

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CASCARILLA DE ARROZ PRETRATADA CON ACIDO DILUIDO PARA EVALUAR LA EFICACIA DE LA ETAPA DE PRETRATAMIENTO

Eliana P. Dagnino^{a,b*}, Facundo S. Roggero Luque^a, Walter G. Morales^a, Ester R. Chamorro^a, Fernando E. Felissia^c, María C. Area^{c,d}, Silvia D. Romano^{b,d}

^a*Grupo UTN de Investigación en Química Orgánica Biológica (QUIMOB) Facultad Regional Resistencia (FRRe), Universidad Tecnológica Nacional (UTN), French 414, 3500, Resistencia, Argentina.*

^b*Grupo de Energías Renovables (GER), Facultad de Ingeniería (FI), Universidad de Buenos Aires (UBA), Paseo Colón, 850, C1063ACV, Capital Federal, Argentina.*

^c*Programa de Celulosa y Papel (PROCYP), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEyN), Universidad Nacional de Misiones (UNAM), Félix de Azara, 1552, 3300, Posadas, Argentina.*

^d*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia, 1917, 1033, Capital Federal, Argentina*

*Autor a quien dirigir la correspondencia: Número de fax: + 54 362-4432683 int 224 y e-mail: pdagnino@frre.utn.edu.ar o paoladagnino@yahoo.com.ar

Resumen

La obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, como la cascarilla de arroz, requiere de los siguientes pasos: pre-tratamiento, hidrólisis, fermentación y separación. El presente trabajo de investigación centró su atención en la segunda etapa. Para ello se partió de cascarilla de arroz pre-tratada con ácido sulfúrico diluido optimizado en estudios previos. Se realizó la hidrólisis enzimática del material pre-tratado y sin tratar, para comparar los avances producidos debido a la etapa de pre-tratamiento. Mediante la cuantificación de los azúcares liberados durante la etapa de hidrólisis enzimática se observó que esta liberación es mucho más eficaz en el caso de la cascarilla pre-tratada. La conversión al comienzo de la hidrólisis (50 minutos de reacción) fue del 21,2% de mientras que en la cascarilla sin tratar solo se convirtió el 8,1%. A las 50 horas se puede dar por finalizada la reacción con el 50% de conversión para el caso de cascarilla pre-tratada y del 31% para la sin tratar.

Palabras clave: cascarilla de arroz; hidrólisis enzimática; bioetanol

Introducción

La producción de bioetanol, vía hidrólisis enzimática, a partir de materiales lignocelulósicos, (como la cascarilla de arroz) requiere básicamente de tres etapas: pre-tratamiento, hidrólisis y fermentación. A diferencia de las materias primas ricas en azúcares simples (sacarosa y almidón), los residuos agroindustriales presentan una estructura compleja en la que los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) se encuentran protegidos por un compuesto fenólico, hidrofóbico y muy resistente, llamado lignina. Además, las hemicelulosas presentan en su composición azúcares de cinco carbonos que no son fermentables por los microorganismos comunes. Es por esta razón, que estos materiales requieren de una etapa de pre-tratamiento para "liberar" a los carbohidratos de los impedimentos estructurales que estos presentan (1, 2). El objetivo de esta etapa es provocar una perturbación física de la estructura facilitando la hidrólisis, específicamente modificando la estructura de los residuos lignocelulósicos mediante el fraccionamiento de los componentes principales de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y lignina, aumentar el área superficial, dejar el material altamente accesible al ataque enzimático, reducir la degradación de los carbohidratos e impedir la formación de inhibidores.

Luego del pre-tratamiento los carbohidratos deben ser hidrolizados a sus azúcares simples y posteriormente fermentados a etanol por microorganismos. Debido a su estructura compleja, las diferentes fracciones de biomasa lignocelulósica deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables. Mientras que las hemicelulosas, componentes minoritarios, presentan una estructura amorfa de fácil acceso (3,4).

