

PRETRACTAMENT AMB HIDRÒLISI PARCIAL DE RESIDUS LIGNOCEL·LULÒSICS

per

GLÒRIA GONZÀLEZ I ANADÓN

Departament de Química Tècnica.
Universitat Autònoma de Barcelona

SUMMARY

The hydrolysis of wheat straw hemicellulose has been carried out as a pretreatment to improve the action of acids or enzymes on the cellulose. The partial hydrolysis with dilute sulfuric acid at moderate temperatures, produces pentoses (xilose and arabinose). It has been modelled involving sequential reactions using first order kinetic model. The acid concentration influence on the kinetic parameters has been studied, as well as, the enhanced accesibility of the spent residue.

1. RESUM

Aquest resum recull el treball realitzat sobre la hidròlisi àcida de la fracció hemicel·lulòsica de residus agrícoles, com un pretractament de la cel·lulosa present, cara a la hidròlisi enzimàtica.

S'ha treballat amb palla de blat, a la qual s'ha sotmès a un procés de mòlta i garvellat a fi d'aconseguir un substrat el més homogeni possible.

Un cop seleccionades les variables d'operació, s'han dut a terme experiències a diferents concentracions d'àcid sulfúric i diverses temperatures, obtenint-se una solució de sucres que conté xilosa i arabinosa principalment. S'ha intentat modelitzar el comportament del sistema tot i proposant un model cinètic del qual s'han calculat els valors dels paràmeters òptims, en funció de la mínima desviació respecte dels punts

experimentals. S'ha pogut trobar també la correlació entre els valors dels paràmetres obtinguts i la concentració d'àcid.

Atès que la hidròlisi de la fracció hemicel·lulòsica és un pretractament eficaç per a la cel·lulosa, s'han realitzat proves enzimàtiques d'accessibilitat de la cel·lulosa amb cel·lulasa, sobre el material pretractat, amb les quals és fàcilment observable l'augment de la producció de sucres, si es compara amb el material no tractat. A més a més s'ha vist utilitzant la tècnica de la Microscòpia Electrònica de Rastreig, una clara destrucció de les fibres vegetals, en comparar ambdòs materials.

2. INTRODUCCIÓ

El creixent interès per a desenvolupar fonts energètiques alternatives al petroli, ha anat decantant una sèrie de possibilitats com a les més atractives tant tècnicament com econòmicament. Una de les més interessants és l'aprofitament de biomassa d'origen lignocel·lulòsic i de caràcter residual, amb vista a la seva revalorització mitjançant l'obtenció d'etanol via fermentació. L'etanol obtingut pot utilitzar-se com a producte de partida per a síntesi o bé com a combustible.

2.1. Estructura dels materials lignocel·lulòsics

El material lignocel·lulòsic representa una excel·lent font de matèria primera per a la bioconversió, degut a la seva abundància i a la seva naturalesa renovable. Està constituït per una mescla de polisacàrids, principalment cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina. Les fonts naturals són les fustes, les tiges vegetals de cereals, canyes, palmes, etc.; hi ha d'altres materials, que encara que menys abundants (algues, papers, escombres) són força interessants com a matèria primera per a la bioconversió, degut a la seva disponibilitat.

Cel·lulosa

La cel·lulosa és un homopolímer lineal constituït per monòmers de glucopiranososa (anhidroglucosa) units amb enllaços β (1-4) glucosídics. La conformació que s'obté amb aquest tipus d'unió, afavoreix la formació d'enllaços per pont d'hidrogen entre sucres de la mateixa cadena o fins i tot entre sucres de cadenes adjacents, Això condueix a un empaquet estratificat on les microfibrilles formades queden enllaçades entre si, formant una mena d'estructura cristal·lina, que confereix a la cel·lulosa una alta resistència tan mecànica com enfront d'agents químics.

Hemicel·lulosa

A diferència de la cel·lulosa, l'hemicel·lulosa presenta una gran varietat d'estructures i composicions. Es consideren hemicel·luloses, els heteropolímers de la paret cel·lular de cadena curta i generalment ramificada, on s'alternen pentoses i hexoses. El grau de polimerització de l'hemicel·lulosa és, per tant, més baix que el de la cel·lulosa. Mentre que les cadenes de cel·lulosa es situen per sobre de 10.000 monòmers, l'hemicel·lulosa conté entre 50 i 200 unitats.¹

El tipus més abundant és el que està format per una cadena bàsica d'unitats de D-Xilosa unides amb enllaços $\beta(1-4)$ glucosídics, amb monòmers de L-Arabinosa units amb enllaços $\alpha(1-3)$ constituint-se així cadenes secundàries o ramificades.² Aquests Arabinoxilans són els constituents majoritaris de l'hemicel·lulosa present a cereals i herbàcies, mentre que, a la fusta, els xilans es caracteritzen per la presència d'àcids urònics, en concret l'àcid 4-O-metil-D-glucorònic, enllacat també a la cadena principal. En alguns casos es poden trobar també unitats de D-glucosa.

L'hemicel·lulosa pot ser hidrolitzada fins a l'obtenció dels sucres monomèrics que la constitueixen. Es coneixen molts àcids capaços d'hidrolitzar de forma efectiva aquestes cadenes, el mètode usual utilitza àcid diluït i temperatures de l'ordre de 130 a 160°C. Durant la hidròlisi les pentoses obtingudes es degraden ràpidament a furfuraldehid i altres productes de condensació; per evitar la formació d'aquests productes indesitjables cal fer la hidròlisi en condicions més suaus de concentració i temperatura.³

Lignina

La lignina és el tercer component majoritari dels materials ligno-cel·lulòsics, és un polímer aromàtic tridimensional constituït per unitats d'oxifenilpropà. L'estructura resultant és amorfa, molt complexa i amb un pes molecular mitjà superior a 10.000.⁴

Al contrari dels altres polímers, cel·lulosa i hemicel·lulosa, la lignina no conté un enllaç hidrolitzable que es vagi repetint al llarg d'una cadena principal, sinó que conté una sèrie d'enllaços tipus èter,⁴ aparentment distribuïts a l'atzar que li confereixen una estructura no gaire adient per a la hidròlisi biològica. Quant a agents químics, és insoluble en aigua i àcids minerals forts.

2.2. Pretractament

La via clàssica per a l'obtenció d'etanol consta de dues etapes principals: Hidròlisi (àcida o enzimàtica) i Fermentació, que es complementen amb un pretractament previ a la hidròlisi i una separació i/o purificació de l'etanol obtingut a la fermentació (fig. 1).

