



Universidad de Chile

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

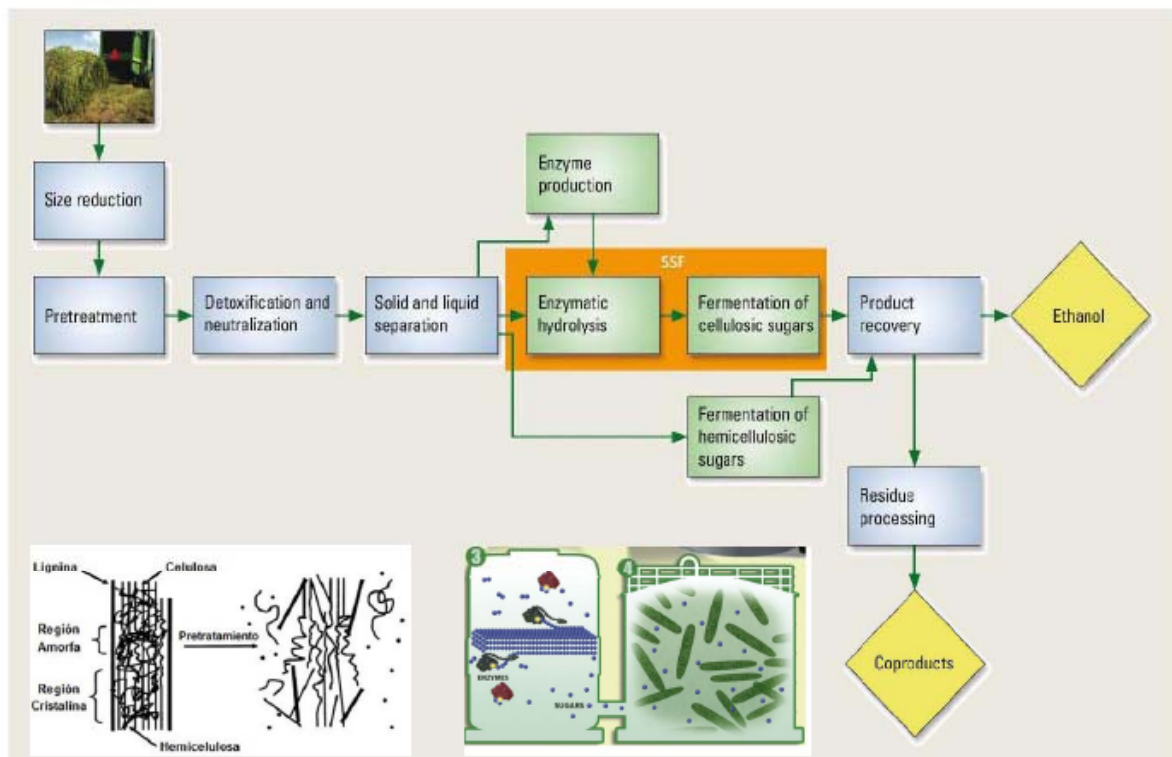
V. Cortínez¹, R. Pezoa¹, O.Salazar¹, A.García², R. Carmona³, M.E. Lienqueo¹.

¹Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología

²Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo

³Departamento 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⁺][Cl⁻]
 - [emin⁺][OAc⁻]
- 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 a 258°C] > ethylene glycol [16 cP] > agua [0,9cP] > metanol [0,5cP]
- Anión y catión dan alta especificidad.

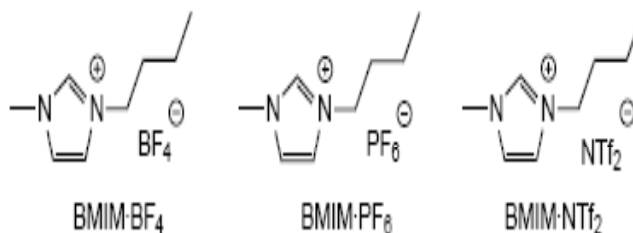
Composición y propiedades de los IL

Constitución

- Iones asimétricos
- Gran tamaño
- **Cationes** orgánicos
 - Derivados del imidazol, piridina, iones amonio o fosfonio
- **Aniones** son orgánicos e inorgánicos.
 - tetrafluoroborato (BF₄-),
 - hexafluorofosfato (PF₆-) o hexafluoroarseniato
 - Trifluoroacetato
 - Trifluorosulfonato o triflato
 - Bis- trifluorosulfonilimida o bistriflimida

