
Generación de D-xilosa por tratamiento hidrotérmico de endocarpios de aceitunas e hidrólisis enzimática de los oligosacáridos

Manuel Cuevas¹, Juan Francisco García^{1,2}, Nicolás Cruz¹, Sebastián Sánchez^{1*}

¹Dept. Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, Universidad de Jaén. 23071 Jaén, España ²School of Biosystems Engineering, UCD Agriculture and Food Science Centre, University College Dublin. Belfield, Dublin 4, Ireland

Generation of D-xylose by hydrothermal treatment of olives endocarps and enzymatic hydrolysis of oligosaccharides

Generació de D-xilosa per tractament hidrotèrmic d'endocarpi d'olives i hidròlisi enzimàtica dels oligosacàrids

Recibido: 8 de agosto de 2012; aceptado: 11 de febrero de 2013

RESUMEN

Se ha desarrollado un procedimiento para obtener altas concentraciones de D-xilosa partiendo de huesos fragmentados de aceituna, un material abundante en los países del sur de Europa. El esquema operativo consistió en el tratamiento de la materia prima con agua caliente a presión (ensayando temperaturas máximas entre 195 y 225°C, y relaciones sólido/líquido entre 1/8 y 1/3), seguido de la hidrólisis enzimática del licor con celulasas, hemicelulasas y β -glucosidasas. En la primera etapa, el trabajo a 210°C maximizó el rendimiento de oligosacáridos en el licor (16,9 kg/100 kg materia prima) con una baja producción del inhibidor fermentativo HMF (0,25 kg/100 kg materia prima). Posteriormente, la acción sinérgica de hemicelulasas y β -glucosidasas generó la mayor cantidad de D-xilosa por hidrólisis de los oligómeros. En ese contexto, y para cargas de hemicelulasas de hasta 500 U/g, se alcanzaron rendimientos de 23,4 kg de D-xilosa, 0,63 kg de L-arabinosa y 0,21 kg de D-galactosa a partir de 100 kg de endocarpios de aceituna.

Palabras clave: Hueso de aceituna, Autohidrólisis, Oligosacáridos, Hidrólisis enzimática, D-xilosa.

SUMMARY

A new procedure to obtain high D-xylose concentration from olive stones, a widely raw material in South European countries, was developed. The scheme consisted in a pretreatment of the raw material with liquid hot water (maximum temperatures in the range 195-225°C, and solid/liquid ratio between 1/8 and 1/3), and the subsequent enzymatic hydrolysis of the liquor with cellulases, hemicellulases and β -glucosidases. In the first step, the oligosaccharide yield in the liquor was maximized working at 210°C (16.9 kg oligosaccharides per 100 kg raw material), generating low production of fermentation inhibitors, such as hydroxymethylfurfural (0.25 kg HMF per 100 kg raw material). Subsequently, the synergistic action of hemicel-

lulases and β -glucosidase led to the highest D-xylose yield by hydrolysis of oligomers. In this context, for hemicellulase loadings up to 500 U/g, maximum yields of D-xylose, L-arabinose and D-galactose (23.4, 0.63 and 0.21 kg per 100 kg olive endocarps) were obtained.

Key words: Olive stones, Autohydrolysis, Oligosaccharides, Enzymatic hydrolysis, D-xylose.

RESUM

S'ha desenvolupat un procediment per obtenir altes concentracions de D-xilosa partint d'ossos fragmentats d'oliva, un material abundant en els països del sud d'Europa. L'esquema operatiu va consistir en el tractament de la matèria primera amb aigua calenta a pressió (assajant temperatures màximes entre 195 i 225°C, i relacions sòlid/líquid entre 1/8 i 1/3), seguit de la hidròlisi enzimàtica del licor amb cel·lulases, hemicel·lulases i β -glucosidasas. En la primera etapa, el treball a 210 °C va maximitzar el rendiment d'oligosacàrids en el licor (16,9 kg/100 kg matèria primera) amb una baixa producció de l'inhibidor fermentatiu HMF (0,25 kg/100 kg matèria primera). Posteriorment, l'acció sinérgica de hemicel·lulases i β -glucosidasas va generar la quantitat més elevada de D-xilosa per hidròlisi dels oligòmers. En aquest context, i per a càrregues de hemicel·lulases de fins a 500 U/g, es van assolir rendiments de 23,4 kg de D-xilosa, 0,63 kg de L-arabinosa i 0,21 kg de D-galactosa a partir de 100 kg de endocarpi d'oliva.

Paraules clau: Os d'oliva, autohidròlisi, oligosacàrids, hidròlisi enzimàtica, D-xilosa.

*Autor para la correspondencia: ssanchez@ujaen.es; tel. : 34 953 212219

INTRODUCCIÓN

La agroindustria derivada del cultivo del olivo, sector con un peso significativo en la economía de los países de la cuenca mediterránea, no sólo genera aceite de oliva y aceitunas de mesa, sino que también da lugar a subproductos (poda de olivo, huesos de aceituna, orujillos...) cuyo aprovechamiento podría mejorar su rentabilidad económica. Las almazaras españolas han incorporado, en los últimos años, separadoras de pulpa y hueso en sus esquemas operativos, produciéndose importantes cantidades de endocarpios fragmentados procedentes del fruto del olivo. Aunque los endocarpios se utilizan como combustible, existen otras posibles alternativas de uso, entre las que se podrían mencionar la producción de oligosacáridos y azúcares simples⁽¹⁾, o de alcoholes, como etanol o xilitol⁽²⁾. El bajo precio de los endocarpios, y su reducido tamaño de partícula, que podría evitar molturaciones adicionales durante su posterior procesado, son factores que mejoran las perspectivas de uso de esta biomasa.

