

# Alcohol de biomasa. III. Hidrólisis de la fracción lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y cosechas de sorgo

F. J. García Breijo (I) y E. Primo Yúfera (II)

(I) *Departamento de Microbiología, CEU San Pablo. Moncada (Valencia)*

(II) *Departamento de Biotecnología, ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. 46022 Valencia*

*Original recibido 19-10-1988. Versión revisada 19-04-1989*

## RESUMEN

Se ha estudiado la hidrólisis fuerte de los productos lignocelulósicos resultantes de una etapa previa de hidrólisis suave de diferentes materiales agrícolas (tallos y zuros de dos variedades de maíz; paja de arroz y sarmientos de vid) y cosechas agroenergéticas (tallos de sorgo dulce), con ácido sulfúrico concentrado. Los procesos de hidrólisis estudiados en este trabajo constan de 2 fases; en la primera se emplea ácido sulfúrico concentrado, a baja temperatura, para romper la estructura cristalina de la celulosa e iniciar su degradación. En la segunda, se emplea ácido sulfúrico diluido para hidrolizar los oligómeros formados.

El grado de hidrólisis alcanzado en cada residuo lignocelulósico depende del contenido en lignina de éste. En general, la celulosa de los residuos con contenido en lignina inferior al 10% respecto a materia seca inicial (r.m.s.i.), se hidroliza bien (más del 80%); es el caso de los zuros de maíz y de los tallos de sorgo dulce. Los materiales cuyo contenido en lignina es más elevado, tienen unos rendimientos de hidrólisis más bajos; es el caso de la paja de arroz y de los sarmientos de vid con más del 20% r.m.s.i. La degradación de las hexosas a hidroximetilfurfural (HMF) no ha superado, en ningún caso, el 8%. La fermentación de los caldos de hidrólisis obtenidos proporcionó a las 48 horas rendimientos en alcohol comprendidos entre el 60 y el 65% del máximo teórico.

## Alcohol from biomass. III. Hydrolysis of the lignocellulosic fraction obtained from agricultural wastes and sorghum harvests

### ABSTRACT

The strong acid hydrolysis with concentrated sulfuric acid of the lignocellulosic wastes, obtained in a previous stage of slight acid hydrolysis of different agricultural materials (stalks and cobs of Funk's corn, stalks and cobs of sacarine corn, rice straw, and wine shoot) and agroenergetic crops (stalks of sweet sorghum) has been studied. The processes studied in this work had 2 stages: in the first, concentrated sulfuric acid, at low temperature was used to break the crystalline structure of the cellulose and to begin its degradation. In the second stage, diluted sulfuric acid was used to hydrolyze the formed oligomers.

The degree of hydrolysis of lignocellulosic wastes depends on its lignin content. In general, cellulose from wastes with a lignin content lower than 10%, referred to dry initial material (r.d.i.m.), hydrolyzed very well (more than 80%); this is the case with corn cobs and stalks of sweet sorghum. Materials with a higher lignin content showed a lower hydrolysis yield; this is the case with rice straw and wine shoots (with a lignin content higher than 20% r.d.i.m.). The degradation of hexoses to HMF didn't exceed 8% of hydrolyzed hexoses in any case. Fermentation yields ranging between 60 and 65% of the theoretical maximum were obtained.

### INTRODUCCION

El ataque con ácido es el método usual para la obtención de caldos fermentables, a partir de materiales leñosos. En el proceso estudiado se trata de recuperar con el máximo rendimiento (es decir, minimizando la formación de productos secundarios) la mayor parte de hidratos de carbono presentes en tales materiales mediante su hidrólisis hasta oligosacáridos solubles, glucosa y pentosas.

