



## Badanie podatności wybranych, wstępnie przygotowanych materiałów ligninocelulozowych na enzymatyczną hydrolizę

Jacek Pielecki, Zdzisław Targoński

Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa  
Akademia Rolnicza, Lublin

### Studies on susceptibility of selected pretreated ligninocellulosic materials on enzymic hydrolysis

#### Summary

Studies described in this paper were conducted in order to determine the dependence between the conditions of ligninocellulosic substrate pretreatment and its susceptibility to enzymic hydrolysis. In view of this, a semi-empirical mathematical model was used to examine the process of enzymic hydrolysis of cellulose by assuming that this reaction proceeds as a sum of two first order reactions with different rates of reactions. The application of quasi-Newtonian equations allowed for the determination of percentage fractions of easily and non-easily hydrolysed cellulose in the structures of pretreated substrates.

#### Key words:

enzymic hydrolysis, ligninocellulosic materials, quasi-Newtonian equations.

#### Adres do korespondencji

Jacek Pielecki,  
Katedra Technologii  
Przemysłu  
Rolno-Spożywczego  
i Przechowalnictwa,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Skromna 8,  
20-950 Lublin.

### 1. Wstęp

Z uwagi na wyczerpywanie się nieodnawialnych zasobów paliw kopalnych, takich jak ropa naftowa, gaz ziemny, węgiel kamienny, coraz większa uwaga będzie skupiona na wykorzystaniu biomasy roślinnej na cele energetyczne i produkcję chemikaliów. W wyniku fotosyntezy produkowana jest biomasa w ilościach 10-krotnie większych niż wynosi obecne globalne zużycie energii. Dlatego też biomasa roślinna w nieodległej perspekty-

wie może stać się jednym z ważnych źródeł energii dla ludzkości, przetwarzanym m.in. na paliwa płynne.

Pomimo wieloletnich badań proces konwersji biomasy na paliwa płynne jest nadal skomplikowany z punktu widzenia enzymatycznego i ekologicznego. Stały postęp w badaniach, w szczególności nad wstępnym przygotowaniem substratu, enzymatyczną hydrolizą celulozy, biosyntezą enzymów celololitycznych i fermentacją pentoz znacznie przybliżył moment wdrożenia tej technologii. Na ograniczenie rozwoju technologii produkcji paliw płynnych z biomasy mają również wpływ wahania cen ropy naftowej na rynkach światowych.

Podstawowa trudność w biotechnologicznym wykorzystaniu biomasy wynika ze złożoności kompleksu ligninocelulozowego, będącego podstawowym składnikiem biomasy roślinnej i jego odporności na enzymatyczną hydrolizę. Czynniki limitującymi efektywność enzymatycznej hydrolizy materiałów ligninocelulozowych i celulozowych jest krystaliczność celulozy, zawartość ligniny i jej rozmieszczenie w strukturze tkanki roślinnej, powierzchnia właściwa celulozy i jej dostępność dla kompleksu celulaz. Dlatego też procesy, których celem jest enzymatyczna depolimeryzacja materiałów ligninocelulozowych powinny być poprzedzone wstępnym ich przygotowaniem (1,3,6). Zabiegi te mają na celu istotną zmianę charakteru czynników limitujących enzymatyczną hydrolizę celulozy, o których już wspomniano.

Celem badań była próba oceny wpływu warunków wstępnego przygotowania materiału ligninocelulozowego na późniejszą jego podatność na enzymatyczną hydrolizę.

## 2. Materiały i metody

Do badań użyto powietrznie suchej słomy pszennej, rozdrobnionej przy użyciu młynka młotkowego. Niefrakcjonowany, rozdrobniony surowiec poddano wstępnemu przygotowaniu polegającemu na impregnowaniu 10 g naważek 1,5% wodnym roztworem kwasu azotowego w ilości 50 cm<sup>3</sup> w ciągu 24 godzin, przeniesieniu do wysokociśnieniowego autoklawu o pojemności 250 cm<sup>3</sup> i ogrzewaniu biomasy w temperaturze 185°C w czasie 12 i 18 minut. W tym celu pojemnik autoklawu umieszczano w łaźni olejowej o temperaturze 220°C i po szybkim osiągnięciu temperatury 185°C (mierzonej przyrostem ciśnienia wewnątrz autoklawu) przenoszono do drugiej łaźni olejowej o stabilnej temperaturze 185°C na ustalony okres. Po tym czasie autoklaw gwałtownie schładzano w łaźni wodnej do temperatury ok. 20°C. Przygotowaną wstępnie biomasę przenoszono na lejek Bühnera i przez ok. 5 min strumieniem pary usuwano powstałe lotne produkty pirolizy. W następnej kolejności biomasę przemywano buforem cytrynowym w celu usunięcia z niej hydrolizatu hemice-luloz i nadmiaru kwasu azotowego. Do kolb Erlenmayera o poj. 500 cm<sup>3</sup> wprowadzano 10 g tak przygotowanej wstępnie ligninocelulozy (w przeliczeniu na suchą substancję substratu), dodawano odpowiednią dawkę celulaz i uzupełniano do obje-



