

Ultrastructure of rice straw subjected to ammonia reactor processing

Zoraida Medina de Salcedo¹, Betzabé Sulbarán de Ferrer², Alexis Ferrer² and Graciela Ojeda de Rodríguez²

¹Departamento de Biología, e-mail: zmedina@solidos.ciens.luz.ve.

²Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, e-mail: bferrer@solidos.ciens.luz.ve
Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Abstract

In this study a method that uses pressurization and depressurization with ammonia processing (PDA) was applied to rice straw samples. The effect of PDA on the structure of rice straw samples with various moisture contents (15%, 35% and 60%); different treatment times with ammonia (0 min, 6 min, and 20 min) and four combinations of addition and treatment times of ammonia (1-0 min, 1-5 min, 4-0 min, 4-5 min) was determined. Morphological changes were detected by Scanning Electron Microscope. PDA treatment produced noticeable structural changes in rice straw. As moisture content increased there were more cellular architectural losses of parenchyma tissue. As ammonia treatment time increased, more shredding of cellulose fibrils appeared and the higher the ammonia addition time and the treatment time combination, the higher the parenchymal and epidermal cells collapse as well as that of the epidermal wax.

Key words: Ultrastructure, rice straw, ammonia.

Ultraestructura de la fibra de arroz sometida a procesamiento en un reactor con amoníaco

Resumen

En este estudio se utilizó un tratamiento de presión y descompresión con amoníaco (PDA), en muestras de desecho de arroz (paja de arroz). Este trabajo consistió en determinar el efecto del PDA sobre la estructura de la paja de arroz con varios contenidos de humedad (15%, 35% y 60%), varios tiempos de tratamiento con amoníaco (0 min, 6 min, 20 min) y con diferentes combinaciones de tiempos de adición-tratamiento con amoníaco (1-0 min, 1-5 min, 4-0 min, 4-5 min). Los cambios morfológicos se evidenciaron con el uso del Microscopio Electrónico de Barrido. Se determinó que el tratamiento amoniacal PDA produce cambios estructurales notables en la muestra; el aumento del contenido de humedad provocó mayores pérdidas de la arquitectura celular del tejido parenquimatoso, a mayor tiempo de tratamiento del amoníaco hubo mayor separación de la celulosa en microfibrillas y a mayor tiempo de adición y tratamiento del amoníaco hubo mayor colapso de las células del parénquima y de la epidermis, al igual que la cera cuticular que envuelve la epidermis.

Palabras clave: Ultraestructura, paja de arroz, amoníaco.

Introducción

El incremento de la población humana en los países subdesarrollados en las últimas décadas ha aumentado grandemente la demanda de

productos alimenticios de origen animal. En consecuencia, ésto requiere un considerable desarrollo en la producción de animales monogástricos y rumiantes. Los tejidos de las plantas proporcionan toda la alimentación humana, directa

o indirectamente a través de los animales [1]. Se ha reportado, que las paredes celulares de las plantas proporcionan la fuente principal de energía a más de 1,4 billardos de rumiantes en el mundo, los cuales producen el 70% del total de proteína animal comestible y el 10% de la fibra natural utilizada por humanos [2]. Las paredes celulares comprenden del 20% al 80% del peso seco del forraje y están compuestas principalmente por celulosa, polisacáridos no celulósicos (hemicelulosas y compuestos relacionados), lignina, sustancias pécticas y proteínas, así como también por otros compuestos como monosacáridos libres, iones metálicos, sílice, cutina y suberina. Maximizar la energía obtenida de las paredes celulares del forraje es importante para una alta eficiencia en la producción animal. Todo esto ha inclinado a muchos investigadores a centrar su mirada en los desechos agrícolas como una fuente potencial importante de energía para la alimentación de animales [2, 3].

Existe una extensa literatura sobre tratamientos físicos-químicos para mejorar el valor nutritivo del forraje, entre ellos destaca el proceso AFEX que utiliza amoníaco [4]. A partir de éste se ha desarrollado un tratamiento de presión y descompresión con amoníaco (PDA) que aumenta significativamente la digestibilidad de materiales como la paja de arroz, pasto elefante enano, maní forrajero, entre otros, el cual se realiza a temperaturas y presiones moderadas en tiempos cortos [3]. El proceso PDA requiere mayores contenidos de humedad (30%-60%) y temperaturas superiores a 65°C, a diferencia del proceso AFEX que se aplica óptimamente a materiales con contenidos de humedad inferiores a 30% y a temperatura ambiente. El tratamiento PDA se basa sobre la disolución exotérmica del amoníaco en agua, ruptura de enlaces éster en las fibras, solubilización parcial de la hemicelulosa y penetración del amoníaco en la matriz celulósica, aunado posteriormente al efecto físico de la descompresión [3].

Diversos estudios han reportado la acción del amoníaco en el mejoramiento del valor nutritivo de la paja de arroz, sin embargo, no existe información sobre los cambios ultraestructurales de este material bajo condiciones de tratamiento PDA [5, 6, 7].