La hidrólisis del residuo lignocelulósico presenta graves dificultades y exige tratamientos muy enérgicos que, si bien pueden ser adecuados para hidrolizar madera en gran escala no lo son para su aplicación a las condiciones de las zonas rurales españolas con disponibilidad de residuos agrícolas. Entre los procesos que utilizan ácidos diluidos, los más conocidos son los llamados "americano", Scholler, y Madison (Goldstein, 1981). La hidrólisis con ácido diluido a elevadas temperaturas (180-230°C) se usa a escala comercial y produce rendimientos del 50-60% de la celulosa de madera. Los procesos que emplean altas temperaturas requieren instalaciones de alta resistencia a la presión y a la corrosión y son, por ello, muy costosos (Hofenk, 1980; Saeman, 1980). Las mejoras en la resistencia de los materiales a la corrosión y las técnicas de recuperación han permitido el desarrollo de métodos de hidrólisis con ácidos concentrados, como el clorhi-

drico y el sulfúrico (Rugg *et al.*, 1980a y 1980b; Goldstein, 1981), el fluorhídrico (Goldstein, 1981) y el trifluoroacético (Fengel y Wegener, 1979). En estos procesos, la hidrólisis de la celulosa se realiza a temperaturas más bajas para evitar la degradación de la glucosa.

Entre los procesos que emplean ácido clorhídrico tenemos el de Rheinau y el de Udic-Rheinau. Los procesos Prodor, Hereng, Naguchi-Chisso y Chalov, entre otros, utilizan CIH gaseoso a contracorriente (Goldstein, 1981). Los procesos con sulfúrico concentrado están poco estudiados y la tendencia es a utilizar operaciones secuenciales de ácido diluido y concentrado (Ladisch, 1979; Grethlein, 1978). Para definir las condiciones industriales de este tipo de proceso en planta piloto, es necesario conocer, previamente, la influencia de la concentración de ácido y de la temperatura, usados en el tratamiento fuerte, sobre la hidrólisis y sobre la producción de hidroximetilfurfural, de lo que depende el rendimiento en azúcares fermentables. Este es el objeto principal del presente trabajo. Asimismo, se estudian las pentosanas difíciles de hidrolizar, ligadas al residuo lignocelulósico, su comportamiento en la hidrólisis fuerte y la contaminación que producen en los caldos fermentables por la presencia en los mismos de pentosas y furfural. Para ello se ensayan distintas condiciones de tratamiento con ácido concentrado y temperaturas mo-

deradas. Para juzgar la eficiencia de estos tratamientos, los residuos se posthidrolizan con ácido diluido a 100°C en condiciones constantes que se consideran muy favorables, con el fin de extraer el máximo de azúcares que permita el tratamiento fuerte. En los caldos obtenidos se analizan azúcares fermentables, pentosas, furfural y HMF. En los residuos se analizan azúcares potenciales sin hidrolizar. Finalmente, se estudia la capacidad de fermentación de los caldos obtenidos.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

El estudio del proceso de hidrólisis se ha llevado a cabo con tallos de maíz sacarino, var. E-41, maíz Funk's, var. G-5050, y sorgo dulce de la variedad Wray (materiales clasificados en el grupo denominado azucarado), así como con zuros de dichas variedades de maíz, paja de arroz Bahía y sarmientos de vid Bobal (estos otros del grupo pentosánico-celulósico). Las características y procedencias de las variedades de maíz y sorgo empleadas se especificaron en el primer trabajo de esta serie (García y Primo, 1986). La paja de arroz Bahía se obtuvo en el Departamento del Arroz del I.V.I.A., en Sueca (Valencia). Los sarmientos de vid, variedad Bobal, procedían del Instituto Enológico de Requena (Valencia).

### Métodos

Para la determinación de los azúcares reductores, reductores totales, azúcares fermentables, pentosas y pentosanas, hidroximetilfurfural, furfural, y azúcares potenciales fermentables en residuos lignocelulósicos, se han empleado los mismos métodos de análisis que se utilizaron en los anteriores trabajos de esta serie (García Breijo y Primo Yúfera, 1986 y 1987).

### Proceso de hidrólisis

Se ha efectuado en dos condiciones diferentes:

Proceso A (con ácido diluido al 72%, a 30°C). —

El residuo de la prehidrólisis (500 g) se introduce en un matraz esférico de 10 L y se mezcla con ácido sulfúrico al 72%, en una relación residuo/ácido de 1:10 (g/mL de ácido). Se calienta a 30°C durante 1 hora; se adiciona agua hasta una concentración de ácido del 8% y se calienta a reflujo durante 1 hora. Finalmente, se enfría a temperatura ambiente y se filtra a vacío suave. El filtrado se neutraliza con cal, se filtra y se afora, guardándose en refrigeración hasta su análisis.