En numerosos artículos científicos se ha propuesto el empleo de agua caliente a presión para hidrolizar la fracción hemicelulósica existente en los materiales lignocelulósicos^(3,4,5), alternativa también conocida como "tratamiento hidrotérmico" o "autohidrólisis". En estos tratamientos es habitual utilizar un factor de severidad ($\log R_s$), propuesto por Overend y Chornet⁽⁶⁾, para tener en cuenta el efecto combinado de las variables "tiempo" y "temperatura" en el proceso de rotura de los polisacáridos. El empleo de agua como único agente hidrolítico evita los problemas de corrosión y los mayores costes de adquisición de reactivos derivados del uso de ácidos concentrados, eliminándose la posterior etapa de neutralización de los hidrolizados. Sin embargo, las autohidrólisis difícilmente consiguen altos rendimientos de monosacáridos debido a que los tratamientos de baja y media severidad llevan fundamentalmente hacia oligosacáridos, mientras que los de alta severidad producen una intensa degradación de los azúcares simples⁽⁷⁾. Por este motivo, y con vista a generar hidrolizados ricos en monosacáridos y con baja concentración de inhibidores fermentativos, se podría optar por una estrategia en dos etapas que consiga, en primer lugar y mediante tratamiento hidrotérmico, la mayor producción posible de oligosacáridos para, después, efectuar la hidrólisis enzimática de esos compuestos⁽⁸⁾. Con relación a la segunda etapa, la compleja estructura de los oligómeros hemicelulósicos hace necesario el empleo de varias enzimas, tales como celulasas, hemicelulasas y β -glucosidasas, para alcanzar un grado de hidrólisis aceptable⁽⁹⁾. De esta forma, una vez conocido el proceso en su conjunto, sería posible fermentar el hidrolizado con levaduras no tradicionales para la producción de etanol^(10,11), bien con esquemas de hidrólisis y fermentación consecutivas o simultáneas.

El objetivo de este trabajo es doble. Por un lado, analizar el comportamiento de los endocarpios de aceituna durante su tratamiento con agua caliente a presión, estudiando la composición del hidrolizado líquido en función de dos importantes variables de proceso: temperatura máxima de tratamiento y relación sólido/líquido. Por otra parte, una vez obtenido un hidrolizado con alta concentración de oligosacáridos hemicelulósicos, se investigará el uso de varias formulaciones enzimáticas con el fin de completar la hidrólisis de dichos compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y enzimas. Los endocarpios fragmentados del hueso de la aceituna (EFHA) fueron suministrados por la almazara "S.C.A. San Juan", ubicada en el polígono industrial "Los Olivares" (Jaén, España). Esta instalación, que trabaja con frutos de la variedad 'Picual', separa los endocarpios del orujo graso, procedente del decanter de dos salida, mediante un separador de pulpa y hueso de la firma JAR (Mod. SEP/R-50). Una vez en el laboratorio, el material se dejó secar hasta alcanzar la humedad de equilibrio determinándose, posteriormente, la distribución de los tamaños de partícula mediante una tamizadora Restch (Mod. Vibro). El resultado del ensayo fue el siguiente: 0,00–0,600 mm = $0,9 \pm 0,7\%$; 0,60–0,85 mm = $0,7 \pm 0,1\%$; 0,85–1,20 mm = $1,2 \pm 0,2\%$; 1,20–1,60 mm = $7,4 \pm 0,4\%$; 1,60–2,00 mm = $9,9 \pm 0,6\%$; 2,00–7,00 mm = $80,0 \pm 1,9\%$. Debido al pequeño tamaño relativo de los sólidos, y con el objetivo de minimizar las necesidades energéticas del proceso de obtención de azúcares, sobre los endocarpios no se aplicaron reducciones adicionales de tamaño.

Tres complejos enzimáticos comerciales, suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), fueron empleados en el estudio. En todos los casos se trató de preparaciones en polvo solubles en agua de diversas procedencias y actividades. Las celulasas (CE), de *Trichoderma viride*, presentaron una actividad declarada de 7,8 U/mg. Una unidad de actividad celulasa generó 1,0 mmol de D-glucosa a partir de celulosa en 1 h a pH 5,0 y 37°C. Las actividades declaradas de las hemicelulasas (HE) de *Aspergillus niger*, y las β -glucosidasas (β G) de almendras, fueron iguales a 1,6 U/mg y 2,6 U/mg, respectivamente.

Caracterización de la materia prima. La fracción de extractos existente en la materia prima se cuantificó mediante el empleo de la norma TAPPI T280 pm-99. Los porcentajes de humedad y materia volátil, cenizas y lignina ácido insoluble (LAI) se evaluaron siguiendo, respectivamente, las normas TAPPI T257, T211 y T222. Finalmente, el contenido de celulosa (CEL) y hemicelulosa (HEM) se determinó calculando con carácter previo los porcentajes de fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD), tras lo cual se aplicaron las ecuaciones (1) y (2)⁽¹²⁾:

$$HEM = FND - FAD \quad (1)$$

$$CEL = FAD - LAI \quad (2)$$

También se calculó el contenido potencial de D-xilosa en la materia prima mediante el desarrollo de dos hidrólisis ácidas en serie, capaces de romper los carbohidratos del sólido hasta el nivel de monosacáridos, y el posterior análisis del hidrolizado⁽¹³⁾. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

Tratamiento hidrotérmico. Los tratamientos se llevaron a cabo en un reactor discontinuo a presión Parr (Mod. 4522), de 2 L de capacidad total, operando con una velocidad de agitación igual a 250 rpm. En una primera serie experimental (TH1) se estudió el efecto de la temperatura máxima de proceso (T_{TH}) manteniendo constante la relación sólido/líquido (S/L = 1/6; 50 g de materia prima seca en 300 cm³ de agua ultrapura). Se realizaron experimentos a cinco niveles térmicos (195, 205, 210, 215 y 225°C) procediendo a enfriar el sistema de reacción justo al alcanzarse T_{TH} . Los enfriamientos, hasta temperatura ambiente,

se lograron en menos de 10 minutos al hacer circular agua fría por un serpentín interno del reactor. En la Fig. 1 se muestran los perfiles de temperatura para cuatro experimentos, observándose la gran reproducibilidad de datos en la rampa de calentamiento (con velocidades de $5,4 \pm 0,1^\circ\text{C}/\text{min}$) y el rápido enfriamiento de la carga. Debido a que no se trabajó en condiciones isotérmicas, se anotó la evolución temporal de temperaturas con el fin de obtener, mediante un procedimiento descrito en trabajos previos^(14, 15), los valores del factor de severidad ($\log R_0$).

