

Autohidrólisis y post-hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo

Juan Francisco García^{1,2*}, Sebastián Sánchez², Vicente Bravo³, Manuel Cuevas²

¹ FRCFT, University College Dublin, National University of Ireland, Agriculture and Food Science Centre, Belfield, Dublin 4, Ireland.

² Dep. Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, Universidad de Jaén. 23071 Jaén, España.

³ Dep. Ingeniería Química, Universidad de Granada. 18071 Granada, España.

Autohydrolysis and acid post-hydrolysis of olive-pruning debris

Autohidràlisi i post-hidràlisi àcida del residu d'esporga d'olivera

Recibido: 23 de julio de 2010; aceptado: 30 de julio de 2010

RESUMEN

Se ha ensayado una post-hidrólisis ácida al proceso de autohidrólisis del residuo de poda del olivo, una biomasa renovable, de bajo coste y disponible como residuo agrario. Aplicada sobre el residuo resultante de la autohidrólisis, una post-hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N a 90°C no aumenta la conversión de la celulosa ni degrada la lignina. Sin embargo, aplicada sobre el hidrolizado, aumenta los rendimientos en azúcares presentes en el mismo desde un 0,8 hasta un 11,4% en D-glucosa, y desde un 0,1% a un 7,8% en D-xilosa, en las condiciones ensayadas, sin que se detecten cantidades apreciables de compuestos fenólicos.

Palabras clave: Autohidrólisis, D-glucosa, Hidrólisis ácida, Residuo de poda de olivo, D-xilosa.

ABSTRACT

An acid post-hydrolysis was carried out after the autohydrolysis process of the olive-pruning debris, a renewable, low-cost and widely available agricultural waste. Applied on the solid remainder obtained after the autohydrolysis, a post-hydrolysis with 1 N sulphuric acid at 90°C neither increases the cellulose conversion nor produces lignin degradation. However, applied on the hydrolysate, sugar yields in the liquid rose from 0.8% up to 11.4% for D-glucose and from 0.1 to 7.8% for D-xylose in the assayed conditions. Finally, the hydrolysate can be considered free of phenolic compounds.

Key words: Acid hydrolysis, Autohydrolysis, D-glucose, Olive-pruning debris, D-xylose.

RESUM

S'assaja una post-hidràlisi àcida al procés d'autohidràlisi del residu d'esporga d'olivera, una biomassa renovable, de baix cost i disponible com a residu agrari. Aplicada sobre el residu resultant de l'autohidràlisi, una post-hidràlisi amb àcid sulfúric 1 N a 90°C no augmenta la conversió de la cel·lulosa ni degrada la lignina. Tanmateix, aplicada sobre l'hidrolitzat, augmenta els rendiments en sucres presents en aquest des d'un 0,8% fins a un 11,4% en D-glucosa, i des d'un 0,1% a un 7,8% en D-xilosa en les condicions assajades, sense que es detectin quantitats apreciables de compostos fenòlics.

Mots clau: Autohidràlisi, D-glucosa, hidràlisi àcida, residu d'esporga d'olivera, D-xilosa.

*Corresponding author: Juan Francisco García Martín.
Tel: +353 1 716 7391 Fax: +353 1 716 7415
E-mail addresses: juan.garciamartin@ucd.ie,
jfgarmar@ujaen.es

INTRODUCCIÓN

La biomasa lignocelulósica representa una de las fuentes renovables más abundantes y menos costosas del planeta. Está compuesta principalmente por 3 fracciones: celulosa (estructura cristalina de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos), hemicelulosa (polisacárido muy ramificado constituido principalmente por pentosas y hexosas) y lignina (polímero aromático). Esta biomasa puede ser aprovechada para la obtención directa de azúcares simples, oligosacáridos y antioxidantes naturales, e indirecta de biocarburantes (etanol) y edulcorantes (xilitol). La obtención de estos dos últimos productos requiere la recuperación previa de los azúcares de las fracciones celulósica (D-glucosa) y hemicelulósica (D-xilosa y D-glucosa) mediante un proceso de hidrólisis para fermentarlos posteriormente.

