

Katarzyna DĄBKOWSKA, Maciej PILAREK

e-mail: k.dabkowska@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

## Hydroliza enzymatyczna surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej (*Salix viminalis* L.)

### Wstęp

Obserwowany w ostatnim czasie szybki rozwój światowej gospodarki implikuje potrzebę wykorzystywania odnawialnych źródeł energii. Gama naturalnych, odnawialnych surowców możliwych do zagospodarowania w tym kierunku jest szeroka i obejmuje przede wszystkim biomasę lignocelulozową, do której zalicza się odpady rolnicze i leśne oraz uprawy celowe [Cheng i Timilsina, 2011].

Hydroliza surowców lignocelulozowych jest jednym z etapów wytwarzania biopaliw II generacji. W jej wyniku, z zawartych w surowcu długołańcuchowych polimerów celulozy i hemiceluloz otrzymuje się cukry proste, które na drodze fermentacji mogą zostać przekształcone do bioetanolu, biogazu lub wodoru [Szewczyk, 2010]. Proces hydrolizy biomasy może być prowadzony z użyciem stężonych kwasów, bądź metodą enzymatyczną zapewniającą łagodniejsze warunki [Sun i Cheng, 2002]. Ponadto okazuje się, że przed procesem hydrolizy niezbędna jest obróbka wstępna surowca, która zwiększa dostępność substratu dla enzymów [Traherzadeh, 2008].

Celem prezentowanej pracy było wyznaczenie optymalnych warunków hydrolizy surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej *Salix viminalis* L. (poddanego obróbce wstępnej metodą eksplozji pary) prowadzonej z użyciem preparatów enzymatycznych *Cellic*<sup>®</sup> *CTec2* oraz *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2*.

### Materiały i metodyka

#### Preparaty enzymatyczne

W badaniach stosowano dwa preparaty enzymatyczne firmy *Novozymes* (Dania): *Cellic*<sup>®</sup> *CTec2* i *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2*. Są to wysokowydajne, stosowane przemysłowo, preparaty do hydrolizy surowców lignocelulozowych. *Cellic*<sup>®</sup> *CTec2* jest kompleksowym preparatem wykazującym wysoką aktywność celulolityczną oraz hemicelulolityczną, natomiast preparat *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2* zawiera dodatkową porcję hemicelulaz. Zgodnie z informacjami producenta, zależnie od rodzaju użytego surowca, metody obróbki wstępnej oraz warunków prowadzenia hydrolizy dodatek nawet niewielkiej ilości *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2* może zwiększyć wydajność hydrolizy surowca lignocelulozowego.

#### Surowiec lignocelulozowy

Zrębki wierzby energetycznej *S. viminalis* L. były surowcem lignocelulozowym wykorzystywanym w badaniach. Stosowano rozdrobnioną biomasę poddaną obróbce wstępnej metodą eksplozji pary, przeprowadzonej w Zakładzie Energii Odnawialnych Instytutu Maszyn Przepływowych w Gdańsku. Procentowa zawartość celulozy, hemiceluloz oraz ligniny w surowcu poddanemu obróbce wynosiła odpowiednio: 39,03%, 0,73% oraz 45,83%.

#### Hydroliza enzymatyczna

Do kolb *Erlenmayera* o pojemności 0,3 dm<sup>3</sup> dodawano 5 g suchej masy surowca lignocelulozowego, 0,1 dm<sup>3</sup> 0,05 mol·dm<sup>-3</sup> buforu cytrynianowego o odczynie *pH* z zakresu 5,0÷6,0; 0,02 g azydki sodu oraz odpowiednie ilości preparatów enzymatycznych w stosunku do użytej suchej masy surowca (w zależności od doświadczenia stosowano 5,4÷6,0% w/w *Cellic*<sup>®</sup> *CTec2* oraz 0÷0,6% w/w *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2*). Sumaryczna ilość preparatów enzymatycznych użytych do badań była wartością stałą, wynoszącą 6% w/w w stosunku do suchej masy surowca. Kolby reakcyjne inkubowano w termostатовanej wstrząsarce (150 obr·min<sup>-1</sup>) w założonej temperaturze z zakresu 40÷50°C przez 72 h. W różnych odstępach czasu pobierano próbki mieszanin reakcyjnych

i natychmiast schładzano je w wodzie z lodem. Schłodzone próbki wirowano następnie (4500× g, 5 min.), po czym przesączano je przez filtr o średnicy porów 0,2·10<sup>-6</sup> m.