ANIONES TÍPICOS DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

BF ₄ ⁻	CF ₃ -COO ⁻
PF ₆ ⁻	CF ₃ -SO ₃ ⁻ (Triflato)
AsF ₆ ⁻	(CF ₃ -SO ₂) ₂ N ⁻ (Bistriflimida)



Current Opinion in Biotechnology

Composición y propiedades de los IL

Los IL son solubles e insolubles en agua

Los IL son polares

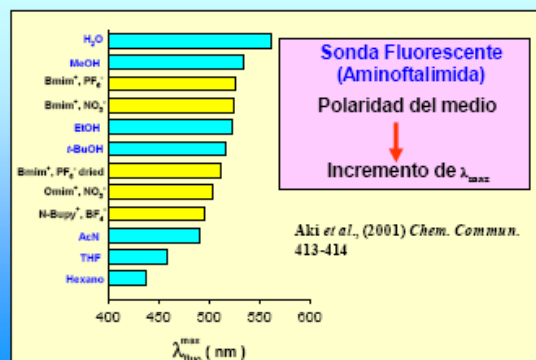
SOLUBILIDAD DEL H₂O EN LÍQUIDOS IÓNICOS A 20 °C (% w/w)

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

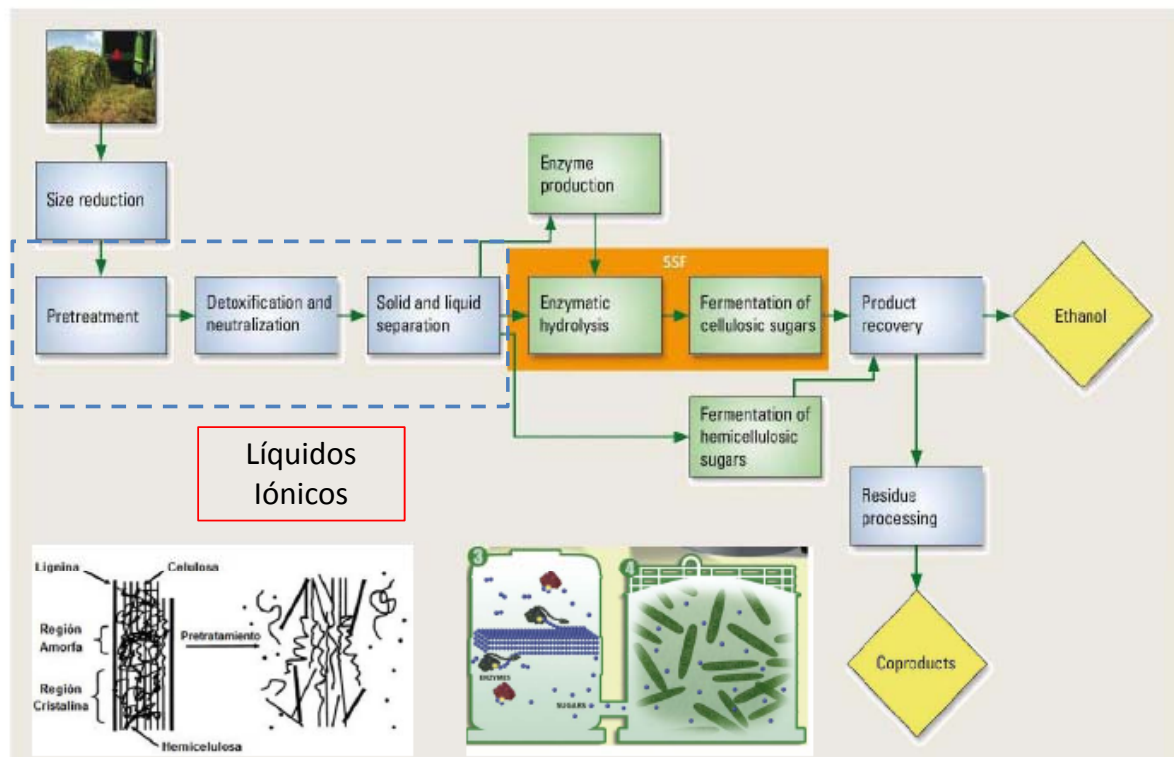


Los IL son polares pero no desactivan las enzimas

¿ 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 BF_4 , BF_6 , NTf_2
- Enzimas no son activas con Cl , NO_3 , CF_3O_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

