

Karina MICHALSKA^{1,2}, Stanisław LEDAKOWICZ²

e-mail: karina.michalska@iw.lodz.pl

¹ Instytut Włókiennictwa, Łódź² Politechnika Łódzka, Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Łódź

Degradacja struktur lignocelulozowych oraz produktów ich hydrolizy

Wstęp

Biomasa lignocelulozowa jest jednym z najpowszechniej stosowanych odnawialnych źródeł energii. Budowa chemiczna oraz wysoka wartość kaloryczna umożliwia wykorzystanie jej w szeregu różnych procesów prowadzących do wytwarzania znacznych ilości energii w formie zarówno gazowej, stałej jak i ciekłej [Kuma i in., 2009; Sun i Cheng, 2002]. Materiał taki najczęściej wykorzystuje się w procesach produkcji biogazu, biodiesla oraz energii cieplnej pochodzącej ze spalania brykietów. W tym celu biomasa lignocelulozowa podawana jest specjalistycznej obróbce fizycznej, chemicznej i enzymatycznej, zapewniającej prawidłowy i efektywny przebieg procesów finalnych.

Podstawowymi składnikami biomasy lignocelulozowej są: celuloza, hemiceluloza i lignina – struktury polimerowe dość trudno podlegające biodegradacji. Najbardziej energetyczna z nich celuloza, otoczona jest zarówno fragmentami hemicelulozy jak i drzewnika (ligniny), co znacznie utrudnia jej rozkład i uwalnianie zgromadzonej w niej energii. Stąd też w ciągu ostatnich kilkunastu lat wzrosło zainteresowanie badaniami dotyczącymi metod chemicznej degradacji poszczególnych struktur lignocelulozowych, a w konsekwencji – maksymalizacji wydajności bioprosesów [Mosier i in., 2005; Wyman i in., 2005]. Tendencja ta obserwowana jest głównie w przypadku procesu fermentacji metanowej prowadzącego do wytwarzania biogazu o znacznej zawartości metanu. Duży nacisk położony jest na zbadanie wpływu każdej z metod na stopień degradacji poszczególnych struktur polimerowych, ale także produktów ich rozkładu, takich jak glukoza, ksyloza oraz związki fenolowe [Hendriks i Zeeman, 2008].

Spośród metod najczęściej wykorzystywanych do wstępnej obróbki biomasy wymienić można hydrolizę kwasową, alkaliczną, techniki zaawansowanego utleniania i metody termiczne [Kang i in., 2012; Michalska i in., 2011]. Każda z nich odpowiedzialna jest za rozkład innego polimeru, a zatem za uwalnianie różnych produktów rozkładu. Z punktu widzenia inżynierii procesowej konieczna jest zatem weryfikacja możliwości zastosowania każdej z takich metod w odniesieniu do wydajności otrzymania pożądanego produktu końcowego. Dobór odpowiedniej metody rzutować może bowiem na efektywność całego procesu produkcji energii z biomasy.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu trzech stosowanych metod chemicznej hydrolizy na poziom degradacji struktur lignocelulozowych oraz produktów ich rozkładu w odniesieniu do wydajności procesu fermentacji metanowej.

Metodyka badań

Obiektem badań były czyste związki chemiczne stanowiące podstawowe struktury budulcowe biomasy oraz typowe produkty ich rozkładu. Do celów eksperymentalnych wykorzystano krystaliczną celulozę (Sigma - Aldrich), glukozę (CHEMPUR), ksylozę (Carl Roth GmbH + Co.KG) oraz wanilinę (POCH S.A.). Do chemicznej, wstępnej hydrolizy biomasy wykorzystano obróbkę kwasową, alkaliczną oraz utlenianie za pomocą odczynnika *Fentona*. Ponadto w celu enzymatycznej degradacji próbek celulozy stosowano dwa rodzaje enzymów: celulazę (*Celluclast 1.5L*, Sigma - Aldrich) i celobiazę (*Novozyme 188*, Sigma - Aldrich).

Hydroliza chemiczna

Badany związek rozprowadzano w wodzie destylowanej lub odpowiednim roztworze kwasu bądź zasady i poddawano chemicznej obróbce. Otrzymane po procesie hydrolizaty sączono na sączkach jakościowych, po czym poddawano analizom chemicznym umożliwiającym określenie wydajności reakcji.

Kwasową hydrolizę chemiczną prowadzono przy wykorzystaniu 3% (v/v) roztworu kwasu siarkowego (H₂SO₄). Badaną próbkę o stężeniu 5% (obj.) umieszczano w autoklawie i poddawano obróbce termicznej w temperaturze 121°C na czas 30 minut.