#### Plan eksperymentów

Doświadczenia prowadzono według planu *Boxa-Behnkena* (Tab. 1) co pozwoliło wyznaczyć 10 współczynników w równaniu kwadratowym służącym do estymacji powierzchni odpowiedzi:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

gdzie:

$y$  – zmienna zależna (stopień hydrolizy po 72 h reakcji),  
 $b_0$ – $b_{33}$  – współczynniki,  
 $x_1$ – $x_3$  – zmienne niezależne (temperatura, *pH*, procentowy udział *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2*).

Do opracowania wyników doświadczeń, polegającym na wyznaczeniu wartości współczynników i oceny ich istotności, wykorzystano pakiet *STATISTICA* (*StatSoft*, Polska).

W tab. 1 przedstawiono realizowany w pracy plan eksperymentów. Dla trzech zmiennych niezależnych plan *Boxa-Behnkena* wymaga przeprowadzenia 15 doświadczeń. Dodatkowo w tab. 1 umieszczono także dane dotyczące ilości dodawanych w poszczególnych eksperymentach preparatów enzymatycznych oraz odnotowane stopnie hydrolizy ( $\alpha_g$ ) po 72 h reakcji.

Tab. 1. Plan przeprowadzonych eksperymentów oraz ilość preparatów enzymatycznych użytych w poszczególnych eksperymentach w przeliczeniu na suchą masę badanego surowca lignocelulozowego

Plan <i>Boxa-Behnkena</i>						
nr eksp.	$x_1 = T$ [°C]	$x_2 = pH$	$x_3 =$ udział <sup>a</sup> <i>Cellic</i> <sup>®</sup> <i>HTec2</i> [%]	<i>Cellic</i> <sup>®</sup> <i>HTec2</i> <sup>b</sup> [% w/w]	<i>Cellic</i> <sup>®</sup> <i>CTec2</i> <sup>b</sup> [% w/w]	$y = \alpha_g$ po 72 h
1	40	5,0	5	0,3	5,7	0,41
2	50	5,0	5	0,3	5,7	0,32
3	40	6,0	5	0,3	5,7	0,42
4	50	6,0	5	0,3	5,7	0,35
5	40	5,5	0	0	6,0	0,45
6	50	5,5	0	0	6,0	0,40
7	40	5,5	10	0,6	5,4	0,45
8	50	5,5	10	0,6	5,4	0,38
9	45	5,0	0	0	6,0	0,47
10	45	6,0	0	0	6,0	0,47
11	45	5,0	10	0,6	5,4	0,45
12	45	6,0	10	0,6	5,4	0,46
13	45	5,5	5	0,3	5,7	0,51
14	45	5,5	5	0,3	5,7	0,50
15	45	5,5	5	0,3	5,7	0,51

<sup>a</sup> procentowa zawartość preparatu *Cellic*<sup>®</sup> *HTec2* w całkowitej ilości zastosowanych preparatów, <sup>b</sup> ilość preparatu w stosunku do suchej masy surowca lignocelulozowego

Stopnie hydrolizy wyznaczono z zależności:

$$\alpha_g = C_g/C_{c,0} \quad (2)$$

gdzie:

$C_g$  – stężenie glukozy uwolnionej w wyniku hydrolizy [g·dm<sup>-3</sup>],  
 $C_{c,0}$  – początkowe stężenie celulozy w surowcu [g·dm<sup>-3</sup>].