El objetivo principal de este trabajo fue investigar con el microscopio electrónico de barrido los cambios morfológicos en muestras de paja de arroz, procesadas por el tratamiento de presión y descompresión con amoníaco (PDA) para conocer la efectividad del proceso, bajo diferentes condiciones de humedad, tiempo de tratamiento y combinaciones de tiempo de adición y tratamiento de amoníaco [4].

Materiales y Métodos

Descripción de la muestra

La paja de arroz cosechada en septiembre de 1994 en Princeton, California, fue triturada en un molino de martillo hasta un tamaño de 5 cm, previo a la aplicación del pretratamiento amoniacal. Las muestras presentaron una humedad de 15%.

Pretratamiento PDA

Las muestras se trataron en un reactor PDA localizado en la Universidad de Texas A&M y fueron suministradas por A. Ferrer y B. de Ferrer.

El tratamiento PDA consistió en un proceso de presión y descompresión con amoníaco anhidro a varias condiciones de temperatura, presión, contenido de humedad del material y carga de amoníaco en tiempos cortos. La temperatura de la muestra y del amoníaco y la temperatura y la presión del reactor se midieron durante todo el proceso. El control consistió en una muestra no tratada. Se colocaron 160 gramos de materia seca de paja de arroz, triturada, en un reactor de 4 litros de capacidad al cual se le agregó el agua necesaria para alcanzar el contenido de humedad deseado, y amoníaco líquido anhidro en proporción 1,5:1 (amoníaco/materia seca). Después del tiempo de tratamiento la presión se liberó rápidamente. El amoníaco se recogió en un tanque. La muestra se recuperó del reactor y se secó parcialmente con aire a temperatura ambiente. Todas las muestras se procesaron por duplicado. Una porción de la muestra se utilizó para los estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB).

Se utilizaron las siguientes condiciones para el pretratamiento PDA: tres contenidos de humedad (sobre base húmeda): 15%, 35% y 60%. (Tabla 1); tres tiempos de tratamientos: 0 min, 6

min y 20 min (Tabla 2); cuatro combinaciones de tiempo de tratamiento y de retención del amoníaco: 1-0 min, 1-5 min, 4-0 min y 4-5 min (Tabla 3); carga de amoníaco de 1,5 kg de amoníaco puro/kg de materia seca y temperatura inicial de 85°C, para todos los tratamientos y para duplicados de las muestras. Estas condiciones fueron sugeridas por ensayos preliminares.

Microscopía electrónica de barrido

La muestra control y todas las muestras tratadas con PDA (secadas hasta un contenido de humedad del 15%) se prepararon para el MEB. Estas se montaron en un disco de aluminio (por-

ta muestra) para ser metalizadas con una capa de 200 Å de oro, utilizando un recubridor *Sputter Coarse* y observadas en un Microscopio Electrónico de Barrido Phillips XL 30. El voltaje fue 25 KV. Las muestras se observaron a 50, 100, 200, 500, 1000 y 5000X.

Resultados y Discusión

Muestra

La paja de arroz utilizada contenía un 15% de humedad. La composición en base seca fue de: 5% de proteína cruda, 45,2% de celulosa, 27,6% de hemicelulosa y 5% de lignina [5].

Tabla 1
Diseño experimental para estudiar el efecto del contenido de humedad

Muestra	Contenido de humedad (%)	Tiempo de adición del amoníaco (min)	Tiempo de tratamiento (min)
Control	15	Ninguno	Ninguno
2	15	4	20
3	35	4	20
6	60	4	20

Tabla 2
Diseño experimental para estudiar el efecto del tiempo de tratamiento

Muestra	Contenido de humedad (%)	Tiempo de adición del amoníaco (min)	Tiempo de tratamiento (min)
Control	15	Ninguno	Ninguno
8	35	4	0
5	35	4	6
3	35	4	20

Tabla 3
Diseño experimental para estudiar el efecto de la combinación tiempo de adición del amoníaco-tiempo de tratamiento

Muestras	Contenido de humedad (%)	Tiempo de adición del amoníaco (min)	Tiempo de tratamiento (min)
Control	15	Ninguno	Ninguno
14	60	1	0
12	60	1	5
15	60	4	0
13	60	4	5