Proceso B (con ácido sulfúrico al 72%, a 55°C). —

El residuo de la prehidrólisis (500 g) se introduce en un matraz de 10 L y se mezcla con ácido sulfúrico al 72%, precalentado a 55°C, en una relación residuo/ácido de 1:5 (g/mL de ácido). Se mantiene la hidrólisis 5 min, con agitación constante, a esta temperatura. A continuación se añade rápidamente agua hasta una concentración de ácido del 4%. Se calienta a reflujo durante 2 h; se enfría hasta temperatura ambiente y se filtra a vacío. El filtrado se neutraliza con cal, se filtra y afora. Este caldo se guarda en refrigeración hasta su análisis.

### Determinaciones en los caldos y residuos de la hidrólisis

Determinaciones en los caldos. — Todas las determinaciones se realizan con los métodos descritos anteriormente (García Breijo y Primo Yúfera, 1987). Por el método de destilación se determinan, conjuntamente, las pentosas y el furfural libre procedente de la transformación parcial de aquéllas por los ácidos en caliente. La determinación de furfural libre permite conocer, por diferencia, las pentosas reales en el extracto. Como reductores totales se valoran todas las sustancias reductoras presentes que, fundamentalmente son: pentosas, hexosas, furfural y HMF. La fermentación selectiva por *S. cerevisiae* de

los caldos, permite conocer la cantidad de reductores no fermentables en el extracto y, por diferencia entre los totales y los no fermentables, se obtiene el valor de los azúcares fermentables en el extracto, que equivale a la cantidad de hexosas hidrolizadas, bien de las hemicelulosas o procedentes de una hidrólisis parcial de la celulosa.

Las determinaciones del HMF libre en el extracto es un índice de la cantidad de hexosas destruidas durante el proceso. Por diferencia entre los valores de reductores totales en el extracto y la suma del furfural libre y del HMF en el extracto, se obtiene la cantidad de azúcares totales en el extracto. Restando de los reductores no fermentables en el extracto da la cantidad de azúcares no fermentables en el extracto.

Determinaciones en los residuos de la hidrólisis—.Las pentosas en el residuo de la prehidrólisis representan las pentosanas sin hidrolizar y las pentosas íntimamente unidas a la lignocelulosa. La diferencia entre las pentosanas en el residuo de la extracción acuosa (García Breijo y Primo Yúfera, 1986) y este valor, proporciona la cantidad de pentosas hidrolizadas, valor siempre superior al encontrado de pentosas reales en el extracto como consecuencia de la transformación a furfural producida por los ácidos en caliente. La diferencia entre pentosas hidrolizadas y pentosas reales en el extracto indica el valor del furfural total producido. Este valor es casi siempre superior al del furfural libre en el extracto, lo que se debe al furfural evaporado que podría recuperarse en un proceso industrial. La suma de éste y el presente en los caldos es igual al total de las pentosanas hidrolizadas transformadas (diferencia entre las pentosanas hidrolizadas y las pentosas reales obtenidas) cuando todos los valores se dan en xilosa. Asimismo, la diferencia entre el peso del residuo seco de la hidrólisis y los reductores potenciales en el mismo, es un índice de la cantidad de lignina existente.

### Criterios de selección

Para evaluar la eficacia del proceso en cada resi-

duo, se establecen cuatro criterios de selección: a) la relación entre los azúcares fermentables y los azúcares totales; b) la relación entre los azúcares fermentables y la suma de éstos y el HMF; c) el porcentaje de reductores potenciales extraídos (índice del porcentaje de hidrólisis); y d) la relación entre las pentosas y la suma de éstas y el furfural. Para los criterios a, b y d, la relación óptima es el valor 1, mientras que para el c, es el 100%.

### Rendimiento en la fermentación de los caldos

La fermentación alcohólica de los caldos de hidrólisis y su rendimiento se realiza utilizando las cepas y procedimientos expuestos en un trabajo anterior (García y Primo, 1986).

