

Katarzyna DĄBKOWSKA, Izabela CHMIELEWSKA, Maciej PILAREK, Krzysztof W. SZEWCZYK

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

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

Wpływ metody wstępnej obróbki surowca lignocelulozowego na efektywność hydrolizy enzymatycznej

Wstęp

Hydroliza surowców lignocelulozowych stanowi kluczowy etap przetwarzania surowców roślinnych w biorafineriach. Podczas procesu hydrolizy następuje przekształcenie długich polimerów celulozy i hemicelulozy zawartych w surowcu lignocelulozowym do pojedynczych cząsteczek fermentowalnych cukrów prostych (głównie glukozy i ksylozy). Powstałe monocukry mogą być wykorzystywane do wytwarzania biopaliw (etanol, butanol, biogaz, wodór) jak i różnych półproduktów dla przemysłu chemicznego [Szewczyk, 2010]. Proces hydrolizy surowców lignocelulozowych może być prowadzony na drodze hydrolizy kwaśnej lub z użyciem enzymów jako katalizatorów. Przewaga hydrolizy enzymatycznej nad innymi metodami hydrolizy polega na mniejszym zużyciu mediów (wody, energii), niższych kosztach zagospodarowania odpadów oraz braku kłopotów z korozją aparatury [Sun i Cheng, 2002]. Poza tym, w wyniku hydrolizy kwaśnej mogą powstawać duże ilości toksycznych produktów ubocznych, które hamują wzrost i fermentację drobnoustrojów.

Enzymatyczny rozkład celulozy do cukrów prostych wymaga synergicznego działania trzech rodzajów celulaz [Rabinovich i inni, 2002]:

- endoglukanaz (EC 3.2.1.4), które w przypadkowym miejscu atakują wiązania β -1,4-glikozydowe w łańcuchu celulozowym;
- celobiohydrolaz (EC 3.2.1.91), które atakują co drugie wiązanie β -1,4-glikozydowe poczynając od redukującego końca łańcucha uwalniając celbiozę;
- β -glukozydazy (EC 3.2.1.21) które hydrolizują celbiozę do glukozy.

Dane literaturowe wskazują na istnienie wielu czynników limitujących szybkość enzymatycznej hydrolizy odpadów lignocelulozowych [Zhang i inni, 2010; Bansal i inni, 2009]. Zwiększenie efektywności ekonomicznej enzymatycznej hydrolizy jest możliwe dzięki zwiększeniu aktywności stosowanych preparatów enzymatycznych oraz dostępności substratu dla działania enzymów. Istotną rolę odgrywa tu obróbka wstępna surowca lignocelulozowego.

Wstępne przygotowanie biomasy lignocelulozowej ma na celu uszkodzenie zwartej struktury lignocelulozy, aby ułatwić przebieg hydrolizy polisacharydów. Na etapie obróbki wstępnej dąży się do rozbicia kompleksu lignocelulozowego, zmniejszenia stopnia krystalizacji i polimeryzacji, zwiększenia powierzchni kontaktu surowca z enzymami oraz usunięcia lignin. Wybór metody oraz efektywność obróbki wstępnej zależy od rodzaju surowca poddawanego procesowi [Taherzadeh i Karimi, 2008; Mcmillan, 1994].

Celem prezentowanej pracy było określenie wpływu metody obróbki wstępnej surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej na jego podatność na hydrolizę katalizowaną enzymatycznie.

Materiały i metodyka

Preparaty enzymatyczne

Do badań wybrano dwa preparaty enzymatyczne firmy Novozymes: *Cellic[®] CTec2* i *Cellic[®] HTec2*. Pierwszy z nich jest kompleksowym preparatem wykazującym wysoką aktywność celulolityczną, drugi zaś wykazuje wysoką aktywność hemicelulolityczną. Są to najnowsze wysokowydajne preparaty do hydrolizy surowców lignocelulozowych. Zgodnie z informacjami podanymi przez producenta enzymów, optymalne warunki hydrolizy dla preparatu *Cellic[®] CTec2* to temperatura 45–50°C i $pH = 5-5,5$, zaś dla preparatu *Cellic[®] HTec2* temperatura 65–70°C i $pH = 4,5-5,5$.