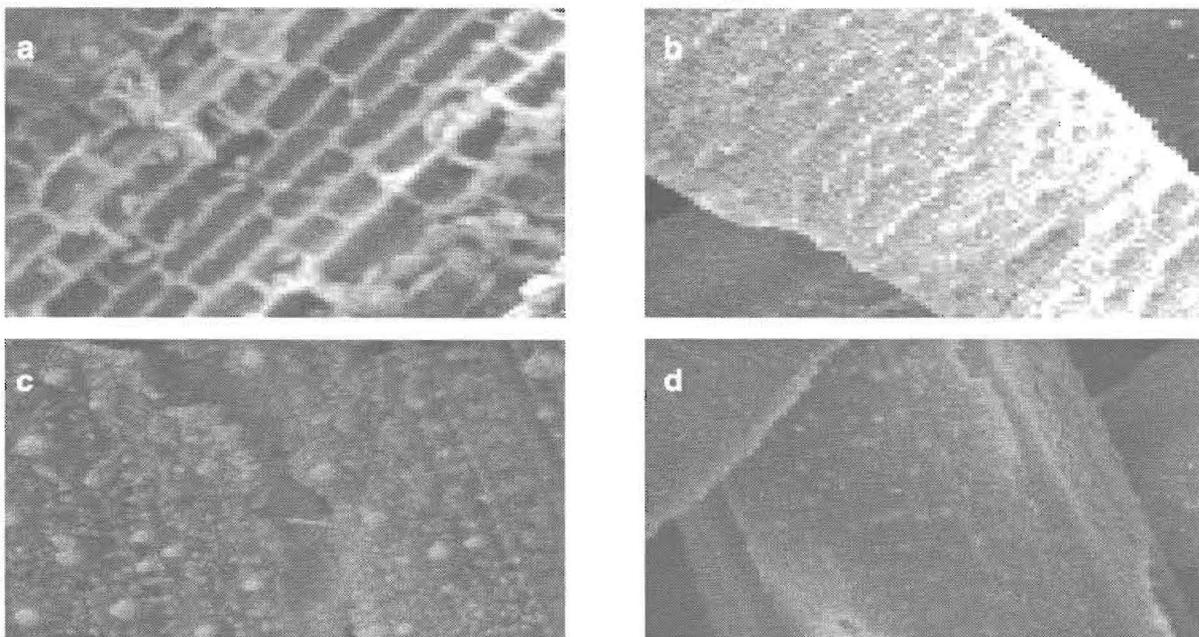


Figura 1. Control: Paja no tratada. a) 50X; 500 μm . b) 100X; 200 μm . c) 200X; 100 μm . d) 50X; 500 μm .

Paja de arroz no tratada (control)

Las fotomicrografías muestran que todas las paredes celulares de los tejidos permanecieron intactos al igual que la epidermis (Figura 1a). El tejido lignificado no fue afectado por la molienda, que fue el único tratamiento recibido, y la integridad estructural se mantuvo; solo se observaron los bordes ligeramente afectados y resquebrajamiento de las secciones. Las células de la capa interna (parénquima) permanecieron unidas y bien definidas (Figura 1b). No se evidenció desorden del tejido interno, solo rupturas al final y en la mitad de las secciones, producto de la molienda en la preparación de la muestra (Figura 1a-c) [8]. Esto es típico de la paja de arroz molida no tratada [6]. Sin embargo, moliendas muy severas han causado la separación de los tejidos lignificados (vascular) y no lignificados (parénquima) en alfalfa [9], así como la fragmentación de los tallos.

En la epidermis se observaron protuberancias bien pronunciadas y delimitadas (capa de cera cuticular) (Figura 1c, 1d).

Muestras tratadas con diferentes porcentajes de humedad (Tabla 1)

15% de humedad

Las fotomicrografías revelan que las muestras después del tratamiento PDA presentan des-

prendimientos de la capa epidérmica quedando expuestas las células del parénquima (Figura 2a). Las células del parénquima revelaron una disrupción leve con adelgazamientos en sus paredes celulares. El tejido más afectado fue el parénquima, quizás porque sus células sólo poseen paredes celulares primarias no lignificadas, fáciles de ser afectadas [10] (Figura 2a). La capa cuticular externa fue levemente afectada por el tratamiento mostrando pérdida parcial de las protuberancias (Figura 2b). Estos efectos se han observado en la paja de arroz tratada con 5% de amoníaco durante tres días [6].

35% de humedad

Las fotomicrografías revelan que las secciones expuestas presentaron aberturas centrales con liberación y relajamiento de las fibras de celulosa, debido probablemente a una alteración entre las uniones de los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) y la lignina (Figura 3a-b). La celulosa es más resistente a la acción del tratamiento y sólo se lograrían romper los enlaces de hidrógeno entre las moléculas, disminuyendo así su cristalinidad [11].

60% de humedad

La Figura 4 revela que el alto contenido de humedad logró incrementar la acción del tratamiento sobre las células de la epidermis, posible-