Hydrolizę zasadową prowadzono przy użyciu 5% (m/v) roztworu zasady sodowej (NaOH). Badaną próbkę o stężeniu 5% (m/v) umieszczano w autoklawie w temperaturze 121°C na okres 30 minut.

Utlenianie za pomocą odczynnika *Fentona* prowadzono z wykorzystaniem 0,498 g siarczanu żelazawego (FeSO₄·7H₂O) i 8,33 cm³ 30% roztworu nadtlenu wodoru (H₂O₂). Badaną próbkę o stężeniu 5% zawieszoną w wodzie destylowanej doprowadzano do *pH* = 3 za pomocą stężonego kwasu siarkowego (H₂SO₄). Następnie do próbki dodawano siarczan żelazawy i mieszano za pomocą mieszadła elektrycznego z szybkością 550 rpm. Po upływie 5 minut do próbki dodawano nadtlenek wodoru i mieszano zawartość z szybkością 200 rpm. Po 2 h próbkę umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 50°C na okres 30 minut w celu usunięcia pozostałego nadtlenu wodoru.

Hydroliza enzymatyczna

Hydrolizę enzymatyczną prowadzono z wykorzystaniem chemicznie zhydrolizowanej celulozy. Próbkę o masie 1g umieszczano w 20 cm³ 50mM roztworu buforu cytrynianowego o *pH* 4,8. Do mieszaniny dodawano enzymy: celulazę (160 EGU/g próbki) i celobiazę (17,2 CBU/g próbki). Próbkę umieszczano w wytrząsarce w temperaturze 50°C. Po upływie 24 h próbkę sączono, a uzyskany hydrolizat poddawano analizom fizykochemicznym.

Metody analityczne

W badanych próbkach przed procesem jak i po procesie hydrolizy chemicznej oznaczano następujące parametry fizykochemiczne: stężenie glukozy *C_g* i ksylozy *C_k* (chromatograf *Waters 600* wyposażony w kolumnę *Bio-Rad Aminex HPX-87H*, detektor *Waters 410 RI*; temperatura w kolumnie 60°C, faza ruchoma 0,01 N kwas siarkowy, przepływ 0,6 cm³/min), stężenie związków fenolowych – waniliny *C_w* (metoda *Folina-Ciocalteu*, spektrofotometr *UV-VIS T80+ PG Instruments Limited*, długość fali $\lambda = 765$ nm), ogólny węgiel organiczny *OWO* (*Analizator TOC, HACH-LANGE*).

Wyniki i dyskusja

Degradacja celulozy

Zarówno dostępność celulozy dla mikroorganizmów i enzymów, jak i stopień jej degradacji do glukozy odgrywa kluczową rolę w procesie fermentacji metanowej. Równie istotny jest wpływ konkretnej metody chemicznej hydrolizy celulozy na efektywność rozkładu glukozy jako podstawowego substratu bakterii metanogennych. Metody prowadzące do mineralizacji tego monosacharydu są – z punktu widzenia wydajności całego procesu – niekorzystne i nie zalecane. W technologiach

fermentacyjnych sprawdzają się te z nich, które prowadzą do dalszych przekształceń glukozy w lotne kwasy tłuszczowe.

W tab. 1 przedstawiono wyniki uzyskane po procesach chemicznej hydrolizy celulozy trzema różnymi metodami. W badaniach określano zarówno stopień degradacji celulozy (Y_c), jak i stężenie uwolnionej glukozy C_{g_k} i jej przekształcenia w inne produkty pośrednie OWO_k). Indeksy l i k odpowiadają warunkom początkowym i końcowym procesu degradacji chemicznej. Wydajność Y_c obliczono uwzględniając ubytek masy celulozy.

Tab. 1. Parametry fizykochemiczne opisujące próby przed i po procesie rozkładu celulozy różnymi metodami chemicznymi

Parametr	Hydroliza kwasowa	Hydroliza zasadowa	Utlenianie odczynnikiem <i>Fentona</i>
mc_0 [g]	2,5000	2,5000	5,0000
mc_k [g]	2,2193	1,3897	3,8884
Y_c [%]	11,20	44,40	22,20
C_{g_k} [g/dm ³]	0,00	0,00	0,00
OWO_0 [g/dm ³]	19,98	19,98	19,98
OWO_k [g/dm ³]	1,46	12,10	0,89

Z uzyskanych danych eksperymentalnych wynika, iż największy poziom degradacji celulozy uzyskano dla procesu hydrolizy zasadowej, a najniższy dla obróbki kwasowej. Jednocześnie wszystkie z zaproponowanych w badaniach metod prowadzą do rozkładu produktu pożądanego – glukozy. Hydroliza zasadowa w najmniejszym stopniu obniża wydajność rozkładu celulozy z uwagi na fakt, iż tylko częściowo mineralizuje węgiel organiczny, a więc wszystkie produkty pośrednie rozkładu. Spośród trzech analizowanych metod utlenianie odczynnikiem *Fentona* daje najmniej korzystne rezultaty.

