

Hidrólisis de residuos de naranja para la obtención de carbohidratos fermentables

SÁNCHEZ-OROZCO, Raymundo*† & VÁZQUEZ-VELÁZQUEZ, José

Tecnológico de Estudios Superiores de Jocotitlán, Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 44.8, Ejido de San Juan y San Agustín, C.P. 50700 Jocotitlán, México.

Recibido Mayo 15, 2017; Aceptado Julio 25, 2017

Resumen

En la hidrólisis ácida de la biomasa vegetal, los polisacáridos son convertidos a monosacáridos, correspondientes a la materia prima básica para la biorrefinería en procesos de base fermentativa. En este trabajo se evaluó el efecto de la hidrólisis ácida de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) para la conversión de celulosa a carbohidratos reductores. El proceso de hidrólisis se llevó a cabo con ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (0.25-1.0 %v/v), temperatura (110-125 °C) y tiempo de reacción (10-30 min). Se realizaron determinaciones de azúcares reductores (AR) mediante fotolorimetría y ácido dinitrosalicílico (DNS). El análisis bromatológico permitió cuantificar el contenido de humedad, cenizas, extracto etéreo, así como porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina de la biomasa lignocelulósica. También se realizó el análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía infrarroja (FT-IR) de la biomasa para evidenciar la modificación física y estructural promovida por la hidrólisis. Las condiciones que favorecieron mayor conversión a carbohidratos reductores fueron el tratamiento con ácido sulfúrico al 0.50 y 0.75 % durante 30 min de reacción a 125 °C obteniéndose como máximo 0.38 g de AR/g biomasa seca. Los resultados obtenidos muestran la posibilidad de implementar mecanismos de pretratamiento tendientes a generar insumos de valor agregado como los azúcares y el bioetanol.

Residuos de naranja, hidrólisis ácida, azúcares reductores, análisis proximal

Abstract

In acid hydrolysis of plant biomass, the polysaccharides are converted to monosaccharides, which corresponds to the basic raw material for biorefinery in fermentation-based processes. This work was aimed at investigating the effect of the acid hydrolysis on orange peels (*Citrus sinensis*) to evaluate the conversion of cellulose to reducing carbohydrates. The hydrolysis process was carried out with sulfuric acid at different concentrations (0.25-1.0% v / v), temperature (110-125 ° C) and reaction time (10-30 min). Reducing sugars (AR) were determined using photolorimetry and dinitrosalicyclic acid (DNS). The bromatological analysis allowed to quantify the moisture content, ashes, ethereal extract, as well as percentages of cellulose, hemicellulose and lignin of the lignocellulosic biomass. Scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy (FT-IR) of the biomass were also performed to demonstrate the physical and structural modification promoted by the hydrolysis. The conditions favoring greater conversion to reducing carbohydrates were the treatment with sulfuric acid at 0.50 and 0.75% for 30 min of reaction at 125 ° C. The results show the possibility of implementing pretreatment mechanisms tending to generate value added inputs such as sugars and bioethanol.

Orange waste, acid hydrolysis, reducing sugars, proximate analysis

Citación: SÁNCHEZ-OROZCO, Raymundo & VÁZQUEZ-VELÁZQUEZ, José. Hidrólisis de residuos de naranja para la obtención de carbohidratos fermentables. Revista de Investigación y Desarrollo.2017, 3-9: 63-70.

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: r.sanchez@tesjo.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La creciente necesidad de ampliar de modo sostenible el uso de fuentes renovables de energía para proporcionar mayor seguridad al suministro energético y reducir los impactos ambientales asociados a los combustibles fósiles, encuentra en los residuos cítricos una alternativa económicamente viable y con significativo potencial de expansión. Esto puede ser un elemento de partida para la mejor utilización de los recursos y la disminución de la contaminación ambiental generada particularmente por la agroindustria de pulpas y jugos. Los residuos cítricos están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, su composición varía dependiendo del origen del material (Taghizadeh-Alisaraeia et al., 2017; Mejía-Trejo et al., 2016).

La utilización de materiales lignocelulósicos se está investigando intensamente, debido a que éstos representan el mayor componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, constituyendo una fuente abundante y segura de recursos renovables y energía (Alfenore y Molina-Jouve, 2016; Zabed et al., 2017; Sharma et al., 2017; Mejías-Brizuela et al., 2016; Guarneros-Flores et al., 2016). El uso de lignocelulosa disminuye el posible conflicto con el uso de la tierra para la producción de alimentos, al mismo tiempo que constituye materia prima más barata que las materias primas convencionales de tipo agrícola.