### RESULTADOS Y DISCUSION

Los dos procesos de hidrólisis (A y B) se han aplicado a muestras de prehidrolizados de los dos grupos de materias primas, es decir, al grupo "azucarado" y al grupo "pentosánico-celulósico". Los resultados obtenidos se dan en las tablas I, II, III y IV.

El contenido en lignocelulosa es abundante en todos los materiales estudiados. Los del grupo "azucarado" contienen menor cantidad de celulosa, pero siempre por encima del 20% r.m.s.i. (respecto a materia seca inicial) en todos los casos estudiados. Los del grupo "pentosánico-celulósico" son más ricos (por encima del 35% r.m.s.i.), con más del 40% r.m.s.i. en los zuros de maíz.

La hidrólisis de la celulosa, en el residuo lignocelulósico, da mejores resultados con el proceso A, ya que, además de dar unos rendimientos algo más altos en azúcares fermentables extraídos, la fase de

Tabla I

## RESULTADOS OBTENIDOS CON EL PROCESO "A". GRUPO "AZUCARADO"

Análisis <sup>(1)</sup>	Maíz Sacarino <sup>(2)</sup>	Maíz Funk's <sup>(2)</sup>	Sorgo dulce <sup>(2)</sup>
1. Reductores totales en el extracto . . . . .	19'4 ± 0'4	25'4 ± 0'5	17'3 ± 0'1
2. Reductores no fermentables en el extracto	4'0 ± 0'1	2'8 ± 0'1	2'9 ± 0'1
3. Azúcares fermentables en el extracto . .	15'4 ± 0'4	22'5 ± 0'5	14'4 ± 0'1
4. HMF en el extracto . . . . .	0'87 ± 0'05	1'8 ± 0'1	1'0 ± 0'1
5. Furfural libre en el extracto . . . . .	0'31 ± 0'05	0'15 ± 0'05	Inapreciable
6. Azúcares totales [1 - (4 + 5)] . . . . .	18'2 ± 0'4	23'4 ± 0'4	16'3 ± 0'1
7. Azúcares. no fermentables [2 - (4 + 5)]	2'8 ± 0'1	0'8 ± 0'1	1'9 ± 0'1
8. Pentosas reales en el extracto . . . . .	2'4 ± 0'1	0'7 ± 0'1	1'7 ± 0'1
9. Furfural total producido . . . . .	0'18 ± 0'03	0'27 ± 0'03	1'9 ± 0'2
10. Peso del residuo de la hidrólisis . . . . .	15'8 ± 0'4	24'1 ± 0'5	9'0 ± 0'3
CRITERIOS DE SELECCION:			
a) Azúc. fermentables/azúc. totales . . . . .	0'85	0'96	0'88
b) Azúc. fermentables (azúc. ferm. + HMF)	0'95	0'92	0'93
c) Porcentaje de red. Potenciales extraídos .	78'2	78'2	81'2
d) Pentosas (pentosas + furfural) . . . . .	0'80	0'60	0'34
ANÁLISIS PREVIOS <sup>(3)</sup> :			
11. Red. potenciales en res. prehidrólisis . .	24'8 ± 0'4	32'5 ± 0'3	21'3 ± 0'4
12. Pentosanas en res. prehidrólisis . . . . .	2'6 ± 0'1	1'2 ± 0'1	5'1 ± 0'4

Todos los datos se dan respecto a materia seca inicial (r.m.s.i.).

(1) Los análisis núms. 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se dan como glucosa; el 8 y el 12 como xilosa; el 9 como furfural, y el 10 como sólidos. Los valores son media de 6 análisis y se acompañan del intervalo de confianza (para un nivel de significación del 5%). Se efectuaron 2 operaciones de hidrólisis y 3 determinaciones en cada una.

(2) Tallos de maíz sacarino, var. E-41; tallos de maíz Funk's, var. G-5050; tallos de sorgo dulce, var. Wray.

(3) García Breijo y Primo Yúfera (1987).

posthidrólisis es menos enérgica que la del proceso B, lo que reduce la proporción de hexosas destruídas en forma de HMF.