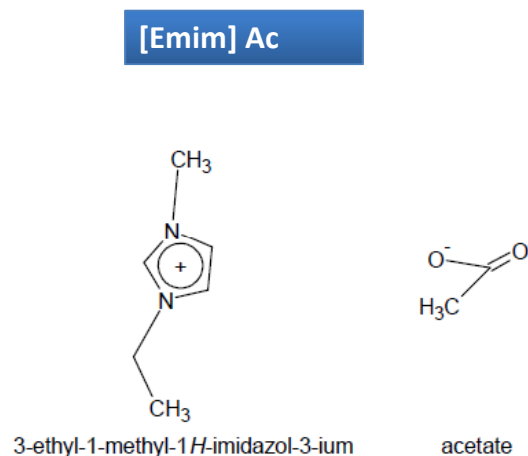
- IL con anión Cl, son capaces de disolver hasta un 10%w/t distintos tipos de celulosa (cristalina y amorfa) bajo calor.
- Investigaciones sugieren una regeneración (lavado) de la celulosa desde soluciones con IL aumentan la sacarificación versus sustratos no tratados. → usar IL como una alternativa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

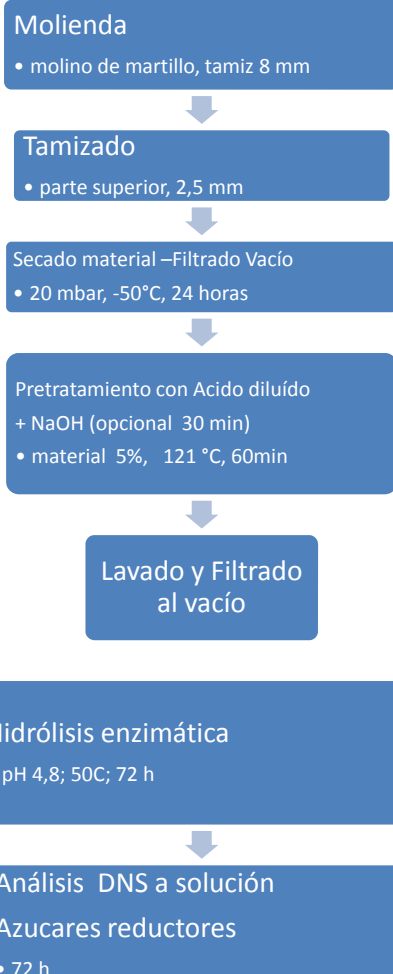
Materiales
 Y
 Métodos

Materiales

- **Materiales lignocelulósicos:**
 - Residuos Lengua (*Nothofagus pumilio*)
 - Residuos de eucalitus
 - Rastrojos de trigo
 - Rastrojos de maíz
- **ILs**
 - IL1 (sin Cl⁻)
 - IL2 (con Cl⁻)
- **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

