



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**OBTENCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ASPECTOS
ESTRUCTURALES DE XILOOLIGOSACÁRIDOS DEL *ULEX***

**OBTENCIÓN E DETERMINACIÓN DE ASPECTOS
ESTRUTURAS DE XILOOLIGOSACÁRIDOS DO *ULEX***

**OBTAINING AND DETERMINATION OF STRUCTURAL
ASPECTS OF *ULEX*'S XYLOOLIGOSACCHARIDES**

Directores: Alberto de Vega Martín
Pablo Ligeró Martínez-Risco

MIGUEL JÁCOME SALGADO

Curso: 2017/2018 – Convocatoria: Septiembre

Índice

RESUMEN / RESUMO / ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Materiales lignocelulósicos	7
1.1.1. Estructura de la pared celular de los MLCs	7
1.1.2. Componentes químicos de los materiales lignocelulósicos	9
1.2. Xilooligosacáridos	14
1.2.1. Obtención de XOS	15
1.2.2. Análisis estructural de oligosacáridos	16
1.3. Biorrefinería	17
1.3.1. Autohidrólisis	18
1.3.2. Otros tratamientos de obtención de hemicelulosas	19
1.4. <i>Ulex europæus</i>	20
2. OBJETIVOS	22
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23
3.1. Pretratamiento de la muestra	23
3.2. Extracción sólido-líquido	24
3.3. Hidrólisis cuantitativa	24
3.4. Autohidrólisis	25
3.4.1. Factor de severidad	26
3.5. Liofilización	27
3.6. Espectrometría de masas MALDI-TOF	27
4. Resultados y discusión.	28
4.1. Extracción sólido-líquido	28
4.2. Tratamientos de autohidrólisis	29
4.2.1. Materia disuelta, volátil y no volátil	29
4.2.2. Xilooligosacáridos	31
4.2.3. Otros azúcares y compuestos	32
4.3. Autohidrólisis del <i>Ulex</i> en función del factor de severidad	33
4.4. Análisis estructural por espectrometría MALDI-TOF	36
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIÓN / CONCLUSIONS	38
6. BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

Obtención y determinación de aspectos estructurales de xilooligosacáridos del *Ulex*.

En este trabajo se ha tratado la fracción lignocelulósica del *Ulex* extraída con una mezcla de etanol y agua para la extracción de los oligosacáridos hemicelulósicos.

Para ello se estudiaron las influencias de las dos variables fundamentales del proceso de autohidrólisis, tiempo (5, 30 y 60 minutos) y temperatura (en el rango 160-200 °C).

La evolución de la solubilización de hemicelulosas se analizó a través de un parámetro pseudo cinético como es el factor de severidad.

Se definieron como las mejores condiciones de operación la temperatura de 180 °C durante un intervalo de tiempo de 30 minutos.

Así mismo se analizó la presencia de otros compuestos disueltos en el proceso.

Como una primera aproximación para obtener la estructura de los xilooligosacáridos extraídos se realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF al licor obtenido en las condiciones óptimas de operación.

RESUMO

Obtención e determinación de aspectos estruturais de xilooligosacáridos do *Ulex*.

Neste traballo tratouse a fracción lignocelulósica do *Ulex* extraída cunha mezcla de etanol e auga para a extracción dos oligosacáridos hemicelulósicos.

Para isto estudiáronse as influencias das dúas variables fundamentais do proceso de autohidrólise, tempo (5, 30 e 60 minutos) e temperatura (no rango 160-200 °C).

A evolución da solubilización das hemicelulosas analizouse a través dun parámetro pseudo cinético como é o factor de severidade.

Definíronse como as mellores condicións de operación a temperatura de 180 °C durante un lapso de tempo de 30 minutos.

Así mesmo analizouse a presenza doutros compostos disoltos no proceso.

Coma unha primeira aproximación a fin de obter a estrutura dos xilooligosacáridos

extraídos realizouse unha espectrometría de masas MALDI-TOF ao licor obtido nas condicións óptimas de operación.

ABSTRACT

Obtaining and determination of structural aspects of *Ulex*'s xylooligosaccharides.

In this work the lignocellulosic fraction of *Ulex* extracted by a mixture of ethanol and water its been treated for the extraction of hemicellulosic oligosaccharides.

By this mean the influences of the two fundamental process variables had been studied, time (5, 30 and 60 minutes) and temperature (160-200 °C Interval).

The behaviour of hemicelluloses solubilization its been analyzed based on a pseudo kinetic parameter as the severity factor is.

The best operational conditions had been defined as 180 °C of temperature during 30 minutes of time.

Likewise other compounds dissolved in the process had benn analyzed.

As a first approach to obtain the xylooligosaccharides structure a MALDI-TOF mass spectrometry its been made to the liqueur obtained in the optimal conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Materiales lignocelulósicos

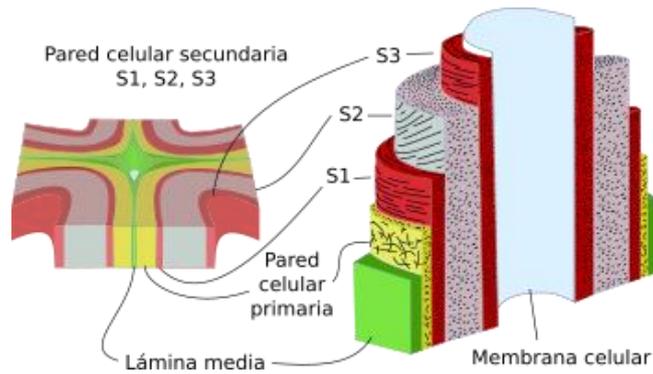
Se denominan como materiales lignocelulósicos (MLCs) todos aquellos que tienen como característica común el estar formados en su mayor parte por polisacáridos (celulosa y hemicelulosas) y lignina (polímero de naturaleza fenólica), lo que les otorga sus propiedades más características. Cualitativamente son muchos los compuestos químicos que los forman, si bien esta condición únicamente se debe a un tipo de sustancias llamadas que, de forma genérica, se denominan extractos, los cuales se encuentran en proporciones minoritarias.

1.1.1. Estructura de la pared celular de los MLCs

La pared de la célula vegetal va consolidándose en diferentes capas a medida que la célula crece y se desarrolla, de tal forma que la capa más externa será la capa más antigua y la capa más joven se hallará dispuesta hacia el interior. Tiene como funciones principales dar rigidez y estabilidad a la estructura celular, proteger el interior y mediar en las interacciones de la célula y sus alrededores.

De la capa más externa hacia la más interna de la pared celular se pueden distinguir las siguientes partes (Figura 1.1):

- Lámina media (LM; 0,2-1,0 μm de espesor): formada fundamentalmente por sustancias pécticas y lignina, corresponde al espacio intercelular.
- Pared primaria (Pared P; 0,1-0,2 μm de espesor): constituida mayoritariamente por hemicelulosas que conforman la matriz en la que se integran microfibrillas de celulosa dispuestas aparentemente al azar y con un grado de polimerización entre 2000 y 6000.
- Pared secundaria (Pared S): La celulosa, con un grado de polimerización poco variable y con 13000 de valor medio, constituye el 60% de esta capa, las hemicelulosas y la lignina suman cerca del 30%. Se compone de tres subcapas con características fisicoquímicas diferentes:
 - a) S1 (capa externa; 0,1-0,2 μm de espesor): las microfibrillas de celulosa forman una estructura compacta al alinearse paralelamente.
 - b) S2 (capa media; 1,5 μm de espesor): las microfibrillas se alinean paralelamente al eje celular formando la capa más gruesa de la pared celular.
 - c) S3 (capa interna; 0,1-0,2 μm de espesor): las microfibrillas se disponen transversalmente al eje celular.



<https://mmeqias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/2-pared-celular.php>

Figura 1.1: Estructura de la pared celular vegetal.

A nivel submicroscópico, en la pared celular de los MLCs pueden distinguirse dos fases, una con naturaleza fibrilar y otra amorfa:

- La fase fibrilar está constituida por cadenas lineales de celulosa que permanecen unidas por enlaces de hidrógeno intermoleculares formando microfibrillas de un espesor aproximado 25 μm , pueden alcanzar hasta 4 μm de longitud, constituyendo la base estructural de la celulosa.

En la pared primaria las microfibrillas están mezcladas aleatoriamente, sin embargo, la diferenciación en subcapas de la pared secundaria atiende a la orientación de estas fibras: dispuestas horizontalmente en la capa externa (capa S1), casi vertical en la capa media (capa S2) y más o menos horizontal en la capa interna (capa S3).

- La fase amorfa está formada por hemicelulosas, polisacáridos no celulósicos (xilano, glucano, manano, etc.), pectinas y glucoproteínas. Las hemicelulosas recubren las microfibrillas de celulosa actuando de nexo entre estas y la lignina. Las pectinas son polímeros formados por moléculas de ácidos urónicos mientras que las proteínas de la pared celular están ligadas con azúcares como arabinosa, glucosa y galactosa (Figura 1.2).

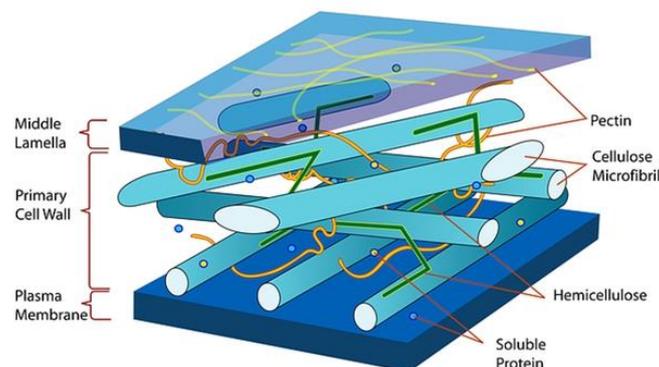


Figura 1.2: Organización de la pared celular vegetal.

Todos los MLCs están conformados por una estructura en la que los componentes principales (celulosa, hemicelulosas y lignina) se han formado por procesos fotosintéticos. La celulosa desempeña una función estructural en la célula vegetal; las hemicelulosas proporcionan una interfase para la unión de la celulosa con la lignina; la lignina, por su parte, fortalece la pared celular confiriéndole rigidez estructural a la planta, actuando como barrera física contra hongos e insectos y facilitando el transporte de agua a través del sistema vascular, debido a su naturaleza hidrofóbica (Ten y Vermerris, 2013).

1.1.2. Componentes químicos de los materiales lignocelulósicos

Desde el punto de vista químico, los componentes de los MLCs se pueden separar en dos grupos principales (Figura 1.3):

- Componentes no estructurales: en este grupo se integran el agua, los extractos y las cenizas entre otros. Suponen fracciones minoritarias en el material lignocelulósico.
- Componentes estructurales de la pared celular: comprende la celulosa, hemicelulosas y lignina. Representando, en conjunto, más del 75% del material lignocelulósico.