### Metody analityczne

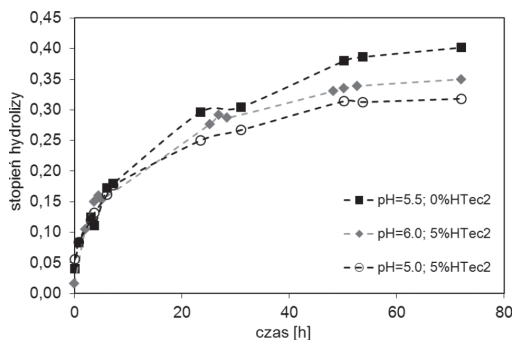
Przebieg reakcji monitorowano na podstawie oznaczeń stężenia uwolnionych cukrów w próbkach mieszanin reakcyjnych, rozcieńczonych 11-krotnie wodą. Oznaczenia przeprowadzono wykorzystując technikę HPLC, przy użyciu chromatografu *Varian 625 CL System* (USA) wyposażonego w kolumnę *ANIMEX HPX-87H* (*Bio-Rad Laboratories Inc*, USA) w następujących warunkach:

- eluent: 0,04 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przepływ 0,4 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>;
- detektor refraktometryczny  $T_{wew} = 45^{\circ}\text{C}$ .

### Wyniki i dyskusja

Przeprowadzona analiza prób mieszanin reakcyjnych jednoznacznie wskazuje, że produktami badanej reakcji hydrolizy surowca lignocelulozowego są glukoza i ksyloza. Okazało się, że stężenie celobiozy w mieszaninach reakcyjnych jest bliskie zeru ( $0,01 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i nie zmienia się w czasie. Jest to korzystne z uwagi na fakt, że celobioza jest inhibitorem enzymów celulolitycznych. Po 72 h hydrolizy, w mieszaninach reakcyjnych stężenie glukozy wynosiło od 6,24 do 9,95 g·dm<sup>-3</sup>, w zależności od warunków prowadzenia reakcji. Z uwagi na niewielką zawartość hemicelulozy w surowcu, stężenie ksylozy było znacznie niższe i nie przekraczało 0,30 g·dm<sup>-3</sup>.

Na rys. 1 przedstawiono przykładowe zmiany stopnia hydrolizy celulozy do glukozy w czasie dla reakcji prowadzonych w 50°C.



Rys. 1. Przykładowe zależności zmiany stopnia hydrolizy w czasie ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ) dla różnych wariantów odczynu  $\text{pH}$  mieszaniny reakcyjnej oraz stężenia *Celliec*<sup>®</sup> *HTec2*

Jak można zauważyć, po około 50 h obserwowano wyraźne spowolnienie reakcji. Podobne zjawisko odnotowano dla wszystkich badanych układów reakcyjnych. W celu stwierdzenia, czy jest ono wynikiem dezaktywacji preparatu enzymatycznego czy też adsorpcji enzymów na ligninie obecnej w surowcu, po 72 h prowadzenia reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano kolejną porcję preparatu *Celliec*<sup>®</sup> *CTec2* a po następnych 10 h pobrano z niej próbkę do analiz. Okazało się, że dodatek porcji świeżego enzymu nie spowodował wzrostu stężenia glukozy. Zatem można stwierdzić, że obserwowane zatrzymanie reakcji związane jest z brakiem w surowcu wiązań hydrolizowanych przez enzym.

Na podstawie wartości stopni hydrolizy uzyskanych w wyniku prowadzenia poszczególnych reakcji (Tab. 1), przy użyciu pakietu *STATISTICA* wyznaczono współczynniki regresji równania kwadratowego (1). Po uwzględnieniu wyznaczonych współczynników oraz po wyeliminowaniu czynników, dla których współczynniki regresji przyjmują wartości bliskie zeru, równ. (1) przyjęło postać:

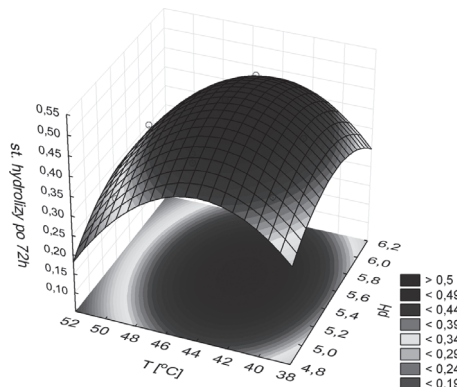
$$y = -11,0 + 0,29x_1 - 0,035x_1^2 + 1,83x_2 - 0,17x_2^2 \quad (3)$$

Współczynnik dopasowania ( $R^2$ ) modelu do danych doświadczalnych był wysoki i wynosił 0,991.