Por otra parte, los biocombustibles elaborados de lignocelulosa generan muy bajas emisiones de gases de efecto invernadero, reduciendo impactos ambientales, especialmente de cambio climático. Seidl y Goulart (2016) indican que actualmente estos residuos están siendo subutilizados y en la mayoría de los casos causando serios problemas de contaminación ambiental debido a la deficiencia en su disposición final.

A pesar de que son potencialmente buenos para ser empleados como materia prima en la producción de azúcares, biomasa microbiana, producción de ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros. La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, por lo que su conversión a etanol comprende dos etapas generales: la primera de pretratamiento e hidrólisis (Dewan et al., 2013; Negahdar et al., 2016); donde se obtienen los azúcares simples fermentables (glucosa y xilosa), y la de fermentación en la cual estos azúcares son convertidos en etanol por la acción de los microorganismos (Boluda-Aguilar y López-Gómez 2013; Choi et al., 2013).

Dicha fermentación está influenciada por factores como la concentración de azúcares en el sustrato y el microorganismo fermentativo empleado. Se han desarrollado diversos tratamientos para lograr que los materiales lignocelulósicos sean más susceptibles a la sacarificación, dentro de éstos se incluyen los tratamientos físicos, químicos y enzimáticos (Santi et al., 2014). Como tratamiento físico, el triturado y molienda disminuyen el índice de cristalinidad y el grado de depolimerización de la celulosa, aunque también permiten aumentar la superficie de contacto con reactivos y enzimas, según lo reporta Yoon et al. (2014). Por otra parte, Cortés y Bridgwater (2015) evaluaron el efecto de la temperatura, concentración y tiempo de residencia en procesos de hidrólisis ácida.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente trabajo se centró en el estudio de caracterización físico-química e hidrólisis ácida con H_2SO_4 diluido de la cáscara de naranja (CN), a condiciones controladas de reacción con el propósito de alcanzar una elevada conversión a carbohidratos reductores. A cada tratamiento aplicado se le efectuaron pruebas de concentración de azúcares reductores (AR) mediante el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Metodología

Materiales

La biomasa empleada en el presente estudio fue obtenida de frutos frescos de naranja, los cuáles fue necesario lavar con agua destilada para eliminar residuos y demás partículas presentes en la superficie. Posteriormente se realizaron cortes únicamente de la cáscara, se pesaron y sometieron a secado con el propósito de remover el agua para conservación del material y mejor control de las variables del proceso y a su vez aplicar tratamientos de hidrólisis.

El secado se prolongó hasta obtener peso constante y se realizó en un horno con flujo de aire forzado a una temperatura de 60 °C. El material seco fue molido en molino de discos y tamizado para obtener tamaños de partícula a través de tamiz No. 80, el cual diluye sin problemas y facilita la hidrólisis por la ampliación del área de contacto.

Para determinar la proporción de hidratación, fue necesario preparar soluciones con 2.5, 5 y 10 %p/v de materia seca y se encontró que la mejor condición de la muestra para la hidrólisis es la solución al 2.5 %p/v, con la cual se trabajaron los ensayos experimentales.

Análisis proximal

La composición proximal de la biomasa implicó cuantificar el contenido de humedad, fibra cruda, proteína cruda, cenizas y extracto etéreo. Lo anterior, permitió determinar los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina en base a AOAC (1998). Cada análisis se realizó por triplicado.

Proceso de hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se llevó a cabo con ácido sulfúrico diluido, partiendo de una solución concentrada (96.7%) que se diluyó a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 %v/v. A estas soluciones se les adicionó el sólido seco (cáscara de naranja en polvo), se mezcló perfectamente y se dejó reaccionar durante 10, 20 y 30 min, manteniendo temperaturas constantes en el intervalo de 110 a 125 °C en incrementos de 5 °C.

Estos ensayos se llevaron a cabo empleando peso constante de sólido seco (2.5 %p/v). Lo anterior permitió estudiar el comportamiento de las variables sobre el proceso de hidrólisis con el propósito de evaluar las mejores condiciones de producción de azúcares reductores.

Finalizado el proceso de hidrólisis, las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 1500 rpm sin neutralización previa. Finalmente, el líquido sobrenadante se empleó para la determinación de azúcares reductores por el método DNS.

