

Universidad de Concepción
Facultad De Farmacia
Programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica



Implementación de Tecnología Analítica para el Análisis y Desarrollo de Bioetanol desde Material Lignocelulósico

Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

Roberto Valenzuela Pickrodt

Prof. Guía

Prof. Dra. Juanita Freer Calderón

Diciembre - 2009

Resumen

Para que la producción de bioetanol desde material lignocelulósico sea económicamente viable, los costos de producción del proceso deben reducirse significativamente. Los métodos de pretratamiento y la tecnología para generar azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática son etapas fundamentales en la producción de bioetanol y son consideradas barreras económicas para el proceso global.

Una alternativa para reducir los costos es utilizar enzimas inmovilizadas con el fin de retener y reciclar, sin pérdida de actividad enzimática, uno de los componentes más caros del proceso de producción de bioetanol. La elección del soporte en el que se inmoviliza la enzima es importante. La síntesis debe ser fácil y económica, pero por sobre todo debe ser fácil de separar de la mezcla de reacción y no debe afectar la actividad y estabilidad de la enzima.

En el presente trabajo se estudia el uso de nanopartículas de magnetita como soporte de enzimas. Al ser un óxido de hierro que presenta características magnéticas, su separación desde las mezclas de reacción se puede realizar fácilmente a través de imanes. Dos metodologías diferentes para sintetizar nanopartículas de magnetita fueron estudiadas: la metodología de co-precipitación de los iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en medio básico y por medio de la oxidación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ por H_2O_2 . Las nanopartículas sintetizadas por ambos métodos fueron caracterizadas fisicoquímicamente. Por medio de difracción de rayos-X (XRD) se analizó la estructura cristalina. Para confirmar la síntesis de magnetita en vez de meghemita, la cual posee un patrón de difracción de rayos-X idéntico, se utilizó espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS) para examinar la estequiometría Fe:O. La distribución de tamaño, forma y morfología de las nanopartículas de magnetita se determinaron a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM). El diámetro hidrodinámico de las muestras dispersadas se determinó por dispersión dinámica de luz (DLS). Las propiedades magnéticas se analizaron utilizando un magnetrómetro superconductor con dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID).

Mediante el método de co-precipitación de los iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (razón molar 1:2) por adición de amonio bajo agitación mecánica a 10000 rpm, se obtuvieron nanopartículas superparamagnéticas

de magnetita con un diámetro promedio de ~ 10 nm. Se encontró que ésta velocidad de agitación es la adecuada para la obtención de nanopartículas con este tamaño promedio. Una disminución en la velocidad de agitación da como resultado mayores tamaños (~19 nm) y distribución de tamaño más amplia. A 18000 rpm, además de magnetita, se sintetiza goetita a la forma de nanopartículas y nanovaras. A mayores velocidades de agitación (25000 rpm), la temperatura del núcleo de la solución aumenta, generando una mezcla de compuestos de hierro sin características magnéticas.

Por medio de la metodología de oxidación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ por H_2O_2 , se determinó que no sólo se sintetiza nanopartículas de magnetita de distintas formas y tamaño, si no que además cristales de lepidocrocita.

Se inmovilizó la enzima β -glucosidasa de *Trichoderma reesi* sobre nanopartículas de magnetita con diámetro promedio de ~10 nm amino funcionalizadas con 3-aminopropiltrietoxisilano, y utilizando glutaraldehído como agente enlazante. Al ser las nanopartículas silanizadas se produce el aumento del diámetro hidrodinámico, mientras que la saturación magnética disminuye sin perder el superparamagnetismo. La enzima inmovilizada se mantuvo estable por al menos 45 días sin pérdida de actividad enzimática. La β -glucosidasa inmovilizada se utilizó para suplementar a la celulasa en la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada por explosión por vapor. El porcentaje de hidrólisis tras 72 h fue sólo 8.1 % más bajo que la hidrólisis realizada con celulasa suplementada con β -glucosidasa libre. Aunque el rendimiento es un poco menor, el reciclaje de la enzima inmovilizada permite reducir el costo del proceso de sacarificación de material lignocelulósico.

Durante las etapas iniciales de degradación de madera por hongos de pudrición parda se produce la degradación de carbohidratos sin remover lignina. Estos hongos utilizan agentes de degradación de baja masa molar para mediar la producción de radicales $\bullet\text{OH}$ por la reacción de Fenton. Los metales tienen un rol importante en los procesos de degradación no enzimáticos debido a que en esta reacción formas reducidas de metales de transición reducen H_2O_2 a $\bullet\text{OH}$. Se realizó un estudio de los efectos de la reacción de Fenton sobre un compuesto modelo de lignina no fenólica y sobre una forma soluble de celulosa para determinar si los hongos de pudrición

parada son adecuados para ser utilizados como pretratamiento biológico. Se determinó que la reacción de Fenton cuprosa asistida por el dihidroxibenceno catecol es más lenta y menos eficiente que la reacción de Fenton ferrosa asistida por catecol.

La cromatografía líquida de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico (HPAE-PAD) permite la separación de D-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, D-xilosa y D-manosa con buena resolución a través de la columna de intercambio aniónico CarboPac PA10, utilizando 1% de NaOH 200 mM y 99% de agua de calidad nanopura como fase móvil a flujo constante de 1,0 mL min⁻¹. Esta metodología presenta bajos límites de detección y cuantificación, pero requiere grandes diluciones de las muestras de los hidrolizados del material lignocelulósico para que los carbohidratos de éstas puedan ser cuantificados por esta metodología.

