

[Descargar PDF](#)

***Fuente del artículo; aplicación técnica [“Liquid-Liquid Extraction \(LLE\) vs. Novum™ Simplified Liquid Extraction \(SLE\) Caso de estudio: Analysis of Monomeric Phenolic Fermentation Inhibitors in Dilute-Acid Plant Hydrolysate”](#)***

El tratamiento previo de la biomasa lignocelulósica es un requisito previo para maximizar la liberación de glucosa de la celulosa para su fermentación o conversiones químicas subsiguientes. Uno de los principales tratamientos previos implica la hidrólisis con ácido diluido (p. ej., ácido sulfúrico al 0,3-2 %) a temperaturas elevadas (140 a 200 °C) con diferentes tiempos de retención y cargas de biomasa/ácido.<sup>1</sup> Una desventaja de este procedimiento es la degradación parcial de la lignina, una macromolécula polifenólica, a fenólicos más pequeños que se liberan junto con los azúcares en el denominado hidrolizado. Estos compuestos fenólicos son tóxicos para los microorganismos y son posibles inhibidores de la fermentación.<sup>2-5</sup>

El análisis de este perfil fenólico es importante al optimizar los métodos de pretratamiento o desintoxicación con el objetivo de minimizar los niveles de inhibidores o de diseñar microorganismos más resistentes. En una etapa de preparación y limpieza de la muestra ampliamente empleada, los compuestos fenólicos se someten a una extracción líquido-líquido utilizando un solvente orgánico (p. ej., acetato de etilo) y luego se analizan mediante GC/MS6.

Si bien es eficaz, la extracción líquido-líquido puede llevar mucho tiempo y requerir cuatro extracciones por separado y múltiples pasos de centrifugación. En un esfuerzo por reducir el tiempo y las etapas de manipulación de las muestras, se empleó una extracción líquida simplificada (simplified liquid extraction, SLE) con Novum SLE, lo que ahorró una cantidad

significativa de tiempo y redujo la cantidad de pasos necesarios de manipulación de pipeteo y de viales.

## **Materiales y métodos**

La biomasa lignocelulósica se preparó utilizando dos métodos diferentes: una extracción líquido-líquido tradicional y una [\*\*extracción líquida simplificada \(SLE\) utilizando una placa Novum SLE MAX de 96 pocillos\*\*](#) (Referencia 8E-S138-5GA). Antes de cada método de extracción, las muestras se trataron previamente de la siguiente manera:

### **Tratamiento previo**

Se filtró un hidrolizado del tratamiento previo con ácido diluido (ácido sulfúrico al 1,5 %, 190 °C durante un minuto, carga de biomasa al 25 %) de *Miscanthus X giganteus* usando un filtro de 0,45 µm de polietersulfona (PES) y se enriqueció con 20 µg/ml de isopropilfenol como estándar interno (internal standard, IS). Luego, las muestras tratadas previamente se extrajeron mediante extracción líquido-líquido o SLE (a continuación).

### **Procedimiento de extracción líquido-líquido**

Alícuotas del hidrolizado enriquecido de la etapa de pretratamiento se extrajeron 4 veces cada una con 0,5 ml de acetato de etilo. Después de cada extracción, se aplicó un paso de centrifugado (1500 g durante un minuto) para la separación de fases. Los extractos combinados de cada muestra se secaron sobre sulfato de sodio<sup>6</sup> (muestras A).

### **Extracción líquida simplificada (SLE)**

Se cargaron alícuotas de 400 µl del hidrolizado enriquecido de la etapa de pretratamiento en los pocillos de una placa de 96 pocillos Novum SLE MAX. Se permitió que la muestra se absorbiera en el absorbente durante 5 minutos y luego se aplicó el acetato de etilo para eluir los analitos de interés. Se aplicaron tres volúmenes diferentes para determinar el volumen de elución más efectivo. Se aplicó 1x0,4 ml (muestras B), 1x 0,8 ml (muestras C) o 2x0,4 ml (muestras D) de acetato de etilo con un pulso corto de vacío. No se realizó un secado adicional de acetato de etilo después de la elución. Condiciones del GC/MS