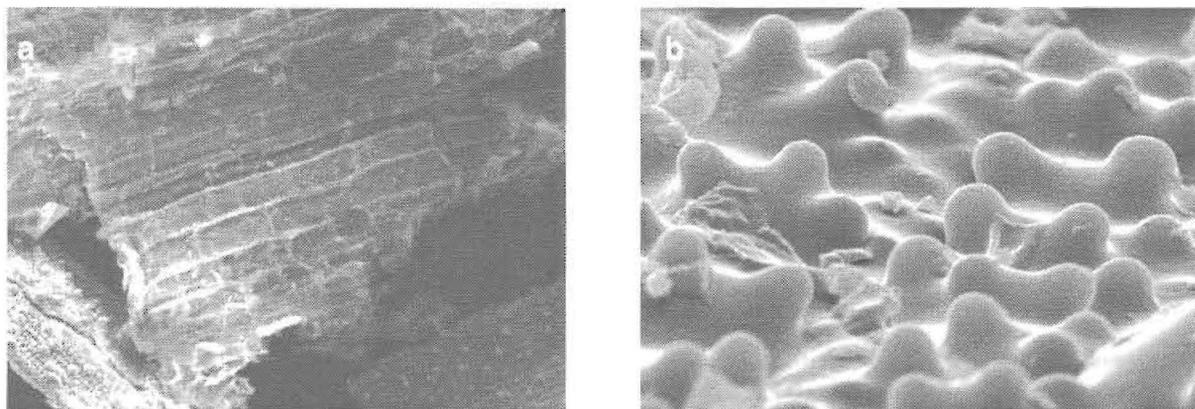


Figura 2. Muestra 2 con 15% de humedad. a) 100X; 200 µm. b) 500X; 50 µm.

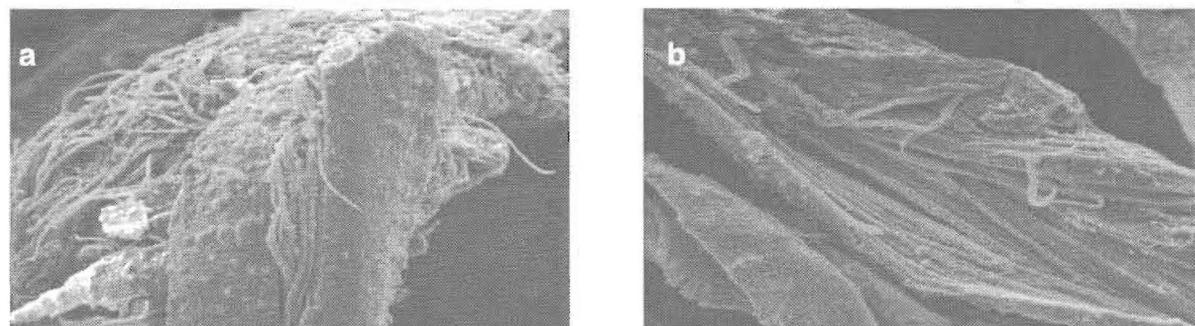


Figura 3. Muestra 3 con 35% de humedad. a) 100X; 200 µm. b) 200X; 100 µm.

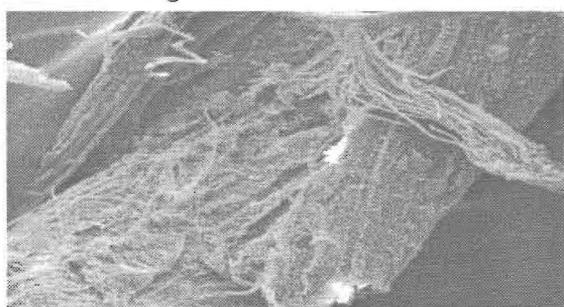


Figura 4. Muestra 6 con 60% de humedad:
100X; 200 µm.

mente debido a separaciones de las uniones polisacáridos-lignina de las células. El parénquima es más atacado por el tratamiento, se pierde toda la arquitectura celular por desintegración de sus paredes y por ende de los límites intercelulares. El parénquima, el tejido vascular y el esclerénquima fueron los más afectados en algunas secciones, ya que sus células poseen menos lignina que las del epitelio. Esta desintegración no se observó en tratamientos amoniacaes de la paja de arroz a temperatura ambiente [6], lo que sí ocurrió en alfalfa amonificada a alta presión durante 30 minutos [9].

El gran efecto ocasionado por el alto contenido de humedad pudiera explicarse por la mayor disolución del amoníaco en agua, lo cual le permitió mayor movilidad y capacidad para penetrar las fibras. Por otra parte, como la disolución del amoníaco en agua es exotérmica, el incremento de temperatura en la biomasa aumenta aún más esta capacidad.

Muestras con diferentes tiempos de tratamiento (Tabla 2)

Tiempo de tratamiento con amoníaco de 0 min

Las fotomicrografías revelan que ocurrieron separaciones de las fibras de celulosa en forma moderada (Figura 5a). La cera cuticular que envuelve el tallo colapsó provocando una disminución y separaciones de las protuberancias de la misma (Figura 5b).

Las células del parénquima pierden sus uniones entre ellas, pero aún permanecen adheridas a la epidermis del tallo (Figura 5c).