Surowiec

Wykorzystywanym do badań surowcem lignocelulozowym były zrębki wierzby energetycznej *Salix viminalis*. Stosowano rozdrobniony surowiec poddany obróbce wstępnej metodą eksplozji pary (z ang. *steam explosion*) w Instytucie Maszyn Przepływowych w Zakładzie Energii Odnawialnych w Gdańsku oraz surowiec lignocelulozowy poddany wstępnej obróbce radiacyjnej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Ponadto, przed hydrolizą rozdrobniony, natywny surowiec poddawano wstępnej obróbce chemicznej: alkalicznej oraz z użyciem kwasu fosforowego i etanolu. W tab. 1 zamieszczono procentową zawartość celulozy, hemiceluloz oraz lignin w natywnym surowcu oraz w surowcu poddanym obróbce wstępnej metodą eksplozji pary. Skład surowców po chemicznej obróbce wstępnej nie był oznaczany.

Tab. 1. Procentowy skład natywnego surowca lignocelulozowego oraz surowca poddanego obróbce wstępnej metodą eksplozji pary.

Surowiec	Celuloza	Hemicelulozy	Ligniny
bez obróbki	51,20 %	7,30 %	19,70 %
obróbka metodą eksplozji pary	39,03 %	0,73 %	45,83 %

Warunki hydrolizy enzymatycznej

Do kolb *Erlenmeyera* o pojemności 300 cm³ dodawano 5 g s.m. surowca lignocelulozowego, 100 cm³ 0,05M buforu cytrynianowego o pH 5,2, 0,02 g azydki sodu oraz odpowiednie ilości preparatów enzymatycznych w stosunku do suchej masy surowca (w zależności od doświadczenia stosowano 5,4÷6% w/w *Cellic[®] CTec2* oraz 0÷0,6% w/w *Cellic[®] HTec2*). Całkowita ilość preparatów enzymatycznych użytych do badań wynosiła zawsze 6% w/w w stosunku do suchej masy surowca. Kolby reakcyjne umieszczano w termostатовanej wytrząsarce w 50°C. Wszystkie doświadczenia prowadzono przy 150 obr/min. Czas prowadzenia reakcji zależał od doświadczenia i wynosił ok. 72 godziny. Z mieszanin reakcyjnych w różnych odstępach czasu pobierano próbki i natychmiast schładzano je w wodzie z lodem. Schłodzone próbki wlewano następnie przez 5 min przy 4500 obr/min po czym sączono je przez filtr 0,2 μ m. Tak przygotowane próbki rozcieńczano 11-krotnie wodą i poddawano analizie z użyciem HPLC.

Chemiczna obróbka wstępna surowca

Obróbka kwasem fosforowym i etanolem

Do kolb o pojemności 300 cm³ dodawano 10g s.m. surowca lignocelulozowego oraz 80 cm³ 85% kwasu fosforowego. Otrzymane mieszaniny umieszczano w termostатовanej wytrząsarce w 60°C na 45 min. Po tym czasie do kolb dodawano 100 cm³ 96% etanolu a następnie ich zawartość odwirowywano przy 3500 obr/min przez 15 min. Do otrzymanego osadu dodawano 100 cm³ 96% etanolu i po dokładnym wymieszaniu zawartość kolb odwirowywano ponownie. Otrzymany osad przepłukiwano następnie dwukrotnie 200 cm³ wody dejonizowanej po czym z użyciem 0,1 M NaOH doprowadzono jego odczyn do $pH \approx 5$.

Obróbka NaOH

Do kolb o pojemności 300 cm³ dodawano 10 g s.m. surowca lignocelulozowego, 2 g NaOH oraz 100 cm³ wody dejonizowanej. Otrzymane mieszaniny umieszczano w wytrząsarce w temperaturze pokojowej na 12 godzin. Po tym czasie zawartość kolb odwirowywano przy 3500 obr/min. przez 15 min, następnie otrzymany osad dwukrotnie płukano wodą

dejonizowaną, a na koniec doprowadzono jego odczyn do $pH \approx 5$ z użyciem 0.1M NaOH.

Obróbka $Ca(OH)_2$

Do kolb o pojemności 300 cm³ dodawano po 10 g s.m. surowca lignocelulozowego, 4 g $Ca(OH)_2$ oraz 100 cm³ wody dejonizowanej. Otrzymane mieszaniny umieszczano w termostatowanej wytrząsarce w 80°C na 6 godzin. Po tym czasie zawartość kolb odwirowywano przy 3500 obr./min. przez 15 min, następnie otrzymany osad dwukrotnie płukano wodą dejonizowaną po czym z użyciem 0,1 M HCl doprowadzono jego odczyn do $pH \approx 5$.