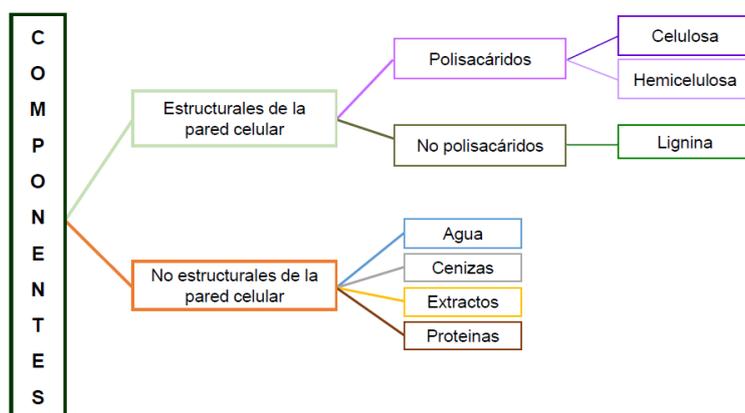


Figura 1.3: Cuadro de componentes estructurales y no estructurales de los MLCs (Ares Peón, Iria. Bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. Tesis doctoral. Univ. de Vigo. 2015).

1.1.2.1. Componentes no estructurales

Son aquellos componentes de los MLCs que no forman parte de la estructura de la pared celular. Representan entre el 5-10% del peso total, pudiendo llegar, excepcionalmente dependiendo de la especie y la parte de la planta de la que proceden, al 40%. Las fracciones químicas no estructurales comunes a los MLCs se citan a continuación.

- Agua

El contenido en agua se debe a su presencia en los fluidos biológicos de la planta y el

carácter higroscópico de los MLCs. Su proporción depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre.

- Cenizas

Llamadas así porque se determinan gravimétricamente tras la calcinación del material a temperaturas superiores a 575 °C. Sus componentes mayoritarios son carbonatos, fosfatos, oxalatos y silicatos de calcio, potasio y magnesio, así como sílice.

El contenido en cenizas varía de manera sustancial con el MLC considerado, si bien las especies arbóreas no suelen contener valores superiores al 1%.

- Extractos

Corresponden a los fluidos biológicos de las plantas (savia, resina). Se caracterizan por ser fácilmente separables del MLC por la extracción con disolventes orgánicos. Es un grupo de sustancias extremadamente diverso en el que se incluyen carbohidratos de bajo peso molecular, proteínas, alcaloides, terpenos, ácidos alifáticos y aromáticos, alcoholes, taninos, ceras, resinas, etc.

En general varían marcadamente de una parte a otra de la planta tanto en la proporción en que se encuentran como en su composición. Sus funciones en la célula vegetal son de reserva de nutrientes y de protección frente a agentes externos.

1.1.2.2. Componentes estructurales

Los componentes estructurales, de naturaleza polimérica y con diferentes propiedades según sus características químicas, se encuentran constituyendo la pared celular confiriéndole firmeza y protección a la célula. Desde el punto de vista cuantitativo son los integrantes mayoritarios en la biomasa vegetal, toda vez que esta está constituida principalmente por paredes celulares. Estos componentes estructurales de los MLCs se encuentran interpenetrados y unidos mediante interacciones físicas y químicas (Carpita y Gibeaut, 1993).

Se pueden distinguir dos tipos de componentes estructurales: lignina (polímero constituido por unidades de fenilpropano oxigenadas) y polisacáridos, dentro de los cuales se diferencia entre celulosa (con un esqueleto de unidades de glucosa) y hemicelulosas (constituidas por diferentes monosacáridos). Sus proporciones varían ampliamente dependiendo de la naturaleza del MLC del que se trate (Garrote et al., 1999).

- Lignina

La lignina es un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización de unidades de fenilpropano mediante la formación de diferentes tipos de enlaces entre unidades de forma aparentemente desordenada. La mayoría de la lignina se encuentra situada en el espacio intercelular y en la pared primaria de la célula. Se va constituyendo a lo largo de la vida

celular partiendo desde el espacio intercelular.

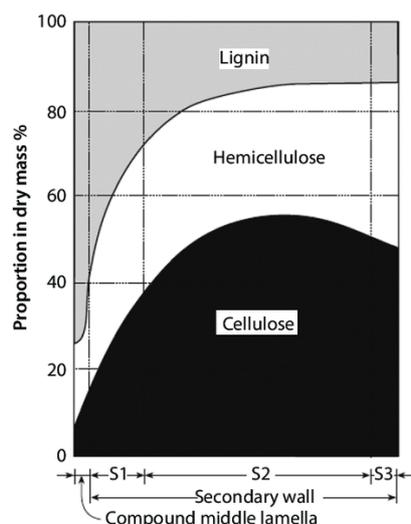


Figura 1.4: Proporción de componentes estructurales en las distintas capas de la pared celular.

Las unidades básicas estructurales que conforman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos (Figura 1.5), distinguibles entre sí por la distinta sustitución del anillo aromático. Así, el alcohol p-cumarílico, que da lugar a las unidades de p-hidroxifenilo, no tiene sustituyentes de tipo metoxilo; el alcohol coniferílico, que constituye las unidades de guayacilo, posee un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo aromático; mientras que el alcohol sinapílico, que conforma las unidades de siringilo, presenta dos grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo. La lignina es un polímero natural complejo en relación a su estructura y heterogeneidad dado que en las variaciones con respecto a su conformación influyen factores como la especie de la planta, su edad o el tipo de tejido (Ten y Vermerris, 2013).

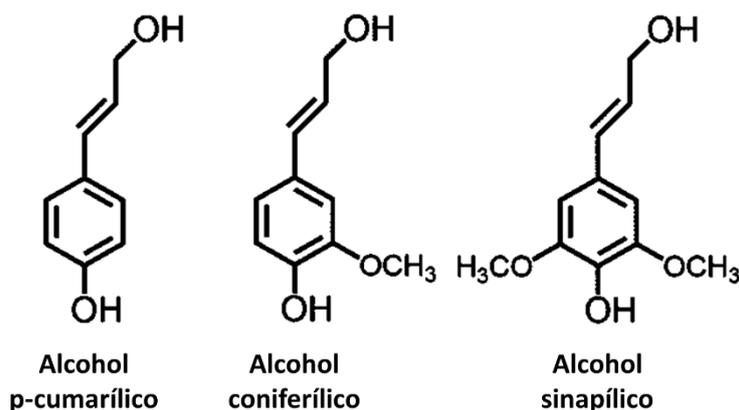


Figura 1.5: Unidades de p-fenilpropano precursoras de la lignina.

Representa típicamente entre el 10-25% en peso de los MLCs. Rodea y protege a las fibras de la celulosa, dándole mayor rigidez a las células, impermeabilizándolas y protegiéndolas de ataques enzimáticos.

- Celulosa

La celulosa es un polímero lineal formado por unidades monoméricas de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces β (1 \rightarrow 4). Los enlaces β forman cadenas lineales altamente estables y resistentes a los tratamientos químicos debido a los puentes de hidrógeno que se forman entre cadenas vecinas (Figura 1.6).

Normalmente cada cadena tiene entre 500 y 15000 unidades de glucosa dependiendo del tipo de planta. Las cadenas se disponen ordenadamente formando estructuras cristalinas unidas por puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (Wyman et al., 2005).

Esta estructura supramolecular determina muchas de las propiedades fisicoquímicas de la celulosa. Las uniones por puente de hidrógeno entre las cadenas de celulosa hacen que los polímeros sean rígidos, lo que impide la flexión de las moléculas y dificulta la hidrólisis de los enlaces glucosídicos.

La celulosa es el principal constituyente de las paredes de las células vegetales confiriendo la mayor parte de su resistencia, representando la fracción mayoritaria de los integrantes de los MLCs con proporciones que abarcan desde el 25 al 50% dependiendo del tipo de planta.

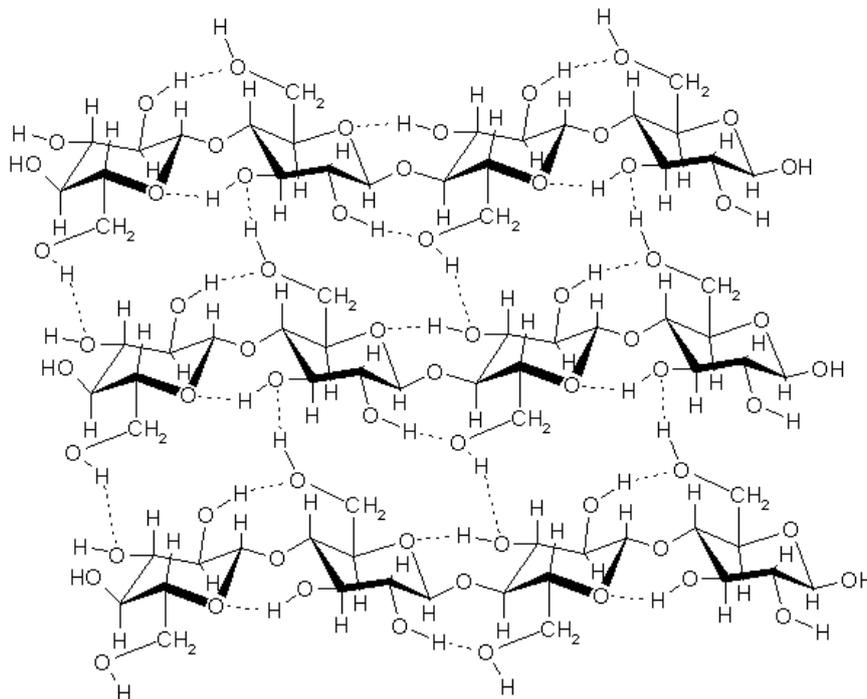


Figura 1.6: Fragmento de la estructura de la celulosa mostrando los enlaces por puente de hidrógeno intra e intermoleculares.

- Hemicelulosas

Las hemicelulosas son un grupo variado de polisacáridos consistentes en cadenas heterogéneas y cortas (GP sobre 200) formados por pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa),

hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa), ácidos urónicos (ácidos α -D-glucurónico, α -D-4-O-metilgalactourónico y α -D-galactourónico) y/o desoxihexosas (α -ramnosa y α -L-fucosa) pudiendo estar algunos de los grupos hidroxilo de los azúcares sustituidos por grupos acetilo.

Los enlaces entre los diferentes monómeros de la cadena son frecuentemente $\beta(1\rightarrow4)$, si bien en algunos casos aparecen otros del tipo $\beta(1\rightarrow3)$. Son más fáciles de solubilizar e hidrolizar que la celulosa, debido a su naturaleza ramificada y longitud más reducida.