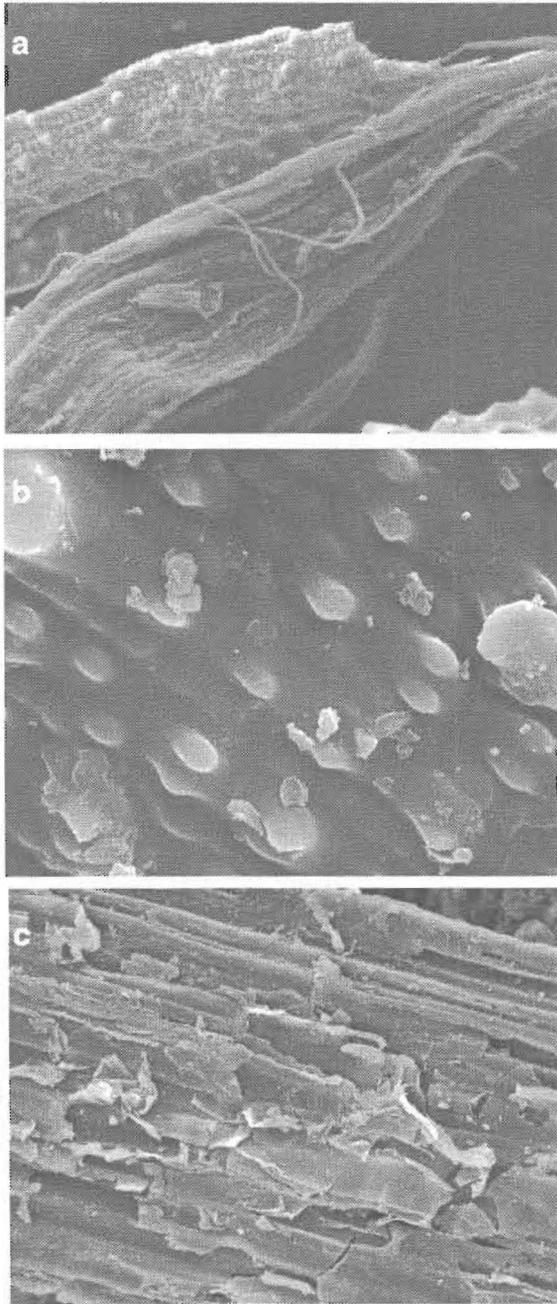


Figura 5. Muestra 8 con 4 min de adición y 0 min de tratamiento. a) 200X; 100 µm. b) 5000X; 5 µm. c) 500X; 50 µm.

Tiempo de tratamiento con amoníaco de 6 min

Las micrografías revelan que las células del parénquima se mostraron totalmente colapsadas, perdiendo por completo sus límites. Esto posiblemente pudiera indicar que para 6 min de

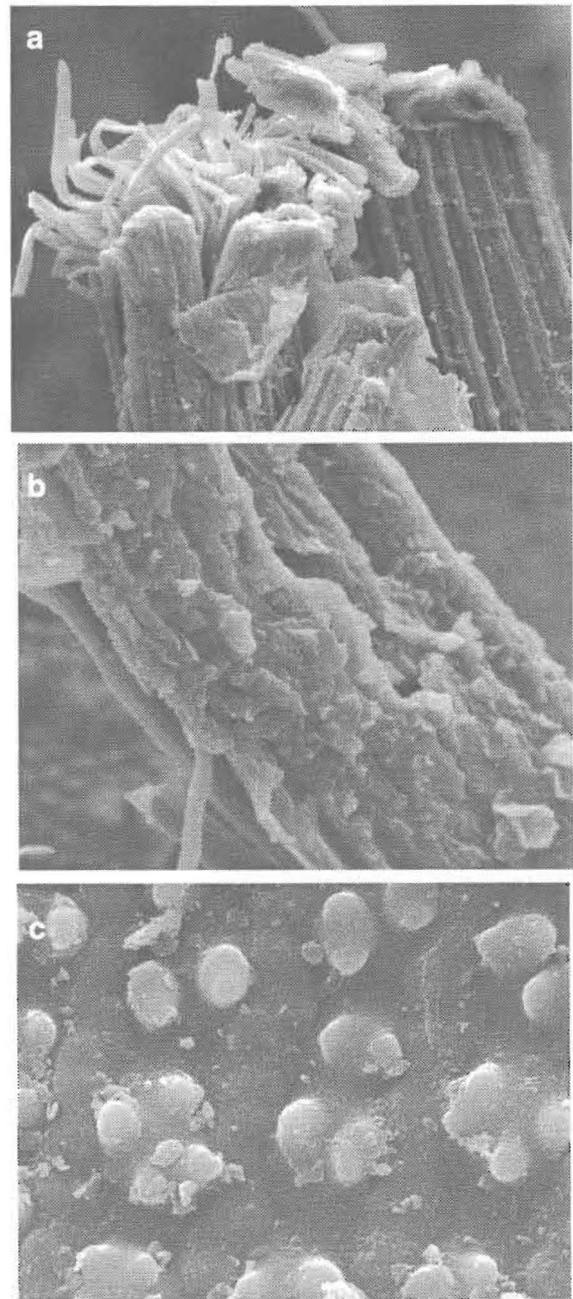


Figura 6. Muestra 5 con 4 min de adición y 6 min de tratamiento. a) 500X; 50 µm. b) 500X; 50 µm. c) 5000X; 5 µm.

tratamiento el amoníaco actúa más efectivamente sobre la hemicelulosa permitiendo su liberación de los complejos con lignina de la matriz de la pared celular (Figura 6a). Sin embargo, una gran proporción de la masa celular permanece adherida a la epidermis (Figura 6b).