tości  $100 \text{ cm}^3$  0,1 M buforem cytrynowym o  $\text{pH} = 4,8$ . Kolby z mieszaniną reagującą umieszczano na rotacyjnej wstrząsarce ( $200 \text{ obr.} \times \text{min}^{-1}$ ) z łaźnią wodną. Do enzymatycznej hydrolizy użyto celulaz pochodzących z hodowli fermentorowej grzyba strzępkowego z gatunku *T. reesei* M-7 na podłożu płynnym zawierającym laktozę. Enzymatyczną hydrolizę wstępnie przygotowanej biomasy, z której usunięto hydrolyzaty hemiceluloz, przeprowadzono w temperaturze  $50^\circ\text{C}$  w czasie 48 godzin, przy zróżnicowanych dawkach celulaz od 2,5 FPU/g do 50 FPU/g substratu, w celu określenia minimalnej dawki jednostek aktywności enzymów w stosunku do ilości substratu, przy której proces hydrolizy przebiegałby z możliwie największą szybkością i wydajnością. Odpowiednio po 1, 4, 24 i 48 godzinie doświadczenia pobierano próby do oznaczania ilości uwolnionych cukrów prostych.

Analizy cukrów wykonywano przy użyciu techniki HPLC w warunkach izokratycznych. W tym celu wykorzystano chromatograf cieczowy typu LC-5A Laboratorni Pstroje-Praha, wyposażonego w detektor refraktometryczny RID-K-102. Stosowano kolumnę SEPARON-SG-NH<sub>2</sub> ( $\varnothing 4 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ ) firmy TESSEK. Jako fazy ruchomej użyto mieszaniny acetonitrylu i dejonizowanej wody destylowanej w stosunku objętościowym 80 : 20. Objętość próbki nanoszonej na kolumnę wynosiła 20  $\mu\text{l}$ . Przed tym, próbki odbiałczano za pomocą 30% roztworu kwasu trójchlorooctowego (TCA), odpowiednio rozcieńczano eluentem i odwirowywano. Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę wynosiła 0,5  $\text{cm}^3/\text{min}$ . Poszczególne piki otrzymane na chromatogramach porównywano z odpowiednimi pikami substancji wzorcowych o znanym stężeniu w roztworze.

W celu oznaczenia ilości celulozy zawartej w materiale ligninocelulozowym odważano 1 g substratu (w przeliczeniu na suchą substancję) do próbki wirówkowej i zadawano 10  $\text{cm}^3$  67% roztworem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tak przygotowaną mieszaninę reagującą inkubowano na mikrowstrząsarce przez 1 godzinę w temperaturze otoczenia. Po tym czasie próbkę zobojętniano za pomocą BaCO<sub>3</sub>, wirowano przez 20 min przy  $10\,000 \times g$  i oznaczano w niej ilość cukrów jak wyżej. Zawartość celulozy w substracie wyliczano z zależności (1):

$$C = 0,9 \times m_G \quad (1)$$

gdzie:

C – wyliczona ilość celulozy zawartej w badanym substracie (g),

$m_G$  – masa glukozy w analizowanej próbce (g).

Stopień scukrzenia celulozy wyliczano na podstawie analizy zawartości cukrów w próbkach hydrolyzatów, korzystając z zależności (1) i definiowano jako stosunek masy celulozy scukrzanej do całkowitej masy celulozy zawartej w próbce.

### 3. Omówienie wyników badań

Tabela 1

Wpływ dawki enzymu i czasu hydrolizy na stopień scukrzenia celulozy zawartej w obrobionej wstępnie słomie pszennej w temperaturze 185°C wobec 1,5% kwasu azotowego w ciągu 12 minut

Ilość enzymu FPU/g	Czas trwania enzymatycznej hydrolizy (h) i odpowiadające mu scukrzenie celulozy (%)			
	1 (h)	4 (h)	24 (h)	48 (h)
2,5	6,14	15,69	40,59	44,65
5	15,32	29,92	59,72	70,35
10	18,42	51,02	71,90	73,14
15	27,92	51,02	80,01	87,66
25	39,64	57,69	92,19	87,66
50	49,13	64,36	91,03	91,01

Tabela 2

Wpływ dawki enzymu i czasu hydrolizy na stopień scukrzenia celulozy zawartej w obrobionej wstępnie słomie pszennej w temperaturze 185°C wobec 1,5% kwasu azotowego w ciągu 18 minut