La etapa de hidrólisis provoca la ruptura de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, obteniéndose los monómeros respectivos. La hidrólisis completa de celulosa da exclusivamente el monómero D-glucosa, mientras que a partir de las hemicelulosas se obtienen un conjunto de pentosas y hexosas, como manosa, glucosa, xilosa, etc. Los azúcares de cinco carbonos son difíciles de fermentar por los microorganismos comunes (5). La etapa de hidrólisis puede realizarse mediante catálisis química o enzimática, aunque existen otros métodos menos utilizados y poco estudiados como la irradiación gamma y la utilización de microondas, entre otros (6).

La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo con enzimas celulasas, catalizadores altamente específicos. La hidrólisis se lleva a cabo bajo condiciones suaves (pH 4.5, 50°C, agitación suave). La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química, entre las cuales pueden mencionarse que no genera gran corrosión, bajo consumo de enzima y baja toxicidad de los hidrolizados (7). También son menores los costos de equipamiento (debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental), los rendimientos son mayores, no necesita utilizar agentes químicos, no produce compuestos inhibidores de la fermentación y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100%. Por otro lado, la hidrólisis enzimática presenta ciertos inconvenientes; en particular, el mayor tiempo de reacción. Ya que, se necesitan varios días mientras que en la hidrólisis con ácido diluido unos pocos minutos son suficientes. Los precios de las enzimas son mayores que, por ejemplo, el ácido sulfúrico que se utiliza en hidrólisis ácida (8) aunque recientemente se ha informado de algún avance en la reducción de los precios (Novozyme S.A.). En hidrólisis ácida, los productos finales (azúcares liberados) no inhiben la progresión de la hidrólisis. Sin embargo, en la hidrólisis enzimática, los disacáridos (celobiosa) y monosacáridos (glucosa, entre otros) producidos inhiben la reacción de hidrólisis (9).

No obstante el impulso que ha dado al tema el uso de enzimas para la generación de biocombustibles, todavía existe una gran brecha entre el enfoque de quienes estudian la bioquímica de los sistemas enzimáticos y los puntos de vista de quienes deben diseñar e implementar los procesos industriales en los que se produce la hidrólisis, por lo cual los ingenieros deben basarse en datos empíricos para diseñar los reactores para la hidrólisis de celulosa (10).

En el presente trabajo de investigación se evaluó el proceso de pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido óptimo a través del seguimiento del progreso de la hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pre-tratada y en forma natural. Se realizó una comparación entre el porcentaje de conversión de la materia prima tratada y sin tratar.

Materiales y Métodos

- Materias Primas

Como materia prima se utilizó cascarilla de arroz suministrada por una industria local (arrocera del interior de la provincia del Chaco, Argentina).

Se utilizaron dos tipos de muestras, una de ellas fue la cascarilla en estado natural y la otra sufrió un proceso de pre-tratamiento. En este último caso, se tomó una muestra representativa de cascarilla de arroz, se la molió hasta alcanzar un tamaño menor de 10 x1 mm. Posteriormente se la trató mediante un proceso de pre-tratamiento con ácido diluido y calor, optimizado en estudios previos (11).

- *Hidrólisis enzimática*

La fracción sólida resultante del proceso de pre-tratamiento de cascarilla de arroz a las condiciones óptimas y cascarilla de arroz en estado natural, se hidrolizaron con enzimas celulasas comerciales. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en las siguientes condiciones: agitación mecánica 450 rpm, 48 h, 50°C y pH 4.8. El ajuste del pH se utilizó buffer de citrato de sodio. El dosaje de enzimas utilizado fue 40FPU/g de celulosa. Se utilizó un exceso de enzimas para evitar cualquier limitación de esta variable. Se tomaron muestras de 0,5ml en diferentes tiempos de reacción y se guardaron a -16°C hasta su caracterización.

- *Caracterización*

La caracterización de la prima en estado natural y pre-tratada se llevó a cabo siguiendo procedimientos estándares del National Renewable Energy Laboratory, Laboratory Analytical Procedure, Technical Reports (NREL/TP).