Una biomasa lignocelulósica de la que se generan ingentes cantidades en los países mediterráneos (cerca de 8×10^6 t solamente en España⁽¹⁾) y de la que se podrían obtener productos de interés industrial es el residuo de la poda del olivo. En trabajos previos se ha comprobado que una hidrólisis ácida en condiciones suaves de temperatura y concentración de ácido conduce a altos rendimientos en D-xilosa⁽²⁾ y, mediante posterior fermentación, en xilitol y etanol^(3,4). Otras técnicas, como la extrusión⁽⁵⁾ y la autohidrólisis⁽⁶⁾, a pesar de solubilizar en considerable extensión las fibras de la biomasa, no conducen a aceptables rendimientos en azúcares. Sin embargo, en el caso de la extrusión, utilizada como pretratamiento del residuo de poda del olivo previo a una hidrólisis ácida, conduce a rendimientos en D-xilosa (y xilitol tras la posterior fermentación con una levadura no tradicional) más elevados que los obtenidos con una sola etapa de hidrólisis ácida en las mismas condiciones⁽⁹⁾. Por tanto, una post-hidrólisis ácida tras una autohidrólisis también podría conducir a un hidrolizado más adecuado para la posterior fermentación que una sola etapa de hidrólisis.

En este trabajo se ha pretratado el residuo de poda del olivo con una autohidrólisis para hidrolizar posteriormente con ácido sulfúrico tanto el residuo como el hidrolizado, con objeto de establecer las condiciones más favorables para la producción de azúcares fermentables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima. El residuo de poda de olivo utilizado procede de árboles de la variedad 'Picual', de una finca con tipología de cultivo tradicional y situada en la provincia de Jaén (España). Este residuo fue picado en el campo utilizando una máquina astilladora de la firma Pimasur S.L. Posteriormente, la fracción de astillas o madera (de superficie aproximada 1 cm^2) fue separada de la hoja mediante una mesa densimétrica a escala industrial. Una vez alcanzada la humedad de equilibrio en el laboratorio se molturó con un molino de cuchillas Retsch, Mod. SM1, y se clasificó por tamaño de partícula mediante una tamizadora Retsch, Mod. Vibro, eligiéndose para este trabajo la fracción comprendida entre 0,425 y 0,6 mm.

Autohidrólisis. Se introdujeron 60 g de residuo de poda y 300 cm^3 de agua ultrapura en un reactor discontinuo a presión Parr, Mod. 4522, de 2 dm^3 de capacidad (Fig. 1). Tras el cierre del reactor se fijó una velocidad de agi-

tación igual a 250 rpm y se procedió a calentar la carga hasta 200°C . Finalmente, se procedió a enfriar el sistema de reacción hasta temperatura ambiente (20°C) utilizando agua de la red circulando por un serpentín interior y, a separar, mediante filtración, el residuo sólido del hidrolizado líquido. El proceso se llevó a cabo por duplicado. El sólido filtrado se lavó repetidamente con agua hasta completar un volumen de hidrolizado igual a 1 dm^3 . El residuo se extendió sobre una superficie plana y, una vez seco, se pesó y caracterizó según su contenido en fibras. El hidrolizado, tras la medida de pH, se centrifugó, y el sobrenadante se analizó de acuerdo con los métodos analíticos descritos posteriormente.