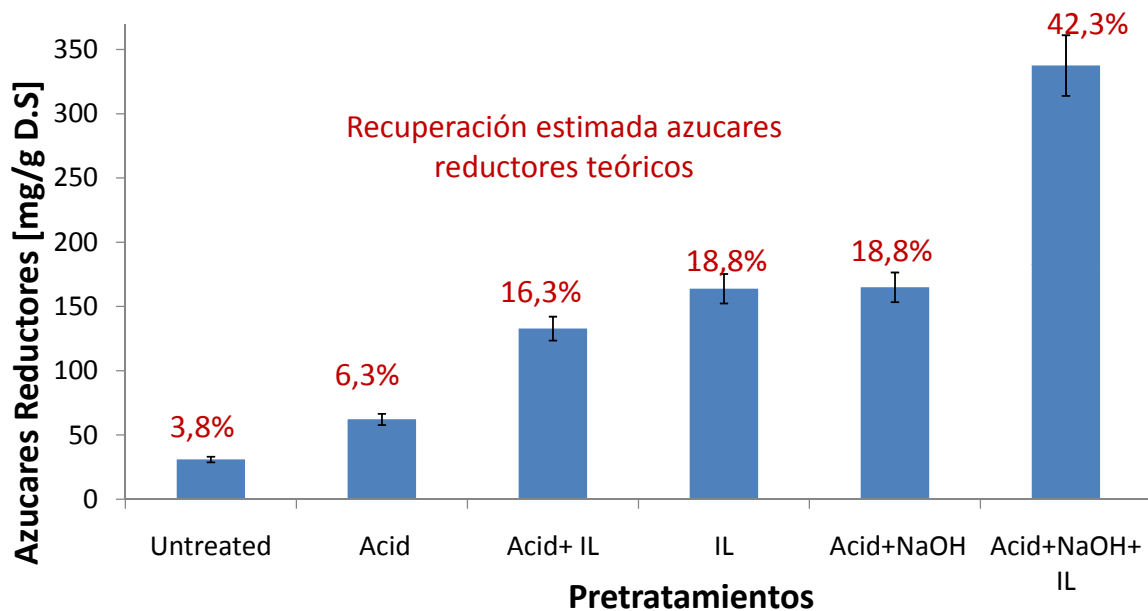
**Lavado y Filtrado
al vacío**

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⁻)**
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