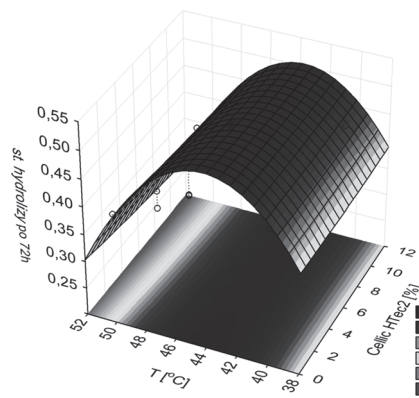
Z równ. (3) wynika, że temperatura oraz odczyn  $\text{pH}$  środowiska reakcji mają największy wpływ na stopień hydrolizy wyznaczony po 72 h reakcji. Odpowiednie dla tych parametrów fizycznych liniowe współczynniki regresji są największe, przy czym wzrost zarówno temperatury jak i odczynu  $\text{pH}$  w zbadanym zakresie dodatnio wpływał na stężenie glukozy w mieszaninie reakcyjnej. Niskie wartości pozostałych współczynników wskazują, że efekty odpowiadających im zmiennych niezależnych i ich wzajemnych korelacji są niewielkie. Ponadto wartości wyznaczonych współczynników regresji są istotne statystycznie – pa-

rametr  $p$  dla nich przyjmuje wartości mniejsze od założonej wartości 0,02.

Na rys. 2 i 3 przedstawiono wyznaczone na podstawie równ. regresji (3) powierzchnie odpowiedzi dla badanych zmiennych niezależnych. Przedstawiają one wartości stopnia hydrolizy w funkcji dwóch parametrów. Wykresy te potwierdzają wyraźny wpływ temperatury i wartości  $\text{pH}$  oraz jednoczesny brak wpływu ilości dodanego preparatu *Celliec*<sup>®</sup> *HTec2* na szybkość reakcji.



Rys. 2. Powierzchnia odpowiedzi w funkcji odczynu  $\text{pH}$  i temperatury dla 5% w/w stężenia preparatu *Celliec*<sup>®</sup> *HTec2* w układzie reakcyjnym



Rys. 3. Powierzchnia odpowiedzi w funkcji udziału preparatu *Celliec*<sup>®</sup> *HTec2* i temperatury przy odczynie  $\text{pH}$  5,5

Na podstawie przeprowadzonej statystycznej analizy danych doświadczalnych wyznaczone zostały optymalne wartości temperatury oraz odczynu  $\text{pH}$ , dla których wartość średniej zależnej jest największa:  $T = 43,8^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}$  5,55. Zgodnie z opracowanym równaniem regresji stopień hydrolizy po 72 h w tych warunkach wynosi 0,52.

### Wnioski

Otrzymane wyniki wskazują, że głównym produktem reakcji hydrolizy surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej *S. viminalis* L. z użyciem preparatów *Celliec*<sup>®</sup> *CTec2* i *Celliec*<sup>®</sup> *HTec2* jest glukoza.

Nie zaobserwowano powstawania celobiozy, co jest korzystne z uwagi na fakt, że jest ona inhibitorem enzymów celulolitycznych.

Wykazano niewielki wpływ preparatu *Celliec*<sup>®</sup> *HTec2* na efektywność hydrolizy. Wyznaczono optymalne wartości temperatury ( $43,8^{\circ}\text{C}$ ) oraz odczynu  $\text{pH}$  (5,55) układu reakcyjnego, w których to warunkach, stopień hydrolizy po 72 h wyniósł 0,52.

### LITERATURA

- Cheng J.J., Timilsina G.R., 2011. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. *Renew. Energ.*, **36**, 3541–3549. DOI:10.1016/j.renene.2011.04.031
- Sun Y., Cheng J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Tech.*, **83**, 1–11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7
- Szewczyk K.W., 2010. Perspektywy rozwoju biotechnologii przemysłowej w Unii Europejskiej. *Wiad. Chem.*, **64**, 45–59
- Traherzadeh M.J., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 1621–1651. DOI: 10.1186/1754-6834-6-11