Wydajność procesów chemicznej obróbki wstępnej, zdefiniowana jako wyrażony w procentach stosunek otrzymanej suchej masy surowca po obróbce do suchej masy surowca użytego do obróbki, była we wszystkich przypadkach bliska 50%.

Metody analityczne

Przebieg reakcji monitorowano na podstawie oznaczeń stężeń cukrów uwolnionych w wyniku hydrolizy w mieszaninie reakcyjnej. Oznaczenia prowadzono z użyciem chromatografu cieczonego HPLC z kolumną AMINEX HPX-87H w następujących warunkach:

- eluent: 0,04 M H_2SO_4 , przepływ 0,4 ml/min;
- detektor refraktometryczny $t_{wew} = 45^\circ C$.

Stężenie suchej masy substratu oznaczano metodą wagową.

Wyniki i dyskusja

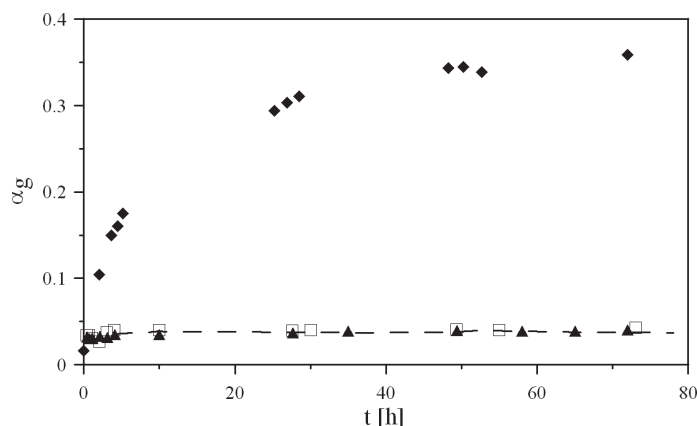
W trakcie prowadzonych badań przebiegi poszczególnych reakcji monitorowano na podstawie oznaczeń zawartości w mieszaninie reakcyjnej produktów hydrolizy takich jak: glukoza, celobioza i ksyloza. Otrzymane wyniki wskazują, że dla wszystkich przeprowadzonych reakcji stężenie celobiozy jest bliskie zeru i nie zmienia się w czasie (jest to korzystne, ponieważ celobioza jest inhibitorem enzymów celolitycznych) natomiast produktami reakcji są glukoza i w niektórych przypadkach ksyloza. Ksyloza powstaje w wyniku hydrolizy hemiceluloz zawartych w surowcu lignocelulozowym. Zgodnie z danymi przedstawionymi w tab. 1 zawartość hemiceluloz w natywnym surowcu wynosi 7,30%, zaś w surowcu poddanym wstępnej obróbce metodą eksplozji pary stanowi tylko 0,73% masy surowca. Stężenie ksylozy w mieszaninie reakcyjnej zależy od metody obróbki wstępnej surowca lignocelulozowego. W reakcjach prowadzonych z użyciem surowca nie poddanego obróbce wstępnej oraz surowca po obróbce wstępnej metodą radiacyjną, stężenie ksylozy uwalnianie w wyniku hydrolizy jest bliskie zeru. Wynika to z faktu, że zawartość hemiceluloz w stosowanych do badań zrębkach wierzby energetycznej jest niewielka (Tab. 1). Podobne wyniki otrzymano dla hydrolizy surowca poddanego obróbce metodą chemiczną z użyciem kwasu fosforowego i etanolu. Z kolei dla surowca po obróbce wstępnej metodą eksplozji pary stężenie ksylozy rośnie w czasie, jednak jest ono niewielkie – po 72 godzinach prowadzenia reakcji nie przekracza 0,4 mg/ml. Znacznie większe stężenia ksylozy w mieszaninie reakcyjnej zaobserwowano w przypadku hydrolizy surowca po chemicznej obróbce wstępnej z użyciem NaOH oraz $Ca(OH)_2$. Biorąc powyższe pod uwagę, w dalszej części opisu wyników prowadzonych badań przedstawiono zmiany stężenia ksylozy w czasie wyłącznie dla hydrolizy surowca po alkalicznej obróbce wstępnej.