Determinación de azúcares reductores

La cuantificación de carbohidratos reductores en los hidrolizados se determinó utilizando el método fotocolorimétrico DNS (Dobois et al., 1956). El ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de calor reduce el ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un color amarillo-café el cual es estable hasta por 24 horas.

La lectura se realizó a 575 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda. El método permitió medir las unidades reductoras presentes en los azúcares. Los datos experimentales para la curva de calibración de azúcares reductores se procesaron en Excel.

Resultados y discusiones

Análisis proximal

La caracterización de la biomasa se realizó mediante análisis proximal; los resultados se presentan en la Tabla 1. El contenido de hemicelulosa está presente en 26.45%. Dicho contenido corresponde a una cantidad significativa de hexosas y pentosas, según lo reportado en trabajos previos (Ververis et al., 2007). La cantidad de celulosa se ubicó en 9.93%. Es evidente que el bajo nivel de lignina (2.81%) favorece el proceso de hidrólisis generando mayor susceptibilidad para su degradación.

Lo anterior no tiene implicaciones potenciales para inhibir la eficacia del proceso de pretratamiento en la liberación de carbohidratos. Por otra parte, la muestra analizada contiene 7.59% de proteína total. Cabe resaltar que estos resultados se encuentran en el rango de proteína cruda que varios investigadores han reportado (Li et al., 2010).

De la misma forma, las fracciones de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido se encuentran en los rangos de los datos publicados en otras frutas comunes (Hernández-Montoya, 2009). Por otro lado, la muestra estudiada inicialmente contenía elevado porcentaje de humedad, esto puede traducirse en un periodo de vida útil más corta para la materia prima, ya que está más propensa al deterioro químico, enzimático y microbiológico, motivo por el cual requiere deshidratarse, además permite mejor control de las variables del proceso.

Componente	Cantidad (%p/p)
Hemicelulosa	26.45
Celulosa	9.93
Lignina	2.81
Proteína	7.59
Fibra detergente neutro	39.19
Fibra ácido detergente	12.74

Tabla 1 Composición de la cáscara de naranja en base seca

Cuantificación de azúcares reductores

Las curvas de absorción son características de diferentes azúcares y el máximo se observa generalmente a 490 nm para hexosas, mientras que para pentosas se ubica a 480 nm (Figura 1). La dependencia de la absorbancia con respecto a la concentración del azúcar estándar empleado para la construcción de la curva de calibración permitió realizar la cuantificación de azúcares reductores.

De acuerdo a la Figura 1, las absorbancias máximas se mostraron cercanas a 490 nm, teniendo una diferencia en la pendiente de la línea de calibración de aproximadamente 13% con respecto a 480 nm, esto debido a que la longitud de onda con absorción máxima varía considerablemente con respecto al tipo de monosacárido.

En este caso, los carbohidratos presentes en el sustrato propuesto se atribuyen principalmente a hexosas (glucosa, fructosa y galactosa). De esta manera, posterior al proceso de hidrólisis y a partir de la gráfica de los diferentes patrones de glucosa medidos a 490 nm se pudo establecer el contenido de azúcares reductores presentes en la biomasa hidrolizada.

Dependencia del contenido de AR respecto a temperatura, concentración y tiempo de contacto.

Se determinó la dependencia de la conversión de la biomasa a carbohidratos reductores en función de la temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción (Figuras 2 y 3). En la Figura 2, se evidencia que la máxima concentración de azúcares reductores con un tiempo de reacción de 10 min se obtuvo con 0.75% de ácido, mientras que la conversión máxima a partir de 30 min de reacción se generó con 0.5% de ácido (Figura 3).

En todos los experimentos, se observó una disminución en el contenido de carbohidratos posterior a la máxima conversión y puede atribuirse a la degradación de los carbohidratos y la subsecuente transformación a productos secundarios.