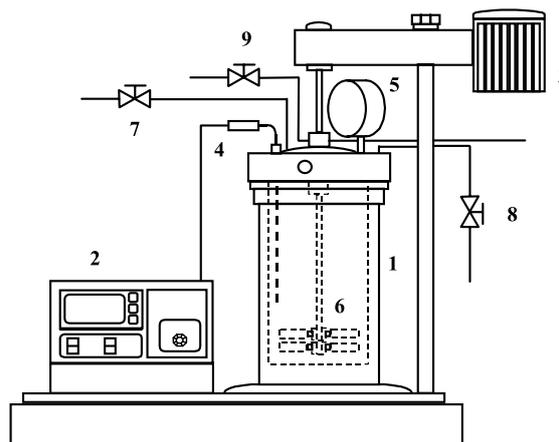


Figura 1. Detalle del equipo de autohidrólisis utilizado. 1: Cuerpo del reactor. 2: Panel de control. 3: Motor. 4: Sonda de temperatura. 5: Medidor de presión. 6: Agitador. 7: Entrada del sistema de refrigeración del reactor. 8: Salida del sistema de refrigeración del reactor. 9: Sistema de refrigeración del agitador.

Post-hidrólisis ácida. Las hidrólisis ácidas se llevaron a cabo en un reactor discontinuo descrito previamente^(2,4) a 90°C y 250 rpm. La hidrólisis sobre el residuo resultante de la autohidrólisis se realizó con H_2SO_4 1 N durante 5,5 h, mientras que con el hidrolizado se llevaron a cabo 2 experimentos, uno con H_2SO_4 0,5 N y otro con H_2SO_4 1 N, ambos durante 3 h.

Caracterización de los residuos. El residuo de partida, así como los sólidos resultantes de las autohidrólisis y post-hidrólisis ácidas, fueron caracterizados de acuerdo a los siguientes parámetros: humedad (TAPPI T257), fibras neutro detergente (FND) y ácido detergente (FAD)⁽⁷⁾, lignina ácido insoluble (LAI; TAPPI T222 os-74) y cenizas (TAPPI T211). El porcentaje de hemicelulosa (HEM) y celulosa (CEL) fue calculado aplicando las expresiones:

$$\text{HEM} = \text{FND} - \text{FAD} \quad [1]$$

$$\text{CEL} = \text{FAD} - \text{LAI} \quad [2]$$

Caracterización de los hidrolizados. Los azúcares reductores totales se determinaron de acuerdo con el método de Miller⁽⁸⁾; la concentración de ácido acético, por un método enzimático basado en el empleo de las enzimas acetil-CoA sintetasa y citrato sintasa⁽⁹⁾; las concentraciones de D-xilosa, D-arabinosa, D-galactosa y D-glucosa mediante cromatografía líquida iónica de alta resolución

(HPLC) acoplada a un detector de pulsos amperométricos (Dionex Bioc DX 300) y las concentraciones de hidroxitirosol, 4-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico, tirosol y vainillina mediante ionización por 'electrosprays' en modo negativo utilizando un HPLC equipado con detector de espectrometría de masas (Varian 1200L). Se ha determinado el índice de inhibidores (contenido en furfural y 5-hidroxi-metil-furfural) mediante medidas de absorbancia a 280 nm siguiendo el método descrito por Tada y col.⁽¹⁰⁾

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones utilizadas para la autohidrólisis determinaron un factor de severidad ($\log R_0$) de 3,5. Este factor de severidad se calculó de acuerdo al procedimiento descrito por Overend y Chornet⁽¹¹⁾ a través de la ecuación [3], donde $T(t)$ es una función que relaciona la temperatura (°C) con el tiempo (min) durante las etapas de calentamiento y enfriamiento del contenido del reactor. Como límite inferior de referencia (T_R) se fijó la temperatura de 100 °C, puesto que por debajo de esta temperatura no se producen procesos de autohidrólisis⁽¹²⁾.