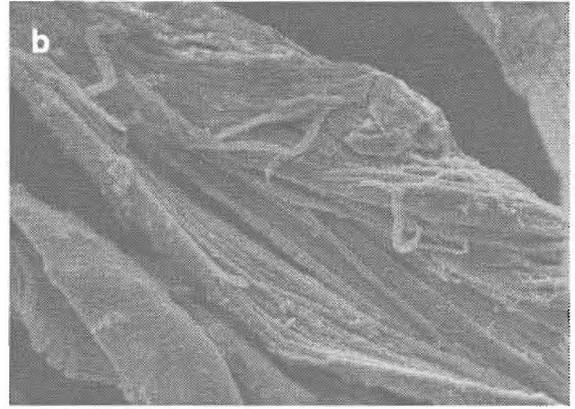
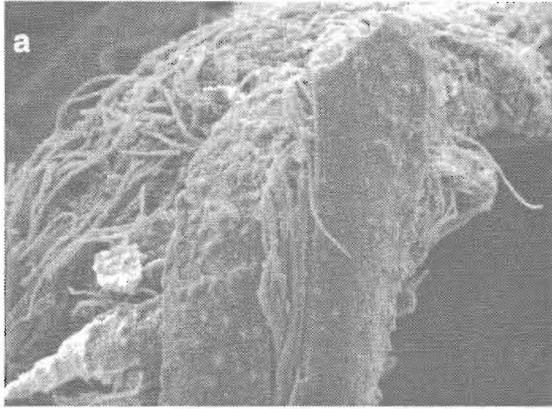


Figura 7a. Muestra 3 con 4 min de adición y 20 min de tratamiento. a) 100X; 200 μ m. b) 200X; 100 μ m.

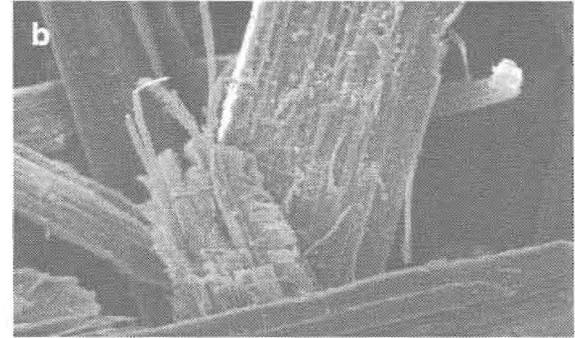
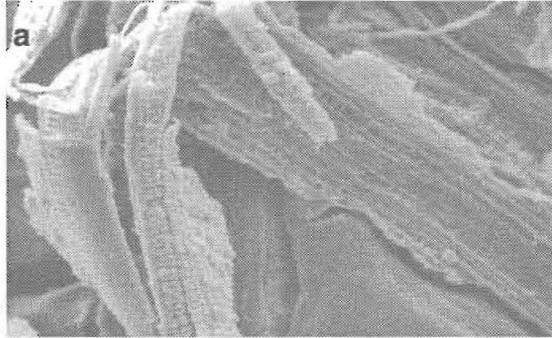


Figura 8a. Muestra 12 con 1 min de adición y 5 min de tratamiento. a) 200X; 100 μ m. b) 100X; 200 μ m.

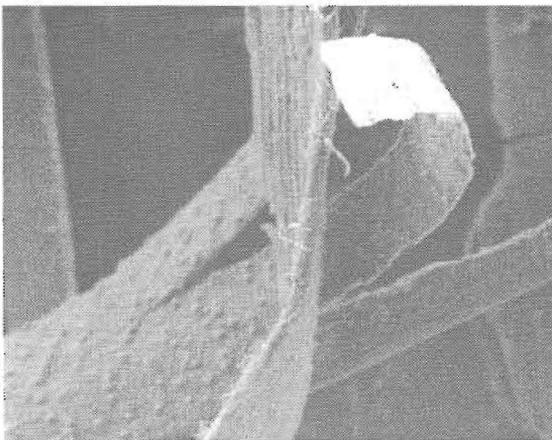


Figura 9. Muestra 15 con 4 min de adición y 0 min de tratamiento: 100X; 200 μ m.

La cera cuticular aún se encontró presente pero con cambios en el tamaño y la separación de sus protuberancias (Figura 6c).

Tiempo de tratamiento con amoníaco de 20 min

Las micrografías evidencian gran proporción de fibras de celulosa abiertas quizás por pér-

didada de los enlaces entre los otros componentes de la célula (hemicelulosa, lignina y sustancias pécticas) (Figura 7a-b). No se evidenciaron separaciones dramáticas de las células del parénquima.

Muestras con diferentes tiempos de adición y tratamiento (Tabla 3)

Tiempo de adición-tratamiento

1 min-5 min (1-5)

Las Figuras 8a-c revelan que esta combinación de tiempos sólo fue capaz de provocar curvaturas en los tallos, partiduras a lo largo de la estructura; pocas fibras de celulosa son liberadas.