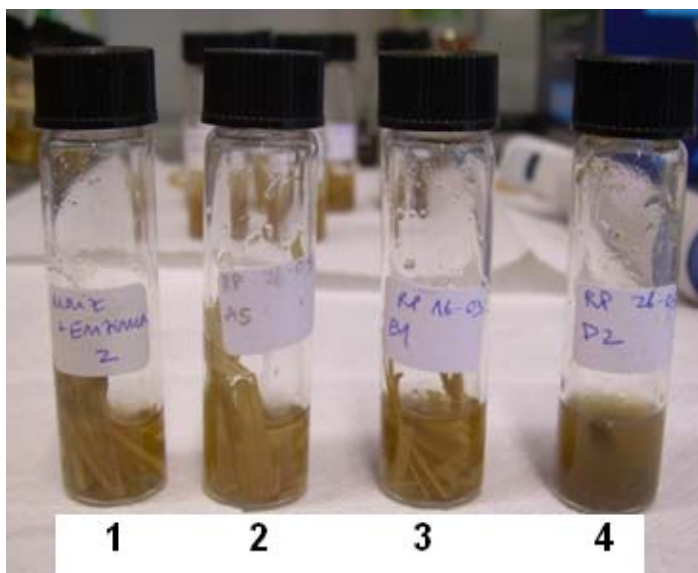
Análisis GC a solución

- 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

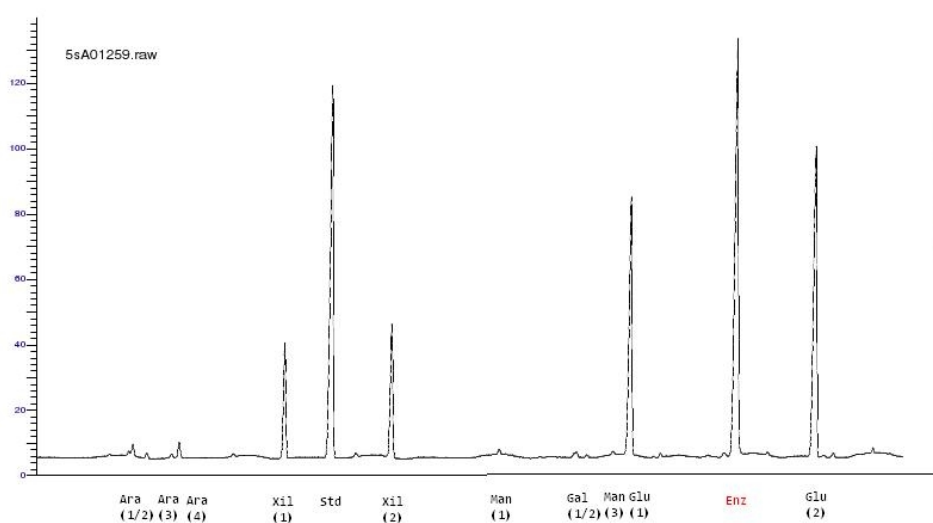
Hidrólisis de los residuos de Maíz



- 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

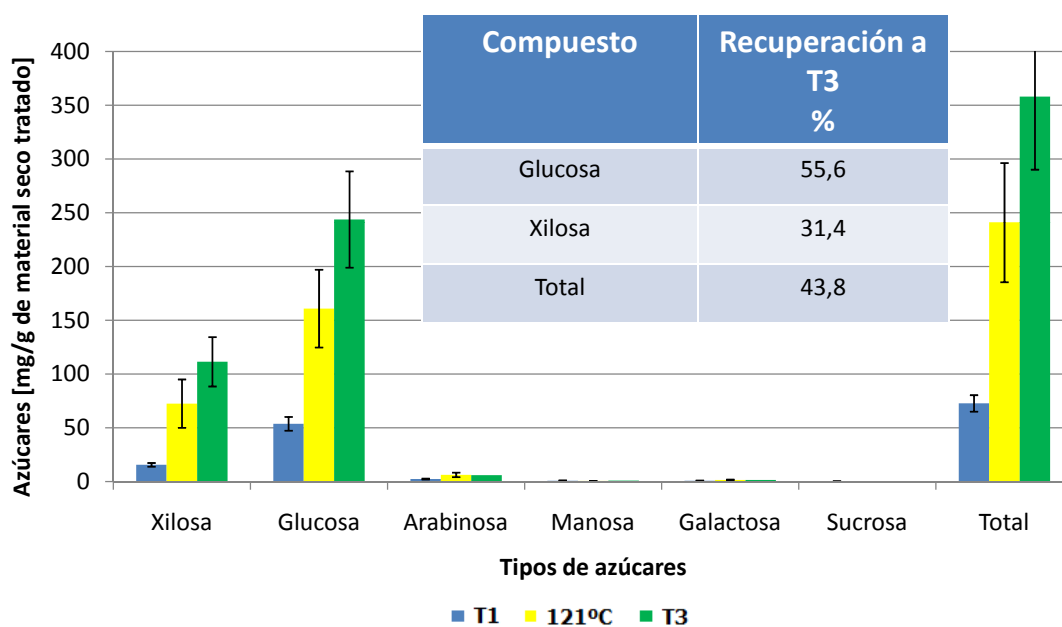
Cromatograma de los azúcares condiciones a las 72 h



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

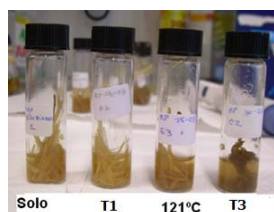
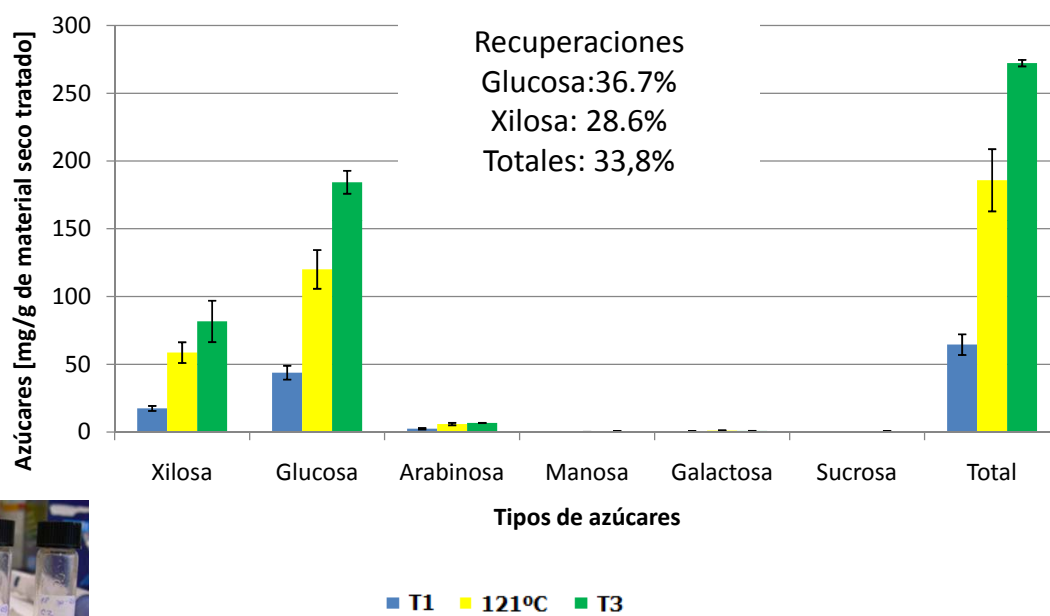
Pre-tratamiento residuos de Maíz

