

**Katarzyna DĄBKOWSKA**

e-mail: Katarzyna.Dabkowska@pw.edu.pl

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

**Alkaliczna obróbka wstępna  
lignocelulozowych odpadów kukurydzianych****Wstęp**

Lignocelulozy, materiał budulcowy ścian komórkowych roślin, są bogatym źródłem polisacharydów, a surowce bogate w lignocelulozy, m.in. biomasa drzewna czy odpady rolnicze, to cenne, odnawialne źródło energii o szczególnym znaczeniu w wytwarzaniu bioetanolu, uznanego za przyjazny środowisku substytut lub biokomponent ropopochodnych paliw pędnych, którego wykorzystywanie w transporcie jest istotnym elementem zrównoważonego rozwoju. Korzyści wynikające ze stosowania biopaliw to: zmniejszenie zużycia wyczerpujących się zasobów paliw kopalnych i produktów ich rafinacji, poprawa bezpieczeństwa energetycznego gospodarki poprzez dywersyfikacja źródeł zaopatrzenia w paliwa, poprawa stanu środowiska przez ograniczenie emisji gazów cieplarnianych do atmosfery, stymulacja rozwoju obszarów wiejskich [Arevalo-Gallegos i in., 2017].

Obecnie ciekłe biopaliwa produkowane są z surowców bogatych w skrobię, stanowiących jednocześnie źródło pożywienia dla ludzi i paszę dla zwierząt [Koizumi, 2015]. Intensyfikuje to wzrost cen surowców żywnościowych i budzi wiele kontrowersji natury ekonomicznej i etycznej. Korzystne jest zastępowanie surowców skrobiowych biomasą lignocelulozową pozbawioną znaczenia żywieniowego. Pomimo licznych badań prowadzonych globalnie nie opracowano dotychczas efektywnej i opłacalnej przemysłowej technologii przetwarzania lignoceluloz w biorafineriach. W procesach tego typu wyróżnia się trzy główne etapy: obróbkę wstępną biomasy, hydrolizę zawartych w niej polisacharydów oraz fermentację uwolnionych cukrów prostych [Kołuniewicz i Dąbkowska, 2016]. Trudności technologiczne hydrolytycznego scukrzania biomasy w łagodnych warunkach procesowych wynikają ze złożonej i zwartej struktury lignoceluloz, zawartości lignin oraz krystalicznej postaci celulozy. Efektywność hydrolizy silnie zależy od rodzaju surowca, a podatność biomasy roślinnej na scukrzanie i końcową wydajność produktów w biorafinerii można intensyfikować poddając biomasę obróbce wstępnej [Seidl i Goulart, 2016].

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych warunków alkalicznej obróbki wstępnej biomasy na efektywność następczej hydrolizy enzymatycznej odpadów kukurydzianych w postaci słomy oraz odziarnionych kolb. Alkaliczna obróbka surowca jest korzystna, z uwagi na ograniczone generowanie chemicznych inhibitorów fermentacji etanolowej, w porównaniu z efektami obróbki wstępnej prowadzonej w środowisku obniżonego *pH*.

**Badania doświadczalne****Surowce lignocelulozowe**

Wykorzystano dwa rodzaje odpadów kukurydzianych: (I) słomę oraz (II) odziarnione kolby. Do badań użyto rozdrobnionego mechanicznie surowca o rozmiarach cząstek z zakresu od 0,5 do 1,0 mm.

**Obróbka wstępna**

Odpady kukurydziane traktowano dwoma różnymi roztworami alkalicznymi: (I) 2% NaOH oraz (II) 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o *pH* 11,5 (odczyn *pH* ustalono 5M NaOH). Stężenia użytych roztworów dobrano na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań wstępnych. Biomasę poddawano obróbce wstępnej przez 2, 9 lub 24 h. W 4 kolbach Erlenmeyera umieszczano po 5 g s.m. surowca kukurydzianego i po 100 cm<sup>3</sup> roztworu alkalinizującego, tzn. NaOH lub H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kolby wstrząsano w 50°C. Po zadanych czasie obróbki wstępnej proces przerywano przez filtrację zawiesiny biomasy pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany osad płukano porcjami wody destylowanej do uzyskania obojętnego odczynu *pH* filtratu i używano jako substrat w hydrolizie enzymatycznej.