Tiempo de adición-tratamiento

4 min-0 min (4-0)

La Figura 9 revela casi el mismo efecto del anterior sólo que en estas condiciones experimentales hay mayor disrupción de las células del parénquima.

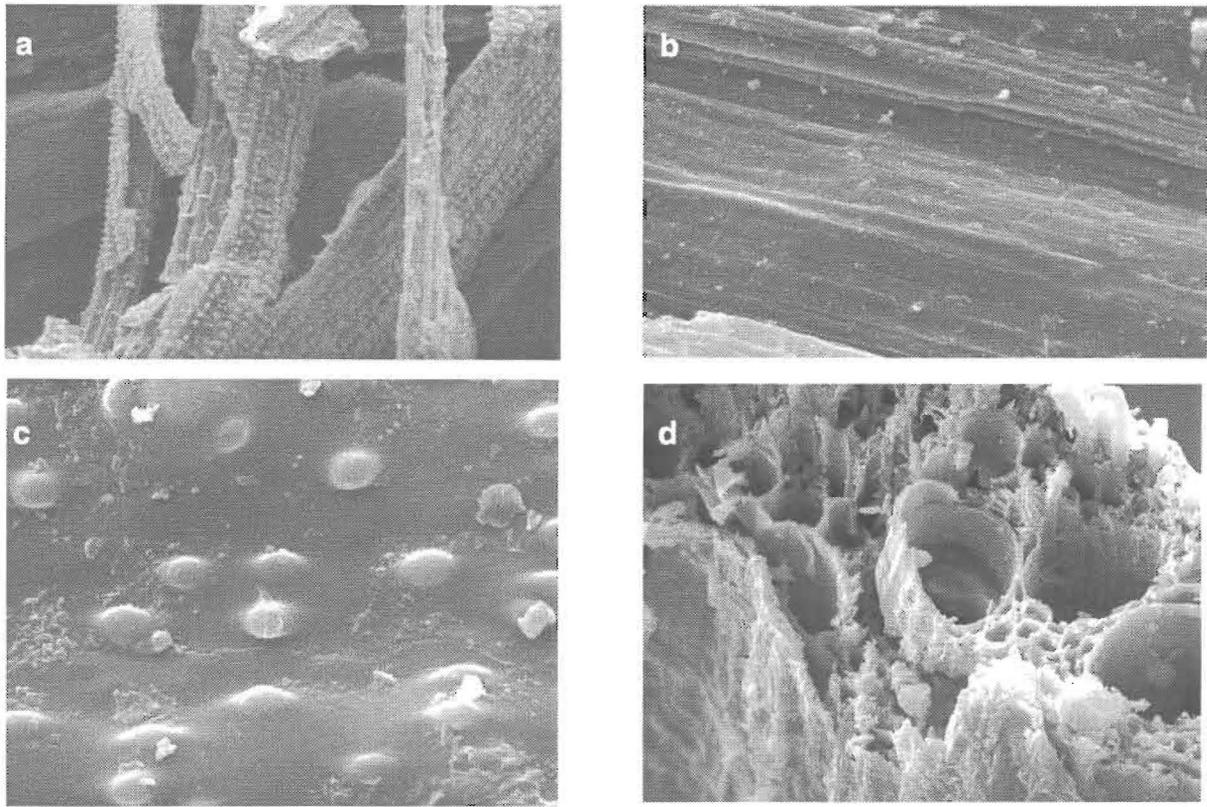


Figura 10. Muestra 14 con 1 min de adición y 0 min de tratamiento. a) 200X; 100 μm . b) 500X; 50 μm . c) 5000X; 5 μm . d) 1000X; 20 μm .

Tiempo de adición-tratamiento

1 min-0 min (1-0)

Comienza a evidenciarse una rajadura a lo largo del tejido [9] (Figura 10a).

En el corte transversal de la muestra se evidenció que el parénquima fue grandemente removido (Figura 10b). Las micrografías revelan que la cera cuticular aún permanece, pero con disminución y separación de sus protuberancias y se presenta laxa (Figura 10c). La epidermis, el esclerénquima y la vaina vascular interna fueron afectadas, el parénquima fue más afectado probablemente por su bajo contenido de lignina (Figura 10d).

Tiempo de adición-tratamiento

4 min- 5 min (4-5)

Las microfotografías revelan que los tallos se fracturaron en forma múltiple a lo largo de toda su longitud; hay curvaturas entre ellos (Figura 11a).

Las células del parénquima colapsaron totalmente al igual que la epidermis. El tallo se se-

paró produciendo la salida de gránulos de almidón que no fueron afectados por el tratamiento, apareciendo intactos en el parénquima [7] (Figura 11b).

La cera cuticular que envuelve la epidermis se observó muy fracturada quizás por alteración de sus constituyentes (Figura 11c).

Conclusiones

El aumento del contenido de humedad asociado al proceso provocó una pérdida de la arquitectura celular del tejido parenquimatoso, proporcional a dicho incremento y mayor (no mejor) a 60%.

La mayor separación celulosa en microfibrillas se obtuvo con el tratamiento de 20 min con el amoníaco.