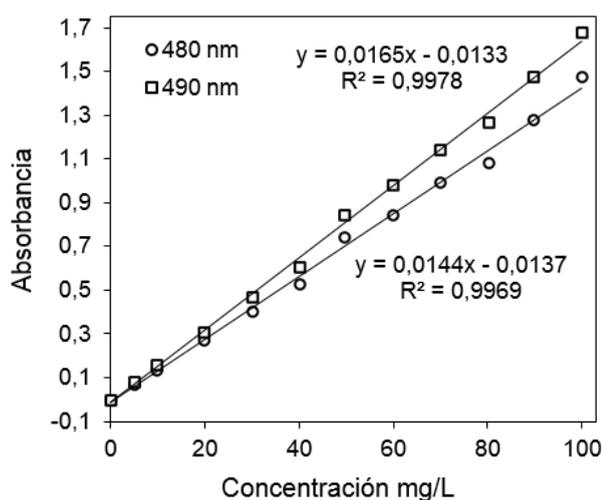


Figura 1 Diferentes patrones de glucosa para la determinación AR

Las condiciones más favorables para el proceso de hidrólisis fueron: concentración de ácido entre 0.5 y 0.75 %v/v a 125 °C y tiempo de contacto de 30 min. La variación general de gramos de AR respecto a gramos de materia seca del total de muestras analizadas se ubicó entre 0.13 y 0.38. Cabe notar que incrementando la concentración de H₂SO₄ se evidencia un aumento en la liberación de azúcares reductores en el pretratamiento, alcanzándose un máximo al 0.75% (v/v) de H₂SO₄ en ambos tiempos de reacción (10 y 30 minutos).

Con ello, se puede inferir que una concentración de H₂SO₄ mayor a 0.75% (v/v) no libera una mayor cantidad de azúcares reductores, además es posible que exista una degradación de azúcares a otros productos como furfural o HMF. Cuando se comparan los tiempos de reacción se tiene que en todas las concentraciones de H₂SO₄, a un mayor tiempo de exposición, mayores son las concentración de azúcares reductores obtenidos (Figura 3).

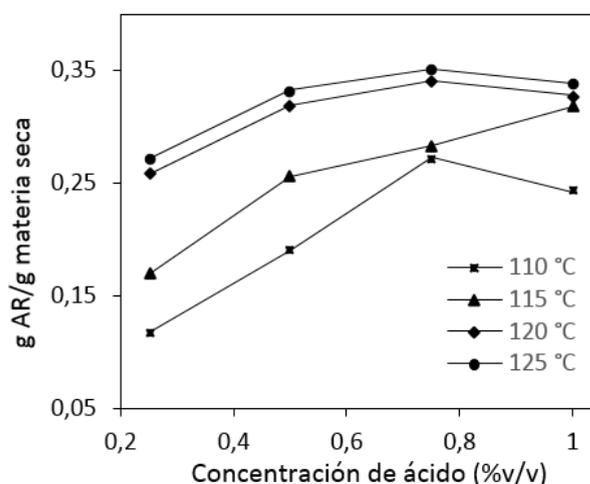


Figura 2 Dependencia del contenido de AR con respecto al tiempo (10 min.)

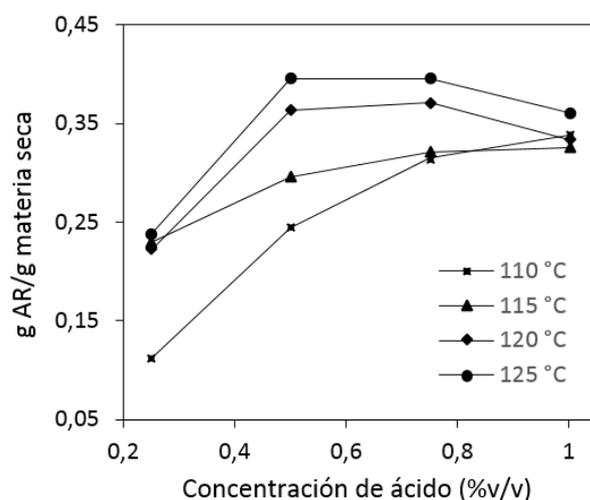


Figura 3 Dependencia del contenido de AR respecto al tiempo (30 min.)

Adicionalmente, cabe notar que en cada sustrato al aumentar el tiempo de reacción y la concentración de H₂SO₄, la liberación de azúcares reductores incrementa, cuyo mayor valor se obtiene a concentraciones de 0.5 y 0.75% (v/v) y un tiempo de reacción de 30 min (Figura 4). De este resultado se puede deducir que no podría obtenerse una mayor liberación de azúcares reductores si se aumentara aún más la concentración de H₂SO₄ o el tiempo de exposición.