Ens centrarem en l'etapa del pretractament. Els residus lignocel·lulòsics són relativament refractaris a la bioconversió, un residu no sotmès a un pretractament dona rendiments baixos d'hidròlisi.⁵ Considerem el cas dels enzims: Els enzims són catalitzadors específics, les cel·lulases són capaces de transformar la cel·lulosa en glucosa i cel·lobiosa sense gairebé subproductes indesitjables. Dissortadament, l'alta especificitat de la cel·lulasa fa que no tingui efectes hidrolítics directes sobre la lignina, i essent l'enzim una macromolècula (pes molecular entre 38.000 i 75.000), aquest no pot penetrar a través de la barrera de lignina que protegeix la cel·lulosa. Així, doncs, el problema principal és la no accessibilitat de la cel·lulosa als enzims.

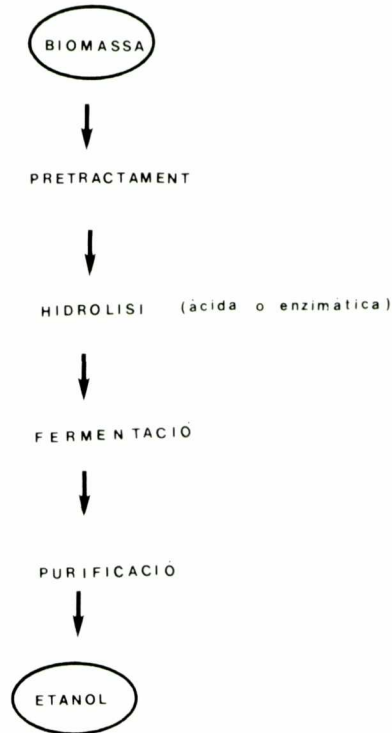


Fig. 1. Etapes principals en un procés d'obtenció d'etanol.

En general podem dir que els inconvenients més grans en quant a l'utilització directe i efectiva de residus cel·lulòsics per a processos de degradació àcida, enzimàtica o microbiològica, resedeixen principalment en els factors següents:⁶

Estructura altament cristal·lina de les fibres: La cel·lulosa continguda a la biomassa té una estructura principalment cristal·lina, amb zones amorfes. Els fragments amorfs, que constitueixen sols un 15% de tota la cel·lulosa,⁷ són més susceptibles a la degradació química i enzimàtica que els fragments cristal·lins, amb la qual cosa si s'augmenta la seva proporció a les fibres, es pot augmentar la velocitat d'hidròlisi. Un trencament físic de les fibres o una dissolució i posterior precipitació, ens condueixen a estructures amorfes.

La Lignina: La presència de lignina suposa una barrera física a l'atac de la cel·lulosa per enzims i àcids, ja que es forma un entrellaçat entre les dues estructures que dificulta l'acció hidrolítica.

Grau de polimerització: El grau de polimerització de la molècula de cel·lulosa varia entre 1.000 i 10.000 unitats d'anhidroglucosa segons el tipus de material.² La disminució del grau de polimerització amb tractaments àcids, ens porta a molècules de 100 a 200 unitats, que corresponen a llargades de cadena entre 500 i 1.000 Å, i amb les quals s'aconsegueix una hidròlisi molt més ràpida.

Àrea superficial accessible: La mesura d'aquesta àrea ens donarà la superfície real de contacte físic entre les molècules d'enzim i les fibres cel·lulòsiques. La limitació de llocs accessibles, susceptibles d'atac enzimàtic, ve donada per la grandària mitjana dels capilars de l'estructura de la biomassa, si aquests són petits, no permetran el pas de les molècules d'enzim, i l'atac quedarà reduït a la superfície externa de les fibres, disminuint considerablement la velocitat de reacció.

El pretractament és per tant necessari i és un punt important amb vista a l'optimització del procés global. Un bon pretractament ha d'ésser capaç d'aconseguir l'aïllament o la separació de les estructures de cel·lulosa dels altres components, així com la reducció de cristal·linitat en l'estructura de totes les fibres. Tot això condueix a una millora en l'accessibilitat dels enllaços $\beta(1-4)$ glucosídics del polímer, i així s'augmenta la velocitat d'hidròlisi.

Tipus de pretractament

Els pretractaments es poden classificar en dos grans grups, segons la seva acció sobre el substrat: Físics i Químics.

En general els pretractaments químics són més efectius que els físics.⁸ Encara que tots dos augmenten la velocitat d'hidròlisi, els tracta-

ments químics causen delignificació mentre que els físics el que aconsegueixen són dràstiques reduccions de la grandària de les fibres, que suposa reducció de la cristal·linitat, sense efectes de delignificació. L'avantatge principal dels tractaments físics està en la no obtenció de subproductes o productes intermitjos de descomposició que poden arribar a ser tòxics en altres operacions del procés, i el principal inconvenient en les despeses energètiques que generalment els acompanyen, i que poden influir en la rendibilitat del procés. Dins els pretractaments físics, els més comuns són la mòlta,⁸ radiació,⁹ tractament amb vapor,¹⁰ explosió,¹¹ tractaments tèrmics.¹²

Pretractaments químics

Els pretractaments químics per a augmentar l'accessibilitat de la cel·lulosa es basen en l'esponjament de les fibres. S'han utilitzat una gran varietat de mètodes per afavorir la velocitat d'hidròlisi. Els podem dividir en tres grups: Alcalins,² Àcids i Tractament amb dissolvents.¹

Els més utilitzats són els àcids. Amb un pretractament àcid s'obté la dissolució pràcticament total de les hemicel·luloses, sense hidrolitzar la cel·lulosa. Les cadenes hemicel·lulòsiques estan entrellaçades amb les fibres cel·lulòsiques, per tant l'extracció de l'hemicel·lulosa suposa un augment considerable d'accessibilitat per la cel·lulosa enfront de l'atac enzimàtic.

L'àcid més emprat és el sulfúric diluït en un rang de concentracions que es mou entre el 0.1 i el 5.0%(p/v) i amb temperatures de treball que van dels 30 fins els 220°C.

Com ja hem dit, un dels principals problemes dels tractaments químics és l'aparició de productes indesitjables. En el cas del sulfúric segons les condicions d'operació, els sucres formats (principalment la Xilosa) es deshidraten passant a furfuraldehid o hidroximetil furfuraldehid. Malgrat tot, l'àcid sulfúric és un dels més emprats i el que serà objecte d'estudi en el present treball. A la taula I es presenten els resultats d'una revisió bibliogràfica dels pretractaments amb àcid sulfúric. La majoria de treballs consideren el procés tan sols com un pretractament, sense separació ni anàlisis detallats dels hidrolitzats.