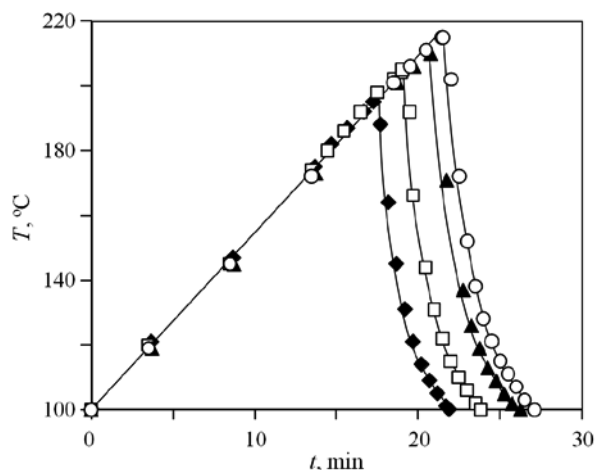


Figura 1. Evolución de temperaturas en los tratamientos hidrotérmicos efectuados con T_{TH} de 195°C (\blacktriangledown), 205°C (\square), 210°C (\blacktriangle) y 215°C (\circ).

En una segunda serie experimental (TH2) se estudió la influencia de la relación sólido/líquido (S/L) sobre las características del hidrolizado líquido. Para ello, se mantuvo el volumen de agua ultrapura en 300 cm^3 y se modificó la cantidad de materia prima logrando relaciones S/L (p/v) iguales a 1/3, 1/4, 1/6 y 1/8. El valor límite de 1/3 no se rebasó porque representa la relación más alta que produce contactos uniformes entre la fase líquida y los sólidos dentro del reactor. La temperatura máxima de proceso (T_{TH}) para esta serie de experimentos se fijó en 210°C . El calentamiento y el enfriamiento del equipo se llevaron a cabo de la misma forma anteriormente descrita.

Tras los tratamientos de las series TH1 y TH2, el contenido del reactor se filtró a vacío lavando con agua ultrapura el residuo insoluble hasta completar un volumen de hidrolizado igual a 1 L. El sólido se extendió sobre una superficie plana y, una vez seco, se pesó y se determinó su humedad con el fin de obtener el porcentaje de materia solubilizada durante el tratamiento (SOL). Con relación al hidrolizado líquido, en primer lugar se determinó el peso de materia seca (MS), mediante la recogida de un volumen de muestra y su desecación en estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, pasándose después a su análisis de acuerdo a los métodos analíticos descritos más adelante. Finalmente, el hidrolizado se centrifugó y congeló en espera de ser utilizado en posteriores etapas hidrolíticas.

Hidrólisis enzimática. Todos los ensayos de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en condiciones estériles en matraces Erlenmeyer de 250 cm^3 , cargados con 100 cm^3 de hidrolizado procedente de los tratamientos hidrotérmicos. Se trabajó a 45°C y 150 rpm en un agitador orbital (Ovan, IC10-CE, Madrid). El pH inicial de la hidrólisis se fijó en 5,0 mediante la adición de NaOH. La evolución del

bioproceso se estudió mediante la recogida de 5 cm^3 de muestra a distintos tiempos: 0, 2, 5, 10, 24, 48 y 72 h. Las muestras se calentaron durante 10 minutos en agua hirviendo para provocar la desnaturalización de las enzimas y, posteriormente, fueron congeladas en espera de su análisis. La eficiencia de la acción enzimática se puso de manifiesto usando el porcentaje de sacarificación, parámetro calculado mediante la ecuación (3),

$$\% \text{ sacarificación} = (M_t - M_0) \cdot 100 / (M_{\text{max}} - M_0) \quad (3)$$

donde M_0 y M_t indican, respectivamente, las cantidades totales de monosacáridos hemicelulósicos (D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa) existentes en el reactor al inicio del ensayo y a tiempo t , y M_{max} es la cantidad potencial máxima de dichos monosacáridos.

Se llevaron a cabo dos series experimentales de hidrólisis enzimática. En la primera (HE1) se analizó el efecto del tipo de preparación enzimática sobre la hidrólisis de oligosacáridos, determinándose la mezcla de biocatalizadores (celulasas, hemicelulasas y β -glucosidasas) que maximiza la producción de D-xilosa. En un segundo diseño experimental (HE2) se escogió la mejor preparación obtenida en la serie previa para estudiar cómo afecta la carga de enzima a las velocidades de reacción. Un resumen de las dosificaciones enzimáticas se muestra en la Tabla 1.

Serie 1 (HE1)			Serie 2 (HE2)		
Exp.	Carga enzimática (U/g MS)		Exp.	Carga enzimática (U/g MS)	
Control	C	H	Control	H	B
HE1 ₁	500	--	HE2 ₁	5	50
HE1 ₂	--	500	HE2 ₂	10	50
HE1 ₃	500	--	HE2 ₃	25	50
HE1 ₄	--	500	HE2 ₄	50	50
HE1 ₅	500	500	HE2 ₅	100	50
HE1 ₆	500	500	HE2 ₆	500	50

C: celulasas; H: hemicelulasas; B: β -glucosidasas; MS: materia seca.

Caracterización de los hidrolizados. En la caracterización de todos los hidrolizados líquidos se determinó las concentraciones de D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa y 5-hidroximetilfurfural (HMF) mediante cromatografía líquida iónica de alta resolución (HPLIC), acoplada a un detector de pulsos amperométricos (Dionex ICS 3000, Sunnyvale, CA, USA). El cromatógrafo se equipó con una columna analítica CARBOPAD PA20 (3 x 150 mm) combinada con una precolumna CARBOPAD PA20 (3 x 30 mm). La elución transcurrió a 30°C usando NaOH 2 mM como fase móvil. Los oligosacáridos fueron cuantificados por un método indirecto basado en la post-hidrólisis ácida de los licores con ácido sulfúrico (4%, p/p) a 121°C durante 60 minutos, y la posterior medida de los carbohidratos generados⁽¹⁶⁾. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materia prima

La caracterización de los endocarpios de aceituna indicó contenidos de extractos y cenizas del $6,0 \pm 0,1\%$ y el $0,7 \pm 0,0\%$, respectivamente. El alto porcentaje de lignina ácido insoluble detectado ($27,7 \pm 0,6\%$) está en consonancia con valores previamente publicados por Taralas y Kontominas⁽¹⁷⁾ ($28,1\%$), y podría explicar la gran dureza del material. Los bajos contenidos de celulosa ($29,9\%$) y los altos de hemicelulosa ($28,1\%$), derivados de los datos de FND ($85,6 \pm 0,5\%$) y FAD ($57,6 \pm 0,7\%$), estarían indicando bajos potenciales relativos para la generación de D-glucosa y altas capacidades para la obtención de pentosas. Recientes investigaciones^(18,19) han puesto de manifiesto las reducidas relaciones celulosa/hemicelulosa (p/p) de los endocarpios de aceituna: 27,1/32,2 o 24,8/34,2. El contenido potencial de D-xilosa fue del $23,4 \pm 0,5\%$, porcentaje cercano al $20,6\%$ determinado en huesos procedentes de otras variedades de aceitunas⁽²⁰⁾.