El hecho de que la biomasa empleada pudiese necesitar una mayor concentración de ácido sulfúrico para la liberación de azúcares se podría explicar por la existencia de mayor porcentaje de lignina en el sustrato. A una mayor cantidad de lignina se dificulta la ruptura del material lignocelulósico y la solubilización de la hemicelulosa, debido a que la lignina forma una matriz protectora al ataque de microorganismos para procesos posteriores como la fermentación.

La Figura 5 muestra la dependencia global de conversión a AR en función de la concentración de ácido. Se evidencia que la máxima concentración de AR se obtiene con 0.5% de ácido. Como se indicó previamente, La disminución que se observa posterior a la máxima conversión se deriva de la degradación de los AR y la subsecuente transformación a productos secundarios.

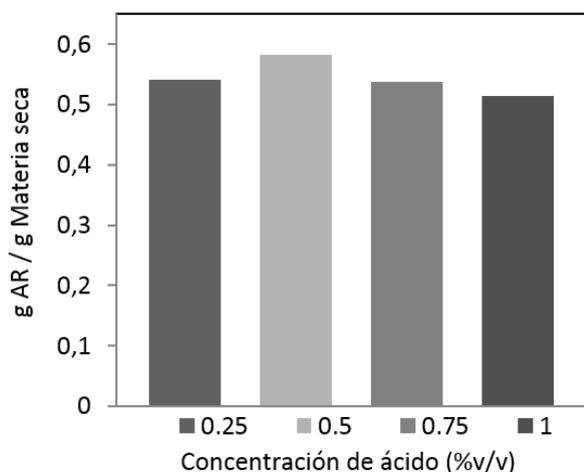


Figura 4 Cantidad de AR máxima en función de la concentración de ácido

A partir de los resultados anteriores se puede establecer que el tiempo de exposición y la concentración de H_2SO_4 juegan un papel importante, ya que en las mínimas condiciones utilizadas no se observan cambios en la materia prima. Para verificar el efecto de la temperatura se realizó un ensayo adicional preparando una solución que solo contenía agua y el sustrato, mantenidos durante 30 minutos a 120 °C.

De este ensayo se obtuvieron valores por debajo de 0.2 g azúcares reductores/g muestra seca, por lo que se concluye que el efecto de la temperatura no es suficiente para la liberación de azúcares desde la materia prima.

Caracterización de la biomasa por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

El espectro FT-IR de la cáscara de naranja natural (a) e hidrolizada (b) con ácido sulfúrico se indica en la Figura 5. Como se observa, la banda ancha de absorción común cercana a 3400 cm^{-1} fue debido a las vibraciones de tensión del O-H debido a la presencia de grupos alcoholes R-OH característicos de la celulosa. Además, se muestra el cambio en la banda de $3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, por lo que establece la participación de los grupos C-H.

Se observa la disminución de la banda de absorción de $1500\text{ a }1750\text{ cm}^{-1}$ del grupo C=O característico de la lignina. Los picos localizados en $1132\text{ y }1012\text{ cm}^{-1}$ muestran la contribución de los grupos C-O-C de los polisacáridos presentes (Li et al., 2010).

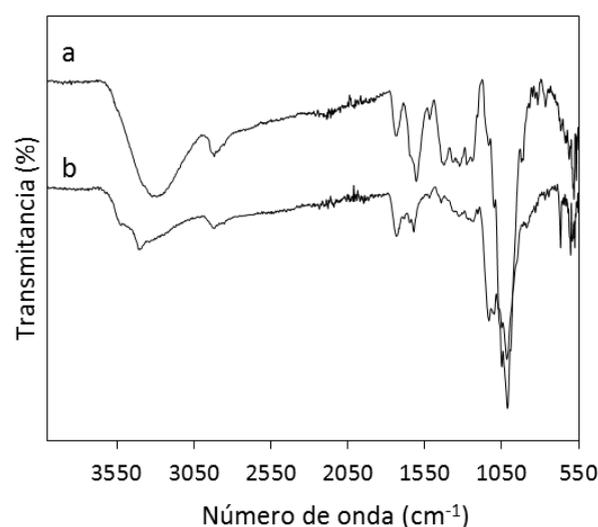


Figura 5 Espectro FTIR de la cáscara natural (a) y cáscara de naranja hidrolizada (b)

Conclusiones

Después de realizar el proceso de pretratamiento por hidrólisis ácida al residuo propuesto para el aprovechamiento del contenido lignocelulósico se llegó a las siguientes conclusiones:

La caracterización de la cáscara de naranja evidenció que es un tipo de biomasa potencial para la extracción de metabolitos fermentables, debido al contenido de carbohidratos que poseen y que están representados en forma global por celulosa y hemicelulosa. Estos componentes son biopolímeros que se constituyen en la materia prima necesaria para diferentes procesos de biodegradación conducentes a la obtención de productos de valor agregado.