A mayores tiempos de adición y tratamiento con amoníaco las células del parénquima y de la epidermis sufren mayor colapso, al igual que la cera cuticular que envuelve la epidermis, siendo óptima la combinación 4 min-5 min.

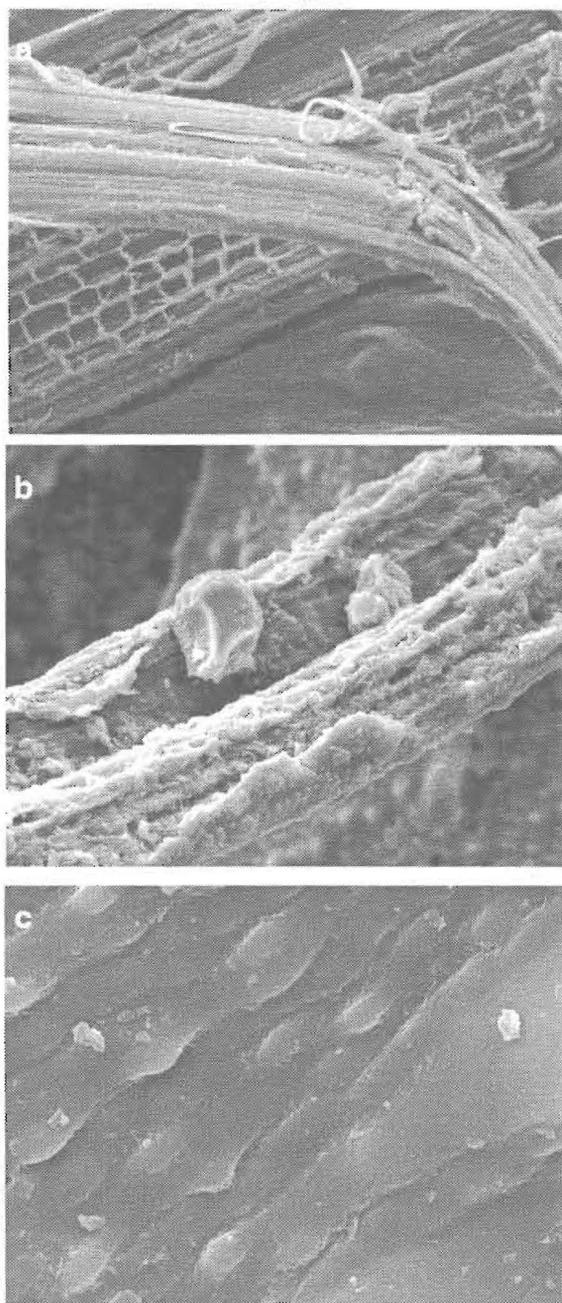


Figura 11. Muestra 13 con 4 min de adición y 5 min de tratamiento. a) 200X; 100 μ m. b) 500X; 50 μ m. c) 5000X; 5 μ m.

Agradecimiento

A C. McDonough de Texas A&M University por su valiosa ayuda en la interpretación de las micrografías.

Referencias Bibliográficas

1. Fennema, O.R. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc., New York (1997), pp 320-325.
2. Minson, D.J. Forage in ruminant nutrition. Academic Press. New York (1990) pp 155-159.
3. Ferrer, A. Development of high energy feeds from forages with ammonia reactor pressurization/depressurization. Texas A&M University. USA. PhD Dissertation. (1997), 217 p.
4. Dale, B.E. and Moreira, M.J. A freeze-explosion technique for increasing hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12 (1983) 31-43.
5. Sulbarán de F., B., Ferrer, A., Byers, F.M., Dale, B.E. and Aristiguieta, M. Sugar production from rice straw. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 5, Supl. 1 (1997) 112-114.
6. Itoh, H., Terashima, Y. and Hayashizaki, A. Ammoniated rice straw and rice hulls and rumen microbial degradation investigated by Scanning Electron Microscopy. Jpn. J. Zootech. Sci. 52 (1981) 671-679.
7. Song, Y., Shimojo, M. and Goto, I. Morphological study on the digestion of rice straw by treatment with ammonia and sulphur dioxide. Asian J. Anim. Sci. 6 (1993) 259-264.
8. Medina de S., Z. Ultraestructura de la fibra expuesta a una explosión amoniacal, PDA. Trabajo de Grado de Maestría. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. (1998), 74 p.
9. Hong, B., Broderick, G., Panciera, M., Koegel, R. and Shinnors, K. Effect of shredding alfalfa stems on fiber digestion determined by in vitro procedures and Scanning Electron Microscopy. J. Dairy Sci. 71 (1988) 1536-1454.
10. Wilson, J.R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. J. Agric. Sci. 122 (1994) 173-82.
11. Holzapple, M.T., Jun, J.H., Ashok, G., Patibandla, S.L. and Dale, B.E. The ammonia freezing explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. Appl. Biochem. Biotechnol. 28/29 (1991) 59-74.

Recibido el 9 de Marzo de 1998

En forma revisada el 25 de Febrero de 1999