucosa
- azucres totales

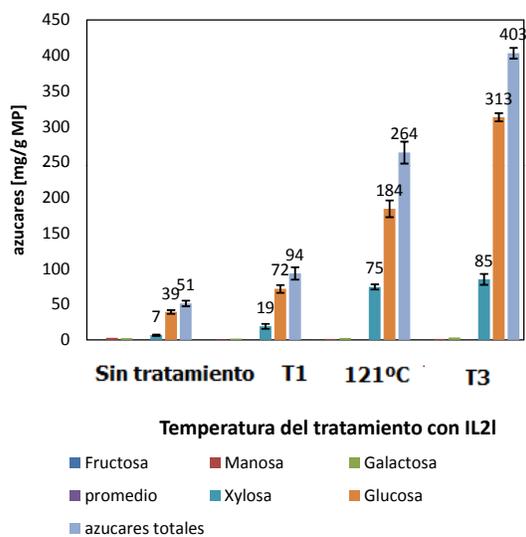
## Recuperación de azúcares en Eucaliptus

Compuesto	Residuos	Recuperación a T3 con hidrólisis de 48 h %
Glucosa	670 mg/g	25,3
Xilosa	150 mg/g	29,0
Totales	820 mg/g	26,7

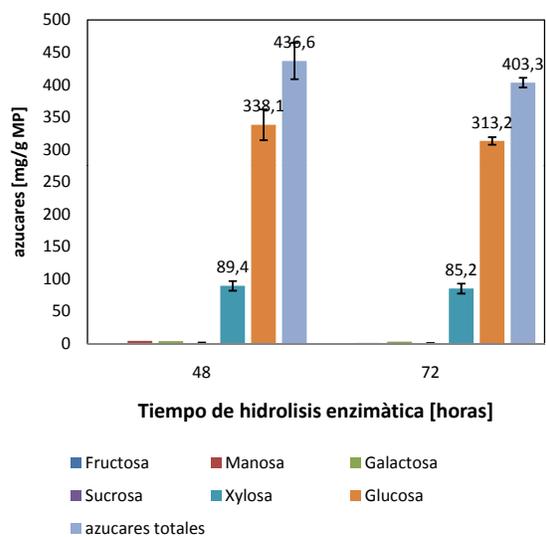


# Tratamiento residuos Lengua

## Hidrólisis enzimática de lenga a 72 horas

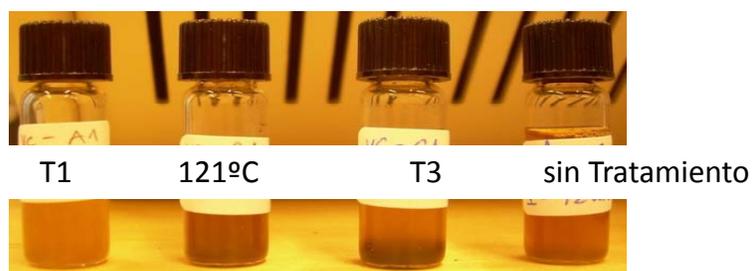


## Hidrólisis enzimática de lenga a T3

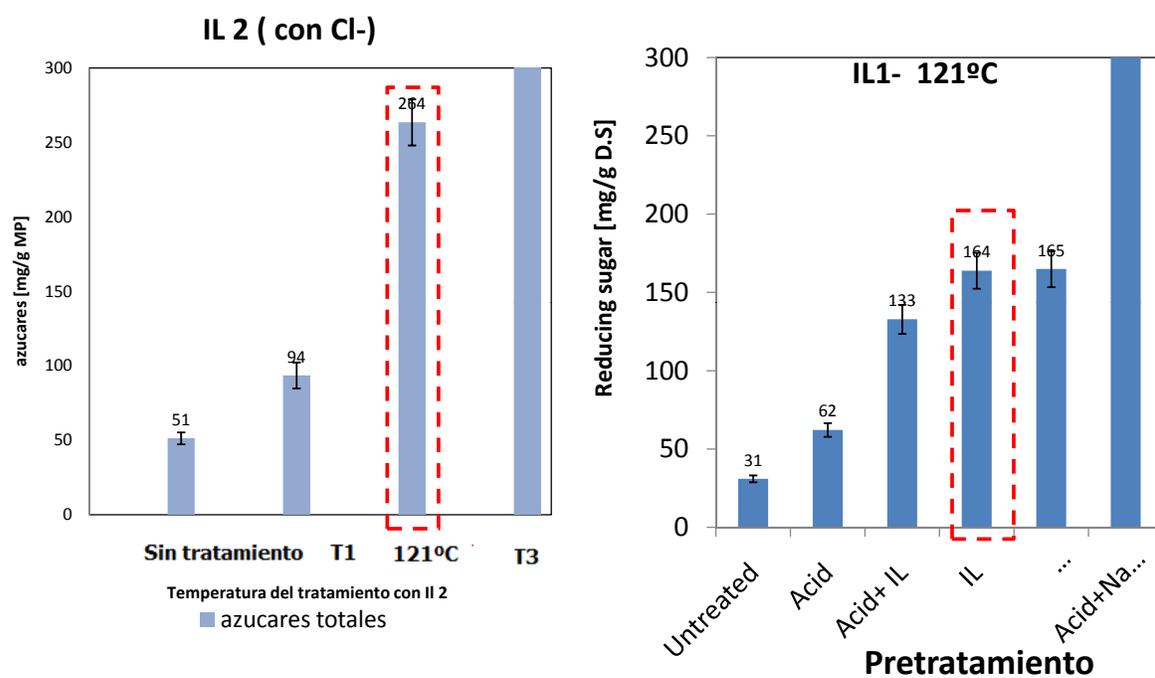


## Recuperación en Lengua

Compuesto	Residuos	Recuperación a T3 por 48 h %
Glucosa	700 mg/g	48,3
Xilosa	100 mg/g	82,4
Totales	800 mg/g	54,6



## Comparación de IIs en Lengua



## Conclusiones

1. Los ILs son una alternativa factible para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos
2. Lenga y Maíz son los materiales lignocelulósicos que presentan mejores niveles de liberación de azúcares totales (glucosa y xilosa) luego del pretratamiento con ILs.
3. IL2 (con Cl<sup>-</sup>) presenta mejores niveles de liberación de azúcares totales que **IL1**.
4. Hay que seguir estudiando los posibles efectos de los ILs en la fermentación.

# Agradecimiento



Conicyt Programa- Bicentenario

Chile- Finlandia **CCF05**

Prof. J.P. Mikkola

Prof. Dmitry Murzin

Sari Hyvarinen

Åbo Akademi University Turku/Åbo

Prof Carlos Carlesi de la Universidad Católica de Valparaíso por la donación de IIs.

# ¿Consultas?