La hidrólisis del residuo lignocelulósico proporciona rendimientos en azúcares reductores muy diferentes para los distintos materiales. Tales rendimientos guardan relación con el contenido en lignina del material. En general, la celulosa de los residuos con contenido en lignina inferior al 10% r.m.s.i., se hidroliza bien (más del 80%); es el caso de los zuros de maíz y de los tallos de sorgo dulce. Los materiales cuyo contenido en lignina es más elevado,

tienen unos rendimientos de hidrólisis más bajos (criterio de selección C en las tablas); es el caso de la paja de arroz y el sarmiento con más del 20% r.m.s.i.

Una parte de las hexosas hidrolizadas se deshidratan a hidroximetilfurfural. Esta degradación no supera, en el peor de los casos, el 8% de las hexosas hidrolizadas. El aprovechamiento o la eliminación del HMF, que pueda producirse, es uno de los problemas a resolver en futuros estudios, ya que la fermentación por levaduras se inhibe, parcialmente, en presencia de HMF.

Todos los caldos de hidrólisis contie-

Tabla II

## RESULTADOS OBTENIDOS CON EL PROCESO "B". GRUPO "AZUCARADO"

Análisis <sup>(1)</sup>	Maíz Sacarino <sup>(2)</sup>	Maíz Funk's <sup>(2)</sup>	Sorgo dulce <sup>(2)</sup>
1. Reductores totales en el extracto . . . . .	18'6 ± 0'1	20'0 ± 0'7	16'4 ± 0'2
2. Reductores no fermentables en el extracto	3'0 ± 0'1	2'5 ± 0'1	2'4 ± 0'1
3. Azúcares fermentables en el extracto . .	15'6 ± 0'1	17'5 ± 0'6	14'0 ± 0'2
4. HMF en el extracto . . . . .	0'62 ± 0'08	1'2 ± 0'1	0'3 ± 0'1
5. Furfural libre en el extracto . . . . .	0'08 ± 0'04	0'04 ± 0'02	Inapreciable
6. Azúcares totales [1 - (4 + 5)] . . . . .	17'9 ± 0'1	18'8 ± 0'6	16'1 ± 0'1
7. Azúcares no fermentables [2 - (4 + 5)]	2'3 ± 0'1	1'27 ± 0'04	2'1 ± 0'1
8. Pentosas reales en el extracto . . . . .	2'0 ± 0'1	1'11 ± 0'03	1'9 ± 0'1
9. Furfural total producido . . . . .	0'27 ± 0'04	0'06 ± 0'02	1'8 ± 0'3
10. Peso del residuo de la hidrólisis . . . . .	15'6 ± 0'2	29'6 ± 0'7	10'0 ± 0'4
<b>CRITERIOS DE SELECCIÓN:</b>			
a) Azúc. fermentables/azúc. totales . . . . .	0'87	0'93	0'87
b) Azúc. fermentables (azúc. ferm. + HMF)	0'96	0'94	0'98
c) Porcentaje de red. Potenciales extraídos .	75'0	61'5	77'0
d) Pentosas (pentosas + furfural) . . . . .	0'89	0'92	0'37
<b>ANÁLISIS PREVIOS<sup>(3)</sup>:</b>			
11. Red. potenciales en res. prehidrólisis . .	24'8 ± 0'4	32'5 ± 0'3	21'3 ± 0'4
12. Pentosanas en res. prehidrólisis . . . . .	2'6 ± 0'1	1'2 ± 0'1	5'1 ± 0'4

(1) (2) (3) Ver notas al pie de tabla I.

nen pentosas, en mayor o menor cantidad, que proceden de las pentosanas más resistentes que no se hidrolizaron en la prehidrólisis (García Breijo y Primo Yúfera, 1987); para muchas aplicaciones estas pentosas son un contaminante. Estas pentosas son más abundantes en el caso de los zuros y del sarmiento, cuyas fracciones de pentosanas residuales son mayores.

El residuo final de lignina, con más o menos celulosa no atacada, varía entre un 6% (zuros de maíz Funk's, var. G-5050) y un 33% r.m.s.i. (paja de arroz, var. Bahía). Como ya se ha comentado, la presencia de la lignina parece influir desfavorablemente en la hidrólisis de la celulosa.