Tratamiento hidrotérmico: efecto de la temperatura máxima de operación.

Tabla 2. Concentración (g/L) de carbohidratos y HMF en los hidrolizados obtenido en la serie TH1 por autohidrólisis de endocarpios de aceituna. Entre paréntesis se indica la concentración de productos tras la post-hidrólisis ácida del licor.

T_{THP} , °C	$\log R_0$	D-xilosa	L-arabinosa	D-glucosa	D-galactosa	OL	HMF
195	3,31	0,10 (3,0)	0,21 (0,38)	0,09 (0,10)	0,02 (0,12)	2,8	0,08
205	3,59	0,53 (8,0)	0,36 (0,44)	0,09 (0,10)	0,06 (0,22)	6,8	0,11
210	3,75	1,2 (10,1)	0,40 (0,41)	0,08 (0,11)	0,08 (0,24)	8,0	0,12
215	3,91	3,5 (9,7)	0,43 (0,32)	0,09 (0,09)	0,14 (0,25)	5,5	0,12
225	4,22	4,5 (6,6)	0,25 (0,22)	0,08 (0,14)	0,16 (0,24)	2,0	0,13

OL: Oligosacáridos; HMF: Hidroximetilfurfural

Los experimentos de la serie TH1 permiten determinar cómo se modifica la composición del hidrolizado líquido de autohidrólisis al incrementarse la temperatura máxima de tratamiento. Las concentraciones de distintas especies químicas en los licores directos, y en los líquidos generados tras las post-hidrólisis ácidas de los primeros, se tabulan en la Tabla 2. Los datos que surgen de las post-hidrólisis ácidas indican el potencial total de carbohidratos (en forma de monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos) existente en los líquidos directos de autohidrólisis. Se comprueba la limitada capacidad del agua caliente para generar hexosas en todo el intervalo de temperaturas ensayadas. Así, la concentración de D-glucosa en el hidrolizado directo osciló entre 0,08 y 0,09 g/L, mientras que, tras las post-hidrólisis, los valores sólo fueron ligeramente superiores, y fluctuaron entre 0,09 y 0,14 g/L. Teniendo en cuenta que la hemicelulosa es el material que más fácilmente se hidroliza en los tratamientos con agua caliente a presión, los datos anteriores estarían revelando una pobre presencia de D-glucosa en la fracción hemicelulósica del hueso de aceituna. Esta observación está en consonancia con lo publicado por Coimbra et al.⁽²¹⁾ en relación a los porcentajes de D-glucosa en la hemicelulosa del hueso. Con relación a D-galactosa, las concentraciones oscilaron entre 0,02 y 0,16 g/L para el hidrolizado directo, y entre 0,12 y 0,24 g/L en el obtenido en la post-hidrólisis (Tabla 2); de estos valores se derivan rendimientos máximos iguales a 0,53 kg por 100 kg de EFHA. Hay que destacar que para

D-galactosa no se detectaron disminuciones significativas de su concentración con el incremento de temperatura, hecho que podría indicar su mayor estabilidad térmica frente a D-xilosa o L-arabinosa.

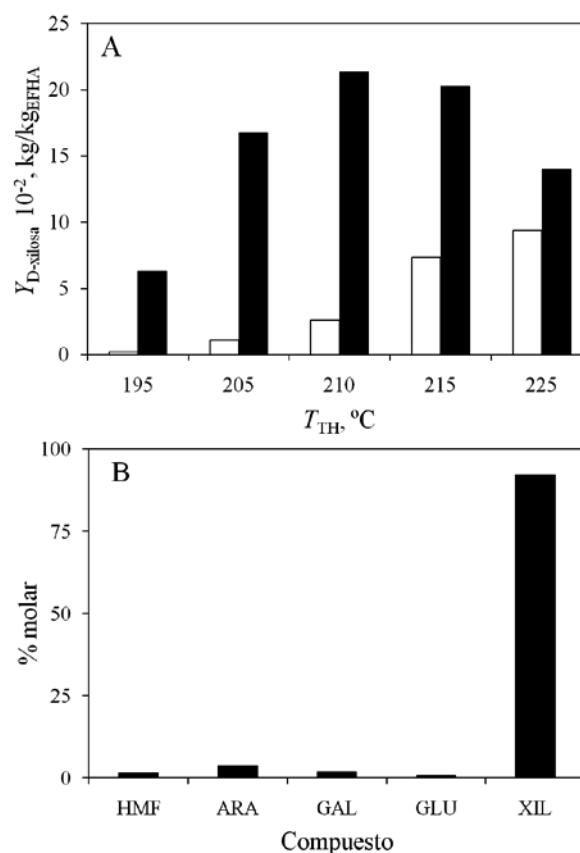


Figura 2. A. Influencia de la temperatura máxima del tratamiento hidrotérmico en el rendimiento de D-xilosa en el hidrolizado directo (barras blancas) y en el que se obtiene de la post-hidrólisis ácida (barras negras). B. Composición (% molar) del hidrolizado de post-hidrólisis ácida generado tras la autohidrólisis a 210°C.

El tratamiento hidrotérmico de los endocarpios de aceituna condujo, preferentemente, a la producción de dos pentosas: D-xilosa y L-arabinosa. Respecto a la primera, las concentraciones en el líquido directo aumentaron continuamente, desde 0,10 hasta 4,5 g/L, con el incremento de temperatura, mientras que en el licor de post-hidrólisis se alcanzó la máxima concentración (10,1 g/L) a la temperatura intermedia de 210°C (Tabla 2). Este comportamiento es el que se visualiza en la Fig. 2-A, donde se representan, tanto para el hidrolizado directo como para el de post-hidrólisis, los rendimientos de D-xilosa expresados como kg de producto por 100 kg de EFHA. El valor máximo observado, 21,3 kg D-xilosa/100 kg de EFHA, representaría una recuperación del 91% de la D-xilosa inicialmente disponible en el endocarpio. L-arabinosa, el segundo monosacárido más abundante en el hidrolizado, salió de la estructura hemicelulósica antes que D-galactosa y D-xilosa, atendiendo a que su máxima concentración tras la post-hidrólisis ácida (0,44 g/L) fue alcanzada a 205°C, frente a los 210°C de D-xilosa, y los 215°C de D-galactosa. Dicha concentración equivale a un rendimiento de 0,93 kg de L-arabinosa/100 kg de EFHA, valor muy parecido al máximo encontrado por otros autores, tras someter huesos

de aceituna a tratamientos de explosión con vapor (0,94 kg/100 kg materia prima)²². En general, se puede decir que los datos de la Tabla 2 son bastante coincidentes, tanto en valores de concentración como en comportamientos respecto a la temperatura de tratamiento, con los publicados por Cuevas et al.⁽²⁾ tras aplicar autohidrólisis sobre endocarpios de aceituna con diámetros comprendidos entre 0,300 y 0,425 mm.