Pretractament amb hidròlisi parcial

Tot i que la hidròlisi àcida de l'hemicel·lulosa ha estat una tècnica molt estudiada com a pretractament de residus lignocel·lulòsics, són pocs els treballs que es dediquen a l'estudi específic d'aquesta etapa.

TAULA I

| Ref. | Substrat | S/L (p/v) | C _H % (p/v) | T (°C) | t (min) |
|------|------------------|--------------|---------------------------|-----------|------------|
| (23) | palla blat | 1/40 | 0.25 | 157 | 40 |
| (24) | bagàs | — | 5.4 | 100 | 240 |
| (25) | fusta | — | 0.8 | 180 | 40 |
| (13) | gra d'hivernacle | 1/10 | 4.4 | 100 | 120 |
| (26) | gra d'hivernacle | 1/20 | 0.5 | 180 | 0.22 |
| (14) | fenàs | 1/15 | 9.8 | 155 | 15 |
| (27) | panotxes | 22/100 | 4.9 | 99 | 72 |
| (28) | palla blat | 1/30 | 5.0 | 25 | 240 |
| (28) | palla blat | 1/30 | 5.0 | 90 | 240 |
| (8) | palla blat | 6/100 | 4.4 | 98 | 60 |
| (30) | fusta | 1/30 | 0.8 | 200 | 0.12 |
| (3) | fusta | 1/10 | 0.4 | 170 | 120 |
| (31) | palla blat | — | 5.0 | 30 | 240 |
| (29) | bagàs | 1/10 | 2.0 | 145 | 180 |

Generalment es considera que el procés d'hidròlisi respon a un sistema de reaccions consecutives de primer ordre, segons l'estructura següent:



entenen per productes de degradació, principalment el furfuraldehid.

S'ha de tenir en compte però que la deshidratació dels sucres formats depèn en gran mesura de les condicions d'operació. La temperatura és un dels factors que influeix, es poden trobar referències d'estudis en aquest sentit,²⁹ on la variació s'inclou dins les constants cinètiques segons la llei d'Arrhenius.

L'altre factor del qual depèn el rendiment de la reacció, és la concentració de catalitzador,^{3, 13, 14} que s'intenta també englobar dins les constants cinètiques de la forma:

$$k_i = k_{i0} C_H^n$$

obtenint-se correlacions satisfactòries.²⁹

La hidròlisi de l'hemicel·lulosa suposa, a part de la separació d'una part important del material (de l'ordre del 25%), amb aplicacions biotecnològiques concretes, un pretractament capaç d'aconseguir un augment d'accessibilitat de la cel·lulosa continguda en el residu, amb vista

a un atac enzimàtic amb cel·lulasa. En aquest sentit és important comparar la velocitat d'hidròlisi enzimàtica o els rendiments finals, entre substrats tractats o sense pretractar.⁵

2.3. Plantejament del treball

Es proposa realitzar l'estudi del pretractament de residus lignocel·lulòsics, previ a una hidròlisi enzimàtica de la cel·lulosa. El pretractament seleccionat és d'hidròlisi àcida de la fracció hemicel·lulòsica, amb el qual s'obté una solució de sucres constituïda principalment per xilosa, susceptible de ser posteriorment fermentada.^{15, 16, 17, 18} La cel·lulosa queda junt amb la lignina i es pot separar per extracció amb dissolvents⁷ obtenint-se així la separació dels tres components majoritaris del material. El poder aplicar a cada component per separat el tractament més adient, en les condicions més adients, suposa obtenir, en cada part del procés, rendiments més elevats a més a més d'un aprofitament integral del material de partida.

El pretractament es durà a terme amb àcid sulfúric diluït i a temperatures moderades per tal d'evitar la formació de furfuraldehid, que encara que no sembla ser inhibidor de la hidròlisi enzimàtica, sí que ho és dels llevats responsables de la fermentació.

A l'estudi del tractament escollit, s'abordarà la influència de la concentració d'àcid sobre el rendiment, així com l'estudi de la cinètica del procés, amb vista a obtenir-se expressions representatives, que siguin d'utilitat per al disseny de reactors. Es tracta de comprovar també l'augment d'accessibilitat del material, un cop extreta l'hemicel·lulosa, amb proves d'hidròlisi enzimàtica.

Selecció de la matèria primera

La selecció de la matèria primera per a realitzar les experiències quantitatives és un tema especialment delicat, quan tractem amb productes naturals i de caràcter residual. Interessa partir d'un material tal que la seva composició sigui homogènia i reproducible. El material seleccionat ha estat palla de blat per la seva abundància, fàcil maneig i per la seva homogeneïtat en la composició.

Objectius

– Muntatge d'una instal·lació experimental on es pugui realitzar el pretractament dels residus lignocel·lulòsics, variant les condicions d'operació.

– Preparació i posta a punt del mètode analític per a determinar la concentració de sucres. S'utilitzarà la cromatografia líquida d'alta resolució per tal d'avaluar el grau de sacarificació de l'hemicel·lulosa. S'ha de posar a punt un mètode analític que permeti conèixer la composició del material de partida.

– Selecció i realització de les sèries experimentals del tractament amb àcid sulfúric diluït.

– Determinació del model cinètic d'hidròlisi de l'hemicel·lulosa.

– Posta a punt de mètodes d'avaluació de l'augment d'accessibilitat de la fracció cel·lulòsica amb vista a la hidròlisi enzimàtica, mitjançant la reacció amb cel·lulasa en condicions estàndard.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Matèria primera

La matèria primera utilitzada per a totes les experiències ha estat palla de blat, a la qual s'ha sotmés a un procés de mòlta i garvellat a fi d'aconseguir un substrat el més homogeni possible. La grandària de partícula a utilitzar es tria en funció de les condicions de circulació dins del reactor, realitzant-se tots els experiments amb material entre 0.73 i 1.0 mm de diàmetre.

A fi d'evitar interferències de substàncies estranyes en les anàlisis cromatogràfiques, es realitza una extracció de compostos solubles en aigua, del material un cop mòlt. Les pèrdues per material soluble representen aproximadament el 12% del pes inicial.

3.2. Tècnica experimental

Els experiments cinètics es realitzen en un reactor discontinu de tanc agitat d'un litre de volum. La relació sòlid-líquid seleccionada és de $S/L = 1/20$, la qual cosa garanteix una bona agitació, fixada en 320 min^{-1} .

El reactor està submergit en un bany termostatat, i els experiments es realitzen a 34 i 90°C amb concentracions d'àcid sulfúric que van des de 0.5 fins el 2.0% (p/v).