Na rys. 1 przedstawiono zmiany stopnia hydrolizy celulozy do glukozy w czasie dla reakcji prowadzonych z użyciem surowca nie poddanego obróbce wstępnej oraz poddanego fizycznej obróbce wstępnej: metodą eksplozji pary oraz metodą radiacyjną z różnymi dawkami promieniowania (25 i 50 kGy). Stopnie hydrolizy (α_g) wyznaczono z zależności opisanej w równaniu 1 na podstawie oznaczonych stężeń glukozy w mieszaninie reakcyjnej oraz z wykorzystaniem początkowej zawartości procentowej celulozy w surowcu (Tab. 1).

$$\alpha_g = \frac{C_g}{C_{C,0}} \quad (1)$$

gdzie:

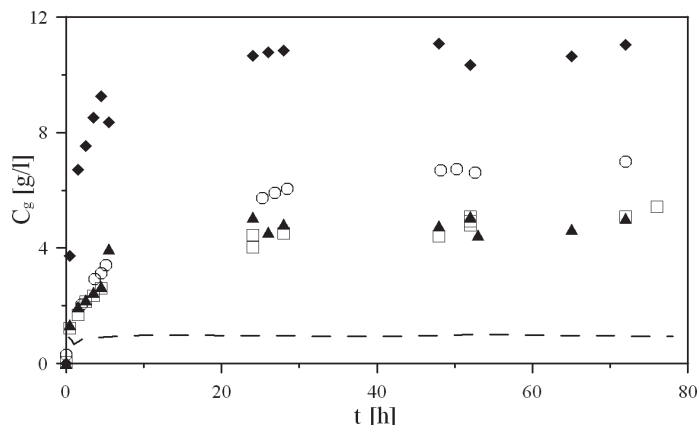
- C_g – stężenie glukozy uwolnionej w wyniku hydrolizy [g/l],
- $C_{C,0}$ – początkowe stężenie celulozy w surowcu [g/l].



Rys. 1. Wpływ metody fizycznej obróbki wstępnej na zmianę stopnia hydrolizy w czasie. Surowiec natywny (—●—), surowiec poddany obróbce wstępnej metodą eksplozji pary (●) oraz metodą radiacyjną z dawką promieniowania 25 kGy (□) i 50 kGy (▲)

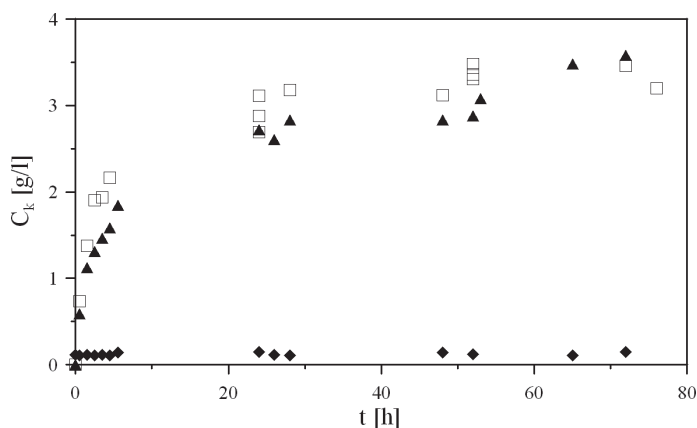
Jak widać, najwyższe stopnie hydrolizy otrzymano wówczas gdy zastosowano surowiec poddany wstępnej obróbce metodą eksplozji pary. Po 72 h prowadzenia reakcji hydrolizy $\alpha_g = 0,36$. Dla pozostałych reakcji wartości α_g układają się na tych samych krzywych niezależnie od użytego surowca i są znacznie niższe – po 72 h wynoszą 0,037–0,042. Otrzymane wyniki wskazują zatem, że obróbka radiacyjna nie zwiększa podatności surowca na hydrolizę enzymatyczną.

Na rys. 2 przedstawiono zmianę stężenia glukozy w funkcji czasu dla reakcji prowadzonych z użyciem surowca poddanego wstępnej obróbce chemicznej kwasem fosforowym i etanolem, NaOH oraz $Ca(OH)_2$. Dla porównania na wykres naniesiono także dane doświadczalne otrzymane dla surowca natywnego oraz dla surowca po wstępnej obróbce metodą eksplozji pary. Jak widać, hydroliza surowca poddanego chemicznej obróbce wstępnej prowadzi do znacznie wyższych stężeń glukozy niż w przypadku zastosowania surowca natywnego. Zdecydowanie najlepsze wyniki otrzymano dla surowca po obróbce kwaśnej z etanolem. Z otrzymanych danych doświadczalnych wynika także, że obie zastosowane metody obróbki alkalicznej prowadzą do podobnych szybkości hydrolizy. Porównując te wyniki z przedstawionymi także na wykresie przebiegiem reakcji hydrolizy surowca poddanego obróbce metodą eksplozji pary można zauważyć, że reakcja z tym surowcem biegnie wolniej niż w surowcem po obróbce kwasem fosforowym i etanolem. Może to wynikać jednak nie z podatności surowca na hydrolizę enzymatyczną, ale z zawartości celulozy w surowcu. Procentowa zawartość celulozy znana jest tylko dla surowca po obróbce wstępnej metodą eksplozji pary, nie była natomiast wyznaczana dla surowca po chemicznej obróbce wstępnej.