Con relación a los oligosacáridos, su rendimiento máximo en el licor de autohidrólisis (16,9 kg/100 kg EFHA) se obtuvo a 210°C bajo una severidad de tratamiento ($\log R_0$) igual a 3,75. En esas condiciones de severidad se consiguió un hidrolizado directo con un bajo potencial de D-xilosa monomérica (2,6 kg/100 kg EFHA), pero con un gran potencial de D-xilosa contenida en las cadenas solubilizadas de carbohidratos (el 89% en peso del total). Así, la post-hidrólisis ácida de ese licor generó un medio muy rico en la pentosa, cuya composición es mostrada en la Fig. 2-B. Son numerosas las reseñas bibliográficas en las que las máximas producciones de oligosacáridos son conseguidas con severidades de tratamiento medias. Así, Requejo et al.⁽²³⁾ obtuvieron los rendimientos más altos de xilo-oligosacáridos durante el tratamiento con agua caliente a presión de madera de poda de olivo para valores de $\log R_0$ iguales a 3,68. Finalmente, el análisis de HMF puso de manifiesto cómo el aumento de la temperatura máxima de reacción provocó un incremento paralelo de la concentración del furano, algo lógico al ser éste compuesto un producto de la degradación térmica de D-glucosa. Las concentraciones de HMF oscilaron desde 0,08 hasta 0,13 g/L, lo que equivale a rendimientos entre 0,17 y 0,27 kg/100 kg de materia prima. Cabe destacar la baja relación molar HMF/D-xilosa encontrada tras la post-hidrólisis ácida del licor de autohidrólisis a 210°C (1,6%), dato de interés si se pretende fermentar ese hidrolizado (Fig. 2-B).

Tratamiento hidrotérmico: efecto de la relación sólido/líquido

Una vez analizado el efecto de la temperatura máxima de tratamiento sobre la composición de los hidrolizados líquidos, se planteó una nueva serie (TH2) donde T_{TH} se fijó en 210°C (nivel térmico que maximiza el potencial de recuperación de D-xilosa en los licores) y se modificó la relación S/L manteniendo fijo el volumen de agua en el reactor (300 cm³) e incrementando la carga de materia prima alimentada al mismo. Los datos experimentales ponen de manifiesto aumentos continuados de la concentración de carbohidratos, y de HMF, tanto en los líquidos directos de autohidrólisis (Fig. 3-A) como en los de post-hidrólisis (Fig. 3-B). D-xilosa alcanzó valores próximos a 20 g/L tras la hidrólisis ácida del licor directo obtenido con relación S/L igual a 1/3, mientras que las concentraciones de oligosacáridos estuvieron comprendidas entre los 6,3 g/L del experimento con relación 1/8 y los 15,0 g/L del que se realizó con relación 1/3. Hay que tener en cuenta que los datos de concentración se refieren a un volumen de hidrolizado de 1 L (300 cm³ de hidrolizado directo más el agua de lavado), por lo que la concentración de los compuestos podría incrementarse sustancialmente si se optimiza la etapa de lavado.

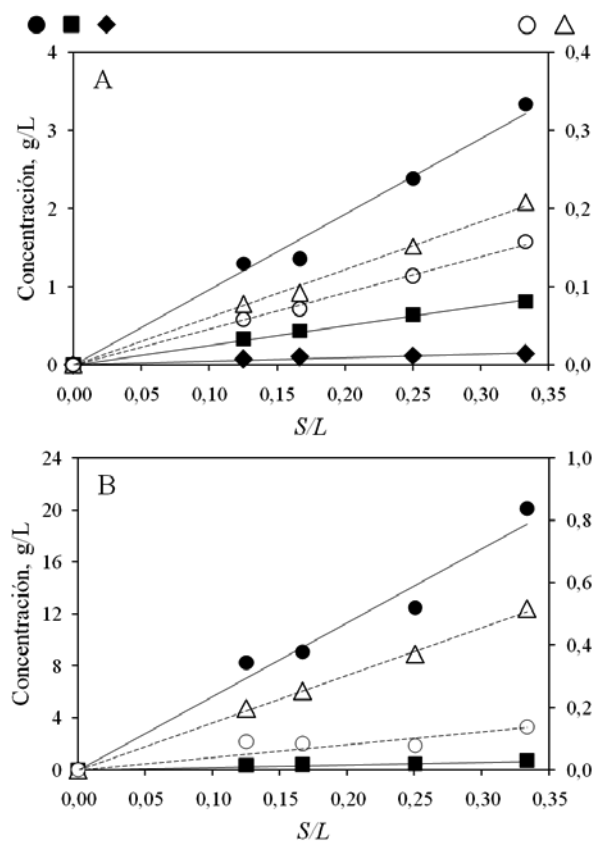


Figura 3. Concentración (g/L) de D-xilosa (●), L-arabinosa (■), HMF (◆), D-glucosa (○) y D-galactosa (△) en los hidrolizados directos de autohidrólisis (A), y en los derivados de post-hidrólisis ácida (B).