Les mostres, d'aproximadament 5 ml, s'extrauen del reactor a diferents temps de reacció, es filtren a buit amb membrana de $45 \mu\text{m}$, per tal de separar el substrat no reaccionat. El filtrat es neutralitza amb hidròxid sòdic fins a un pH aproximat de 5. La filtració i la neutralització són necessàries tant per a l'acondicionament de les mostres, previ a l'anàlisi de sucres, com per a garantir l'aturament de la reacció.

3.3. Mètodes analítics

Anàlisi de sucres

El mètode seleccionat per a la determinació de sucres és la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Es disposa d'un cromatògraf líquid PERKIN-ELMER Series 2/1, amb forn incorporat que permet treballar a temperatura constant. Les columnes de separació utilitzades són SHODEX IONPAK S- 801/S, específiques per a sucres, però que permeten també la separació de l'etanol; utilitzen com a fase mòbil aigua destil·lada, microfiltrada ($45 \mu\text{m}$) i desgasificada. La detecció es fa per índex de refracció amb un aparell de la casa WATERS R-401. Es disposa també d'un integrador HEWLETT - PACKARD 3390-A.

S'han realitzat proves amb solucions patró de sucres, a fi de determinar les condicions òptimes per a l'anàlisi: Cabal i Temperatura, que proporcionin una millor separació entre els sucres (Glucosa, Xilosa i Arabinosa) majoritaris. S'utilitzen dues columnes de 25 cm de longitud col·locades en sèrie i una precolumna. La separació així obtinguda és bona quan el cabal és de 1 ml/min i la temperatura de 80°C .

El sistema cromatogràfic permet la separació i detecció de monosacàrids, disacàrids i fins i tot trisacàrids. Els hidrats de carboni es separen detectant-se per ordre de major a menor pes molecular. Les condicions analítiques són tals que permeten la separació entre els components majoritaris, però no la detecció de Manosa i Galactosa que poden estar també presents en hidrolitzats d'hemicel·lulosa, encara que en menor proporció. Les columnes permeten també la separació i detecció del furfuraldehid que surt en una zona bastant allunyada dels sucres. A la figura 2 es mostra una anàlisi típica de les mostres de hidrolitzats, es pot veure la resposta de totes les espècies presents (Glucosa, Xilosa, Arabinosa i Etanol, utilitzat com a patró intern).

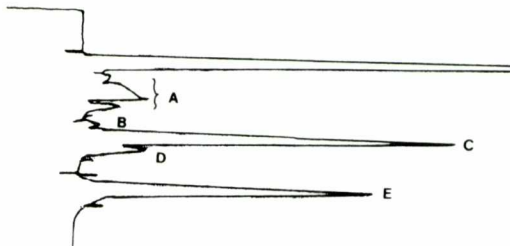


Fig. 2. Cromatograma típic d'una mostra d'hidrolitzats. A: oligosacàrids, B: glucosa, C: xilosa, D: arabinosa, E: etanol.

Accesibilitat de la cel·lulosa

Per tal de comparar l'augment d'accessibilitat de la cel·lulosa continguda en el material un cop eliminada la fracció hemicel·lulòsica, es realitzen assaigs d'hidròlisi enzimàtica.

El mètode del test enzimàtic consisteix en la comparació de la concentració de sucres produïts (Glucosa i Cel·lobiosa) quan es deixa reaccionar el substrat amb cel·lulasa. Les condicions de reacció òptimes en quant a activitat enzimàtica són:¹⁹

T = 50°C

pH = 4.8

Les proves s'han fet en un bany agitat, termostatat on s'ha submergit el matràs de reacció. La mescla reaccionant està constituïda per 7 ml de solució tampó (citrat/cítric) de pH= 4.8, i quantitats d'enzim i substrat determinades segons el tipus d'experiència que es realitza. Després d'un temps fixat de reacció, el mateix per a tots els experiments d'una sèrie, els sucres resultants s'analitzen per cromatografia utilitzant també etanol com a patró intern i fent ús dels calibratges realitzats per l'anàlisi de les mostres d'hidrolitzats.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Matèria primera

Prèviament als experiments d'hidròlisi, es realitza la determinació de la composició en sucres hidrolitzables de la palla de blat. S'utilitza el mètode d'hidròlisi total de la fracció hemicel·lulòsica amb àcid trifluoracètic²⁰ obtenint-se per al nostre cas concret 0.25 mg de xilosa /mg de material i 0.034 mg d'arabiosa /mg de material. Aquests resultats analítics corresponen a material al qual ja s'hi ha extret la fracció soluble.

4.2. Hidròlisi de l'hemicel·lulosa

Segons el mètode experimental explicat anteriorment, s'efectuen proves d'hidròlisi mesurant la concentració de sucres produïts, per l'acció de l'àcid sulfúric, per a diferents temps de reacció.

La primera experiència es duu a terme a 34°C i amb una concentració d'àcid del 2% (p/v). En aquestes condicions les anàlisis no detecten nivells importants de sucres hidrolitzats. Per a la següent s'augmenta la concentració d'àcid fins al 5%; amb les noves condicions és ja quantitzable el grau d'hidròlisi encara que continua essent molt baix. Després

de més de 160 hores de reacció, tan sols s'assoleix un 10% de la conversió total.

A 90°C, es realitzen experiments amb concentració d'àcid del 2%, 1% i 0.5%. Els nivells de concentració són més alts i ja perfectament quantitzables fins i tot per a l'espècie minoritària (glucosa). Pel que fa a la influència de la concentració de l'àcid es pot veure (fig. 3) una clara dependència pel que es refereix als rendiments (sucres totals hidrolitzats). Mentre que en l'experiment al 2% s'arriba a conversió pràcticament total en 10 hores, en aquest temps la hidròlisi amb àcid del 1% es situa en un 50% de la total i l'àcid al 0.5% només aconsegueix el 25% de la conversió en el mateix temps.

Cal remarcar també la diferent evolució al llarg del temps de cada un dels sucres obtinguts. A la figura 4 es pot observar el comportament dels dos productes principals en una de les experiències (2% d'àcid sulfúric). Mentre que l'arabinosa es produeix ràpidament a l'inici de la reacció, i es continua després amb un nivell pràcticament constant, la xilosa amb una velocitat inicial més petita va augmentant progressivament al llarg del temps i és el seu nivell de concentració qui assenyala el fi de l'experiment.

Centrem la nostra atenció en aquests dos productes i ignorem la glucosa, donat els baixos nivells de concentració que s'obtenen. El diferent comportament de la xilosa i arabinosa, quant a velocitats inicials, pot justificar-se per l'estructura ramificada de l'hemicel·lulosa. Si les unitats d'arabinosa són les que constitueixen les ramificacions de les cadenes d'hemicel·lulosa, es pot suposar que la seva hidròlisi serà relativament més senzilla, ja que no es tracta de trencar un polímer, sinó de hidrolitzar ramificacions. El contrari succeirà amb la xilosa, la hidròlisi dels enllaços (1-4) de la cadena ens donarà, en un primer pas, fragments polimèrics de xilans i no serà fins que hagi passat un cert temps (i hi hagin hagut prou trencaments), quan tinguem producció important de xilosa.