Los ensayos de fermentación realizados sobre los caldos de la hidrólisis produ-

cen a las 48 horas rendimientos en alcohol comprendido entre el 60 y el 65% del teórico, mucho menores que los obtenidos en trabajos previos realizados sobre los caldos de la fase de extracción acuosa (García Breijo y Primo Yúfera, 1986). Estos rendimientos están influidos por la presencia de HMF y furfural, así como de diferentes oligómeros no fermentables, producto de la hidrólisis incompleta de la celulosa, presentes en los caldos de hidrólisis que inhiben parcialmente la fermentación. En la tabla V, están los rendimientos a las 24 h, con las 6 mejores levaduras encontradas para cada uno de los caldos estudiados y en la tabla VI los kg de azúcares fermentables que se obtendrían por tonelada de material en la etapa de hidrólisis.

Tabla VI

PRODUCCION DE AZUCARES FERMENTABLES POR TONELADA DE RESIDUO EN LA ETAPA DE HIDROLISIS

1 tonelada (peso seco)	Azúcares fermentables
Tallos maíz Sacarino . . . . .	156
Tallos maíz Funk's . . . . .	225
Tallos sorgo dulce . . . . .	144
Zuros maíz Sacarino . . . . .	343
Zuros maíz Funk's . . . . .	360
Paja arroz . . . . .	160
Sarmientos . . . . .	226

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los doctores J. L. Blanco, C. López y D. Gómez de Barreda su colaboración en este trabajo al habernos suministrado las materias primas estudiadas en el mismo. Asimismo, agradecemos a la CAICYT y a la Caja de Ahorros de Valencia el haber subvencionado esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

FENGEL, D. y WEGENER, G. "Hydrolysis of polysaccharides with trifluoroacetic acid and its applications to rapis wood and pulp analysis." En: Hydrolysis of Cellulose: Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis (Eds. R. D. Brown Jr. y L. Jurasek). American Chemical Society. Washington, D.C. (1979), pp. 145-157.

GARCIA BREJO, F. J. Obtención de etanol carbu-

rante a partir de residuos agrícolas. Tesis doctoral. Facultad de Biología, Universidad de Valencia (1985).

GARCIA BREJO, F. J. y PRIMO YUFERA, E. "Alcohol de biomasa. I. Azúcares solubles fermentables en tallos de variedades de maíz y sorgo dulce." Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 26/4 (1986), 571-580.

GARCIA BREJO, F. J. y PRIMO YUFERA, E. "Alcohol de biomasa. II. Hidrólisis de las pentosanas de tallos y zuros de maíz, tallos de sorgo, paja de arroz y sarmientos." Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 27/2 (1987), 304-316.

GOLDSTEIN, I. S. "Chemical from cellulose." En: Organic Chemical from Biomass (Ed. I. S. Goldstein). C.R.C. Press, Inc., New York (1981), pp. 101-125.

GRETHLEIM, H. E. "A comparison of the economics of acid and enzymatic hydrolysis of newsprint." Biotechnol. Bioeng., 20 (1978), 503-512.

HOFENK, G. "The hydrolysis of straw by diluted strong acids." En: Proc. of Organization for Economic Co-Operation and Development (O.E.C.D.). Workshop 2: Conversion of lignocellulosic materials to simple carbohydrates. Amersfoot, The Netherlands (1980), pp. 69-74.

LADISCH, M. R. "Fermentable sugars from cellulosic residues." Process Biochem., 14/1 (1979), 21-25.

RUGG, B., ARMSTRONG, P. y STANTON, R. "Preparation of glucose substrates for fermentation from cellulose using the N.Y.U. continuous acid hydrolysis process." New York University. Department of Applied Science. (NYU/DAS 80-14) (1980a).

RUGG, B., ARMSTRONG, P. y STANTON, R. "The New York University Continuous Acid Process hemicellulose utilization preliminary data and economics for ethanol production." New York University, Department of Applied science (NYU/DAS 80-05/A) (1980b).

SAEMAN, J. F. "Assesment of dilute acid hydrolysis of cellulose." En: Proc. BioEnergy'80 World Congr. Expos. Atlanta, USA (1980), pp. 162-164.