La clasificación de las hemicelulosas se hace en base a los monosacáridos que constituyen la cadena principal del polímero y sus ramificaciones. Dado que existe una gran variabilidad de cadenas y sustituyentes no existe una clasificación concreta aceptada, aceptando nombres genéricos (xilanos, mananos, glucanos, etc.) que seguidamente son completados en base a las ramificaciones que presenten.

a) Xilanos (Xs)

Formados por una cadena principal de unidades de D-xilopiranosas unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, con ramificaciones cortas que pueden contener unidades de ácido glucurónico, arabinosa, u oligosacáridos formados por xilosa, arabinosa, galactosa o glucosa. La distribución de las cadenas laterales no sigue una secuencia regular. Pudiendo presentar esterificación con ácidos como el acético, ferúlico y *p*-cumárico. La frecuencia y composición de las ramificaciones dependen de su procedencia. Los xilanos forman enlaces covalentes y no-covalentes con otros componentes de la pared celular, por lo que tiene gran importancia en su resistencia estructural.

La solubilidad de los Xs, como es común para los polisacáridos y sus derivados, está condicionada por los patrones de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Así las regiones de polímero no sustituido presentan menor solubilidad por su tendencia a la agregación de cadenas. Este hecho afecta a la hora de la obtención de los mismos por medio extractivos. Estas uniones por puentes de hidrógeno condicionan la accesibilidad y reactividad de los grupos funcionales (Ebringerová et al., 2000).

Son las hemicelulosas más abundantes en los MLCs siendo el componente mayoritario de la pared secundaria de la célula vegetal. Así, por ejemplo, constituyen el 20-30% de la biomasa total de maderas de caducifolias y plantas herbáceas, mientras que en algunos tejidos de hierbas y cereales llegan a porcentajes del 50% (Gírio et al., 2010).

La diferencia en la estructura de los Xs permite distinguir los siguientes subgrupos:

- Homoxilanos: homopolímeros formados exclusivamente por unidades de xilopiranosas con uniones de tipo $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ y combinaciones de ambos enlaces. Son frecuentes en las algas (Gírio et al., 2010).
- Glucuronoxilanos: formados por una cadena de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -xilopiranosas con sustituyentes de ácido glucurónico o su derivado esterificado ácido 4-O-

metilglucurónico. Son las hemicelulosas típicas de las maderas de caducifolias, representando el 15-30% de su peso seco (Gírio et al., 2010).

- Arabinoxilanos: Constan de una cadena principal de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ entre unidades de xilopiranosas con sustituyentes de α -arabinofuranosa en posiciones 2 y 3. Hemicelulosas características de hierbas y granos de cereales (Gírio et al., 2010).
- Heteroxilanos: polisacáridos que tienen en común una estructura de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -xilopiranosas con una considerable diversidad de sustituyentes, partes de oligosacáridos incluidos. Presentes en cereales y semillas, entre otros (Gírio et al., 2010).

b) Mananos

Existen dos tipos principales de mananos que se diferencian tanto en la constitución de la cadena principal como en el tipo de sustitución de esta:

- Galactomananos: formados por un esqueleto de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -manopiranosas con sustituciones parciales de unidades de α -galactopiranosas. Se encuentran especialmente en semillas de leguminosas.
- Glucomananos: su estructura alterna frecuentemente unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -manopiranosas con unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -glucopiranosas y, ocasionalmente, aparecen ramificaciones de galactosa (galactoglucomananos). Se trata del polisacárido principal de las maderas de perennifolias.

c) Xiloglucanos

Consisten en unidades de glucosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, con un 75% de éstas sustituidas con unidades de xilosa por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$. Algunas de las unidades de xilosa están a su vez sustituidas por residuos de galactosa y arabinosa. También se han detectado moléculas de fucosa unidas a residuos de galactosa. Presentes mayoritariamente en la pared celular de plantas superiores y en pequeñas cantidades en hierbas (Gírio et al., 2010).

d) β -glucanos

Cuentan con una estructura similar a la celulosa, con un esqueleto no sustituido de unidades de β -glucopiranosas en el que se suceden, de forma aparentemente aleatoria, enlaces $1\rightarrow3$ y $1\rightarrow4$. Se encuentran fundamentalmente en granos de cereales (Ebringerová, 2006).

1.2. Xilooligosacáridos

Los xilooligosacáridos (XOS), oligómeros de xilosa, son polímeros de cadena corta formados por unidades de monosacáridos enlazadas a través de enlaces glucosídicos α y/o β . Se consideran dentro de la categoría de los XOS los compuestos con cadenas comprendidas entre

2 y 10 unidades de xilosa, aunque a veces se contemplan fragmentos de hasta 40 monómeros (Carvalho et al., 2013; Aachary y Prapulla, 2011) .

Los valores de sus pesos moleculares varían considerablemente dependiendo del método de empleado para su evaluación (Ebringerová et al. 2000).

Los XOS tienen un gran potencial como prebióticos pudiendo ser incorporados a muchos productos alimenticios. Han mostrado sus beneficios nutricionales en varias especies animales si bien aún siguen sin resolverse numerosas cuestiones acerca del mecanismo de acción que tienen y las indicaciones clínicas de los XOS. Solo se han recogido datos de pequeños muestreos que apoyen el uso de los XOS en el tratamiento de diferentes escenarios clínicos (Aachary y Prapulla, 2011).

En lo que se refiere exclusivamente a la salud humana, los XOS favorecen selectivamente el crecimiento de las bifidobacterias, promoviendo un ambiente intestinal más beneficioso (Garrote et al., 1999).

En vista de la creciente demanda a nivel mundial de prebióticos, los investigadores están trabajando en el desarrollo de nuevos procesos económicos y eficientes de producción de XOS a partir de diferentes materiales vegetales (Samanta et al., 2015).

1.2.1. Obtención de XOS

Los XOS proceden de diferentes tipos de xilanos presentes en los MLCs tras la ruptura de algunos enlaces glucosídicos de los xilanos iniciales. La especie vegetal de procedencia, junto con el método de obtención, define el grado de polimerización obtenido y los tipos de enlace que resisten tras el proceso de solubilización (Aachary y Prapulla, 2011).

La obtención de XOS a partir de los MLCs abarca un gran número de fenómenos complejos, al margen de la degradación de las hemicelulosas, que implican la difusión de especies hacia el interior del material sólido y la consecuente migración de los productos de reacción hacia el seno del fluido.

Dado que los xilanos poseen estructuras químicas diferentes y se encuentran integrados en la pared celular mediante interacciones distintas se desconoce el mecanismo preciso de las etapas que conforman el proceso global.

Los XOS pueden producirse a partir de MLC por métodos químicos o por hidrólisis enzimática de los sustratos como se explica más adelante.

La extracción de XOS con disolventes orgánicos es útil para retirar los componentes no sacáridos de los licores de la autohidrólisis produciendo una fase acuosa refinada y una fase orgánica principalmente compuesta por compuestos fenólicos y derivados de los extractos iniciales de la planta. El grado de purificación y el rendimiento de la recuperación depende tanto

del disolvente empleado como del MLC tratado (Aachary y Prapulla, 2011).

La adsorción es una técnica de separación que se basa en la diferente afinidad de los compuestos de una disolución por unirse físicamente a una fase sólida, el adsorbente. Uno de los adsorbentes más empleados es el carbón activo, empleado en hidrolizados para reducir la presencia de ácido acético, furfural, HMF y compuestos fenólicos derivados de la lignina (Rivas et al., 2002).

Es numerosa la bibliografía en la que se emplea la adsorción de XOS en combinación con otros tratamientos tanto para la eliminación de compuestos indeseados como para la separación entre oligosacáridos y monosacáridos. De todas formas, la adsorción de productos relacionados con la lignina es mayor que la de los XOS, pese a que la retención de estos se encuentra condicionada debido a que parte de ellos se encuentran ligados a los XOS (Aachary y Prapulla, 2011).

Se han escrito algunos artículos en relación al fraccionamiento y/o purificación de sacáridos obtenidos de hemicelulosas de maderas y otros materiales lignocelulósicos mediante separación con membranas. En este campo, se ha informado sobre la filtración de oligosacáridos presentes en aguas procesadas de pulpa termomecánica de *Picea* para eliminar compuestos de bajo peso molecular y monosacáridos, también en el refinado y/o concentrado de oligosacáridos de madera de eucalipto empleando membranas de diferente punto de corte de masa molecular. La concentración, el fraccionamiento y la purificación de XOS procedentes de xilano de cascarilla de arroz por ultra- y nanofiltración también se ha tenido en cuenta (González-Muñoz et al., 2013).

1.2.2. Análisis estructural de oligosacáridos

El uso reciente de distintas técnicas experimentales empleadas conjuntamente ha propiciado el progreso en la elucidación estructural de los oligosacáridos. Técnicas como la cromatografía de exclusión molecular, la cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia con detección amperométrica pulsada, la electroforesis capilar, la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear o la desorción-ionización mediante láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo y espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) son algunas de las empleadas para la separación y/o determinación estructural de oligosacáridos (Corradini et al., 2013).

Cada una de estas técnicas aporta algún tipo de conocimiento sobre las características estructurales de los oligosacáridos, permitiendo la combinación de ellas completar la mayoría de información estructural existente sobre oligosacáridos.

En los últimos años, la espectrometría de masas MALDI-TOF-MS se ha mostrado como una técnica rápida, eficaz, precisa y versátil de análisis estructural que permite obtener información sobre la longitud de las cadenas, así como el tipo de unidades estructurales de muchos tipos de carbohidratos y compuestos relacionados con estos (Harvey, 1999).

1.3. Biorrefinería

La sostenibilidad demanda un modelo de producción respetuoso con el medio ambiente, enfocado a alcanzar un aumento de la eficacia del proceso favoreciendo el aprovechamiento y la reutilización de materiales. De este modo se han debido de buscar procesos industriales que promuevan un modelo de fabricación diferente que reduzca los costes de manipulación y limite el impacto ambiental sin perjudicar calidad del producto final. Es por ello que el desenvolvimiento de nuevas tecnologías de producción, basadas en materias primas renovables y capaces de lograr un rendimiento eficiente y rentable de las mismas, se hace imprescindible ante un modelo de producción y consumo no sostenible, cimentado en el empleo masivo de materias primas fósiles, como es el actual (Ten y Vermerris, 2013).

Las propiedades y composición de los MLCs los convierten en adecuados para ser utilizados como materias primas en multitud de procesos. Su carácter renovable, destacada abundancia y reducido coste incrementan el interés de su utilización a nivel industrial asentando el interés de los estudios que desarrollan sus potenciales aplicaciones (Rivas et al., 2014).

Es grande el número de pequeñas y medianas empresas de transformación primaria, tanto en el sector agrícola como forestal, en las cuales se procesan materias primas de origen vegetal. Algunas de estas industrias generan residuos o subproductos que podrían emplearse como material renovable para obtener de ellos productos de alto valor añadido.

Debido a las crecientes demandas de la sociedad y los gobiernos por una producción más limpia y menos productora de gases contaminantes, los novedosos sistemas de transformación son de especial interés para la conversión de fuentes de biomasa en energía o productos químicos (Ligero et al., 2011).

Los MLCs pueden emplearse para someterlos a etapas de “fraccionamiento” haciendo uso de tratamientos secuenciales y, en función de las diferentes propiedades químicas que presentan sus principales constituyentes estructurales (celulosa, hemicelulosas y lignina), obtener alguno o varios de estos en corrientes separadas, pudiendo realizar un aprovechamiento individualizado de los mismos. De una manera similar a como se procesa el petróleo en una refinería (Garrote et al., 1999; Liu et al., 2012; Ten y Vermerris, 2013).