Rys. 2. Wpływ metody obróbki wstępnej surowca na zmianę stężenia glukozy w czasie. Surowiec natywny (—●—), surowiec poddany obróbce wstępnej z użyciem kwasu fosforowego i etanolu (●) z użyciem NaOH (□) z użyciem $Ca(OH)_2$ (▲) oraz surowiec poddany fizycznej obróbce wstępnej metodą eksplozji pary (○)

Na kolejnym wykresie (Rys. 3) przedstawiono zależność stężenia ksylozy od czasu trwania reakcji hydrolizy dla chemicznej obróbki

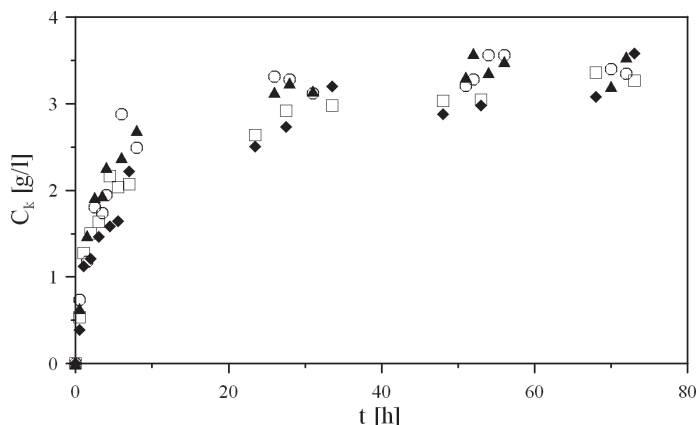


Rys. 3. Wpływ chemicznej metody obróbki wstępnej surowca na zmianę stężenia ksylozy w czasie. Surowiec poddany obróbce wstępnej z użyciem kwasu fosforowego i etanolu (♦), z użyciem NaOH (□) oraz z użyciem Ca(OH)₂ (▲)

wstępnej surowca. Jak można zauważyć ksyloza jest produktem hydrolizy surowca lignocelulozowego tylko wówczas, gdy został on poddany alkalicznej obróbce wstępnej. W wyniku obróbki kwasem i etanolem większość hemiceluloz mogła zostać rozpuszczona w alkoholu zatem jej zawartość w surowcu po obróbce mogła być znacznie mniejsza niż w surowcu natywnym. Ponadto na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że stężenie ksylozy uwolnionej podczas hydrolizy surowca poddanego obróbce z użyciem NaOH i Ca(OH)₂ jest niewiele mniejsze od stężenia glukozy powstałej w tych reakcjach (Rys. 2). Może to świadczyć o tym, że surowiec po alkalicznej obróbce zawiera znacznie więcej ksylozy w stosunku do glukozy niż surowiec po obróbce metodą eksplozji pary.

Przedstawione wyniki dotyczą reakcji prowadzonych z użyciem preparatu *Cellic*[®] *CTec2* jako biokatalizatora. Zgodnie z informacjami podanymi przez producenta stosowanych do badań preparatów enzymatycznych zależnie od użytego surowca, metody jego obróbki wstępnej oraz warunków prowadzenia hydrolizy wydajność reakcji można zwiększyć stosując obok preparatu *Cellic*[®] *CTec2* niewielki dodatek preparatu *Cellic*[®] *HTec2*, który zawiera dodatkową porcję enzymów katalizujących hydrolizę ksylianów obecnych w surowcu. Z tego względu doświadczenia w wyniku których powstaje ksyloza jako produkt reakcji powtórzone z użyciem obu preparatów enzymatycznych *Cellic*[®], przy czym sugerując się wskazówkami firmy *Novozymes* stężenie enzymu *Cellic*[®] *HTec2* wynosiło 5 i 10% w/w w stosunku do sumarycznego stężenia obu preparatów.