Ilość enzymu FPU/g	Czas trwania hydrolizy enzymatycznej (h) i odpowiadające mu scukrzenie celulozy (%)			
	1 (h)	4 (h)	24 (h)	48 (h)
2,5	4,88	17,29	55,75	60,82
5	8,87	26,60	70,68	77,72
10	11,97	38,57	83,62	85,92
15	18,18	47,89	90,29	85,45
25	22,61	59,86	90,29	90,61
50	18,82	60,30	92,26	90,99

Celuloza natywna, jak i częściowo modyfikowana, składa się z frakcji krystalicznych trudno hydrolizujących i frakcji amorficznych łatwo hydrolizujących. Przebieg enzymatycznej hydrolizy można opisać równaniem matematycznym, co zaproponowali Lee i Fan oraz Okazaki i Moo-Young (2,4) przyjmując następujące założenia:

- celuloza składa się z dwóch frakcji o różnej podatności na hydrolizę,
- w celulozie substratu ligninocelulozowego, przygotowanego wstępnie do enzymatycznej hydrolizy ilość frakcji łatwo i trudno hydrolizującej jest stała dla określonych warunków obróbki wstępnej,
- frakcje łatwo i trudno hydrolizująca jednocześnie podlegają oddziaływaniu enzymów celulolitycznych,
- w procesie enzymatycznej hydrolizy celulozy można wyróżnić dwie reakcje pierwszorzędowe o różnych kinetykach.



Półempiryczny model matematyczny enzymatycznej hydrolizy celulozy zakłada przebieg reakcji jako sumę dwóch reakcji pierwszorzędowych, przebiegających z różną szybkością. Równanie matematyczne ujmujące tę zależność ma postać:

$$C = C_a \times \exp(-K_a \times t) + C_b \times \exp(-K_b \times t) \quad (2)$$

gdzie:

$C$  – ilość celulozy pozostałej w substracie po hydrolizie w czasie  $t$  (%),

$C_a$  – ilość frakcji celulozy łatwo hydrolizującej (%),

$C_b$  – ilość frakcji celulozy trudno hydrolizującej (%),

$K_a$  – stała szybkości reakcji frakcji celulozy łatwo hydrolizującej ( $h^{-1}$ ),

$K_b$  – stała szybkości reakcji frakcji celulozy trudno hydrolizującej ( $h^{-1}$ ),

$t$  – czas trwania hydrolizy enzymatycznej.

Na podstawie ilości cukrów uwolnionych w czasie hydrolizy (tab. 1 i tab. 2) obliczono ilość celulozy zhydrolizowanej w dowolnym czasie  $t$ , korzystając z równania ujmującego zależność pomiędzy ilością zhydrolizowanej celulozy a jej ilością pozostałą w substracie w dowolnym czasie  $t$ :

$$Y = (C_a + C_b) - C \quad (3)$$

gdzie:

$Y$  – ilość celulozy zhydrolizowanej po czasie  $t$ ,

$C_a$  – tak jak w równaniu 1,

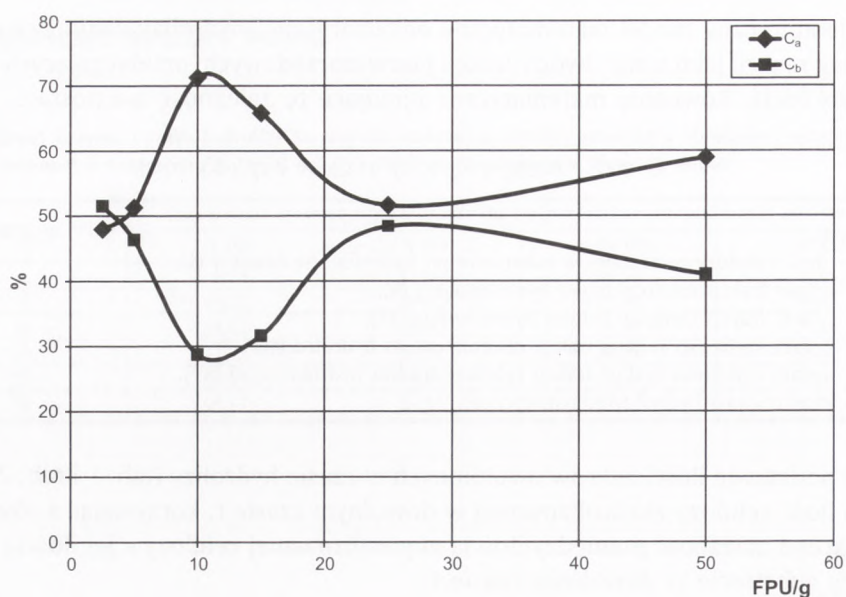
$C_b$  – tak jak w równaniu 1,

$C$  – ilość celulozy pozostała w substracie po czasie  $t$ .