La caracterización constó en la determinación de: sólidos totales y humedad, sustancias extraíbles en agua y alcohol etílico (NREL/TP 510-42621), carbohidratos estructurales: glucanos, xilanos y arabanos, grupos acetilos (NREL/TP 510-42619), lignina ácido soluble e insoluble (NREL/TP 510-42618) y cenizas (NREL/TP 510-42622).

La determinación de carbohidratos de las materias primas se cuantificó mediante Cromatografía Líquida (sistema Waters HPLC), usando una columna Aminex-HPX87H (BIO-RAD) y las siguientes condiciones: eluyente H₂SO₄ 4mM, 0,6ml/min, 35°C y detectores de índice de refracción y arreglo de diodos.

Los azúcares liberados por hidrólisis se cuantificaron utilizando el método del ácido Dinitrosalisílico o DNS (11).

El grado de conversión se calculó mediante la relación: (azúcares presentes en el producto de la hidrólisis/azúcares componentes del material sólido sin hidrolizar)*100.

Resultados y Discusión

- *Caracterización de las Materias Primas*

La caracterización de la materia prima en forma natural (sin pre-tratamiento) y pre-tratada se puede observar en la Tabla 1. En esta Tabla se visualiza un importante aumento en la proporción de celulosa y una gran disminución en la concentración de xilanos y arabanos, en el caso de la cascarilla de arroz pre-tratada. Las hemicelulosas son carbohidratos de más fácil acceso que la celulosa, debido a su estructura amorfa, ramificada y por lo tanto mucho más reactiva. Consecuentemente, el proceso de pre-tratamiento con ácido diluido y calor provoca la hidrólisis de las hemicelulosas (en su mayoría xilosas), quedando como resultado un material sólido con alto contenido de glucanos, con mayor porosidad y gran área superficial. Las enzimas son proteínas que actúan a nivel superficial, por lo tanto estas características hacen que la celulosa presente en la cascarilla de arroz pre-tratada sea más accesible al ataque enzimático, favoreciendo de esta manera la reacción de hidrólisis.

Tabla 1. Caracterización de la materia prima natural y pre-tratada.

<i>Componentes*</i>	<i>Cascarilla de arroz natural</i>	<i>Cascarilla de arroz pre-tratada</i>
Carbohidratos estructurales Totales	48,7	55,0
- Glucanos	34,1	52,8
- Xilanos	13,1	2,2
- Arabanos	1,5	-
Lignina Total	19,0	22,3
- Lignina ácido insoluble	17,2	22,3
- Lignina ácido soluble	1,8	-
Grupos acetilos	1,2	-
Cenizas	15,0	23,9
Extractivos	8,2	-
Otros (gomas, etc., por diferencia)	8,0	-

*Porcentajes en base seca.

- *Hidrólisis enzimática*

En la Figura 1 se puede observar la progresión de la hidrólisis enzimática, tanto para la cascarilla en estado natural como la pre-tratada. Mediante la cuantificación de los azúcares liberados durante la etapa de hidrólisis enzimática, expresada como porcentaje de conversión, se observó que el proceso de hidrólisis es mucho más eficiente en el caso de la cascarilla pre-tratada que en la cascarilla cruda. Esto coincide perfectamente con lo manifestado en la sección de caracterización de la materia prima.