Na rys. 4 przedstawiono zależność stężenia ksylozy od czasu dla reakcji hydrolizy surowca poddanego alkalicznej obróbce wstępnej prowadzonych z użyciem preparatów *Cellic*[®] *CTec2* oraz *Cellic*[®] *HTec2*.



Rys. 4. Wpływ stężenia preparatu *Cellic*[®] *HTec2* na zmianę stężenia ksylozy w czasie hydrolizy surowca poddanego alkalicznej obróbce wstępnej. Surowiec po obróbce NaOH: 5% *Cellic*[®] *HTec2* (♦), 10% *Cellic*[®] *HTec2* (□), surowiec po obróbce Ca(OH)₂: 5% *Cellic*[®] *HTec2* (▲), 10% *Cellic*[®] *HTec2* (○)

Jak można zaobserwować, wszystkie badane reakcje biegają praktycznie z taką samą szybkością niezależnie od ilości preparatu *Cellic*[®] *HTec2* dodanego do mieszaniny reakcyjnej. Poza tym przebiegi reakcji są zbliżone do tych przedstawionych na rys. 3, który dotyczy reakcji prowadzonych wyłącznie z użyciem preparatu *Cellic*[®] *CTec2*. Oznacza to, że preparat *Cellic*[®] *HTec2* nie wpływa na szybkość hydrolizy hemiceluloz zawartych w stosowanym do badań surowcu lignocelulozowym.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań hydrolizy enzymatycznej surowca lignocelulozowego poddanego różnym metodom obróbki wstępnej można sformułować następujące wnioski:

- Surowiec nie poddany obróbce wstępnej praktycznie nie ulega enzymatycznej hydrolizie.
- Radiacyjna obróbka surowca nie zwiększa jego podatności na hydrolizę enzymatyczną.
- Obróbka fizyczna metodą eksplozji pary oraz chemiczna kwaśna i zasadowa korzystnie wpływają na wydajność reakcji hydrolizy celulozy do glukozy. Najwyższe wartości stężeń glukozy otrzymano dla reakcji hydrolizy prowadzonej z użyciem surowca poddanego obróbce wstępnej kwasem fosforowym i etanolem.
- W produktach hydrolizy stosowanych surowców lignocelulozowych prowadzonej z użyciem preparatu *Cellic*[®] *CTec2* nie występuje celobioza. Jest to korzystne ze względu na fakt, że jest ona inhibitorem enzymów celulolitycznych.
- Głównym produktem hydrolizy surowca poddanego kwaśnej obróbce wstępnej oraz obróbce metodą eksplozji pary jest glukoza. W produktach hydrolizy tych surowców stężenie ksylozy jest bliskie zeru. Wynika to z faktu, że zastosowana obróbka wstępna spowodowała usunięcie znacznej części hemiceluloz z surowca.
- Obok glukozy, produktem hydrolizy surowca poddanego obróbce wstępnej z użyciem NaOH lub Ca(OH)₂ jest także ksyloza. Może to świadczyć o tym, że surowiec po obróbce alkalicznej zawiera obok celulozy także hemicelulozy.
- Dodatek preparatu *Cellic*[®] *HTec2* do mieszaniny reakcyjnej praktycznie nie ma wpływu na szybkość uwalniania ksylozy z surowca poddanego alkalicznej obróbce wstępnej.

LITERATURA

- Bansal P., Hall M., Realf M.J., Lee J.H., Bommarius A. S., 2009. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates *Biotechnol. Adv.*, 27, 833-848. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.005
- McMillan J.D., 1994. *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. In: Kimmel M.E., Baker J.O., Overend R.P. (Eds.) *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. American Chemical Society, Washington, DC, 292-320.
- Rabinovich M.L., Melnick M.S., Bolobova A.V., 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes *Biochem. (Moscow)*, 67, 850-871. DOI: 10.1023/A:1019958419032
- Sun Y., Cheng J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review *Bioresour. Technol.*, 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.
- Taherzadeh M.J., Karimi K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1621-1651. DOI: 10.3390/ijms9091621
- Zhang Y., Jing-Liang Xu J-L., Hui-Juan Xu H-J., Zhen-Hong Yuan Z-H., Ying Guo Y., 2010. Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw *Bioresour. Technol.*, 101, 8261-8266. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.015

Badania były finansowane z budżetu Zadania Badawczego nr 4 pt. „Opracowanie zintegrowanych technologii wytwarzania paliw i energii z biomasy, odpadów rolniczych i innych” w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych pt.: „Zaawansowane technologie pozyskiwania energii” realizowanego.