Pel que fa a la degradació dels productes de reacció, tot i que en la concentració de xilosa no es detecten disminucions, ni tan sols quan s'ha assolit la concentració final (conversió total), a totes les experiències realitzades a 90°C s'han efectuat assaigs de detecció de furfuraldehid per HPLC.

4.3. Modelització

Disposant de dades experimentals de concentració de cada un dels sucres constituents de l'hemicel·lulosa, per diversos temps de reacció, es

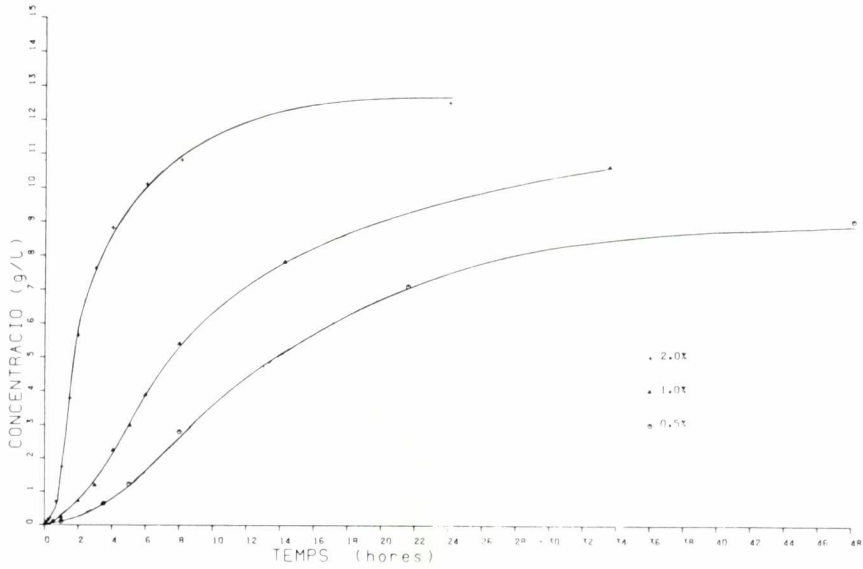


Fig. 3. Concentració de xilosa vs. temps per a diferents concentracions d'àcid sulfúric. ($T = 90^{\circ}\text{C}$).

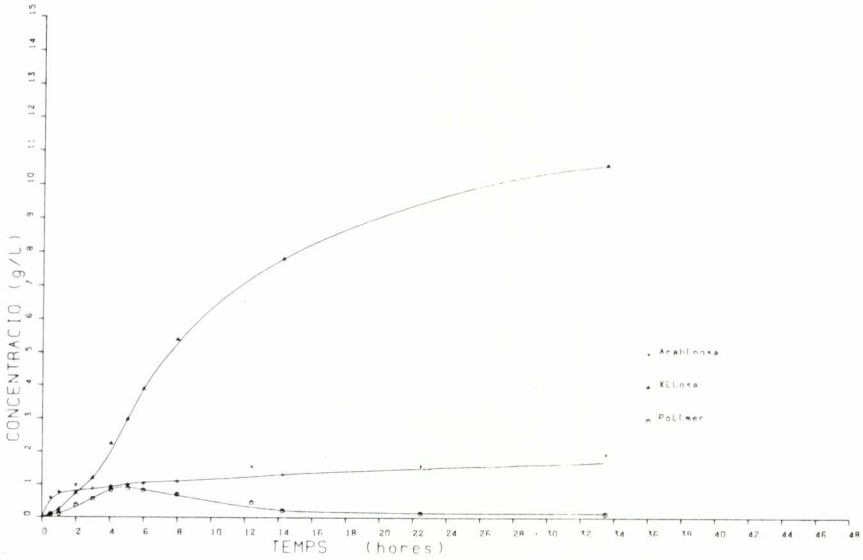


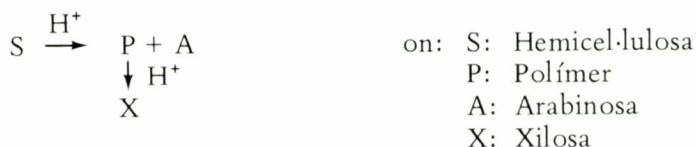
Fig. 4. Resultat experimental de les concentracions en l'experiment a 90°C i amb una concentració d'àcid del 1%.

proposa fer una modelització de la hidròlisi que justifiqui la forma de les corbes obtingudes experimentalment.

Ja que sols es disposa de referències bibliogràfiques on la hidròlisi es representa per una cinètica de primer ordre respecte de la concentració de sucres totals, es va optar per proposar un nou esquema on es tingués en compte, d'alguna forma, la naturalesa heterogènia de les cadenes d'hemicel·lulosa, així com la seva estructura. A partir de la informació sobre les diferents velocitats de producció d'arabinosa i xilosa, hom pot pensar en un mecanisme que suposi la ruptura inicial dels enllaços de la cadena principal amb l'arabinosa, obtenint-se polímers derivats de l'hemicel·lulosa, i monòmers d'arabinosa. Posteriorment, es degradarien aquest polímers, alliberant unitats de xilosa.

Degut al tipus d'anàlisi efectuat, no es disposa d'informació diferenciada, sobre els possibles polímers formats, donat el límit d'exclusió de la columna. Tot i així, però, s'observa en els cromatogrames la presència de pics que corresponen a substàncies de pes molecular superior al dels sucres monomèrics (temps de retenció a la columna, baixos), que van evolucionant en el transcurs de la reacció. La desconeixença de la identitat d'aquestes substàncies fa que no sigui possible el calibratge de les seves respostes cromatogràfiques; però si pot veure's de forma qualitativa la seva evolució al llarg del temps, fent ús del calibratge dels sucres monomèrics. A la figura 4 els punts corresponents a una d'aquestes espècies polimèriques, s'han representat conjuntament amb els altres dos productes de reacció (xilosa i arabinosa).

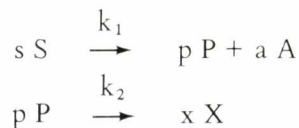
Tot el dit anteriorment sembla adreçar-nos cap a un model amb dues reaccions consecutives, catalitzades per l'àcid, de la forma:



i a on s'ha simplificat l'esquema introduint una sola espècie polimèrica intermitja P, en lloc de les diverses que en realitat han d'haver-hi. A més a més, com ja hem dit, no considerem la glucosa, ja que no es té la seguretat de que l'obtinguda formi part realment de l'hemicel·lulosa o bé provingui d'una hidròlisi en petita escala de la cel·lulosa present en el material.