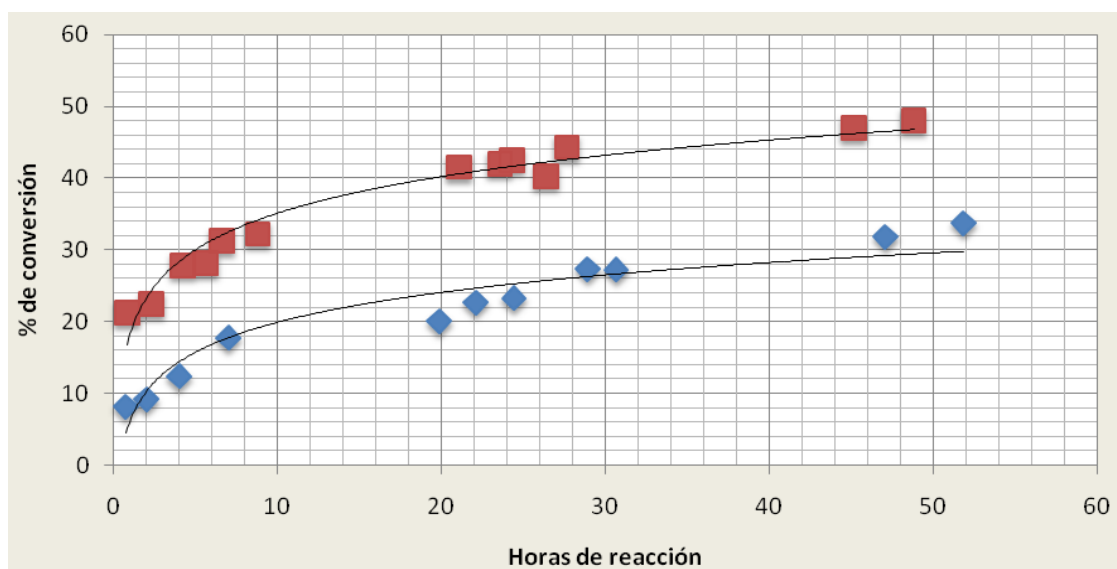


Fig 1. Progreso de hidrólisis enzimática de: ◆ cascarilla de arroz natural y ■ cascarilla de arroz pretratada.

Al comienzo de la hidrólisis (50 minutos de reacción) se observa 21,2% de conversión mientras que con la cascarilla sin tratar solo del 8,1%. Al final de la reacción, 50 horas, se observa un 50% de conversión para el caso de cascarilla pre-tratada y del 31% para la sin tratar.

Conclusiones

El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido y calor es efectivo para aumentar la accesibilidad enzimática de cascarilla de arroz.

Luego de 50 horas de reacción con enzimas celulasas se obtiene una conversión del 50% del total de celulosa presente en la cascarilla de arroz pre-tratada, valor notoriamente superior al 31% correspondiente a la cascarilla sin tratar.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Novozymes S.A. por la donación de las enzimas celulasas. Además, se agradece a la Universidad Tecnológica Nacional por el soporte financiero de la beca doctoral de la Ing. Dagnino.

Referencias

- 1) HENDRIKS A.T.W.M., ZEEMAN, G. (2009). Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 100, 10-18.
- 2) ZHENG, Y., PAM, Z., ZHANG, R. (2009) Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng.* 2, 51-58.
- 3) CAREY, F.A. (2006). *Química Orgánica*. Sexta edición. Mac Graw Hill.
- 4) FENGEL D., WEGENER, G. (1984). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. De Gruyter. Berlin.
- 5) TAHERZADEH M.J., Y KARIMI K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Inter J Molecular Science.* 9, 1621-1651.
- 6) BALAT, M (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers Manage.* 52, 858-875.
- 7) TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. (2007). Acid-Based hydrolysis processes for ethanol lignocellulosic material: a review. *BioResouces.* 2, 472-479.
- 8) SHEEHAN J. S., HIMMEL, M. E. (2001). Outlook for Bioethanol Production from Lignocellulosic Feedstocks: Technology Hurdles. *Agro Food Industry Hi Tech.* 12, 54-57.
- 9) LINDE M., GALBE, M., ZACCHI, G. (2007). Simultaneous saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast. *Enzyme Microb Technol.* 40, 1100-1107.
- 10) TALEBNIA F., KARAKASHEV, D., ANGELIDAKI, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 101, 4744-4753.
- 11) MILLER, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chem.*, 31, 426-428.