$$R_0 = \int_0^t \exp^{-\frac{T(t)-T_R}{w}} dt \quad [3]$$

Para el parámetro $w = \frac{RT_R^2}{E_a}$ se utilizó el valor 14,75,

seleccionado en un trabajo previo para el cálculo de R_0 en procesos de autohidrólisis del residuo de poda del olivo⁽⁶⁾. El proceso de autohidrólisis, en las condiciones ensayadas, fue insuficiente para llevar a cabo la hidrólisis total de la hemicelulosa y obtener una disolución de azúcares fermentables. A pesar de las elevadas conversiones fraccionales de la hemicelulosa y celulosa (Tabla I), los rendimientos en D-glucosa y D-xilosa fueron bajos (Tabla II). La post-hidrólisis con H_2SO_4 1 N sobre el residuo resultante aumentó aún más dichas conversiones, pero los rendimientos en azúcares también fueron reducidos. Es interesante destacar que el único azúcar obtenido fue D-glucosa (procedente de la celulosa) ya que no se detectó ni D-xilosa ni D-fructosa, azúcares procedentes de la fracción hemicelulósica. En cuanto a la lignina, aunque ciertos autores han encontrado que la autohidrólisis de biomásas lignocelulósicas conduce a una solubilización parcial de la lignina^(6,13), en las condiciones ensayadas dicha solubilización se produjo en poca extensión (1,8%). La post-hidrólisis llevada a cabo sobre el residuo no aumentó dicho porcentaje pues, como ya se comprobó en trabajos previos, una hidrólisis ácida en condiciones suaves de temperatura y de concentración de ácido sulfúrico no produce degradación de la lignina del residuo de poda del olivo⁽²⁾. Por otra parte, se comprueba que la hidrólisis de la celulosa es inviable en las condiciones ensayadas, H_2SO_4 1 N a 90°C.

TABLA I

Conversiones en fibras obtenidas en la autohidrólisis y en la post-hidrólisis al residuo con ácido sulfúrico 1 N (R 1 N).

Exp.	X _{HEM} , %	X _{CEL} , %	X _{LIG} , %
Autohidrólisis	79,8	29,8	1,8
R 1 N	97,1	37,7	1,8

TABLA II

Rendimientos en azúcares reductores totales, D-glucosa, D-xilosa y ácido acético obtenidos en la autohidrólisis y en las post-hidrólisis al residuo (R 1 N) y al hidrolizado con ácido sulfúrico 0,5 N (HA 0,5 N) y 1 N (HA 1 N).

Exp.	Y _{ART} , %	Y _{GLU} , %	Y _{XIL} , %	Y _{Ac} , %
Autohidrólisis	20,5	0,8	0,1	0,5
R 1 N	31,4	1,4	0,0	3,1
H 0,5 N	42,6	6,1	-	1,8
H 1 N	40,0	11,4	7,8	1,9

En cuando a las post-hidrólisis ácidas sobre el hidrolizado resultante de la autohidrólisis, los mayores rendimientos en D-glucosa (11,4%), D-xilosa (7,8%), D-arabinosa (2,5%) y D-galactosa (1%) se alcanzaron utilizando H_2SO_4 1 N. Como se observa en el experimento realizado con H_2SO_4 0,5 N (Fig. 2), la pequeña concentración de D-fructosa obtenida al principio del experimento disminuye lentamente en el transcurso del mismo, mientras que el índice de inhibidores aumenta (formación de furfural y 5-hidroxi-metil-furfural), lo cual demuestra la existencia de degradación de azúcares. Por otra parte, la concentración de compuestos fenólicos al final del proceso fue muy pequeña, siendo la más elevada la correspondiente a vainillina (2,1 mg m⁻³). Este hecho es lógico si se tiene en cuenta que no se produce hidrólisis de la lignina.

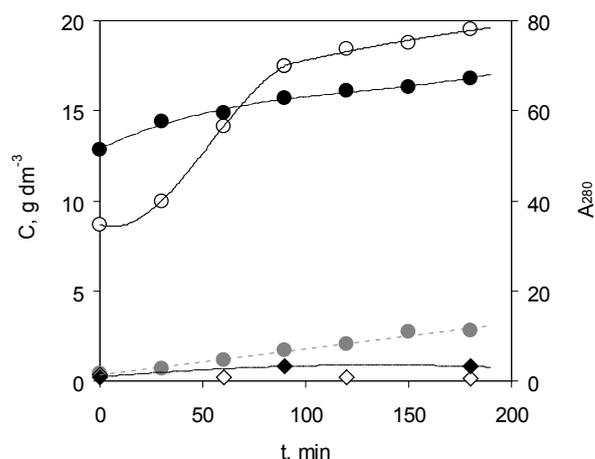


Figura 2. Índice de inhibidores (●) y concentraciones de azúcares reductores totales (○), D-glucosa (●), D-fructosa (◇) y ácido acético (◆) en la post-hidrólisis llevada a cabo con H_2SO_4 0,5 N.

CONCLUSIÓN

La inclusión de una etapa de post-hidrólisis ácida sobre el hidrolizado obtenido con una autohidrólisis determina un nuevo hidrolizado más rico en azúcares (114 g de D-glucosa y 78 g de D-xilosa por kg de residuo de poda utilizado) y libre de compuestos fenólicos, por lo que podría fermentarse con levaduras no tradicionales para producir elevadas cantidades de etanol y xilitol, respectivamente. Sin embargo, la detección en el hidrolizado de compuestos de degradación de azúcares (furfural y 5-hidroxi-metil-furfural) que podrían inhibir la fermentación de estos hi-

drolizados con algunas levaduras sugiere la necesidad de optimizar el proceso de post-hidrólisis. La combinación adecuada de las variables temperatura, concentración de ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis podría conducir a un hidrolizado con mayor composición en azúcares y menor degradación de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto AGR-1272/2005, concedido por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa en su primera convocatoria de Proyectos de Excelencia. El Dr. Juan F. García Martín agradece la concesión de la beca predoctoral a la Junta de Andalucía (España).

BIBLIOGRAFÍA

1. García J.F., Sánchez S., Bravo V. 2010. Producción de bioetanol a partir del residuo de poda del olivo. Ed. Fundación ECA Bureau Veritas, Barcelona.
2. García J.F., Sánchez S., Bravo V., Rigal L., Cuevas, M. 2008: «Acid hydrolysis of olive-pruning debris for D-xylose production». *Collect. Czech. Chem. Commun* **73**, 637–648.
3. Cuevas M., Sánchez S., Bravo V., García J.F., Baeza J., Parra C., Freer J. 2010: «Determination of optimal pre-treatment conditions for ethanol production from olive-pruning debris by simultaneous saccharification and fermentation». *Fuel* **89**, 2891–2896.
4. García J.F., Sánchez S., Bravo V., Cuevas M., Rigal L., Gaset A. 2010: «Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis* ». *Holzforchung* **65**, 59–65.
5. García J.F., Sánchez S., Bravo V., Cruz N., Cuevas M., Rigal L., Doumeng C. 2008: «Hidrólisis ácida del residuo de poda de olivo en un reactor continuo de extrusión». *Afinidad* **534**, 39–44.
6. García J.F., Cuevas M., Bravo V., Sánchez S. 2010: «Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*». *Renewable Energy* **35**, 1602–1608.
7. 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.
8. Miller G. 1959: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
9. Bergmeyer H., Möllering H. 1974: Acetic acid. En: *Methods of enzymatic analysis* (2^a Ed.), Bergmeyer H.U. (Ed), Vol. 3, Academic Press, Nueva York 1520-1528.
10. Tada K., Horiuchi J.I., Kanno T., Kobayashi M. 2004: «Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*». *J. Biosci. Bioeng.* **47**, 228-230.
11. Overend R.P., Chornet E. 1987: «Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments». *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **321**, 523–536.
12. Tortosa J.F., Rubio M., Soler A. 1995: «Autohidrólisis de tallo de maíz en suspensión acuosa». *Afinidad* **52**, 305–311.
13. Van Walsum G.P., Allen S.G., Spencer M.J., Laser M.S., Antal M.J., Lynd L.R. 1996: «Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol». *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**, 157-170.