A partir de los resultados de esta serie se ha podido determinar los rendimientos en productos, Tabla 3, comprobándose cómo el incremento de la relación S/L no produjo diferencias apreciables en los valores correspondientes a D-glucosa y D-galactosa para los líquidos directos de autohidrólisis, aunque sí llevó a reducciones de los rendimientos asociados a D-xilosa (desde 3,5 hasta 3,2 kg producto/100 kg EFHA), L-arabinosa (0,91–0,83 kg producto/100 kg EFHA), oligosacáridos (16,9–14,2 kg producto/100 kg EFHA) y HMF (0,21–0,15 kg producto/100 kg EFHA). Los valores mínimos de D-xilosa y oligosacáridos obtenidos para la relación intermedia 1/4 podrían ser explicados teniendo en cuenta la baja severidad relativa de ese tratamiento ($\log R_0 = 3,73$), lo que permitiría afirmar que aunque el incremento de la relación S/L afecta negativamente a la producción de carbohidratos (posiblemente como consecuencia de una limitación del poder hidrolítico por defecto de agua), el empleo de la relación 1/3 sigue garantizando altos rendimientos y concentraciones de D-xilosa. Este comportamiento también se pone de manifiesto al calcular los porcentajes de sólido solubilizado durante las autohidrólisis (SOL). El parámetro descendió suave y continuamente al aumentar la relación S/L: 33,6%, 33,5%, 32,9% y 31,5%.

Tabla 3. Composición (expresada en forma de rendimiento, kg producto/100 kg EFHA) del hidrolizado obtenido por autohidrólisis del hueso de aceituna. Entre paréntesis se indica el rendimiento de productos tras la post-hidrólisis ácida del licor.

S/L	log R_0	D-xilosa	L-arabinosa	D-glucosa	D-galactosa	OL	HMF
1/8	3,82	3,5 (22,3)	0,91 (0,90)	0,16 (0,24)	0,21 (0,53)	16,9	0,21
1/6	3,76	3,2 (19,2)	0,93 (0,77)	0,15 (0,18)	0,19 (0,53)	16,3	0,22
1/4	3,73	3,2 (17,5)	0,85 (0,57)	0,15 (0,10)	0,20 (0,49)	12,0	0,17
1/3	3,75	3,2 (20,3)	0,83 (0,70)	0,16 (0,14)	0,21 (0,52)	14,2	0,15

Hidrólisis enzimática: efecto de la mezcla de enzimas

El hidrolizado de partida para el desarrollo de la serie experimental HE1 se consiguió aplicando un tratamiento hidrotérmico de severidad igual a $\log R_0 = 3,82$, correspondiente a una relación S/L = 1/8 y una T_{TH} de 210°C. El licor se analizó determinándose su contenido en materia seca (MS = 15,3 g/L), así como las concentraciones y rendimientos de D-xilosa (2,7 g/L – 5,5 kg/100 kg EFHA), D-glucosa (0,03 g/L – 0,06 kg/100 kg EFHA), L-arabinosa (0,48 g/L – 0,96 kg/100 kg EFHA), D-galactosa (0,12 g/L – 0,24 kg/100 kg EFHA), oligosacáridos (8,7 g/L – 17,4 kg/100 kg EFHA) y HMF (0,05 g/L – 0,1 kg/100 kg EFHA). El potencial total de D-xilosa en el hidrolizado, en forma monomérica, oligomérica o polimérica, fue de 24,6 kg/100 kg EFHA, equivalente a 12,3 g/L.

Los ensayos hidrolíticos llevados a cabo sin enzimas (blanco) alcanzaron, tras 72 h de reacción, concentraciones finales de D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa prácticamente iguales a las del medio de partida: 2,5, 0,40 y 0,11 g/L, respectivamente (Fig. 4), lo que mostraría la necesidad de emplear algún tipo de catalizador para la rotura de las cadenas solubilizadas de carbohidratos.

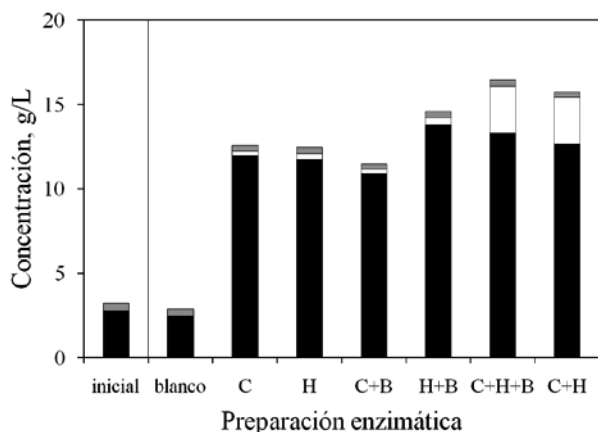


Figura 4. Influencia de la preparación enzimática (Celulasas, C; Hemicelulasas, H; B, β -glucosidasas) en la concentración de carbohidratos simples (D-xilosa, ■; D-glucosa, □ y L-arabinosa, ■) tras 72 h de hidrólisis. Se partió de un hidrolizado a presión obtenido a $T_{TH} = 210^\circ\text{C}$ y S/L = 1/6.

La opción de la hidrólisis enzimática derivó en incrementos muy importantes de las concentraciones de carbohidratos simples (Fig. 4), con valores finales de D-xilosa que fluctuaron entre los 13,8 g/L, del ensayo con hemicelulasas y β -glucosidasas (H+B), y los 10,9 g/L de la prueba efectuada con celulasas y β -glucosidasas (C+B). Los resultados intermedios, referidos a D-xilosa, fueron 13,3, 12,6,

12,0 y 11,7 g/L para las preparaciones (C+H+B), (C+H), (C) y (H), respectivamente. Los datos mostraron que para obtener toda la D-xilosa potencial existente en el hidrolizado se necesitó la presencia de hemicelulasas combinadas con otras enzimas. El uso exclusivo de celulasas o hemicelulasas, así como el de la mezcla de celulasas y β -glucosidasas, no garantizó la hidrólisis total de las cadenas de xilooligosacáridos. Con relación a L-arabinosa, las hidrólisis enzimáticas no consiguieron incrementos apreciables de la concentración del compuesto a lo largo del bioproceso, lo que podría ser explicado considerando una baja presencia de L-arabinosa en las cadenas de carbohidratos del licor, posiblemente como consecuencia de una hidrólisis selectiva y rápida del monómero, desde la matriz hemicelulósica, durante la autohidrólisis. La acción enzimática provocó los mayores aumentos de D-glucosa (2,8 g/L) en las hidrólisis realizadas con las mezclas C+H+B y C+H, es decir, en aquellas en las que se crearon sinergias positivas entre celulasas y hemicelulasas, Fig. 4. Finalmente, la producción de D-galactosa no fue significativa, excepto para las pruebas H+B y C+H+B, donde las concentraciones finales de la especie fueron, en todo caso, muy bajas (0,14 y 0,15 g/L, respectivamente). Del anterior análisis, y para alcanzar la máxima producción de D-xilosa con el menor consumo posible de enzima, se optó por escoger, como mejor preparación enzimática, aquella formulada exclusivamente con hemicelulasas y β -glucosidasas, pasando a analizar, seguidamente, el efecto de la carga enzimática sobre este bioproceso (serie HE2).