Antes del análisis de GC, se incubaron alícuotas de 10 µl de los extractos (muestras A a D) con 50 µl de BSTFA a 70 °C durante 30 minutos y luego se analizaron mediante GC/MS6. Todas las extracciones se realizaron por triplicado y las réplicas (1-3) se analizaron en el siguiente orden: muestras A1 - D1, luego A2 - D2, luego A3 - D3 para evitar cualquier sesgo debido a posibles cambios en la composición de la muestra de muestras sin procesar como consecuencia del tiempo de ejecución prolongado (67 minutos). Se inyectó 1 µl en modo splitless en una columna de GC capilar de 5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent® 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975C de cuadrupolo único para el análisis con la siguiente configuración: Temperatura del inyector y la línea de transferencia 280 °C, gas transportador: helio a 1 ml/min, programa de temperatura: 75 °C durante 3 min isocrático, 5 °C/min a 150 °C, 0,5 °C/min a 160 °C, 2 °C/min a 190 °C, 5 °C/min a 240 °C, 70 °C/min a 325 °C, 3 min isocrático. Se detectaron iones en el modo de exploración completa m/z 35-500.

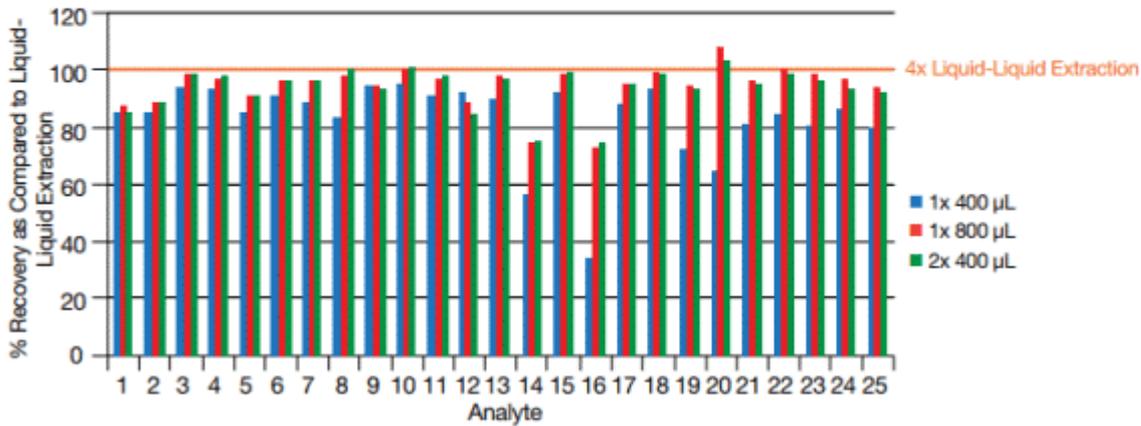
## Resultados y análisis

La Figura 1 muestra las recuperaciones relativas de 25 compuestos fenólicos seleccionados del hidrolizado eluido de la placa Novum SLE MAX de 96 pocillos, utilizando los tres procedimientos de elución (0,4 ml, 0,8 ml y 2x 0,4 ml), en comparación con los valores obtenidos mediante la extracción líquido-líquido convencional (= 100 % en la tabla

## EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN COMPARACIÓN CON EXTRACCIÓN LÍQUIDA SIMPLIFICADA

representativa).

**Figure 1.** Relative recovery (%) after extraction using Novum SLE under various extraction solvent volumes as compared to a liquid-liquid extraction



**Analyte Key:**

1	4-hydroxybenzaldehyde
2	vanillin
3	acetovanillone
4	4-hydroxybenzoic acid
5	syringaldehyde
6	vanillic acid
7	homovanillic acid
8	3,4-dihydroxybenzoic acid
9	4-hydroxy-3-methoxy-cinnamaldehyde
10	syringic acid
11	trans-p-coumaric acid
12	sinapaldehyde