Es va observar, per altra banda, que les etapes físiques de transferència de matèria externa i de difusió interna, podien menysprear-se en les nostres condicions de treball (velocitat d'agitació emprada i grandària de les partícules sòlides).

Un cop proposat el model es fa la deducció de les equacions que el governen; fixat l'esquema de reacció, es fixa també una estequiometria. Ens queda llavors el següent esquema:



on les lletres minúscules (s,p,a i x) representen els coeficients estequiomètrics. Quant a mecanisme de reacció es suposen dues cinètiques de primer ordre amb constants de velocitat k_1 i k_2 . Es plantegen a continuació, les equacions cinètiques i els balanços de matèria.

$$-\frac{1}{s} \frac{dc'_s}{dt} = k_1 c'_s$$

$$\frac{1}{a} \frac{dc'_A}{dt} = -\frac{1}{s} \frac{dc'_s}{dt}$$

$$\frac{1}{p} \frac{dc'_p}{dt} = k_1 c'_s - k_2 c'_p$$

$$\frac{1}{x} \frac{dc'_x}{dt} = k_2 c'_p$$

on: c'_i : concentració molar de l'espècie "i"

Donada la impossibilitat de conèixer els coeficients estequiomètrics, per desconexença del pes molecular de l'hemicel·lulosa i del polímer P, ens és necessari treballar amb concentracions màssiques (c_i), i per tant convertir les equacions obtingudes mitjançant els pesos moleculars. El sistema d'equacions ens queda de la forma:

$$-\frac{dc_s}{dt} = K_1 c_s$$

$$-\frac{dc_A}{dt} = \alpha \frac{dc_s}{dt}$$

$$\frac{dc_p}{dt} = \beta k_1 c_s - k_2 c_p$$

$$\frac{dc_x}{dt} = \gamma K_2 c_p$$

$$\text{on: } K_1 = s k_1 \quad K_2 = p k_2$$

$$i \quad \alpha = \frac{a M_A}{s M_S} \quad \beta = \frac{p M_P}{s M_S} \quad \gamma = \frac{x M_X}{p M_P}$$

essent M_i el pes molecular de l'espècie "i"

Ens queden dos tipus diferents de constants: K_1 i K_2 que contenen les constants de velocitat, i α , β i γ que estan relacionades amb l'estequiometria de les reaccions. Aquestes últimes poden ésser interpretades com:

α = Contingut en arabinosa hidrolitzable, dins de l'hemicel·lulosa

β = Contingut en polímer hidrolitzable, dins de l'hemicel·lulosa

γ = Contingut en xilosa hidrolitzable, dins del polímer P

si es té en compte que les reaccions són irreversibles, el valor d'aquestes constants pot calcular-se a partir de les anàlisis de la matèria primera, acceptant que l'hemicel·lulosa sols està constituïda per xilosa i arabinosa. Deduïm així, a partir de les anàlisis, que el contingut en arabinosa de l'hemicel·lulosa és d'un 12% i el de xilosa d'un 88%, i suposant que el polímer P sols conté xilosa, ens queda:

$$\alpha = 0.12 \quad \beta = 0.88 \quad \gamma = 1.0$$

i per tant un sistema d'equacions diferencials amb dos paràmetres (K_1 i K_2) que poden determinar-se a partir de les dades experimentals de concentració, mitjançant ajustos numèrics.

4.4. Ajust dels paràmetres

A fi d'obtenir el conjunt de paràmetres que s'ajusti millor a les dades experimentals, s'utilitza un programa d'optimització que segueix un algorisme tipus Simplex Flexible²¹ on es minimitza el valor d'una funció error calculada com el quadrat de la diferència entre el valor de la concentració trobat experimentalment i el calculat, segons el model, per un valor concret dels paràmetres. La integració del sistema d'equacions diferencials es fa per un mètode numèric basat en el mètode de Runge-Kutta, que utilitza un pas d'integració de grandària variable.²² A

la figura 5 es presenta un diagrama de flux del conjunt de programes utilitzat.

El valor dels paràmetres obtingut per als experiments a 90°C es presente a la taula II.

A la figura 6, es pot veure la relació entre els valors experimentals i els calculats segons les constants obtingudes en el model proposat. Els residus (valors de la funció error) són relativament elevats. S'observa que les corbes modelitzades representen aproximadament l'evolució experimental de la concentració de xilosa amb el temps. Dissortada-

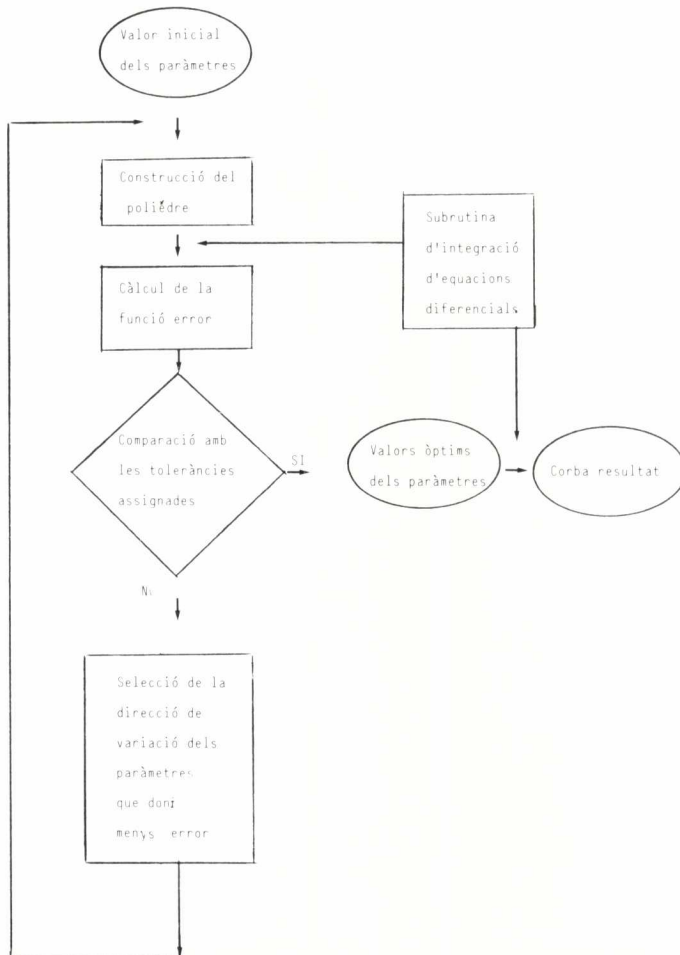


Fig. 5. Diagrama de flux del programa d'optimització.

ment, hi ha una important desviació en el cas de l'arabinosa. Cal tenir en compte que els nivells de concentració d'aquesta són molt baixos i per tant la importància relativa de l'error experimental, és més gran, si es consideren les manipulacions prèvies a l'anàlisi.