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



Tratamiento residuos de Trigo

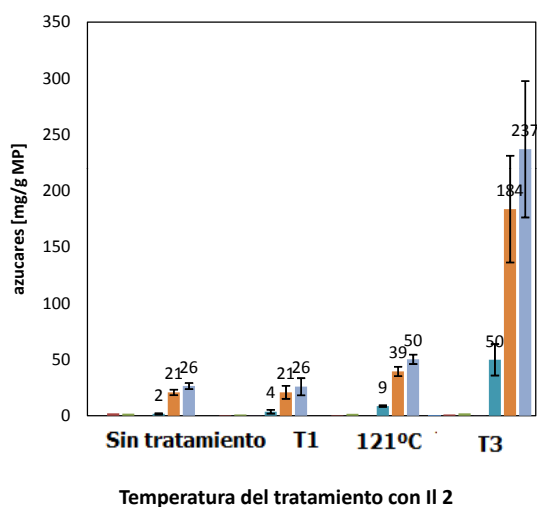
Azúcares obtenidos para 72 h de hidrólisis enzimática previo tratamiento con IL2 a distintas temperaturas por 60 min



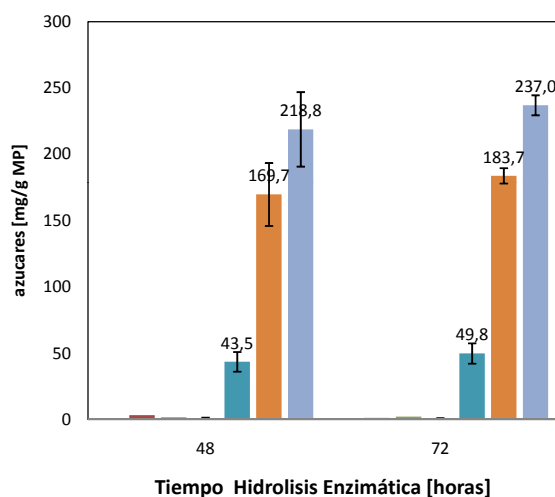
Tratamiento residuos Forestales

Tratamiento residuos Eucaliptus

Hidrólisis enzimática de eucaliptus a 72 horas



Hidrólisis enzimática de eucaliptus a T3

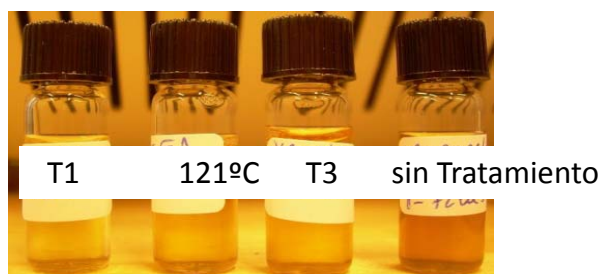


■ Fructosa
■ Manosa
■ Galactosa
■ promedio
■ Xylosa
■ Glucosa
■ azucres totales