Es por ello que a las instalaciones en las cuales se lleva a cabo la separación de las distintas

fracciones y la transformación de biomasa para su aprovechamiento posterior se las designe como refinería de biomasa o biorrefinería (Liu et al., 2012).

La principal dificultad del desarrollo de la biorrefinería reside en que los MLCs no pueden ser aislados simultáneamente como polímeros sin provocar la degradación de parte de estos (Garrote et al., 1999).

Los procesos de fraccionamiento de los MLCs sacan partido de las diferentes propiedades químicas que presentan sus componentes estructurales para llevar a cabo la separación.

Son varios los métodos empleados en biorrefinería para lograr la solubilización de las hemicelulosas. Dependiendo de la materia prima de partida y de las características del tratamiento se pueden obtener oligómeros de mayor o menor grado de polimerización y sustitución, así como monosacáridos libres. Como consecuencia de reacciones indeseables en los procesos se obtienen también productos de degradación.

A continuación se resumen los principales métodos empleados para solubilizar las hemicelulosas profundizando más en el empleado en el presente trabajo.

1.3.1. Autohidrólisis

Este proceso consiste en emplear agua a temperaturas en el intervalo 150-230°C como único reactivo. El objetivo es lograr una despolimerización parcial de las hemicelulosas por la acción catalítica de los iones hidronio procedentes del agua y de los compuestos generados *in situ* (principalmente ácido acético liberado a partir de los grupos acetilo de las hemicelulosas), dejando tanto la lignina como la celulosa con la menor degradación posible (Garrote et al. 1999).

En función de las condiciones de tiempo y temperatura usadas las hemicelulosas se degradan parcialmente obteniéndose, en disolución, proporciones variables de oligómeros, monosacáridos, productos de descomposición de éstos y ácido acético (Ares-Peón et al., 2012).

Durante el proceso de autohidrólisis tiene lugar la rotura de las cadenas de polisacáridos hemicelulósicos en fragmentos de tamaño cada vez menor, conduciendo a la formación de oligómeros, luego a la de monosacáridos y por último a los productos de degradación de estos: furfural (2-furfuraldehído), a partir de las pentosas, y 5-hidroximetilfurfural (HMF), a partir de las hexosas.¹

Al no emplearse ningún otro compuesto químico que agua, se asocian ciertas ventajas con este proceso en comparación con el tratamiento con adición de ácido, como son la baja producción de subproductos, limitados problemas derivados de la corrosión del material debido al no muy bajo pH del medio de reacción y reducción de los costes operacionales en caso de no necesitar una neutralización posterior (Carvalho et al., 2004; Garrote et al. 1999).

1.3.2. Otros tratamientos de obtención de hemicelulosas

- Explosión con vapor

Es un tratamiento consistente en tratar el MLC con una inyección directa de vapor saturado a altas temperaturas durante períodos de tiempo muy cortos. Para a continuación provocar una despresurización rápida, provocando fuertes modificaciones estructurales en la biomasa vegetal (Romaní et al., 2013).

Se induce de este modo la separación de las fibras, principalmente en las zonas más débiles del polímero, las amorfas. También se hidrolizan los grupos acetilos de las hemicelulosas, formándose ácido acético. La despolimerización de la fracción hemicelulósica es función de la dureza de las condiciones de operación.

- Tratamientos ácidos

Este método logra la despolimerización de las hemicelulosas empleando catalizadores ácidos como el sulfúrico, clorhídrico, nítrico, fosfórico y fórmico, si bien únicamente los dos primeros se usan a escala industrial.

El ácido cataliza la ruptura de las cadenas de hemicelulosas para formar oligómeros y, a continuación, monosacáridos. Si las condiciones son muy severas, el ácido puede degradar los monosacáridos. Debido a la mayoritaria forma amorfa de las hemicelulosas las condiciones que se requieren para liberar los azúcares hemicelulósicos son suaves. De hecho, se deben evitar las condiciones más severas pues conducen a la formación de productos de degradación como HMF y furfural (Wyman et al., 2005)

- Tratamientos alcalinos

En esta técnica se emplean generalmente disoluciones acuosas de hidróxido de sodio, potasio, litio, bario, calcio y/o hidróxido amónico. Las más utilizadas son las dos primeras, puesto que tienen un mayor rendimiento.

Este tratamiento consigue la solubilización de las hemicelulosas junto con una parte de la lignina, además de la saponificación de ésteres urónicos y acéticos. Al contrario que los tratamientos ácidos o hidrotérmicos.

- Tratamientos enzimáticos

Las hemicelulasas son las enzimas empleadas para la hidrólisis de las hemicelulosas a sus oligómeros o monómeros correspondientes. Estas enzimas se obtienen a partir de algas, hongos, levaduras, bacterias o semillas y se nombran y clasifican en base al sustrato con el que tienen relación (Peng et al., 2012; Wyman et al., 2005).

Comercialmente se usan en alimentación, producción de biocombustibles, de productos

químicos con valor añadido, y en las industrias de fabricación de papel.

1.4. *Ulex europæus*

El *Ulex europæus, toxo* (en Galicia), también conocido como tojo o espinillo, es un arbusto espinoso, de la familia de las leguminosas, que puede alcanzar los 2,5 m de altura. Carente de hojas en edad adulta, posee espinas rectas, robustas y punzantes, flores amarillas y fruto negro.

En general se desarrolla en laderas y claros de bosque, sobre suelos ácidos, pobres en nutrientes y a veces de poco espesor, siendo muy tolerantes a distintas condiciones físicas; aguantan períodos de acusada sequía, aunque necesitan cierto grado de humedad que pueden conseguir incluso de nieblas y brumas de la zona, por ello se encuentra muy adaptado al clima oceánico y a los suelos pobres de Galicia, donde sus matorrales cubren grandes superficies. También aparece como compañera en bosques, sobre todo en pinares (Carballas, 2003).



Figura 1.7.a: Detalle de una rama de *Ulex*.



Figura 1.7.b: Planta de *Ulex* presente en la zona rural de A Zapateira (A Coruña).

Siendo originario del oeste y centro de Europa, se introdujo en muchas partes del mundo como arbusto ornamental o de cercado. Actualmente está reconocido por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como una de las 100 especies exóticas más invasivas del mundo, debido a que una vez que se establece, demuestra su extremada competitividad, desplazando cultivos y especies de plantas nativas y alterando las propiedades del suelo (<http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Ulex+europaeus>).

El *Ulex* es una planta pirófito. Debido a que tiene un sistema radical que sobrevive al fuego, rebrota intensamente después del incendio y, además, al poseer un banco de semillas cuya germinación es estimulada por el fuego, germina masivamente, aumentando mucho el número de plántulas e invadiendo rápidamente el terreno. Llega a aportar el 70-75% de la biomasa total del terreno quemado a los 10 años, predominando casi exclusivamente la recolonización de los tojos en suelos sobre granito. Su sembrado extensivo por los campesinos para diversos fines desde el siglo XVIII hasta la década de 1950, junto con los incendios repetidos,

explicarían la enorme extensión de los tojales en Galicia (Carballas, 2003)

En consecuencia, el desbroce del *Ulex* previo a la estación seca, como medida preventiva para la generación y propagación de incendios, se ha convertido en un tema muy necesario en ciertas áreas. Encontrar una forma rentable de aprovechar el *toxo* propiciaría un modelo de gestión forestal sostenible, además de beneficios ambientales.

2. OBJETIVOS

En este Trabajo de Fin de Grado se busca la optimización de un método sostenible de biorrefinería para el aprovechamiento del *Ulex europæus* mediante la extracción de xilooligosacáridos para su aprovechamiento posterior.

Se sabe de la existencia de XOS en *Ulex* porque previamente se ha estudiado su presencia en el material bruto inicial (Ligero et al., 2011; Ares-Peón et al. 2012).

Para aportar nuevos datos y conocimiento, y como ya se ha realizado la autohidrólisis del *Ulex* sin tratar, en este trabajo se ha realizado la extracción previa del material para la obtención de un extracto que pudiera presentar bioactividad. Si bien en la fracción de extractos también pueden existir otros compuestos de interés.

Con el residuo (refinado) subsiguiente se realizó un estudio sistemático de la influencia de las variables del tratamiento de autohidrólisis para la máxima obtención de oligosacáridos.

Como punto final se pretende dar una idea acerca de la estructura de los xilooligosacáridos obtenidos.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Pretratamiento de la muestra

- Procedencia del *Ulex*

El *Ulex* fue recolectado en la primavera del año 2015 en una zona rural de A Zapateira - San Vicente de Elviña - A Coruña. Se recogieron especímenes de entre 1 y 1.5 m de altura y se trasladaron al laboratorio donde se dejaron secar al aire durante 15 días. Tras este periodo fueron despojados de flores y otros materiales ajenos a la especie y se procedió a su trituración.

- Trituración

Los tallos de *Ulex*, recogidos tras separar las flores, fueron sometidos a dos etapas de trituración.

* En primer lugar se trituraron empleando una desmenuzadora de jardín Bosch AXT 25 TC. Los fragmentos se juntaron, homogeneizaron y se dejaron secar durante un periodo de 20 días.

* En una segunda etapa, el material anterior fue molido con ayuda de un molino IKA MF 10.1 equipado con un tamiz de 2 mm a la salida (Figura 3.1). Tras esta molienda el material fue repartido en bandejas de polipropileno para permitir un último periodo de equilibrado de humedad (8.5%).

- Análisis de humedad

Todos los análisis de humedad en este trabajo se realizaron en un analizador Ohaus MB45 (Figura 3.2).

Las medidas se repitieron cada día que se empleó muestra y se modificaron los cálculos en caso de existir variación en el porcentaje de humedad.



Figura 3.1: Fotografía del aparato de molienda.



Figura 3.2: Analizador de humedad.

3.2. Extracción sólido-líquido

En una serie de matraces Erlenmeyer de 1 L provistos de tapón de rosca, 15 g de muestra triturada y homogeneizada se sometieron a extracción sólido-líquido con una mezcla de etanol-agua (proporción 1:1 en peso) en relación 1:10 durante 24 horas en un agitador orbital IKA KS 3000 i control.

Tras el tratamiento se separaron los extractos por filtración a vacío. La diferencia de peso entre el *Ulex* seco inicial y el sólido libre de extractos recogido tras filtración proporciona la medida de la tasa de extracción obtenida.

3.3. Hidrólisis cuantitativa

Se denomina hidrólisis cuantitativa al procedimiento que permite la ruptura de todos los enlaces glicosídicos presentes en los polisacáridos liberando los monosacáridos correspondientes. La determinación posterior de estos monosacáridos permite establecer balances de masa y calcular parámetros de eficacia de los tratamientos. Al mismo tiempo, al no ser solubilizadas más que proporciones muy pequeñas de lignina, la determinación gravimétrica del residuo sólido proporciona el contenido en lignina del material inicial.