Malgrat això, la desviació sistemàtica observada per aquest producte, pot ésser conseqüència de les hipòtesis simplificatives del model, en el qual es postula l'existència d'un sol polímer intermig quan el més possible és que es tracti d'una sèrie de polímers de diferent pes molecular i composició, que fins i tot poden contenir unitats d'arabinosa. De fet, en els cromatogrames es poden observar, en el transcurs de la reacció, variacions del temps de retenció cromatogràfic dels pics identificats com a polímers intermitjos de la reacció. Aquestes variacions podrien

TAULA II

| % H ₂ SO ₄ | K ₁ (min ⁻¹) | K ₂ (min ⁻¹) |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 2.0 | 2.833 10 ⁻² | 6.641 10 ⁻³ |
| 1.0 | 1.059 10 ⁻² | 1.279 10 ⁻³ |
| 0.5 | 6.147 10 ⁻³ | 6.264 10 ⁻⁴ |

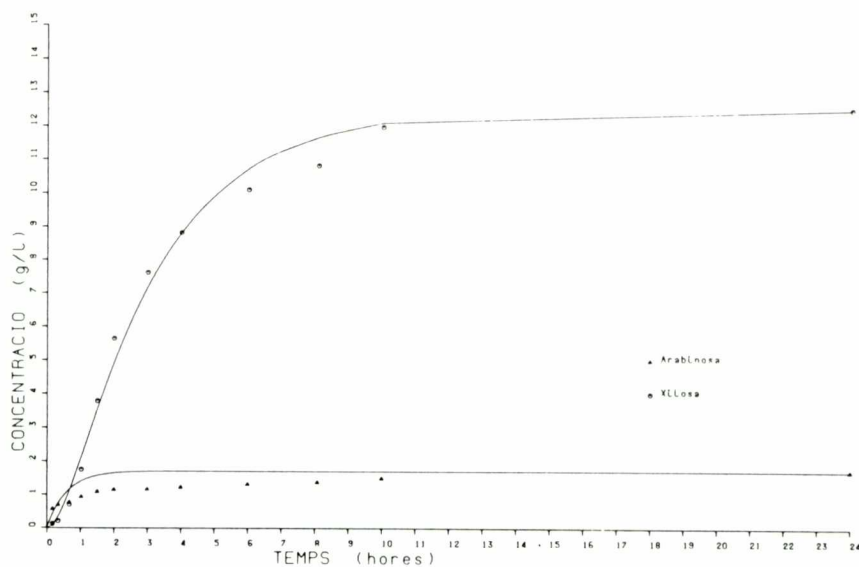


Fig. 6. Ajust dels paràmetres cinètics. Resultats de l'experiment a 90°C i 2% d'àcid. Es presenten els punts experimentals i la corba calculada segons els paràmetres obtinguts.

ésser atribuïdes a les variacions de pesos moleculars i de la seva naturalesa, detectats pel sistema cromatogràfic com a variacions del temps de retenció. La possibilitat de disposar de mètodes d'avaluació quantitativa dels productes intermitjos de degradació, ens podia permetre de postular un model més acurat que actualment no estem en condicions de desenvolupar.

4.5. Influència de la concentració d'àcid

És possible introduir dins les constants cinètiques la influència de la concentració de catalitzador, sobre la velocitat de reacció. En aquest sentit, s'han ajustat els valors dels paràmetres obtinguts, a una equació de tipus potencial, que és la més freqüent a la bibliografia:

$$k_i = k_{i0} c_H^n$$

L'ajust es fa per mínims quadrats lineals, obtenint-se les següents correlacions:

$$K_1 = 9.79 \cdot 10^{-4} c_H^{1.095} \quad K_2 = 3.95 \cdot 10^{-5} c_H^{1.628}$$

$$R_1 = 0.987 \quad R_2 = 0.987$$

4.6. Accessibilitat de la cel·lulosa

Un dels principals objectius del pretractament és augmentar l'accessibilitat de la cel·lulosa present en el material, amb vista a la seva hidròlisi enzimàtica. Per tal de comprovar-ho, es duen a terme assaigs d'activitat enzimàtica amb palla de blat tractada a 90°C comparant-los amb la palla sense tractar (sense extreure l'hemicel·lulosa, només amb l'extracció de solubles).

Els tests d'activitat enzimàtica, es realitzen en unes condicions tals, que la quantitat de sucres que s'obté pugui ésser analitzada per cromatografia líquida.

Des del punt de vista de conèixer l'efecte del pretractament sobre la cel·lulosa, sembla interessant comparar la producció de sucres entre mostres que continguin la mateixa quantitat de cel·lulosa, el que representa diferent quantitat de palla, atès que la pretractada ja no conté hemicel·lulosa. Tot i així, des del punt de vista de la productivitat d'un reactor enzimàtic que utilitzés com a substrat, bé palla tractada, bé palla sense pretractament pot ésser interessant efectuar la comparació entre mostres que continguin la mateixa quantitat de matèria primera.

S'ha realitzat una sèrie d'experiments, les condicions i resultats dels quals es presenten a la taula III on l'augment d'accessibilitat s'expressa, tant respecte a la quantitat de cel·lulosa, com de material lignocel·lulòsic. D'aquests resultats es pot comprovar que l'augment d'accessibilitat és pràcticament el mateix per al material tractat a les diverses concentracions d'àcid, observant-se un augment de l'ordre de 40% (referit a la quantitat inicial de cel·lulosa) o de un 85% (referit a la quantitat inicial de substrat).

Mitjançant la tècnica de la Microscòpia Electrònica de Rastreig, s'ha pogut observar la diferència estructural de les fibres vegetals, quan es comparen dos materials, un d'ells tractat i l'altre sense pretractament. Les fotografies així obtingudes es mostren a la figura 7.