**Hydroliza enzymatyczna**

Do enzymatycznej degradacji polisacharydów zawartych w biomasie poddanej alkalicznej obróbce wstępnej użyto preparatu Cellic<sup>®</sup> CTec2 (Novozymes, Dania), zawierającego enzymy scukrzające celulozę i hemicelulozę. W kolbach Erlenmeyera umieszczano 5 g<sub>s.m.</sub> surowca poddanego obróbce wstępnej, 0,3 g Cellic<sup>®</sup> CTec2 oraz 100 cm<sup>3</sup> buforu cytrynianowego (*pH* 5,4). Kolby wstrząsano (160 obr·min<sup>-1</sup>) w temperaturze 50°C i prowadzono enzymatyczną hydrolizę przez 72 h. W założonych interwałach czasowych pobierano do mikroprobówek typu Eppendorf próbki mieszaniny reakcyjnej (0,5 cm<sup>3</sup>), które natychmiast schładzano w kąpielii lodowej i następnie odwirowywano przy 1·10<sup>4</sup> obr·min<sup>-1</sup> przez 10 min w celu zatrzymania enzymatycznej degradacji surowca. Uzyskany supernatant przenoszono do czystych probówek i po 10-krotnym rozcieńczeniu wodą dejonizowaną oznaczano zawartość cukrów prostych (tj. glukozy, ksylozy i arabinozy) wykorzystując technikę HPLC.

**Metody analityczne**

Zawartość suchej masy surowca oznaczano metodą wagową z użyciem wagosuszarki MA 50/I.R (Radwag, Polska). Zawartość celulozy i hemiceluloz w biomasie kukurydzianej, przed i po obróbce wstępnej, oznaczano zgodnie z procedurą referencyjną National Renewable Energy Laboratory (NREL, USA) [Sluiter i in., 2012].

Stężenia monosacharydów w próbkach oznaczano z użyciem chromatografu Varian 625L (Varian, USA) wyposażonego w detektor refraktometryczny, wykorzystując zdolność rozdzielczą kolumny AMINEX HPX-87H (Bio-Rad, USA) w warunkach termostatowania (50°C) i przepływu (0,4 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>) 0,001 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jako eluentu.

**Wyniki i dyskusja**

W tab.1 zamieszczono wyznaczone doświadczalnie wartości procentowego ubytku masy (*u<sub>B</sub>*) słomy i odziarnionych kolb kukurydzianych podczas obróbki wstępnej, jak i procentowe zawartości celulozy i hemiceluloz w badanych surowcach, przed i po obróbce wstępnej prowadzonej w badanych warunkach. Dodatkowo przedstawiono wartości procentowego odzysku celulozy (*o<sub>C</sub>*) i hemiceluloz (*o<sub>H</sub>*) w osadach uzyskanych po obróbce danego surowca.

Wyznaczona doświadczalnie sumaryczna zawartość polisacharydów (tj. celulozy i hemiceluloz łącznie) w słomie i kolbach są zbliżone. W słomie oznaczono 34,6% celulozy oraz 26,6% hemiceluloz, co łącznie daje 61,2% frakcji węglowodanów. Natomiast w rozdrobnionych odziarnionych kolbach zawartość celulozy wynosiła 35,1%, a hemicelulozy 29,3%, czyli łącznie 64,4 % frakcji polisacharydów.

W wyniku alkalicznej obróbki wstępnej znaczna część masy surowca uległa rozpuszczeniu w roztworze. Świadczą o tym przedstawione w tab.1 wartości *u<sub>B</sub>* (tj. od 42,8 % do 57,2%), obliczone z zależności opisanej równaniem 1:

$$u_B = \frac{m_B - m_O}{m_B} \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

*m<sub>B</sub>* – sucha masa biomasy poddanej obróbce wstępnej, [g];*m<sub>O</sub>* – sucha masa osadu uzyskanego w wyniku obróbki wstępnej, [g].