El procedimiento consta de dos etapas.

- Etapa 1. Solubilización de los polisacáridos. El equivalente a 1 g de muestra seca se trata con 15 mL de H₂SO₄ al 72% (% peso) durante 2 horas a 30 °C con agitación constante.
- Etapa 2. Ruptura de todos los enlaces glicosídicos. Se añade agua en cantidad suficiente para rebajar al 3% la concentración del ácido y, finalmente, se introduce en un autoclave (SELECTA MED12) a 121 °C por espacio de 1 hora.

Se recoge una fracción sólida y otra líquida que se separan por filtración a vacío. Se determina, por gravimetría, tanto la proporción de lignina insoluble en ácido conocida como lignina de Klason, como, tras introducirlo 1 hora en la mufla para su incineración, el contenido en cenizas insolubles en ácido presentes en la muestra.

La determinación de las distribuciones de monosacáridos en los autohidrolizados se llevó a cabo, tanto en los licores “crudos” como en los posthidrolizados, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Previamente al análisis, las muestras fueron neutralizadas con BaCO₃, centrifugadas en una centrífuga (MINI LAN-6K) y filtradas sobre membranas de fibra de vidrio de 0.45 µm.

El sistema cromatográfico empleado consta de: una bomba Waters Binary 1525, un

inyector manual Waters 600, una precolumna (Bio-Rad Micro-Guard IG Cation H), una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) mantenida a 80°C, un detector de índice de refracción Waters 2414 (para la cuantificación de los monosacáridos y ácido acético) y un detector Vis-UV Waters 2489 fijado a 280 nm (para la cuantificación de furfural e hidroximetilfurfural). La fase móvil consistió en agua acidulada con H_2SO_4 $4 \cdot 10^{-3}$ M. La elución se efectuó en régimen isocrático a un flujo de 0.6 mL/min.

La cuantificación de los componentes se realizó mediante calibrado con patrones comerciales.

3.4. Autohidrólisis

Los experimentos de autohidrólisis se llevan a cabo en un reactor cilíndrico Parr Inst. Comp. 452HC3 de 600 mL provisto de agitador y un horno con el que calentar el medio de reacción a la temperatura deseada. El control de temperatura se efectúa con un controlador Watlow Parr 4842 conectado al reactor.



Figura 3.3: Fotografía del montaje empleado para los tratamientos de autohidrólisis.

En un tratamiento típico, se mezclaron en el reactor 4 g de muestra seca con agua, en proporción 1:10, sometiéndolos durante tiempos de 5, 30 y 60 minutos a distintas temperaturas en el intervalo 160-200 °C.

Al terminar el tratamiento se separó por filtración a vacío el licor obtenido, del que se midió el volumen y pH, y el material sin disolver arrastrando, con la menor cantidad posible de aguas de lavado, todo el sólido presente en el reactor.

El licor y las aguas de lavado se juntan y llevan a volumen conocido para determinar, por triplicado, del residuo seco considerado como solubilización no volátil. La diferencia entre este

valor y el correspondiente a la pérdida total de masa tras la autohidrólisis permite la determinación de la materia volátil solubilizada en el tratamiento.

Una alícuota del líquido resultante de mezclar licor y aguas de lavado se filtra a través de membrana de 0.2 μm de tamaño de poro para usar directamente para la determinación por HPLC de los monosacáridos, ácido acético, furfural y HMF. Una segunda alícuota del licor se somete a posthidrólisis (tratamiento similar a la hidrólisis cuantitativa del sólido), con H_2SO_4 al 3% en peso durante 1 h a 121 $^\circ\text{C}$ en autoclave, antes del análisis por HPLC.

Los XOS se determinan de un modo indirecto basado en el incremento en cantidad de xilosa medida tras la posthidrólisis cuantitativa del licor con respecto al dato obtenido previamente del licor producido en la autohidrólisis.

Al finalizar cada uno de los experimentos, el refinado, fase sólida del obtenida tras la filtración a vacío, es secado al aire y sometido a hidrólisis cuantitativa de la misma manera, explicada previamente, que se realiza con el material inicial.

3.4.1. Factor de severidad

Debido al creciente interés que la autohidrólisis de MLC ha generado en los últimos años, existen diversos esquemas y modelos cinéticos disponibles en la bibliografía. Entre ellos, el basado en la suposición de múltiples reacciones simultáneas (*lumped reactions*) deriva en la definición de un parámetro (R_0) que engloba en una sola variable los efectos del tiempo y temperatura de tratamiento (Abatzoglou et al., 1992).

Este “factor de severidad” u ordenada de reacción (R_0) tiene la siguiente expresión:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T - T_r}{\omega}\right) dt$$

donde T es la temperatura de reacción, T_r es una temperatura de referencia (habitualmente se fija en 100 $^\circ\text{C}$), ω es un parámetro empírico que depende de la energía de activación (14,75 $^\circ\text{C}$ en nuestro caso según la bibliografía) y t es el tiempo de reacción (Ligero et al., 2011).

De esta forma, los valores del factor de severidad empleados en el estudio de tratamientos hidrotérmicos de materiales lignocelulósicos proporcionan una manera sencilla de comparar los resultados de experimentos llevados a cabo bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura. El “factor de severidad” R_0 empleado para describir los efectos causados en sustratos está íntimamente ligado a otros parámetros usados con fines similares en la industria de refinado del petróleo o en los procesados de pasta de papel (Garrote et al., 1999).

El rango operacional se elige en función de la solubilización de las hemicelulosas, comenzando por las condiciones de más baja solubilización y terminando por las de más alta solubilización.

3.5. Liofilización

La liofilización se utilizó para eliminar el agua de los licores de autohidrólisis estimados como adecuados antes de ser analizados por MALDI-TOF. Para ello, se tomaron alícuotas de 20 mL que se depositaron en pequeños cristalizadores y se dejaron durante dos días en el liofilizador (TELSTAR LyoQuest). Pasados los cuales se recoge una porción de cada uno que se pasa a sendos tubos Eppendorf para enviar a analizar.

3.6. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Las muestras obtenidas tras la liofilización se diluyeron en acetonitrilo al 30% en proporciones 1:1, 1:10 y 1:100. A continuación, las disoluciones de muestra se mezclaron en proporción 1:1 (v/v) con la matriz (ácido 2,5.dihidroxi benzoico 10mg/mL). Posteriormente la mezcla se centrifugó a 16000 rpm durante 2 min. Pasado ese tiempo se llevó un volumen de 0.5 μ L del sobrenadante a la placa de análisis de MALDI-TOF (Figura 3.4.a).

El instrumento (Applied Biosystems Voyager DE STR, Figura 3.4.b) se calibra empleando una mezcla comercial de calibrado que cubre todo el intervalo de medida. La adquisición se realiza en modo reflector empleando extracción retardada de los iones formados.

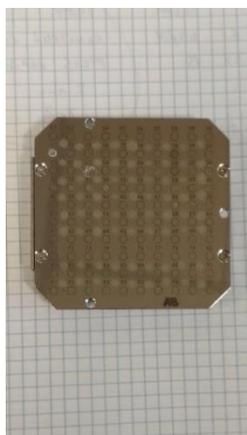


Figura 3.4.a: Detalle de una placa de análisis de MALDI-TOF.



Figura 3.4.b: Equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF
<https://www.sai.udc.es/es/unidades/UEM/equipamiento>

4. Resultados y discusión.

4.1. Extracción sólido-líquido

Como se ha descrito en la sección de *Procedimiento experimental 4.3*, previamente a los experimentos de autohidrólisis, se sometió al *Ulex* a una extracción sólido-líquido. En la tabla 4.1 se presentan los resultados de 4 tratamientos y la caracterización básica de los refinados correspondientes que serán parte de los utilizados en este trabajo. La solubilización total alcanzó un valor del 11.5% ($\pm 0.7\%$) que se correspondió básicamente con la solubilización de sustancias no volátiles (9.4%). La lignina no se disolvió en absoluto y, por tanto, aumento su proporción en el sólido hasta un valor de 30.8 (% base seca inicial).

	1	2	3	4
Extracción (% b.s.i.)	88.5	88.4	89.3	87.7
Solubilización total (% b.s.i.)	11.5	11.6	10.7	12.3
Solubilización volátil (% b.s.i.)	2.1	2.2	1.4	2.6
Solubilización no volátil (% b.s.i.)	9.4	9.5	9.2	9.7
Lignina de Klason en refinado (% sobre refinado seco)	30.6	35.2	28.3	29.1
Lignina disuelta (% sobre lignina inicial)	0	0	0	0
Carbohidratos en refinado				
Glucosa (% b.s.i.)	29.4	32.9	34.1	30.7
Xilosa + galactosa + manosa (% b.s.i.)	13.4	14.5	14.6	14.2
Arabinosa (% b.s.i.)	2.3	2.2	2.3	2.3

Tabla 4.1: Información acerca de los productos obtenidos en las extracciones

Por otra parte, se comprobó que una parte de los carbohidratos presentes en el *Ulex* inicial se habían disuelto durante esta extracción. El análisis cromatográfico de los extractos líquidos permitió cuantificar el valor de esta solubilización en el 3.2% en base seca inicial. La distribución de carbohidratos solubilizados está encabezada por la glucosa libre (monomérica) 1.5%, seguida por la arabinosa, 0.7% y por el grupo (xilosa+galactosa+manosa), 0.6. Es interesante decir que los datos cromatográficos permiten deducir que: glucosa, xilosa, manosa y galactosa están presentes en el extracto como monómeros, mientras que la arabinosa lo está en forma de oligosacárido.

Luego de la cuantificación, los extractos fueron descartados y se prosiguió el trabajo con el material sólido obtenido en la extracción.

4.2. Tratamientos de autohidrólisis

4.2.1. Materia disuelta, volátil y no volátil

Las medidas de pH de los licores procedentes de las autohidrólisis (Figura 4.1) muestran un perfil cinético acorde con la liberación autocatalizada de los grupos acetato. La disminución del pH a medida que avanza la reacción se debe fundamentalmente a la liberación de los grupos acetato de las HMC. Este proceso se mostró más importante durante el período de calentamiento y en los primeros minutos de la fase isotérmica de la autohidrólisis. El pH y, por tanto, esta liberación continuó hasta los 30 min de reacción, período tras el cual la liberación de los grupos acetato decreció considerablemente.