Hidrólisis enzimática: efecto de la carga enzimática

El hidrolizado de partida en la serie experimental HE2 se analizó para determinar su contenido en materia seca (MS = 13,5 g/L) y las concentraciones de D-xilosa (1,1 g/L), D-glucosa (0,05 g/L), L-arabinosa (0,27 g/L), D-galactosa (0,05 g/L) y oligosacáridos (9,6 g/L). El potencial total de D-xilosa en el hidrolizado, en forma monomérica, oligomérica o polimérica, fue de 23,4 kg/100 kg EFHA, mientras el potencial total de monosacáridos hemicelulósicos alcanzó 24,2 kg/100 kg EFHA. Las variaciones en la composición de los parámetros de este hidrolizado, respecto al utilizado en la serie HE1, pueden explicarse teniendo en cuenta que las severidades de los tratamientos hidrotérmicos asociados no son exactamente iguales ($\log R_0 = 3,82$ para HE1 y $\log R_0 = 3,75$ para HE2).

La modificación del nivel de carga enzimática en el rango ensayado (Tabla 1) afectó notablemente tanto a la velocidad como a la extensión de la hidrólisis de los oligosacáridos. Así, para alcanzar un porcentaje de sacarificación próximo al 100% se necesitaron cargas de hemicelulasas iguales o superiores a 100 U/g MS, y tiempos de reacción comprendidos entre las 10 h del ensayo HE2₆ (500 U/g MS) y las 48 h del HE2₅ (100 U/g MS), Fig. 5. El resto de dosificaciones de catalizador consiguieron, a las 72 h, sacarificaciones máximas comprendidas entre el 16,0 y el 76,7%, aunque en estos casos el parámetro estudiado no llegó a estabilizarse. Entre la escasa información bibliográfica existente sobre hidrólisis enzimáticas de oligosacáridos, Belkacemi y Hamoudi⁽⁹⁾ encontraron que para completar la sacarificación de oligómeros procedentes de tallos de maíz se necesitó una carga de celulasas de 120 U/g MS, y un tiempo de reacción inferior a 10 h.

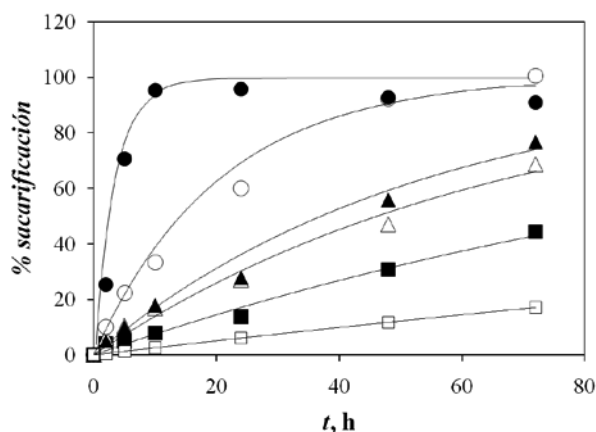


Figura 5. Influencia de la carga de celulasas en el grado de sacarificación de las cadenas de carbohidratos existentes en el licor de autohidrólisis a pH 5,0 y 45°C. La carga de β -glucosidasas se mantuvo en 50 U/g MS y se modificó la carga de hemicelulasas: 5 U/g MS (\square), 10 U/g MS (\blacksquare), 25 U/g MS (\triangle), 50 U/g MS (\blacktriangle), 100 U/g MS (\circ) y 500 U/g MS (\bullet).

Finalmente, es posible plantear un análisis del proceso basado en el estudio de los rendimientos de carbohidratos simples hemicelulósicos (D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa). Con esta idea se calcularon dos variantes de dicho parámetro. Por un lado, el rendimiento de productos generados durante las hidrólisis enzimáticas (Y_{HE}) y, por otro, el rendimiento obtenido al sumarle al primero el rendimiento de cada carbohidrato al comienzo de la biotransformación (rendimiento global del proceso, Y_G), Tabla 4. Los rendimientos de D-xilosa alcanzados a lo largo de las hidrólisis enzimáticas describieron comportamientos paralelos a los descritos en la Figura 5, algo lógico si se tiene en cuenta que esta pentosa es el carbohidrato con mayor peso en el hidrolizado. Así, la utilización de cargas proteicas de 500 U/g MS garantizó un valor máximo de 22,6 kg D-xilosa/100 kg EFHA tras 10 h de reacción, equivalente a una concentración de 10,7 g/L; mientras que la reducción de la dosis enzimática hasta 100 U/g MS tuvo efectos parecidos respecto a la extensión del ataque (21,8 kg/100 kg EFHA, equivalentes a 10,3 g/L) pero se necesitaron 48 horas para completar la hidrólisis. Los rendimientos globales máximos de L-arabinosa y D-galactosa fueron de 0,63 y 0,21 kg/100 kg EFHA, respectivamente.

Tabla 4. Rendimientos (kg producto/100 kg EFHA) máximos de carbohidratos hemicelulósicos, generados durante la hidrólisis enzimática (Y_{HE}) y globales (Y_G). En porcentaje se muestran los incrementos de carbohidratos debidos exclusivamente a la acción enzimática.

	D-xilosa			L-arabinosa			D-galactosa		
	Y_{HE}	Y_G	%	Y_{HE}	Y_G	%	Y_{HE}	Y_G	%
HE2 ₁	2,6	4,9	53,3	0,10	0,48	20,8	0,06	0,14	42,9
HE2 ₂	9,2	11,5	80,1	0,20	0,58	34,5	0,13	0,21	61,9
HE2 ₃	14,3	16,6	86,2	0,25	0,63	39,7	0,12	0,20	60,0
HE2 ₄	16,0	18,3	87,5	0,21	0,59	35,6	0,13	0,21	61,9
HE2 ₅	21,1	23,4	90,2	0,19	0,57	33,3	0,13	0,21	61,9
HE2 ₆	20,3	22,6	89,8	0,21	0,59	35,6	0,11	0,19	57,9

En la Tabla 4 también se incorporan, para los tres carbohidratos y en porcentaje, los incrementos de rendimiento debidos a la acción enzimática, observándose cómo los

valores máximos fueron muy superiores para D-xilosa (90,2%) si se comparan con los de D-galactosa (61,9%) y L-arabinosa (39,7%), lo que podría indicar que la autohidrólisis a 210°C de la materia prima transformó más del 50% de los arabinanos en L-arabinosa, cerca de la mitad de los galactanos en D-galactosa y menos del 50% de los xilanos en D-xilosa.