Głównym składnikiem frakcji polisacharydowej osadu uzyskanego po każdym z wariantów alkalicznej obróbki wstępnej słomy jak i kolb kukurydzianych była celuloza, której zawartość mieściła się w zakresie od 52,3 do 62,8%. Uwzględniając procentową zawartość celulozy w surowej biomasie, straty celulozy zależały od warunków prowadzenia procesu alkalicznej obróbki wstępnej oraz rodzaju

Tab. 1. Wyznaczone doświadczalnie parametry charakteryzujące alkaliczną obróbkę wstępną słomy i odziarnionych kolb kukurydzianych

surowiec	obróbka wstępna	$u_B$ [%]	$C_C$ [%]	$C_H$ [%]	$o_C$ [%]	$o_H$ [%]
słoma	bez obróbki	-	34,6	26,6	-	-
kolby	bez obróbki	-	35,1	29,3	-	-
słoma	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 2h	44,3	60,4	18,2	97,2	38,1
	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 9h	42,8	55,1	18,3	91,1	39,4
	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24h	47,1	59,9	18,1	91,6	36,0
	2% NaOH, 2h	50,2	58,6	21,3	84,3	39,9
	2% NaOH, 9h	52,6	62,6	21,3	85,8	38,0
	2% NaOH, 24h	52,4	62,2	16,4	85,6	29,3
kolby	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 2h	43,3	52,3	19,3	84,5	37,3
	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 4h	44,6	55,6	18,5	87,8	35,0
	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24h	45,7	54,6	17,6	84,5	32,6
	2% NaOH, 2h	52,5	63,5	18,2	85,9	29,5
	2% NaOH, 9h	53,1	62,8	16,4	83,9	26,3
	2% NaOH, 24h	57,2	60,3	18,5	73,5	27,0

$u_B$  – procentowy ubytek biomasy, [%];  $o_H$  – procentowy odzysk hemiceluloz, [%]  
 $C_C$  – procentowa zawartość celulozy [%];  $o_C$  – procentowy odzysk celulozy [%];  
 $C_H$  – procentowa zawartość hemiceluloz [%];

surowca. Świadczą o tym różnice w wartościach parametru  $o_C$  (od 73,5 do 97,2%), zdefiniowanego jako stosunek masy celulozy w osadzie uzyskanym po obróbce do masy celulozy w surowcu wyjściowym (tzn. bez obróbki wstępnej) i określonego równaniem:

$$o_C = \frac{m_o \cdot C_{C,O}}{m_B \cdot C_{C,B}} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:  $m_o$  – sucha masa osadu uzyskanego po obróbce wstępnej, [g];  $m_B$  – sucha masa surowca poddanego obróbce wstępnej, [g];  $C_{C,O}$  – procentowa zawartość celulozy w osadzie uzyskanym po obróbce wstępnej, [%];  $C_{C,B}$  – procentowa zawartość celulozy w biomacie poddanej obróbce wstępnej, [%].

Analogicznie wyznaczone wartości parametru  $o_H$  (od 26,3% do 39,9%), zdefiniowanego stosunkiem masy hemicelulozy w osadzie po obróbce wstępnej do masy hemicelulozy w surowcu przed obróbką wskazują, że podczas alkalicznej obróbki wstępnej rozpuściła się znaczna część hemiceluloz, a uzyskane wartości  $o_H$  zależą od warunków obróbki wstępnej. Dostrzeżono, że wartości  $o_C$  i  $o_H$  w większości przypadków są wyższe po obróbce słomy niż kolb, co oznacza, że obróbka kolb wiąże się z nieco większą stratą polisacharydów.

Na rys. 1 przedstawiono uzyskane wartości wydajności enzymatycznego scukrzania celulozy i hemiceluloz z biomasy odpadów kukurydzianych poddanych alkalicznej obróbce wstępnej w badanych warunkach. Wydajność scukrzania celulozy ( $Y_C$ ) oraz hemicelulozy ( $Y_H$ ) zdefiniowano jako stosunek ilości glukozy (produkt degradacji celulozy) lub ksylozy i arabinozy (produkty rozkładu hemiceluloz) uwolnionych z biomasy po 48 h jej enzymatycznej hydrolizy, odniesionych do wydajności teoretycznej, zgodnie z zależnościami:

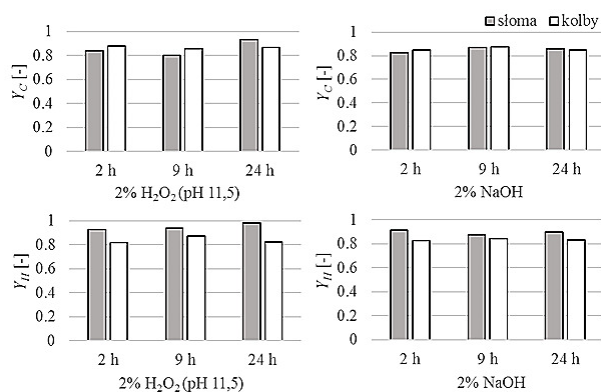
$$Y_C = \frac{m_g}{m_o \cdot C_{C,O}} \cdot \frac{180}{162} \quad (3)$$