En el proceso de hidrólisis ácida se obtienen altas concentraciones de azúcares reductores (>35%) en el tratamiento con ácido sulfúrico al 0.50 y 0.75 % durante 30 min de reacción a 125 °C. La principal ventaja del tratamiento con ácido sulfúrico diluido es la baja cantidad de ácido requerido en el proceso, pero la temperatura para generar la hidrólisis es alta.

El pretratamiento realizado genera un rendimiento de azúcares promedio al comparar con procesos de hidrólisis similares. Cabe señalar que se podrían obtener mejores conversiones de glucosa, mejorándose las sacarificaciones a través de pruebas de cargas enzimáticas.

El pretratamiento ácido no es suficiente para maximizar el grado de sacarificación por lo que es necesario complementar el proceso mediante hidrólisis enzimática.

Condiciones extremas de hidrólisis (por ejemplo: incremento en la concentración de ácido sulfúrico) no generan mayor liberación de azúcares reductores en la sacarificación, ya que con ellas pudo existir en el pretratamiento una degradación de azúcares a otros productos.

Los resultados de este trabajo constituyen una primera etapa de recolección de datos a nivel laboratorio tendiente al diseño de estrategias para el aprovechamiento y tratamiento de los residuos cítricos por medios biotecnológicos y, por tanto ecológicamente limpios.

Referencias

Alfenore, S., Molina-Jouve, C. (2016). Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. *Process Biochemistry*. 51(11): 1747-1756.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. 1998. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists: Washington, D C.

Boluda-Aguilar M., López-Gómez A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*. 41, 188–197.

Choi I. S., Jae-Hoon K., Seung G. W., Kim K. H., Hyeun-Jong B. (2013). Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. *Applied Energy*. 102, 204-210.

Cortés, A. M., Bridgwater, A.V. (2015). Kinetic study of the pyrolysis of miscanthus and its acid hydrolysis residue by thermogravimetric analysis. *Fuel Processing Technology*. 138(1): 184-193.

Dewan, A., Raftery, J.P., Li, Z., Karim, M. N. (2013). Biofuel from Waste Agricultural product and Lignocellulosic Biomass. *IFAC Proceedings*. 46(18): 178-186.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

Guarneros-Flores, J., Lopez-Zamora, L., Aguilar-Uscanga, M. (2016). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pre tratado. *Revista de Investigación y Desarrollo*. 2(6): 75-81.

Hernández-Montoya, V; Montes-Morán, M.A.; Elizalde-González, M.P. 2009. Study of the thermal degradation of citrus seeds. *Biomass and Bioenergy*. 33: 1295-1299.

Li, K.; Fu, S.; Zhan, H.; Zhan, Y.; Lucia, L.A. 2010. Analysis of the chemical composition and morphological structure of banana pseudo-stem. *Bioresources*. 5: 576-85.

Mejía-Trejo, A., Bravo-Lugo, J., Venegas-Sánchez, J., Jiménez-Islas, D. (2016). Hidrólisis ácida de citrus sinensis para la obtención de azúcares fermentables. *Revista de Tecnología e Innovación*. 3(7): 46-50.

Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillen, E., Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*. 2(6): 27-41.

Negahdar L., Delidovich I., Palkovits R. (2016). Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism. *Applied Catalysis B: Environmental*. 84, 285–298.

Santi G., Crognale S., D'Annibale A., Petruccioli M., Ruzzi M., Valentini R., Moresi M. (2014). Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 61, 146-156.

Seidl, P.R., Goulart, A.K. (2016). Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2(1): 48-53.

Sharma K., Mahato N., Cho M. H., Lee Y. R. (2017). Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. *Nutrition*. 34, 29–46.

Taghizadeh-Alisaraeia A., Hasan Hosseinia S., Ghobadianb B., Motevalic A. (2017). Biofuel production from citrus wastes: A feasibility study in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, 1100–1112.

Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*. 98: 296–301

Yoon, S.-Y., Han, S.-H., Shin, S.-J. (2014). The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy*, 77(1): 19-24.

Zabed H., Sahu J. N., Suely A., Boyce A.N., Faruq G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 71, 475–501