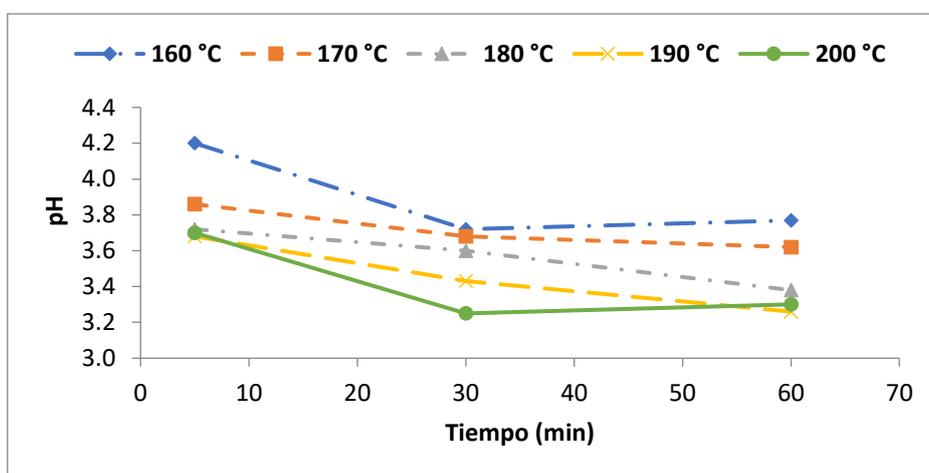


Figura 4.1: Evolución de las medidas de pH durante las autohidrólisis del *Ulex*.

Como era de esperar la cantidad de materia disuelta fue aumentando a medida que lo hacía el tiempo del tratamiento (Figura 4.2), principalmente en los primeros 30 minutos, tiempo tras el cual la tasa de solubilización se ralentiza. Igualmente, los valores más altos de la temperatura de reacción produjeron una mayor solubilización, y esta se alcanzaba más rápidamente. Los valores máximos se situaron en el intervalo 22-35%, en función de la temperatura.

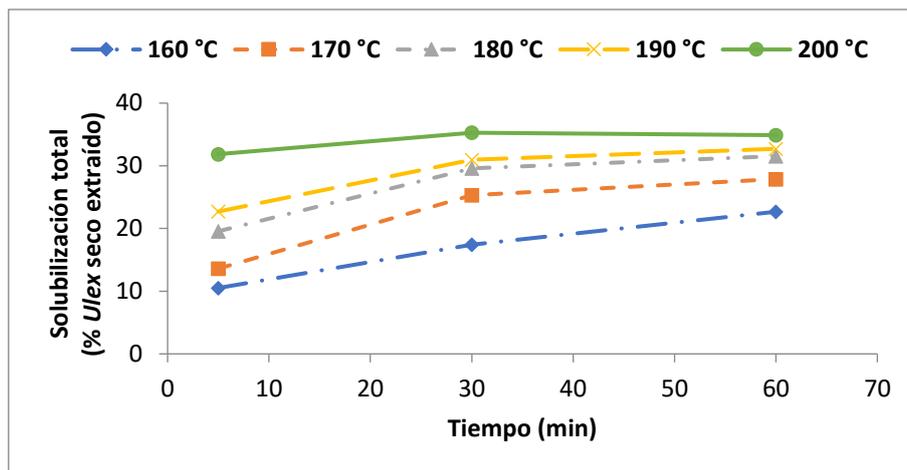


Figura 4.2: Variación de materia de *Ulex* disuelta en los procesos de autohidrólisis.

El material disuelto en los procesos de autohidrólisis puede dividirse en material volátil y material no volátil. Esta distinción es interesante pues dentro de los productos volátiles se encuentran, además del propio ácido acético, los principales productos de descomposición de pentosas (furfural) y hexosas (5-hidroximetilfurfural).

La proporción de solubilización volátil (Figura 4.3) creció con el tiempo y la temperatura del tratamiento. Lo cual es lógico teniendo en cuenta que tanto el ácido acético, como el furfural y el HMF mostraron concentraciones individuales que seguían los mismos patrones.

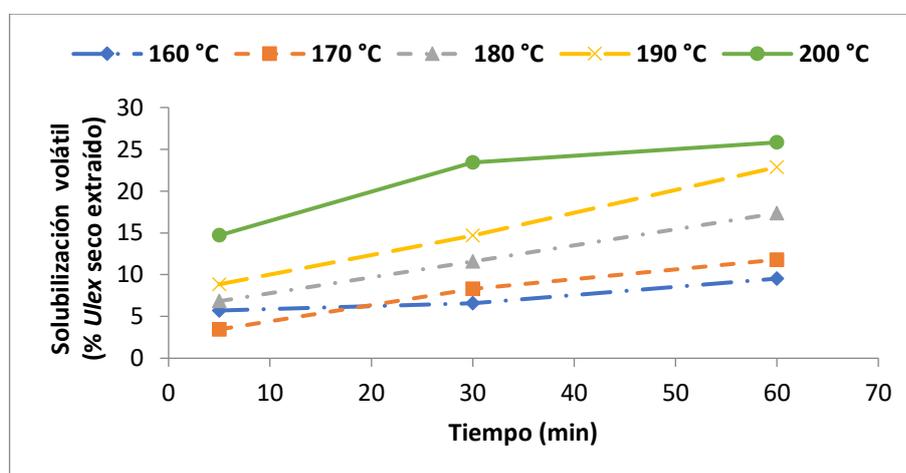


Figura 4.3: Solubilización volátil de *Ulex* en las autohidrólisis.

Los perfiles de seguimiento con el tiempo de la solubilización no volátil muestran las formas típicas de un proceso con dos reacciones consecutivas (en serie) que involucran la formación y la consecuente degradación de productos intermedios (Figura 4.4). Por ello, la obtención máxima de compuestos no volátiles sigue una distribución diferente a la de los volátiles. Así, en las condiciones más severas del tratamiento los volátiles constituyen la mayor

parte de la fracción disuelta. Esto puede explicarse por la formación catalizada por ácido de los productos de deshidratación (HMF y furfural) de los monosacáridos liberados.

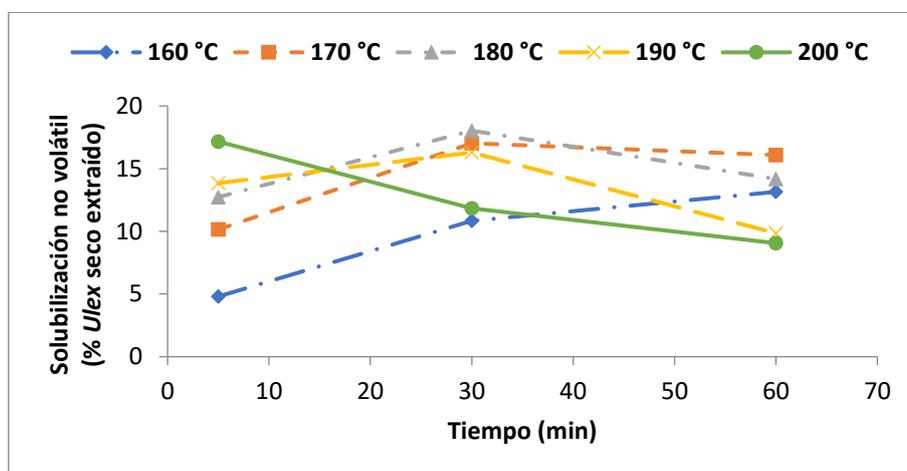


Figura 4.4: Componentes no volátiles de Ulex disueltos en los tratamientos.

4.2.2. Xilooligosacáridos

Los rendimientos de obtención de XOS mostraron que su recuperación está estrechamente ligada a las condiciones de temperatura y tiempo de la reacción (Figura 4.5). Los xilanos se liberan rápidamente en los primeros minutos de la reacción, y después experimentan reacciones de descomposición que también son dependientes de la temperatura. En consecuencia, a la temperatura más baja de reacción (160 °C), la gráfica de producción de XOS siempre crecía con el tiempo, mientras que a temperaturas más altas las reacciones de degradación tomaban más importancia. Las máximas recuperaciones de xilanos (6,9% del Ulex seco procedente de la extracción) se obtuvieron para 180 °C durante 30 min y para 200 °C durante 5 min.

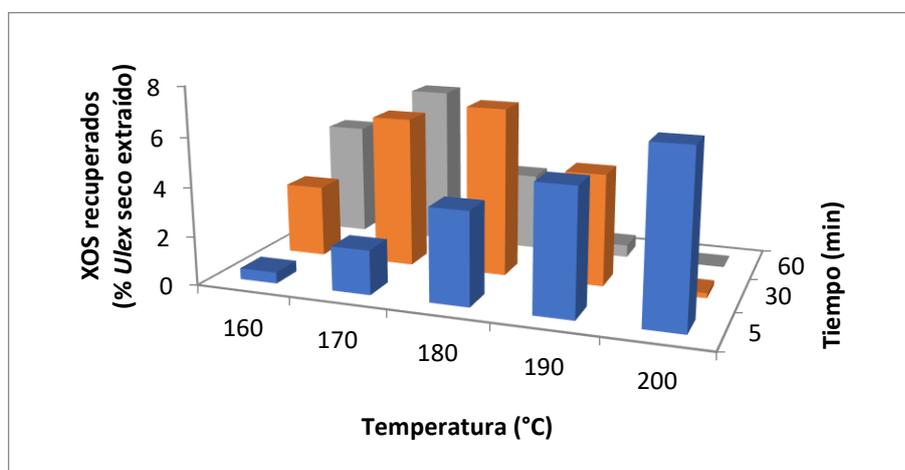


Figura 4.5: Producción de XOS en las reacciones de autohidrólisis.

Estos valores son similares a los obtenidos en la autohidrólisis del *Ulex* sin tratar (Ligero et al., 2011)

Los porcentajes de xilosa presentes en los licores de autohidrólisis (Figura 4.6) aumentaron con el tiempo y la temperatura, poniendo de manifiesto que se estaba llevando a cabo la hidrólisis catalizada por ácido de los XOS solubilizados procedente de las hemicelulosas. Para las temperaturas de tratamiento más altas (190 y 200 °C) las reacciones de degradación (deshidratación) de las xilosas se mostraron más importantes llegados los 30 minutos de reacción. Sin embargo, la proporción de xilosa monomérica en los hidrolizados permaneció en niveles bajos, lo que es indicativo de una selectividad aceptable al no reflejarse una alta tasa de hidrólisis de XOS.

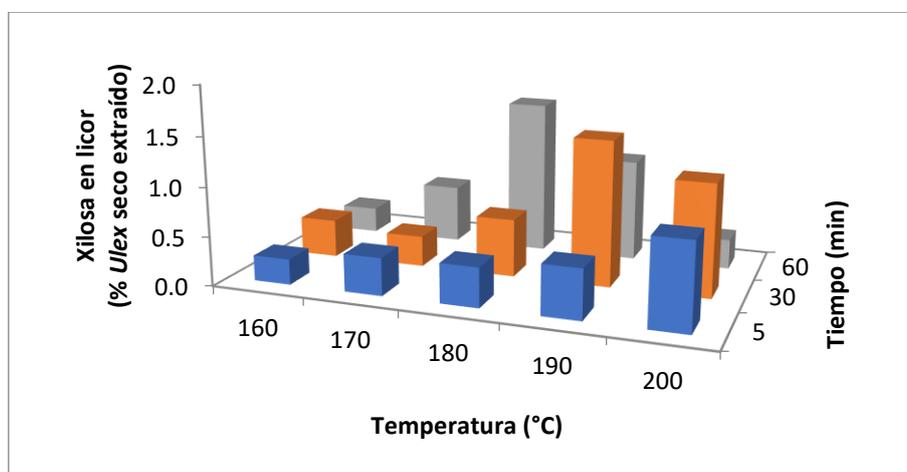


Figura 4.6: Obtención de xilosas en el licor del autohidrolizado.