Degradacja glukozy

Jak już wspomniano z punktu widzenia procesów fermentacji metabolicznej glukoza jest najbardziej pożądanym produktem rozkładu struktur lignocelulozowych wchodzących w skład biomasy. Jej niedobór może zakłócać przebieg reakcji metanogennych bądź też prowadzić do obumierania mikroorganizmów biorących udział w anaerobowej degradacji biomasy i produkcji biogazu. W wyniku poddawania jej działaniu różnych czynników glukoza może ulegać mineralizacji, bądź też tworzyć całe spektrum związków pośrednich, wchodzących w szlaki metaboliczne mikroorganizmów. Stopień jej konwersji w wyniku działania kwasem, zasadą i odczynnikiem *Fentona* przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Parametry fizykochemiczne opisujące próby przed i po procesie rozkładu glukozy różnymi metodami chemicznymi

Parametr	Hydroliza kwasowa	Hydroliza zasadowa	Utlenianie odczynnikiem <i>Fentona</i>
C_{g_0} [g/dm ³]	50,00	50,00	50,00
C_{g_k} [g/dm ³]	45,58	0,77	13,08
Y_g [%]	8,83	98,47	73,84
OWO_0 [g/dm ³]	20,30	20,30	20,30
OWO_k [g/dm ³]	20,30	20,30	20,30

Uzyskane dane wskazują na fakt, iż hydroliza zasadowa prowadzi do niemal całkowitego rozkładu glukozy. Nie mniej jednak stała wartość wskaźnika OWO świadczy o przekształceniu glukozy w związki pośrednie o charakterze organicznym, a zatem istotne substraty dla procesu fermentacji metabolicznej. Podobne właściwości zaobserwowano w odniesieniu do reakcji utleniania glukozy odczynnikiem *Fentona*, choć poziom degradacji glukozy był w tym przypadku nieco mniejszy. Najkorzystniejszą metodą z punktu widzenia dalszych procesów fermentacyjnych okazała się hydroliza kwasowa; nie tylko ze względu na niewielką wydajność degradacji glukozy, ale także na małe prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska inhibicji substratowej, wywołanej obecnością lotnych kwasów tłuszczowych pochodzących z rozkładu glukozy. Im większa ilość glukozy ulega przekształceniom do produktów pochodnych, tym to prawdopodobieństwo jest większe.

Degradacja ksylozy

Ksyloza, będąca głównym produktem rozkładu hemicelulozy, jest również pożądanym substratem w procesie fermentacji metabolicznej, choć nie tak chętnie metabolizowanym przez mikroorganizmy, jak glukoza. Obecność tej pentozy we wsadzie fermentora obarczona jest ryzykiem wprowadzenia toksycznych dla mikroorganizmów substancji pochodnych, takich jak furfural i hydroksymetylofurfural, a w związku z tym – zatrzymania procesu produkcji biogazu [Hu i in., 2010; Lenihan i in., 2010]. Konieczna jest zatem kontrola produktów pośrednich rozkładu ksylozy, choć z drugiej strony – jej obecność w fermentorze świadczyć może o degradacji hemicelulozy, a więc łatwej dostępności mikroorganizmów i enzymów do celulozy.

W tab. 3 zestawiono wartości parametrów fizykochemicznych świadczących o stopniu degradacji ksylozy za pomocą trzech metod chemicznej hydrolizy.

Tab. 3. Parametry fizykochemiczne opisujące próby przed i po procesie rozkładu ksylozy różnymi metodami chemicznymi

Parametr	Hydroliza kwasowa	Hydroliza zasadowa	Utlenianie odczynnikiem <i>Fentona</i>
C_{k_0} [g/dm ³]	50,00	50,00	50,00
C_{k_k} [g/dm ³]	22,12	0,00	3,703
Y_k [%]	55,76	100,00	92,59
OWO_0 [g/dm ³]	19,88	19,88	19,88
OWO_k [g/dm ³]	19,88	19,88	17,99

Z otrzymanych danych eksperymentalnych wynika, iż wyłącznie hydroliza zasadowa prowadzi do całkowitej degradacji ksylozy. Analiza uzyskanych wartości OWO wskazuje jednak w tym przypadku na znaczne prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska inhibicji dalszego procesu fermentacji pochodnymi furfuralu. Nieco korzystniejsze wyniki uzyskano w przypadku utleniania ksylozy odczynnikiem *Fentona*, a najlepsze w przypadku zastosowania hydrolizy kwasowej do chemicznej obróbki biomasy. W każdym z wymienionych przypadków wskazana jest jednak dogłębna analiza produktów rozkładu ksylozy.