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

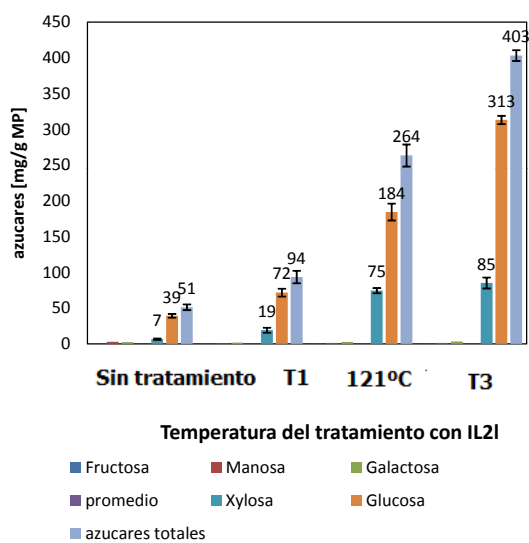
Recuperación de azúcares en Eucaliptus

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

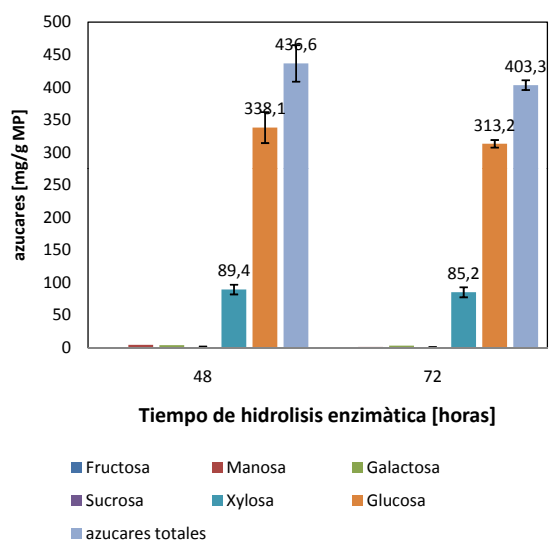


Tratamiento residuos Lengua

Hidrólisis enzimática de lenga a
72 horas

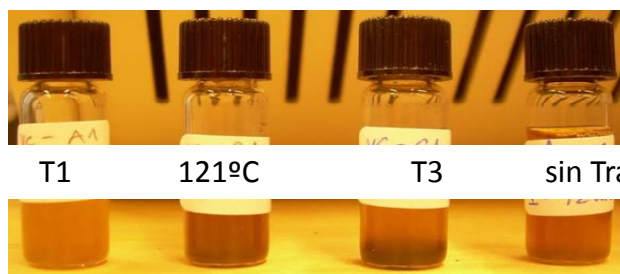


Hidrólisis enzimática de lenga a
T3

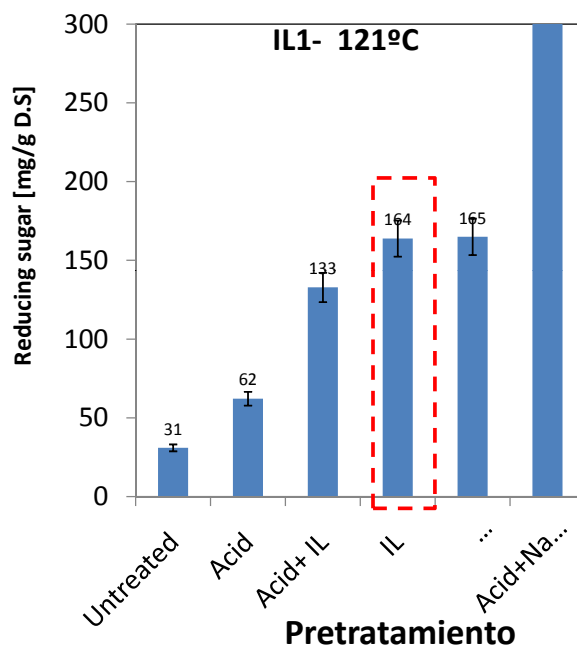
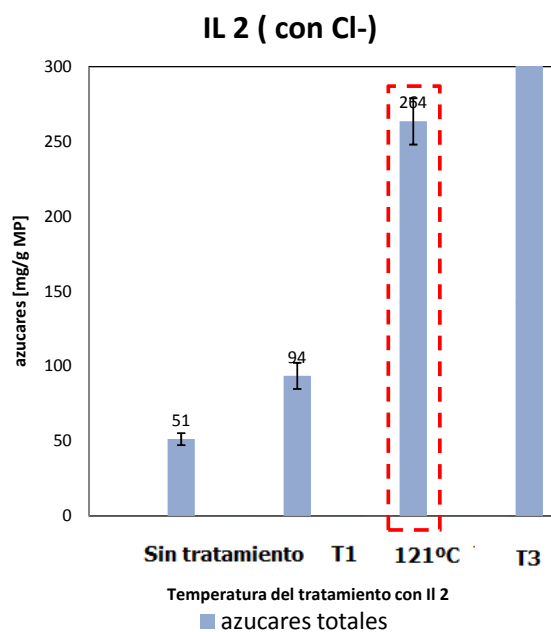


Recuperación en Lengua

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⁻) 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?