4.2.3. Otros azúcares y compuestos

Los datos muestran que se extrajeron pequeñas cantidades de glucosa de la muestra (tabla 4.2). Con valores que van de 0.22% a 0.56% de *Ulex* seco extraído, probablemente resultantes de glucanos de cadena corta (glucomanos o xiloglucanos) y de una pequeña degradación de celulosa. De todos modos, las proporciones de glucosa liberada son muy bajas, lo que indica que la celulosa apenas se vio afectada. Esto se comprobó incluso para las condiciones más severas, ratificando la idea de la selectividad del proceso. Además, las influencias tanto del tiempo como de la temperatura del tratamiento resultaron mucho menores en referencia al desprendimiento de glucosa.

En lo que respecta a la arabinosa presente en el licor (tabla 4.2), se puede explicar cuantitativamente de una manera similar a como se hizo anteriormente con las xilosas, con la diferencia de que la arabinosa está presente en menores cantidades.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ácido acético	Arabinosa en licor	Glucosa en licor	Furfural en licor	HMF en licor
160	5	0.11	0.20	0.45	0.04	0.02
	30	0.57	0.66	0.50	0.03	0.02
	60	0.64	0.63	0.22	0.09	0.03
170	5	0.33	0.47	0.56	0.04	0.07
	30	0.69	0.73	0.30	0.12	0.03
	60	1.47	0.95	0.30	0.44	0.07
180	5	0.32	0.63	0.48	0.05	0.01
	30	1.52	0.92	0.29	0.44	0.07
	60	2.93	0.43	0.28	1.64	0.21
190	5	0.76	0.83	0.48	0.14	0.03
	30	2.78	0.52	0.30	1.40	0.17
	60	3.92	0.17	0.38	2.65	0.42
200	5	1.74	1.16	0.55	0.34	0.09
	30	4.22	0.25	0.39	2.61	0.37
	60	4.64	0.00	0.41	3.05	0.65

Tabla 4.2: Compuestos disueltos (en unidades de % en *Ulex* seco extraído para todos los compuestos) en los procesos de autohidrólisis a diferentes temperaturas y tiempos de reacción.

La formación de ácido acético aumentó con el tiempo y la temperatura del tratamiento (tabla 4.2), siendo especialmente importante a las temperaturas más altas y los tiempos más largos. Estos datos guardan cierta relación con los obtenidos para los productos de degradación como era de esperar.

El hidroximetilfurfural y el furfural son los productos de degradación de hexosas y pentosas respectivamente. Como las hexosas, en las mismas condiciones, tienen una cinética de deshidratación más lenta, la concentración de furfural fue siempre mayor que la de HMF (tabla 4.2). Como era de esperar, la concentración de furfural en los licores aumentó exponencialmente con el tiempo y temperatura. La concentración de furfural más alta superó ligeramente el porcentaje del 3% (porcentaje sobre *Ulex* seco extraído). Los datos de formación de hidroximetilfurfural siguieron un patrón similar a los del furfural, si bien a valores de concentración significativamente más bajos.

4.3. Autohidrólisis del *Ulex* en función del factor de severidad

Al representar los datos obtenidos en las autohidrólisis frente al factor de severidad u ordenada de reacción (R_0), que combina en una sola variable las condiciones de tiempo y temperatura del tratamiento, se comprueba que las gráficas para diferentes temperaturas

prácticamente se superponen.

En lo que respecta a la recuperación de XOS (Figura 4.7), se verifica que para cada tiempo de reacción el valor máximo es en torno a $\log [R_0(\text{min})] = 3.85$. Dato muy similar al obtenido para el *Ulex* sin extraer, aproximadamente $\log [R_0(\text{min})] = 3.65$ (Ligero et al., 2011).

Este resultado concuerda con la mayor pendiente en el gráfico de liberación de grupos acetato (Figura 4.8) y, por tanto, con la mayor velocidad de este proceso. Existe, por tanto, una importante correlación entre la concentración de grupos acetilo en disolución y la velocidad de formación de XOS.

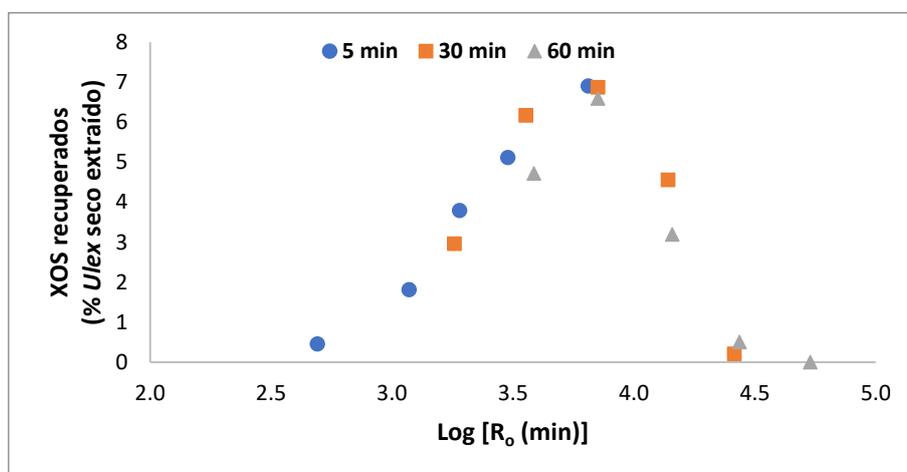


Figura 4.7: Rendimiento de xilanos frente al factor de severidad.

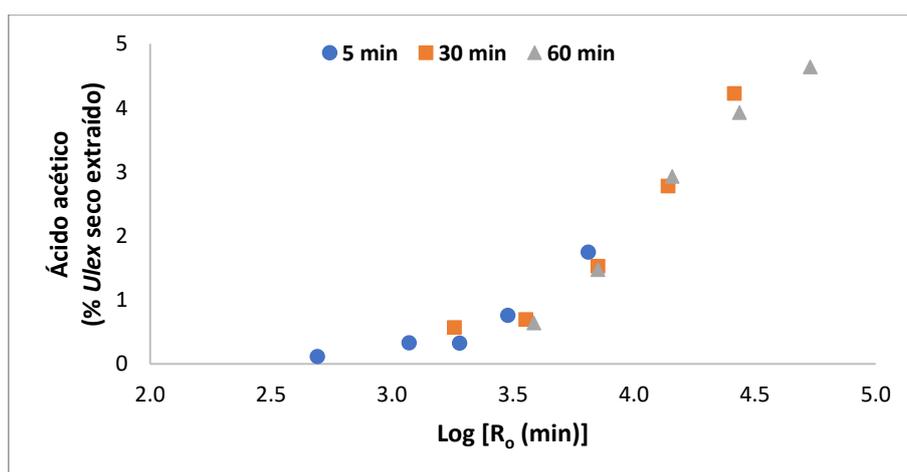


Figura 4.8: Efecto del factor de severidad en la liberación de ácido acético.

Se puede emplear este valor máximo del factor de severidad para calcular los tiempos apropiados de tratamiento para cada temperatura a fin de maximizar la recuperación de XOS. De este modo, se calculan tiempos de 112 min para 160 °C, 60 min para 170 °C, 30 minutos para

180 °C, 15 minutos para 190 °C y 6 min para el tratamiento a 200 °C de temperatura.

En lo que respecta a la solubilización del *Ulex* (tabla 2), se pudo comprobar que para valores de $\log R_0$ inferiores a 3.3 el refinado obtenido tras la autohidrólisis representaba entre el 80% y el 90% de la base seca inicial (con porcentajes de solubilización de compuestos no volátiles inferiores al 13%); condiciones más drásticas, con valores del factor de severidad entre 3.5 y 4 condujeron a refinados del 70-80 % de base seca inicial (y solubilizaciones de no volátiles del 13-18%), y las condiciones más severas aplicadas ($\log R_0 > 4$) proporcionaron refinados de entre el 65% y 69 % de base seca inicial (con porcentajes de solubilizaciones no volátiles decrecientes debido a la descomposición de los azúcares). Estos resultados son similares a los obtenidos en el tratamiento no isotérmico del *Ulex* sin extraer (Ligero et al., 2011; Ares-Peón et al., 2012).

La proporción de lignina de Klason formando parte del sólido obtenido en los procesos de autohidrólisis aumentó con la severidad de las condiciones, alcanzando valores superiores al 44% en las experiencias realizadas con $\log R_0 > 4$. Este aumento del porcentaje de lignina en el sólido, como ya se mencionó, es debido a que no se solubiliza durante la autohidrólisis.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Factor de severidad Log [R ₀ (min)]	Refinado sólido	Solubilización volátil	Solubilización no volátil	Lignina Klason
160	5	2.69	89.49	5.71	4.80	25.18
	30	3.26	82.58	6.59	10.83	37.95
	60	3.59	77.32	9.53	13.15	41.27
170	5	3.07	86.40	3.46	10.14	32.47
	30	3.55	74.67	8.31	17.02	40.64
	60	3.85	72.12	11.79	16.09	44.01
180	5	3.28	80.44	6.83	12.73	35.39
	30	3.85	70.40	11.57	18.03	42.49
	60	4.16	68.46	17.36	14.18	45.62
190	5	3.48	77.29	8.85	13.86	38.12
	30	4.14	69.04	14.68	16.28	45.14
	60	4.44	67.29	22.86	9.85	45.02
200	5	3.81	68.14	14.70	17.16	41.33
	30	4.42	64.72	23.44	11.84	47.71
	60	4.73	65.12	25.82	9.05	44.76

Tabla 4.3: Influencia del factor de severidad en la solubilización del *Ulex*. Porcentajes de refinado y solubilizaciones referidas al *Ulex* seco extraído, y proporción de lignina de Klason presente en el refinado obtenido.

4.4. Análisis estructural por espectrometría MALDI-TOF

Como un primer paso encaminado a la caracterización de los XOS obtenidos mediante el tratamiento de autohidrólisis, se realizó una análisis del licor de autohidrólisis por medio de espectrometría MALDI-TOF, debido a su rapidez, versatilidad y precisión. Se presentan a continuación los espectros de masas obtenidos de la muestra del licor de autohidrolizado considerado como óptimo (Figuras 4.9 y 4.10).