$$Y_H = \frac{m_k + m_a}{m_o \cdot C_{H,O}} \cdot \frac{150}{132} \quad (4)$$

gdzie:  $m_g$ ,  $m_k$ ,  $m_a$  – masy odpowiednio: glukozy, ksylozy lub arabinozy odnotowane po 48 h hydrolizy, [g];  $m_o$   $o_C$  – procentowy odzysk celulozy [%]; początkowa masa osadu biomasy po obróbce wstępnej będąca substratem do hydrolizy [g];  $C_{C,O}$  – wyznaczona doświadczalnie procentowa zawartość celulozy w osadzie biomasy poddanej hydrolizie, [%];  $C_{H,O}$  – wyznaczona doświadczalnie procentowa zawartość hemiceluloz w osadzie biomasy użytej do hydrolizy, [%]; 180/162 – stechiometryczny współczynnik konwersji celulozy do glukozy, [-]; 150/132 – stechiometryczny współczynnik konwersji hemicelulozy do ksylozy i arabinozy, [-] [Sluiter i in., 2012].

Po 48 h procesu enzymatycznej hydrolizy surowców pozyska-

nych w wyniku alkalicznej obróbki wstępnej, skład mieszaniny reakcyjnej nie ulegał zmianie, a ksyloza stanowiła główny cukier prosty uwalniany w wyniku hydrolizy hemiceluloz.



Rys. 1. Wydajności scukrzania celulozy i hemiceluloz uzyskane po 48 h hydrolizie enzymatycznej biomasy słomy i kolb kukurydzianych poddanych uprzednio alkalicznej obróbce wstępnej w środowisku 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 11,5) lub 2% NaOH.

Wyznaczone wydajności można uznać za wysokie – we wszystkich przypadkach wartości przekroczyły 80%. Efektywność hydrolizy nieznacznie rosła wraz z czasem obróbki wstępnej słomy w 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 11,5), a praktycznie nie zależała od czasu obróbki w 2% NaOH. Niewielkie różnice dostrzeżono w zakresie uzyskanych wydajności hydrolizy hemiceluloz przeprowadzonej w 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w zależności od typu surowca. Wydajność reakcji scukrzania hemiceluloz występujących w słomie wynosiła od 93 do 98%, w zależności od czasu prowadzenia obróbki, natomiast w przypadku użycia jako substratu odziarnionych kolb odnotowano niższe wartości od 82 do 87%.

## Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie zastosowane warianty alkalicznej obróbki wstępnej biomasy kukurydzianej pozwalają otrzymać biomę charakteryzującą się wysoką podatnością frakcji polisacharydowej na hydrolizę enzymatyczną. Nie zaobserwowano istotnego wpływu czasu trwania obróbki wstępnej, jak i użytego czynnika alkalizującego środowisko obróbki wstępnej, na skład biomasy oraz wydajność scukrzania celulozy i hemicelulozy. Efektywność hydrolizy celulozy w niewielkim stopniu zależy od czasu trwania obróbki wstępnej, a w przypadku hemiceluloz zależy od rodzaju użytych odpadów kukurydzianych. W wyniku obróbki wstępnej zaobserwowano rozpuszczanie się znacznej części biomasy. Stwierdzono, że straty biomasy dotyczyły przede wszystkim hemiceluloz, jednakże uzyskana w wyniku alkalicznej obróbki wstępnej biomasa słomy, jak i odziarnionych kolb, zawierała większe stężenia polisacharydów niż biomasa surowa nie poddana obróbce wstępnej.

## LITERATURA

- Arevalo-Gallegos A., Ahmad Z., Asgher M., Parra-Saldivara R., Iqbal H.M.N., (2017). Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach- a review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 99, 308-318. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097.
- Koizumi T., (2015). Biofuels and food security. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 52, 829-841. DOI: 10.1016/j.rser.2015.06.041.
- Kołtuniewicz A.B., Dąbkowska K., (2016). Biorefineries - factories of the future. *Chem. Proc. Eng.*, 37(1), 109-119. DOI: 10.1515/cpe-2016-0011.
- Seidl P.R., Goulart A.K., (2016). Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2, 48-53. DOI: j.cogsc.2016.09.003.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D., (2012). *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical report NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory.

**Badania finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG II – nr umowy BIOSTRATEG 2/298241/10/NCBR/2017.**