**Analyte Key cont'd:**

13	trans-ferulic acid
14	2-guaiacylacetalddehyde
15	guaiacylacetone
16	2-syringacetaldehyde
17	3-guaiacylpropanol
18	2-hydroxy-1-guaiacylpropanone
19	3-guaiacylacetol
20	3-syringylacetol
21	1-guaiacylacetol
22	3-(4-hydroxyphenyl)acetol
23	1-syringylacetol
24	2-hydroxy-1-guaiacylethanone
25	2-hydroxy-1-syringylethanone

En general, la extracción con Novum SLE produjo recuperaciones que fueron comparables

con el procedimiento tradicional de extracción líquido-líquido en una fracción del tiempo (una disminución de cinco veces en la cantidad de tiempo de preparación de la muestra). La elución de acetato de etilo de 0,4 ml dio como resultado una recuperación general más baja de los analitos en comparación con las extracciones de volumen de 0,8 ml y 2x 0,4 ml. Las excepciones fueron 4-hidroxi-3-metoxi-cinnamaldehído (Figura 1, analito 9) con niveles de recuperación casi idénticos observados (95 % y 93 %, respectivamente) para todos los volúmenes de elución y sinapaldehído (Figura 1, analito 12), con una recuperación más alta para el volumen de extracción de 0,4 ml (93 %) en comparación con los otros volúmenes de extracción aplicados (89 % y 85 %, respectivamente). Sin embargo, un volumen de extracción de 0,4 ml generalmente se considera subóptimo. Aumentar el volumen de elución a 0,8 ml mejoró la recuperación y la mayoría de las recuperaciones alcanzaron más del 90 %. Se observaron rendimientos ligeramente más bajos para 4-hidroxibenzaldehído (87 %) (Figura 1, analito 1) y vanilina (89 %) (Figura 1, analito 2). Solo los homólogos 2-guaiacilacetaldehído (Figura 1, analito 14) y 2-syringacetaldehído (Figura 1, analito 16) mostraron niveles de recuperación más bajos de 75-76 % y 73-75 %, respectivamente. Aplicar el volumen de elución de 0,8 ml en dos pasos (2 veces 0,4 ml) no mejoró la recuperación en comparación con una sola alícuota de 0,8 ml. TN-0082 Página 2 de 4

## APLICACIONES

### Conclusión

Al extraer 0,4 ml de un hidrolizado de planta con ácido diluido usando una placa de 96 pocillos **Novum™ SLE MAX**, un volumen de elución de 0,8 ml de acetato de etilo dio como resultado recuperaciones altas y mayores que 90 % para la mayoría de los analitos fenólicos. No fue necesario secar aún más la fase de acetato de etilo para garantizar una derivatización exitosa para el análisis de GC/MS posterior. En comparación con la extracción líquido-líquido convencional, estimamos una disminución de hasta cinco veces en el tiempo de preparación de la muestra.

Además, la **extracción Novum SLE** también simplifica en gran medida la preparación de la muestra al reducir la cantidad de pasos de pipeteo y manipulación de viales requeridos. Por

lo tanto, la preparación de la muestra utilizando Novum SLE dio como resultado un perfil de inhibidores fenólicos que fue muy similar y equiparable a la extracción líquido-líquido convencional, pero en una fracción menor del tiempo y del trabajo.

## Referencias

1. Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, Dudgeon D (2011) *Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. Technical Report NREL/TP-5100-47764. United States National Renewable Energy Laboratory, US Department of Energy. May 2011*
2. Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant N-O, Hahn-Hägerdal B (1998) *Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus Trametes versicolor. Appl Microbiol Biotechnol 49:691-697*
3. Luo C, Brink DL, Blanch HW (2002) *Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. Biomass Bioenergy 22:125-138*
4. Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O, Jönsson LJ (1999) *Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. App Biochem Biotechnol 77-79:91- 103*
5. Buchert J, Niemelä K, Puls J, Poutanen K (1990) *Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. Process Biochem Int 176-180*
6. Mitchell VD, Taylor CM, Bauer S (2014) *Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. Bioenerg Res 7:654-669*

Comparta con amigos y compañeros:

Share with friends and coworkers: