

Producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión con vapor

Production of fermentables sugars by enzymatic hydrolysis of steam-exploded rice husks

Yineth Piñeros-Castro^{1*}; Gloria Amparo Velasco¹; Jeimmy Proaños¹; William Cortes²; Ignacio Ballesteros³

¹Programas Ingeniería de alimentos, Ingeniería química y ²Maestría en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Cra.4 22-61, Bogotá, Colombia.

³Centro de Investigaciones Energéticas, Mediambientales y Tecnológicas, Avenida Complutense, 22-28040, Madrid, España.

*yineth.pineros@utadeo.edu.co

Fecha Recepción: 24 de marzo de 2011

Fecha Aceptación: 3 de octubre de 2011

Resumen

Dentro de las alternativas propuestas para el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos se incluye su transformación en azúcares, que luego se usan como materia prima en la producción de etanol. Según Fedearroz, el sector arrocerero colombiano genera alrededor de 400000 t/año de cascarilla de arroz, compuesta por lignina, celulosa y hemicelulosa, por lo que se considera un sustrato adecuado para la producción de azúcares dada su disponibilidad y su relativo bajo costo. Sin embargo, para un adecuado proceso de producción de azúcares fermentables es necesaria la aplicación de pretratamientos que modifiquen la estructura compleja de este material. Uno de los tratamientos utilizados es el de explosión con vapor, en el cual el material lignocelulósico se pone en contacto con vapor saturado a temperaturas entre 190-230°C, durante tiempos definidos, luego de los cuales se realiza una descompresión súbita, ocasionando desagregación y destrucción parcial de los enlaces lignina-carbohidrato, obteniendo como resultado un material cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. Este tratamiento también se ha estudiado utilizando catalizadores ácidos (sulfúrico), el cual es promisorio pues se logran mayores valores en la hidrólisis enzimática. Sin embargo ésta última tecnología no ha sido evaluada con cascarilla de arroz, por lo que en este trabajo se estudió la explosión con vapor a 190°C (10 y 25 min) de cascarilla impregnada con agua y una solución de ácido sulfúrico 0,5% v. Como resultado, se logró solubilizar parcialmente la hemicelulosa y afectar la estructura del material, con lo que se aumentó la producción de azúcares a partir de cascarilla, obteniéndose una máxima recuperación global de glucosa (tratamiento e hidrólisis enzimática) de 14,98% p (0,5% v H₂SO₄, 25 min, 190°C); este valor es muy superior al 0,7% p logrado con material sin tratar.

Palabras clave: azúcares fermentables, lignocelulósicos, aprovechamiento de biomasa, arroz.

Abstract

One of the alternatives proposed as sustainable option for exploiting lignocellulosic materials is their conversion to fermentable sugars to produce feedstock for ethanol. Rice Industry in Colombia generates 400000 tons per year of rice husks, a high availability and low cost material which basic is composed by lignin, cellulose and hemicellulose; resulting in an adequate substrate for sugar conversion. However, this feedstock must be pretreated in order to improve the sugar fermentation process by modifying its complex structure. One effective method is the steaming explosion, which is carried out through exposing the lignocellulosic material to steam at fixed temperature between 190–230°C. After a specific steaming time the substrate undergoes sudden decompression forcing the disintegration and partial destruction of the lignin-carbohydrate bonds; resulting in a new material where the exposure of cellulose to enzymatic hydrolysis is higher. The same treatment has been applied using acid catalysts (sulfuric acid) resulting in higher yields during the enzymatic hydrolysis. The last technology has not been evaluated on rice husk; this work steaming explosion process applied at 190°C (10 y 25 min) to rice husks impregnated with both water and 0.5% v sulfuric acid. The results show partial solubilization of hemicellulose and clear degradation of the material structure, reflected in an increased sugars production by the enzymatic hydrolysis. A maximum glucose yield for pretreatment and enzymatic hydrolysis of 14,98% w was achieved (0.5% v H₂SO₄, 25 minutos, 190°C), a considerable superior value than 0.7% w obtained for the untreated material.

Keywords: fermentable sugars, lignocellulosic materials, biomass exploitation, rice.

Introducción

Los residuos lignocelulósicos generados en el procesamiento del arroz como la cascarilla y el tamo (desecho abandonado en el sitio de recolección), son materiales considerados de poco valor y en algunos casos son un residuo. El poco valor dado especialmente a la cascarilla, se debe principalmente a las pocas tecnologías implementadas en el país para su procesamiento y posterior valorización, ya que su uso se limita como combustible sólido, material para abonos y como cama para animales. Según estadísticas del 2010 [1], el área destinada a la producción de arroz en Colombia es de aproximadamente 437481 Ha, en la cual se genera alrededor de 2,1 millones de toneladas de arroz paddy (con cáscara) y cerca de 400000 toneladas de cascarilla/año. Dentro de otras alternativas para el aprovechamiento de la cascarilla de arroz se encuentran su uso para la producción de sílica [2], intercambiador iónico para el tratamiento de aguas residuales [3], sustrato para producción de enzimas [4], furfural [5] y etanol [6].

Por otro lado, la sacarificación o hidrólisis enzimática para la producción de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos ha sido considerada una manera prometedora de producir combustibles y químicos, ya que son una fuente de materias primas que no compite con los alimentos. Sin embargo, su aprovechamiento se ve limitado por la fuerte asociación que existe en su estructura (lignina, celulosa, hemicelulosa), por lo cual es necesaria la aplicación de pretratamientos que tienen como objetivo desintegrar esta matriz compleja de tal manera que se mejore la hidrólisis enzimática para la producción de azúcares especialmente glucosa. En el pretratamiento de explosión con vapor, el material lignocelulósico se somete a temperaturas entre 190-230°C mediante la inyección directa de vapor saturado, durante un intervalo de tiempo entre 1 y 10 min, luego del cual se realiza una rápida despresurización. En el pretratamiento se desagregan y rompen las fibras, ocurre un proceso de despolimerización y se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato. Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. La explosión por vapor ha sido reconocida como un método muy efectivo para el pretratamiento de maderas duras y residuos agrícolas [7], pastos [8], residuos de trigo [9] y residuos de olivo [10],

entre otros. El proceso de explosión con vapor se ha propuesto con modificaciones como el uso de amoníaco (AFEX) [11], dióxido de carbono [12] y ácido sulfúrico, el cual es promisorio pues combina los efectos del ácido y del vapor, alcanzando rendimientos superiores al 80% peso [13]. La explosión con vapor catalizada con ácido sulfúrico ha sido evaluada en abeto rojo utilizando dos pasos (180°C, 10 min, H₂SO₄ 0,5% en peso y 200°C, 2 min y H₂SO₄ 2% en peso) [14], residuos de trigo (190°C, 10 min, H₂SO₄ 0,2% en peso) [15], maderas blandas (180°C, 10 min, H₂SO₄ 0,5% en peso) [16], residuos de arroz (165°C, 2 min., H₂SO₄ 2% en peso)[17]. No se encuentran reportes sobre la aplicación de esta última tecnología a la cascarilla de arroz, por lo que en este trabajo se realizó explosión con vapor a 190°C de cascarilla de arroz impregnada con agua y ácido sulfúrico al 0,5% vol., bajo dos condiciones (10 y 25 min). Posteriormente se caracterizaron los sólidos y los líquidos y se realizó hidrólisis enzimática para la producción de azúcares fermentables.

Metodología

Material vegetal e impregnación

100g, de cascarilla de arroz proveniente del Espinal (Tolima), se impregnaron con 1000 mL de agua o de solución de ácido sulfúrico al 0,5% peso durante 12h a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró, obteniendo material con una humedad de 60±5% para su tratamiento de explosión con vapor.

Tratamiento de explosión con vapor

Las condiciones del tratamiento de explosión con vapor fueron 190°C, durante 10 y 25 min, utilizando material impregnado con agua y ácido sulfúrico 0,5% v. Los experimentos se realizaron en un reactor de 10 L, acoplado a un tanque de expansión y a un sistema de generación de vapor, el cual se mantuvo a 240°C durante los ensayos. La cascarilla se cargó al reactor, se realizó una purga y se alcanzaron las condiciones del ensayo mediante la inyección de vapor saturado. Luego del tiempo de tratamiento se realizó la expansión súbita alcanzando la presión atmosférica. Posteriormente se separaron las fracciones sólida y líquida. El material sólido se pesó, se determinó la humedad y se caracterizó (lignina, celulosa, hemicelulosa, cenizas); se guardó en refrigeración durante 24h para su posterior hidrólisis enzimática. Al líquido de tratamiento se le determinó el

contenido de compuestos inhibidores (furfural e hidroximetil furfural) y azúcares simples (glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa).

Hidrólisis enzimática

Los sólidos insolubles pretratados fueron sometidos a hidrólisis enzimática, 1,25g (base seca) en 25mL de buffer citrato de sodio 0,1 M, pH 4,8, durante 72h a 150 rpm y 50°C. Se utilizaron las enzimas de Novozymes Celluclast 1,5L, 15 unidades de papel filtro FPU/g de sustrato y NS50010 con actividad β -glucosidasa 15 Unidades internacionales de actividad B-glucosidasa (UI)/g de sustrato. La determinación de las actividades enzimáticas se realizaron de acuerdo a la IUPAC [18].

Métodos analíticos

El contenido de humedad se realizó mediante analizador de humedad (Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus) a 105°C. El contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas de los materiales sin tratar y tratados, se realizó utilizando los procedimientos analíticos para el análisis de biomasa de la NERL (National Renewable Energies Laboratory) [19]. El contenido de glucosa, xilosa, manosa, galactosa, arabinosa, furfural e hidroximetil furfural se realizó por HPLC, utilizando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), temperatura 65°C, fase móvil ácido sulfúrico 0,0005 M a un flujo isocrático de 0,6 mL/min, detector de índice de refracción. Este mismo método se utilizó para determinar

glucosa en los hidrolizados enzimáticos. Los patrones utilizados fueron reactivos grado analítico marca Sigma.

Resultados y discusión

En la Tabla 1, se presentan los resultados de la recuperación de hemicelulosa en el líquido de tratamiento y la generación de compuestos de degradación de xilosa y glucosa, correspondientes a furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente.

Se puede observar que la recuperación de sólidos disminuye con el aumento del tiempo de tratamiento y es menor en el tratamiento con cascarilla impregnada con ácido, debido a la mayor solubilización del material [20]. Aunque no se encontraron reportes de tratamientos de explosión con cascarilla de arroz impregnada con ácido, la recuperación de la cascarilla es superior a la reportada con abeto rojo (63%) tratado bajo condiciones similares [14].

Por otro lado, el tratamiento de explosión con vapor permitió recuperar azúcares hemicelulósicos (xilosa mayoritariamente) de la cascarilla en el líquido de tratamiento, tanto con material impregnado con agua como con ácido. La máxima recuperación se obtuvo con el material impregnado con ácido y tratado a 190°C por 10 min. Sin embargo, a condiciones ácidas se presentó una disminución en la recuperación de la hemicelulosa cuando el tiempo se extiende a 25 min, debido a que a condiciones más severas se ocasiona una mayor degradación de la misma.

Tabla 1. Recuperación de sólidos (base seca); solubilización de glucosa y xilosa y generación de compuestos inhibidores en el líquido de tratamiento de explosión con vapor.

Impregnación, T (°C), t (min)	Recuperación de sólidos secos % peso	% recuperación de glucosa en el líquido ^a	% recuperación de xilosa en el líquido ^b	Furfural ^c	5-Hidroximetil furfural ^d
Agua, 190, 10	79,61	3,32 (8,62)	6,09 (33,90)	0,65	0,08
Agua, 190, 25	77,74	3,20 (8,31)	9,05 (52,87)	1,09	0,13
H ₂ SO ₄ 0,5% vol, 190, 10	74,61	4,51 (11,71)	12,16 (67,68)	0,50	0,05
H ₂ SO ₄ 0,5% vol, 190, 25	68,68	10,20 (26,49)	9,28 (51,65)	1,24	0,26

^a g de glucosa en el líquido de pretratamiento/100 g de cascarilla inicial, ^b g de xilosa en el líquido de pretratamiento/100 g de cascarilla inicial, ^c g de furfural/100 g de cascarilla pretratada, ^d g de hidroximetil-furfural/100 g de cascarilla pretratada. Los valores en paréntesis corresponden al porcentaje recuperado de celulosa (glucosa) o hemicelulosa (xilosa) potencial en la materia prima*100.

En cuanto a la recuperación de glucosa, en el líquido de tratamiento se presenta una mayor

solubilización con impregnación ácida, debido a que la presencia del H₂SO₄ promueve la solubilización

de los azúcares como se ha reportado [17, 20].

En este trabajo bajo condiciones ácidas se logró solubilizar en promedio el 59,66% de la hemicelulosa y el 19,10% de la celulosa, disponibles en el material. Este último valor es similar al obtenido bajo severidades similares utilizando maderas blandas [14]. En la Tabla 1 se observa que en general a condiciones más severas del tratamiento (mayor tiempo) se promueve la producción de compuestos inhibidores de la fermentación, especialmente de furfural, producto de degradación de la xilosa; este resultado concuerda con la disminución de la hemicelulosa a las condiciones más severas.

Similares comportamientos se han reportado en tratamientos de explosión con vapor utilizando subproductos de la extracción de aceite de oliva [21] y tallos de girasol [22]. Los valores encontrados de generación de compuestos inhibidores de la fermentación (furfural y 5-hidroximetilfurfural) fueron similares a los obtenidos en tratamientos de abeto rojo, los cuales se ha reportado no presentaron problemas en la fermentación [14].

En cuanto a los datos de composición de los sólidos sin tratar y tratados, presentados en la Figura 1, se observa un aumento en la concentración de celulosa disponible para la hidrólisis y un mayor porcentaje de lignina, dado básicamente por la extracción de la fracción hemicelulósica ocurrida en el tratamiento. En el proceso de caracterización, no se encontró hemicelulosa en los sólidos tratados impregnados con ácido, condición bajo la cual se ha reportado una mayor solubilización de la misma durante el tratamiento [14].

Respecto a la hidrólisis enzimática en la Figura 2, se presenta el porcentaje de hidrólisis enzimática (%HE) en g de glucosa producida por HE por cada 100 g cascarilla inicial o sometida a tratamiento. En general se observan mayores valores de %HE en la cascarilla impregnada con ácido que con agua, por lo que efectivamente el uso de este catalizador ácido mejora la disponibilidad de la matriz para la HE como previamente ha sido reportado por [14-17].

Entre los dos tiempos de tratamiento al que se sometió la cascarilla impregnada con ácido no se presentaron diferencias significativas. Sin embargo, en presencia de ácido, se logró aumentar 2,26 veces la solubilización de glucosa por un mayor tiempo de tratamiento, como se observa en la Tabla 1.

En general se observa en la Figura 2, que el pretratamiento permite aumentar la eficiencia

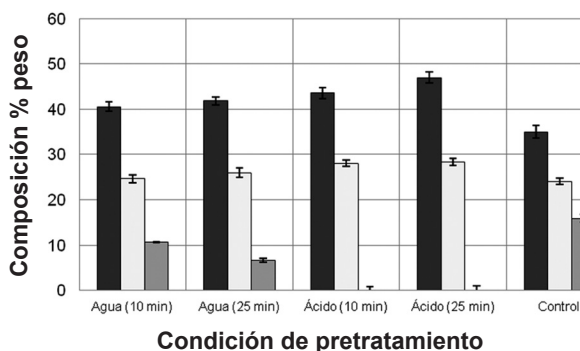


Figura 1. Composición de la cascarilla sin pretratar y pretratada por explosión con vapor. ■ Celulosa, □ Lignina, ■ Hemicelulosa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar n=3.

de la HE bajo todas las condiciones evaluadas, alcanzando un máximo valor de 16,99g glucosa/100g de glucosa potencial en el material pretratado, el cual es 24,3 veces el valor obtenido en el control. Aunque la eficiencia fue mejorando con la severidad del tratamiento, no se presenta diferencias significativas entre los tratamientos con impregnación ácida. En la Figura 3 se presentan los valores de recuperación de glucosa, por HE y la recuperación global (glucosa solubilizada en el tratamiento (Tabla 1) más la producida por HE). La máxima recuperación global obtenida fue de 14,98% en peso de cascarilla a glucosa, realizando explosión con vapor a 190°C y 25 min, con cascarilla impregnada H_2SO_4 0,5% vol. Este valor es 21,4 veces el obtenido en el control y 3,58 veces el obtenido con impregnación con agua, bajo las mismas condiciones. El máximo valor de recuperación total de glucosa obtenido en este trabajo corresponde al 39,91% peso de la celulosa potencial en la cascarilla, tomando como base la caracterización de los materiales presentado en la Figura 1. Se han reportado mayores valores de conversión a severidades similares: 35% en peso en maderas blandas [14], 39,64% en peso en residuos de trigo [15], 49,2% en peso en residuos de arroz [17]. Estos bajos rendimientos se deben especialmente a la estructura fuertemente asociada de la cascarilla de arroz y en particular por la presencia de sílice. En la Figura 4 se encuentran fotografías del material sin tratar y tratado por explosión con vapor, donde se puede observar el rompimiento de la estructura lignocelulósica, especialmente con impregnación ácida lo que favorece la hidrólisis enzimática.

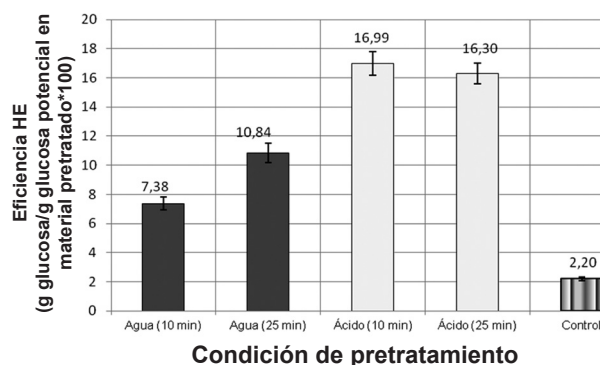


Figura 2. Eficiencia de la hidrólisis enzimática. Las barras de error corresponden a la desviación estándar $n=3$.

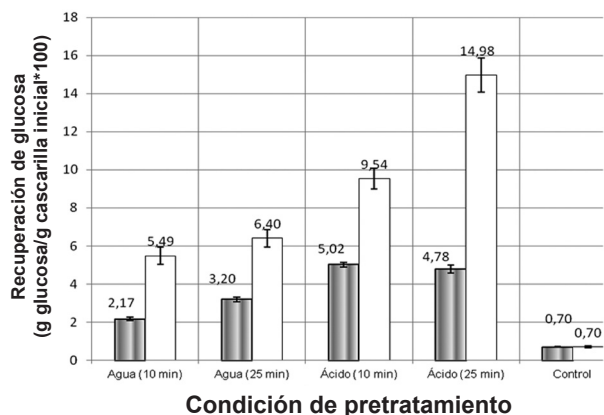


Figura 3. Recuperación de glucosa por hidrólisis enzimática ■ y global □. Las barras de error corresponden a la desviación estándar $n=3$.

a)



b)



c)



Figura 4. Fotografías de cascarrilla a) sin tratar y tratada por explosión con vapor 190°C, 10 min b) impregnada con agua, c) impregnada con ácido sulfúrico 0,5%.

Conclusiones

Se realizó pretratamiento por explosión con vapor a la cascarrilla de arroz, impregnada por 12 h con agua y ácido sulfúrico al 0,5% v tratamiento que permitió la recuperación de los azúcares hemicelulósicos en el líquido de tratamiento hasta en un 67,68% p. Se evidenció que al aumentar la severidad de pretratamiento se generan mayores cantidades de furfural e hidroximetilfurfural, productos de degradación de la xilosa y la glucosa respectivamente. En cuanto a la composición de los materiales, el tratamiento provocó un aumento en la concentración de celulosa disponible para la hidrólisis enzimática, la cual aumentó con la severidad del tratamiento. Comportamiento contrario presentó la hemicelulosa, debido a su mayor solubilización bajo las condiciones evaluadas. Se logró mejorar la hidrólisis enzimática, bajo las condiciones

evaluadas. El valor máximo de recuperación global de glucosa obtenida fue de 14,98g de glucosa por cada 100g de cascarrilla pretratada (glucosa en el líquido de tratamiento más glucosa por hidrólisis enzimática) bajo las condiciones de pretratamiento 190°C, 0,5% v y 25 min; este valor corresponde al 39,91% p de la celulosa potencial en la cascarrilla.

Los valores presentados indican que el tratamiento de impregnación con ácido sulfúrico y explosión con vapor permite la producción de azúcares fermentables a partir de la cascarrilla de arroz, siendo un tratamiento que debe optimizarse para lograr su mayor conversión.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Cámara Induarroz de la ANDI y la Universidad Jorge Tadeo Lozano, entidades financiadoras

del proyecto "Aplicación de tecnologías para el aprovechamiento de las fracciones celulósica y hemicelulósica de la cascarilla de arroz".

Referencias

- [1] Series históricas. Fedearroz. Disponible en: http://www.fedearroz.com.co/apr_public.php. Acceso el 3 de noviembre 2010.
- [2] Kalapathy U, Proctor A, Shultz J.K. A simple method for production of pure silica from rice hull ash. *Bioresour. Technol.* 2000;73:257-62.
- [3] Orlando US, Baes AU, Nishijima W, Okada M. A new procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials. *Bioresour. Technol.* 2002;83:195-8.
- [4] Lee Y, Kim B, Lee B, Jo K., Lee N, Chung C, et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.* 2008;99(2):378-86.
- [5] Montané D, Salvadó J, Torras C, Farriol X. High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass Bioenergy.* 2002;22(4):295-304.
- [6] Biswas A, Saha BC, Lawton JW, Shogren RL, Willett JL. Process for obtaining cellulose acetate from agricultural by-products. *Carbohydr. Polym.* 2006;64:134-7.
- [7] Oliva JM. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Colección Documentos CIEMAT, España, 2003, 160.
- [8] Viola E, Cardinale M, Santarcangelo R, Villone A, Zimbardi F. Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenergy.* 2008;32(7):613-8.
- [9] Montane D, Farriol X, Salvado J, Jollez P, Chornet E. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. *Biomass Bioenergy.* 1998;14(3):261-76.
- [10] Conde E, Cara C, Moure A, Ruiz E, Castro E, Domínguez H. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chem.* 2009;114(3):806-12.
- [11] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 2002;83(1):1-11.
- [12] Zheng Y, Lin HM, Tsao GT. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. progress.* 1998;14(6):890-6.
- [13] Galbe M, Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2002;59(6):618-28.
- [14] Soderstrom J, Pilcher L, Galbe M, Zacchi G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. *Biomass Bioenergy.* 2003;24(6):475-86.
- [15] Linde M, Jakobsson E, Galbe M, Zacchi G. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass Bioenergy.* 2008;32(4):326-32.
- [16] Söderström J, Pilcher L, Galbe M, Zacchi G. Combined use of H₂SO₄ and SO₂ impregnation for steam pretreatment of spruce in ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2003;105(1-3):127-40.
- [17] Wen-Hua C, Ben-Li P, Ching-Tsung Y, Wen-Song H. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 2011;102(3):2916-24.
- [18] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 1987;59(2):257-68.
- [19] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP) NRLE National Renewable Energy Laboratory. Issue Date: 4/25/2008.
- [20] Zimbardi F, Viola E, Nanna F, Larocca E, Cardinale M, Barisano D. Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. *Ind. Crops.Prod.* 2007;26(2):195-206.
- [21] Ballesteros I, Oliva JM, Saez F, Ballesteros M. Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Appl Biochem Biotechnol.* 2001;91(1):237-52.
- [22] Ruiz E, Cara C, Manzanares P, Ballesteros M, Castro E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb Technol.* 2008;42(2):160-6.