Degradacja waniliny

Wanilina jest jednym z głównych produktów rozkładu ligniny. Jej obecność w hydrolizacie świadczy o możliwości częściowej degradacji drzewnika, a zatem swobodniejszym dostępie mikroorganizmów i enzymów do położonej głębiej celulozy. Z drugiej strony każdy produkt pośredni rozkładu ligniny mający charakter fenolowy zwiększa ryzyko wystąpienia zjawiska inhibicji mikroorganizmów metanogennych [Baudel i in., 2005].

W tab. 4 zestawiono wartości parametrów fizykochemicznych charakteryzujących hydrolizaty otrzymane w wyniku chemicznej obróbki waniliny różnymi metodami.

Tab. 4. Parametry fizykochemiczne opisujące próby przed i po procesie rozkładu waniliny różnymi metodami chemicznymi

Parametr	Hydroliza kwasowa	Hydroliza zasadowa	Utlenianie odczynnikiem <i>Fentona</i>
C_{w_0} [g/dm ³]	50,00	50,00	50,00
C_{w_k} [g/dm ³]	7,53	3,74	3,09
Y_w [%]	84,93	92,53	93,83
OWO_0 [g/dm ³]	31,54	31,54	31,54
OWO_k [g/dm ³]	5,33	31,53	20,33

Wszystkie z badanych metod prowadziły w znacznym stopniu do degradacji waniliny. Najmniej efektywna w tym względzie okazała się hydroliza kwasowa, a najbardziej – utlenianie odczynnikiem *Fentona*. Zastosowanie obróbki kwasowej prowadziło dodatkowo do silnej mineralizacji otrzymanych produktów pośrednich, a w związku z tym – zmniejszenia prawdopodobieństwa wystąpienia inhibicji wzrostu mikroorganizmów. W przypadku dwóch pozostałych metod chemicznej hydrolizy to prawdopodobieństwo jest zdecydowanie większe, zwłaszcza dla obróbki zasadowej.

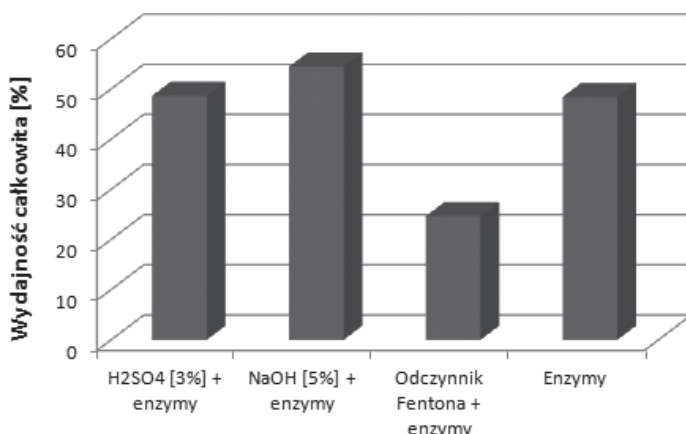
Hydroliza enzymatyczna

Wpływ wszystkich metod chemicznej hydrolizy struktur lignocelulozowych i produktów ich rozkładu analizowano również w odniesieniu do możliwości pozyskania produktu pożądanego, a więc glukozy, ze zhydrolizowanej wcześniej chemicznie celulozy i zastosowaniu hydrolizy enzymatycznej. Stężenie glukozy uzyskanej w dwuetapowym procesie porównywano ze stężeniem glukozy pozyskanej w wyniku jedynie obróbki enzymatycznej. Uzyskane rezultaty przedstawiono w tab. 5.