CONCLUSIONES

Es posible obtener importantes cantidades de D-xilosa utilizando como materia prima un subproducto del proceso de elaboración, en almazara, del aceite de oliva: los endocarpios de aceituna. El esquema de operación estudiado, compuesto de dos etapas, comenzaría con un tratamiento de autohidrólisis efectuado a la temperatura máxima de 210°C ($\log R_0$ próximo a 3,75), capaz de solubilizar toda la D-xilosa del sólido hacia la fase líquida. La pentosa, sin embargo, quedaría confinada, en su mayor parte (un 89% en peso), formando cadenas de oligosacáridos, estructuras cuyo rendimiento alcanza 16,9 kg/100 kg EFHA. Se ha demostrado que el aumento de la relación sólido/líquido, desde 1/8 a 1/3, en esta fase del proceso, sólo provoca pequeñas caídas en los rendimientos de los productos estudiados y, de forma paralela, se produce un importante incremento de sus concentraciones. Durante la etapa de hidrólisis enzimática de oligosacáridos, la mezcla de hemicelulasas (de *Aspergillus niger*) y β -glucosidasas (de almendras) es la que genera una mayor cantidad de D-xilosa. En ese contexto, la carga mínima de hemicelulasas necesaria para conseguir un porcentaje de sacarificación del 100% es de 100 U/g MS. Combinando una adecuada temperatura de autohidrólisis, una alta relación S/L y la hidrólisis enzimática del licor, se podrían obtener hidrolizados con altas concentraciones de azúcares (próximas a 75 g/L) y bajas del inhibidor fermentativo hidroximetilfurfural. En posteriores estudios, este medio se someterá a fermentación con levaduras no tradicionales con el objetivo de evaluar su viabilidad para la producción de etanol o xilitol.

AGRADECIMIENTOS

Los autores, del Grupo Investigación "Bioprocesos TEP-138", agradecen a la Junta de Andalucía la financiación recibida a través del Proyecto AGR/6509. También, desean agradecer a la almazara "San Juan" (Jaén, España) el suministro de endocarpios de aceituna.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez G., Lama A., Rodríguez R., Jiménez A., Guillén R., Fernández-Bolaños J. 2008: «Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds». *Bioresour. Technol.* 99, 5261-5269.
- Cuevas M., Sánchez S., Bravo V., Cruz N., García J.F. 2009: «Fermentation of enzymatic hydrolysates from olive stones by *Pachysolen tannophilus*». *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 461-467.
- Tortosa J.F., Rubio M., Demetrio G. 1995: «Autohidrólisis de tallo de maíz en suspensión acuosa». *Afinidad.* 52, 181-188.

4. Glen S., Cameron K.L., Zemann A.J., Antal M.J. 1996: «Fractionation of sugar cane with hot, compressed, liquid water». *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 2709-2715.
5. Nabarlatz D., Farriol X., Montané D. 2004: «Kinetic modeling of the autohydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of hemicelluloses-derived oligosaccharides». *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 4124-4131.
6. Overend R.P., Chornet E. 1987: «Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatment». *Phil. Trans. Roy. Soc. London A.* 321, 523-536.
7. Parajó J.C., Garrote G., Cruz J.M., Domínguez H. 2004: «Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials». *Trend Food Sci. Technol.* 15, 115-120.
8. Teng C., Yan Q., Jiang Z., Fan G., Shi B. 2010: «Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase». *Bioresour. Technol.* 101, 7679-7682.
9. Belkacemi K., Hamoudi S. 2003: «Enzymatic hydrolysis of dissolved corn stalk hemicelluloses: reaction kinetics and modelling». *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 802-808.
10. Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A.J., Camacho F. 2002: «The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol». *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 641-648.
11. Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Castro E. 1995: «Influence of the concentration of D-xylose and yeast extract on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*». *J. Ferment. Bioeng.* 79, 566-571.
12. Van Soest P.J., Wine R.H. 1967: «Use of detergents in the analysis of fibrous feed. IV. The determination of plant cell wall constituents». *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50, 50-55.
13. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Croker D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. En: *Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures*. National Renewable Energy Laboratory, Golden (USA).
14. García J.F., Cuevas M., Bravo V., Sánchez S. 2010: «Ethanol production from olive pruning by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*». *Renew. Energ.* 35, 1602-1608.
15. García J.F., Sánchez S., Bravo V., Cuevas M. 2010: «Autohydrolysis and acid post hydrolysis of olive-pruning debris». *Afinidad* 548, 279-282.
16. Carvalheiro F., Esteves M.P., Parajó J.C., Pereira H., Gírio F.M. G. 2004: «Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain». *Bioresour. Technol.* 91, 93-100.
17. Taralas G., Kontominas M.G. 2005: «Thermochemical treatment of solid and wastewater effluents originating from the olive oil food industry». *Energ. Fuel.* 19, 1179-1185.
18. Martín-Lara M.A., Hernáinz F., Blázquez G., Calero M., Tenorio G. 2008: «Surface chemistry evaluation of some solid wastes from olive-oil industry used for removal from aqueous solutions». *Biochem. Eng. J.* 44, 151-159.
19. Martínez-Nieto L., Driss Alami S.B., Hodaifa G., Faur C., Rodríguez S., Giménez J.A., Ochando J. 2010: «Adsorption of iron on crude olive stones». *Ind. Crops Prod.* 32, 467-471.
20. Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M. 2002: «Proceso de sacarificación celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol». *Grasas y Aceites.* 53, 282-288.
21. Coimbra M.A., Waldron K.W., Selvendran R.R. 1995: «Isolation and characterization of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull». *Carbohydr. Polym.* 27, 285-294.
22. Ballesteros I., Oliva J.M., Sáez F., Ballesteros M. 2001: «Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction». *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93, 237-252.
23. Requejo A., Peleteiro S., Rodríguez A., Garrote G., Parajó J.C. 2012: «Valorization of residual woody biomass (*Olea europaea* trimmings) based on aqueous fractionation». *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 87-94.