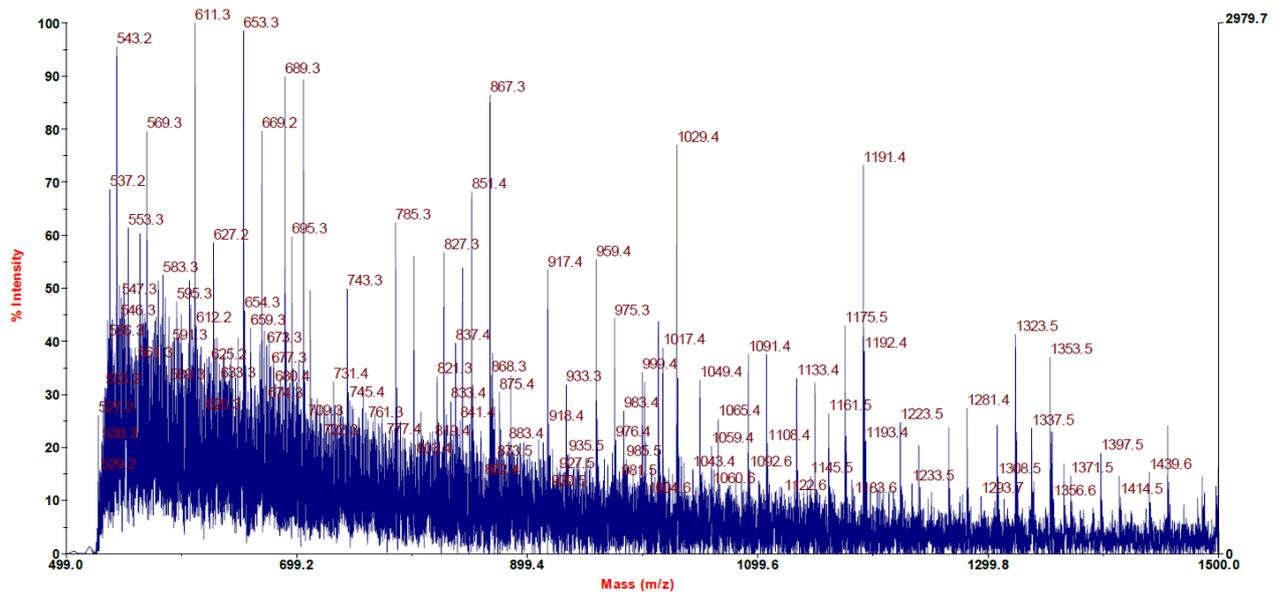


Figura 4.9: Primer rango del espectro de masas MALDI.

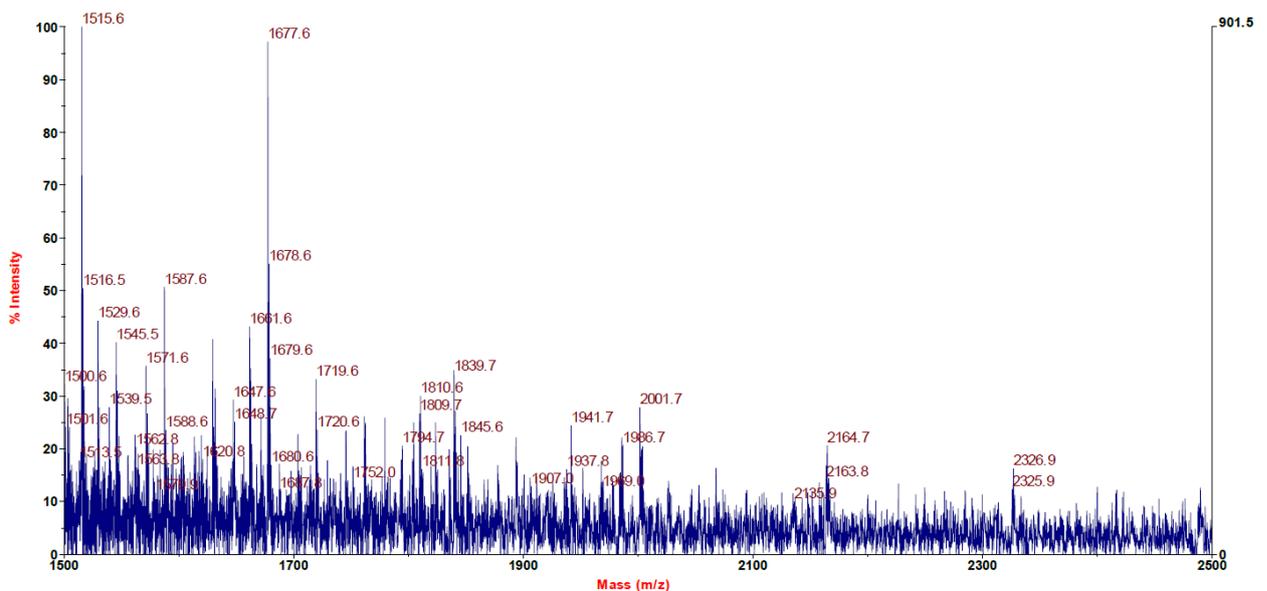


Figura 4.10: Segundo rango del espectro de masas MALDI.

La mayoría de los picos de mayor intensidad se han identificado con cadenas cortas de oligosacáridos de hexosas y otras de pentosas con diferentes sustituciones por grupos acetilo.

Se puede observar en la figura una serie de hexooligosacáridos separados por un valor de 162 u.m.a., que se corresponde con la masa de una unidad de hexosa menos el agua que se pierde al formar el enlace glicosídico.

Debido a la falta de una fase de purificación previa como a la heterogeneidad de compuestos presentes en los licores obtenidos de las autohidrólisis, los espectros obtenidos tienen una importante dificultad de interpretación que no permite dilucidar mucho más los aspectos estructurales de los compuestos. En este sentido se hace necesaria la cumplimentación del análisis estructural con alguna de las otras técnicas mencionadas

5. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, en este apartado se resumen las conclusiones más destacables del trabajo presentado en esta memoria:

- Se ha optimizado el proceso de autohidrólisis del *Ulex* extraído en relación a la producción de XOS. Los valores de 180 °C de temperatura y 30 minutos de tratamiento produjeron el mayor rendimiento de xilooligosacáridos de hemicelulosas del *Ulex* extraído.
- Se demostró una alta selectividad del tratamiento hidrotérmico para la solubilidad de las hemicelulosas al no afectar significativamente a la celulosa y lignina presentes en el material.
- Se ha obtenido un valor del factor de severidad u ordenada de reacción que permite calcular los tiempos óptimos de tratamiento a diferentes temperaturas para la producción máxima de XOS.
- Se realizó un primer aporte al análisis estructural de los xilooligosacáridos obtenidos en el autohidrolizado que proporciona ideas acerca de su composición.

5. CONCLUSIÓNS

En vista dos resultados obtidos, neste apartado resúmense as conclusións máis destacables do traballo presentado nesta memoria:

- Optimizouse o proceso de autohidrólise do *Ulex* extraído en relación á produción de XOS. Os valores de 180 °C de temperatura e 30 minutos de tratamento produciron o maior rendemento de xilooligosacáridos de hemicelulosas do *Ulex* extraído
- Demostrouse unha alta selectividade do tratamento hidrotérmico para a solubilidade das hemicelulosas ao non afectar significativamente á celulosa e lignina presentes no material.
- Obtívose un valor do factor de severidade u ordeada de reacción que permite calcular os tempos óptimos de tratamento a diferentes temperaturas para a produción máxima de XOS.
- Fíxose un primer aporte ao análise estrutural dos xilooligosacáridos obtidos no autohidrolizado que proporciona ideas acerca da súa composición.

5. CONCLUSIONS

This section summarizes the most remarkable conclusions from this study:

- Optimization of the autohydrolysis of *Ulex* has been made related to the XOS production. Values of 180 °C of temperature and 30 minutes of treatment provided the best yield of xylooligosaccharides of extracted *Ulex*'s hemicelluloses.
- Selectivity of the hydrothermal process is demonstrated in reference of hemicellulose's solubility not affecting significantly neither cellulose or lignin from the raw material.
- A value for the severity factor or reaction ordinate is acquired and it leads to the ideal times of treatment for different temperatures for maximize XOS production.
- A first approach is made to structural analysis of obtained autohydrolyzed xylooligosaccharides that provides ideas about its composition.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aachary A. A. Prapulla S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis utilization structural characterization bioactive properties and applications. *Compr. Rev. Food Sci. F.* (2011); 10:2–16.

Abatzoglou N., Chornet E., Belkacemi K., 1992. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chem. Eng. Sci.* 47. 1109-1122.

Ares-Peón, I., Romaní, A., Garrote, G., Parajó, J. C. (2012). "Invasive Biomass Valorization: Environmentally Friendly Processes for Obtaining Second Generation Bioethanol and Saccharides from *Ulex Europæus*". *J Chem Technol Biotechnol* 88 (6), 999-1006.

Carballas T., Los incendios forestales en Galicia, Reflexiones sobre el medio ambiente en Galicia, ed. por Casares Long J.J. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, 363–415 (2003).

Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3: 1–30.

Carvalho, F.; Esteves, M. P.; Parajó, J. C.; Pereira, H.; Gírio, F. M. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, 91: 93-100.

Carvalho, A.F.A., Neto, P.de O., da Silva, D.F., & Pastore, G.M. 2013. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51, 75–85.

Corradini, C.; Lantano, C.; Cavazza, A. (2013). Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 4591-4605.

Cruz, J. M.; Domínguez, J. M.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. (2000). Dimorphic behavior of *Debaryomyces hansenii* grown on barley bran acid hydrolyzates. *Biotechnology Letters*, 22 (7): 605-610.

Ebringerová, A. (2006). Structural diversity and application potential of hemicelluloses.

Macromolecular Symposia, 232: 1-12.

Ebringerová, A. & Heinze, T. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 2000, 21 (9): p. 542 - 556.

Garrote, G., Domínguez, H. & Parajó (1999) Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Journal of Wood and Wood Products*. 57: 191-202.

Garrote, G.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1999, 74: 1101-1109.

Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101: 4775-4800.

Harvey, D. J. (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrometry Reviews*, 18: 349–450.

Ligero, P., de Vega, A., van der Kolk, J.C., & van Dam, J.E.G. (2011). Gorse (*Ulex europæus*) as a possible source of xylans by hydrothermal treatment. *Industrial Crops and Products*, 33, 205-210.

Liu, S.; Lu, H.; Hu, R.; Shupe, A.; Lin, L.; Liang, B. (2012). A sustainable woody biomass biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30: 785-810.

Peng, F.; Peng, P.; Xu, F.; Sun, R. C. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30: 879-903.

Rivas, B.; Domínguez, J. M.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. (2002). Bioconversion of posthydrolysed autohydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corn cobs. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 431-438.

Rivas, S., González-Muñoz, M. J., Santos, V. and Parajó, J. C. (2014). Acidic processing of hemicellulosic saccharides from pine wood: Product distribution and kinetic modeling, *Bioresource Technology*. 162, pp. 192–199.

Romaní, A.; Garrote, G.; Ballesteros, I.; Ballesteros, M. (2013). Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* Wood. *Fuel*, 111: 66-74.

Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 5 (2015), pp. 62-71.

Ten, E.; Vermerris, W. (2013). Functionalized polymers from lignocellulosic biomass: State of the art. *Polymers*, 5: 600-642.

CE Wyman, SR Decker, ME Himmel, JW Brady, CE Skopec, L Viikari (2005). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* 1, 1023-1062.