Tab. 5. Stężenie glukozy w hydrolizatach po chemicznej i enzymatycznej obróbce krystalicznej celulozy

Parametr	Hydroliza kwasowa i enzymatyczna	Hydroliza zasadowa i enzymatyczna	Utlenczenie odczynnikami Fentona i hydroliza enzymatyczna	Hydroliza enzymatyczna
Cg [g/dm ³]	27,03	30,24	27,40	26,90

Z uzyskanych danych eksperymentalnych wynika, iż chemiczna degradacja celulozy zwiększyła efektywność działania enzymów, a zatem i ilość uwolnionej glukozy do pożywki fermentacyjnej. Najlepsze rezultaty uzyskano dla dwuetapowego procesu obróbki, złożonego z hydrolizy zasadowej i enzymatycznej. Stężenie glukozy uwolnionej w wyniku



Rys. 1. Wydajność całkowita Y uwalniania glukozy dla procesów jednoetapowych i dwuetapowych

rozkładu celulozy było najniższe dla celulozy przetwarzanej wyłącznie na drodze enzymatycznej.

Dla każdej z zastosowanych metod obliczono wydajność całkowitą procesu dwuetapowego i porównano ją z wydajnością pojedynczego procesu enzymatycznej degradacji celulozy. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 1.

Najwyższą wydajność uwalniania glukozy z celulozy uzyskano dla dwuetapowej obróbki celulozy z wykorzystaniem hydrolizy enzymatycznej. Wskazuje to na zasadność zastosowania dodatkowego etapu chemicznej hydrolizy biomasy celulozowej, mogącego skutkować zwiększeniem całościowej wydajności procesu fermentacji metanowej. Nieco niższą efektywność otrzymano w przypadku hydrolizy kwasowej. Najniższą wydajnością, mniejszą nawet od wydajności pojedynczego procesu enzymatycznego, charakteryzował się proces z wykorzystaniem odczynnika Fentona w połączeniu z hydrolizą enzymatyczną.

Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, iż ta metoda obliczenia wydajności w oparciu o reakcję chemiczną hydrolizy celulozy do glukozy nie uwzględnia strat glukozy w procesach chemicznej hydrolizy.

Wnioski

Przedstawione w pracy dane eksperymentalne otrzymane w procesach degradacji chemicznej struktur lignocelulozowych i produktów ich rozkładu potwierdzają różnorodność działania w odniesieniu do poszczególnych związków organicznych, jak i celowość ich zastosowania jako obróbki wstępnej biomasy w procesie fermentacji metanowej. Analizowane metody w różnym stopniu degradują produkty pożyteczne, co może niekorzystnie wpływać na sam proces poprzez wywołanie zjawiska inhibicji. Każda z nich dodatkowo zmniejsza stężenie dostępnego węgla organicznego, zwłaszcza pochodzącego z rozkładu glukozy, na co zwrócić należy szczególną uwagę.

Śród wszystkich badanych metod najkorzystniejsze rezultaty daje hydroliza zasadowa. Z punktu widzenia procesu fermentacji metanowej jej zastosowanie wydaje się być najbardziej zasadne. Wydajność degradacji celulozy do glukozy oraz stopień mineralizacji węgla organicznego mogą wyraźnie podnieść efektywność anaerobowej produkcji biogazu. Należy jednak ściśle monitorować rodzaj i ilość uwalnianych produktów pośrednich, mogący mieć toksyczny charakter w odniesieniu do mikroorganizmów fermentacyjnych.

LITERATURA

- Baudel H.M., Zaror C., de Abreu C.A.M., 2005. Improving the value of sugarcane bagasse via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Ind. Crops Prod.*, 21, 309-315. DOI: 10.1016/j.indcrop.2004.04.013
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Biores. Tech.*, 100, 10-18. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027
- Hu R., Lin L., Liu T., Liu S., 2010. Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure. *Biores. Tech.*, 101, 3586-3594. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.005
- Kang K.E., Jeong G.T., Sunwoo C., Park D-H., 2012. Pretreatment of rapeseed straw by soaking in aqueous ammonia. *Bioproc. Biosys. Eng.*, 35, 77-84. DOI: 10.1007/s00449-011-0606-z
- Kumar P., Barret D.M., Delwiche M.J., Stroeve P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 3713-3729. DOI: 10.1021/ie801542g
- Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M.N.M., Rooney D.W., Walker G.M., 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. J.*, 156, 395-403. DOI: 10.1016/j.cej.2009.10.061
- Michalska K., Miazek K., Krzystek L., Ledakowicz S., 2011. Effect of dilute acid pretreatment of different energy crops on their enzymatic hydrolysis. *International Conference Environmental (Bio)Technologies & EU-FP7 Environment Brokerage Event*. Gdańsk, Poland, 5-8 September 2011.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzaple M., Ladisch M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass *Biores. Tech.*, 96, 673-686. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.025
- 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
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzaple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies *Biores. Tech.*, 96, 1959-1966. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.01.010

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu badawczego nr 7678/B/P01/2011/40.