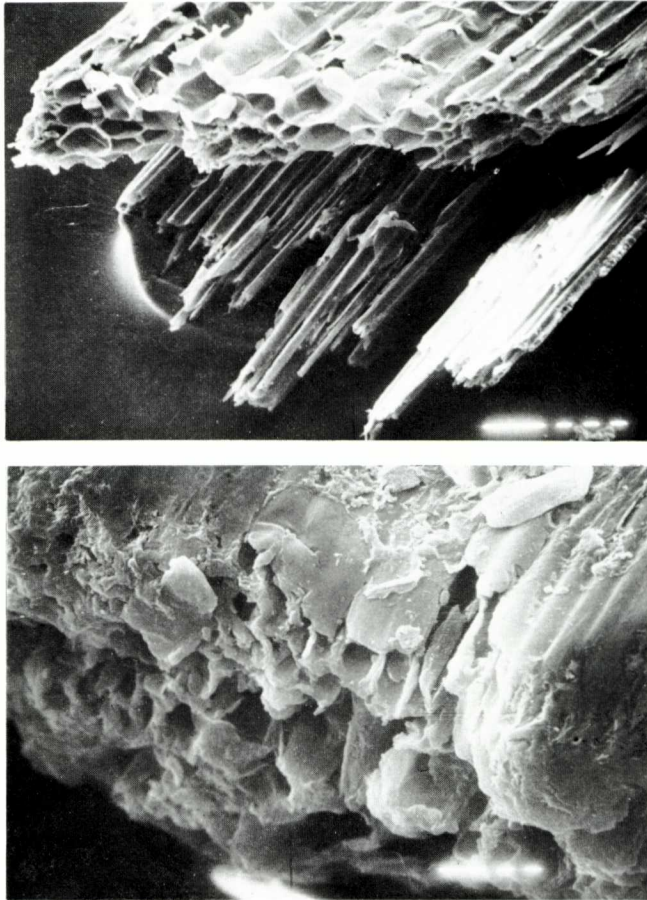


Fig. 7. Observacions al microscopi electrònic. A: Palla de blat sense pretractament, B: Palla de blat tractada amb sulfúric a 90°C.

TAULA III

| Tractament (% H ₂ SO ₄) | Substrat (g) | Accessibilitat ¹ | Accessibilitat ² |
|---|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| — | 0.131 | 1 | 1 |
| 0.5 | 0.100 | 1.384 | 1.819 |
| 1.0 | 0.100 | 1.465 | 1.925 |
| 2.0 | 0.100 | 1.414 | 1.852 |

(1) Accessibilitat referida al contingut en cel·lulosa del material

(2) Accessibilitat referida a la quantitat de substrat inicial

5. CONCLUSIONS

Del treball efectuat s'han tret les següents conclusions:

- 1.— Com a conseqüència de la revisió bibliogràfica, s'ha escollit el tractament amb àcid diluït, per residus lignocel·lulòsics, com un primer pas en l'estudi d'un procés de revalorització d'aquest tipus de material per una via hidrolític-fermentativa.
- 2.— Com a matèria primera s'ha utilitzat palla de blat, i s'ha posat a punt un mètode analític per a conèixer la composició en sucres hidrolitizables.
- 3.— S'ha dut a terme el pretractament a diverses concentracions d'àcid i temperatures, observant-se que, a 90°C, s'obté la hidròlisi de la fracció hemicel·lulòsica, donant xilosa i arabinosa com a productes majoritaris.
- 4.— S'ha efectuat l'estudi cinètic del procés d'hidròlisi tot proposant un model amb dues reaccions consecutives de primer ordre, que representa aproximadament l'evolució de la concentració dels productes en el temps.
- 5.— S'han avaluat els paràmetres cinètics intentant minimitzar les desviacions entre els valors experimentals i els calculats.
- 6.— S'ha trobat una correlació entre els valors dels paràmetres obtinguts i la concentració d'àcid, quan la temperatura es manté a 90°C.
- 7.— S'ha comprovat la major accessibilitat dels materials tractats respecte dels no tractats per mitjà d'assaigs d'activitat enzimàtica de la cel·lulasa sobre la fracció cel·lulòsica, obtenint-se un augment en la producció de sucres del 40%.

BIBLIOGRAFIA

1. THEANDER, O. ; ÅMAN, P. "Dietary Fibers Chemistry and Nutrition" G.E. Inglett i S.I. Falkehag (Ed.) Academic Press (1979).
2. BISARIA, V.S. ; GHOSE, T.K. *Enzim. Microb. Technol.* 3 90-104 (1981).
3. LEE, Y.Y. i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 8 75-88 (1978).
4. CRAWFORD, R.L. "Lignin Biodegradation and Transformation" Wiley-Interscience Ed. (1981).
5. RATHIN DATTA; *Process Biochem.* July 16-20 (1981).
6. FAN, L.T. i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 23 419-424 (1981).
7. TSAO, G.T. *Annual Reports on Fermentation Processes* 2 1-21 (1978).
8. FAN, L.T. i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 11 29-45 (1981).
9. HAN i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 23 2525-2535 (1981).
10. WILKE, C.R. i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 23 163-183 (1981).
11. TANGNU, S.K. *Process Biochem.* June 36-45 (1982).
12. MILLET, M.A. i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 5 193-219 (1975).
13. ACKERSON, M. i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 11 103-112 (1981).
14. HORWATH i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 25 19-32 (1983).
15. CHIANG i Col. *Enzyme Microb. Technol.* 4 169-171 (1982).
16. GONG, CH. i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 23 85-102 (1981).
17. PREEZ, J.C.; VAN DER WALT, J.P. *Biotechnol. Lett.* 5 357-362 (1983).
18. ROSENBERG, S.L. *Enzyme Microb. Technol.* 2 185-193 (1980).
19. CAMINAL, G. *Tesina de Llicenciatura, Universitat Autònoma de Barcelona* (1981).
20. FENGEL, D.; WEGENER, G. a "Hidrolisis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis" *Advances in Chemical Series* n° 181. BROWN, R. D.; JURASEK, L. Ed. Am. Chem. Soc. Washington D.C. (1981).
21. HIMMELBLAU, D.M. "Applied Nonlinear Programing" McGraw-Hill Ed. (1972).
22. FORSYTHE, G.E.; MALCOM, M.A.; MOLER, C.B. "Computer Methods for Mathematical Computations" Prentice-Hall Ed. New Jersey (1977).
23. KOUKLOS, E.G.; VALKANAS, G.N. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 21 309-314 (1982).
24. UENG, P.P.; GONG, CH. *Enzyme Microb. Technol.* 4 169-171 (1982).
25. MILLET, M.A. i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 6 125-153 (1976).
26. KNAPPERT i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 22 1449-1463 (1980).
27. TSAO, G.T. i Col. *Process Biochem.* Oct. 34-38 (1982).
28. DETROY i Col. *Biotechnol. and Bioeng.* 23 1527-1535 (1981).
29. NEE, C.Y.; YEE, W.F.; *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 26 283-287 (1976).
30. KNAPPERT i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 11 66-77 (1981).
31. DETROY i Col. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 10 135-148 (1980).