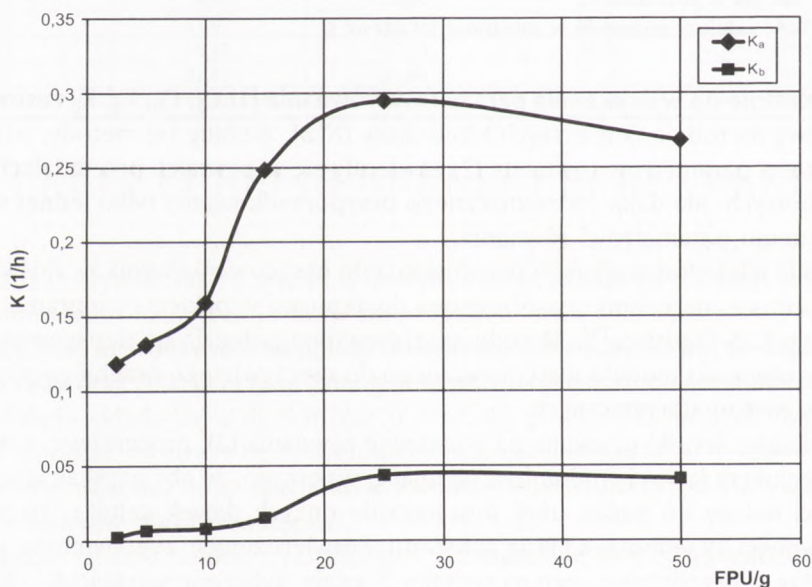
Pierwotnie do wyznaczenia parametrów równania (1)  $C_a$ ,  $C_b$ ,  $K_a$ ,  $K_b$  zastosowano nieliniową metodę najmniejszych kwadratów (NLS). Według tej metody, oszacowane wartości parametrów równania (2) zawierały się w pewnych przedziałach wartości liczbowych, nie dając jednoznacznego przyporządkowania tylko jednej wartości określonego parametrowi równania.

W celu ich jednoznacznego oszacowania do opracowania wyników doświadczeń posłużono się metodami quasi-Newtona dostępnymi w pakiecie programu komputerowego CSS-Statistica<sup>TM</sup>. Metody quasi-Newtona polegają na dopasowaniu parametrów równania modelu matematycznego do rzeczywistego przebiegu procesu za pomocą metod statystycznych.

Analizując wyniki uzyskane na podstawie równania (2), procentowej zawartości frakcji celulozy łatwo i trudno hydrolizującej wskazano, że aby uzyskać wiarygodne wartości należy do badań użyć dostatecznie dużych dawek celulaz, co najmniej o aktywności 20 jednostek FPU/g substratu. Potwierdzeniem tego wniosku jest analiza wykresu przedstawionego na rysunku 2, gdzie wyliczone wartości  $K_a$  i  $K_b$  z równania (2) miały zbliżone wartości, gdy dawka aktywności celulaz wynosiła ponad 20 jednostek FPU/g.

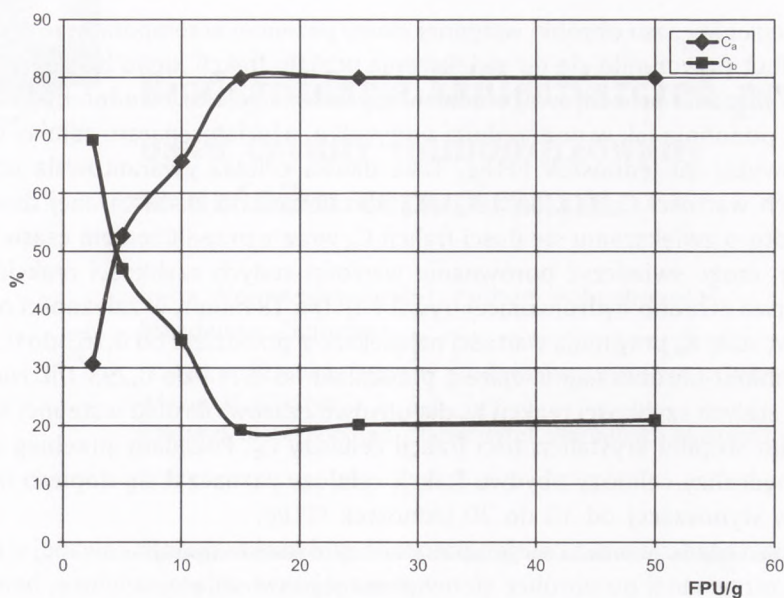


Rys. 1. Procentowa zawartość frakcji łatwo C<sub>a</sub> i trudno hydrolizującej C<sub>b</sub> w celulozie słomy pszennej poddanej uprzednio wstępnej obróbce w temp. 185°C w ciągu 12 min wobec 1,5% HNO<sub>3</sub>.

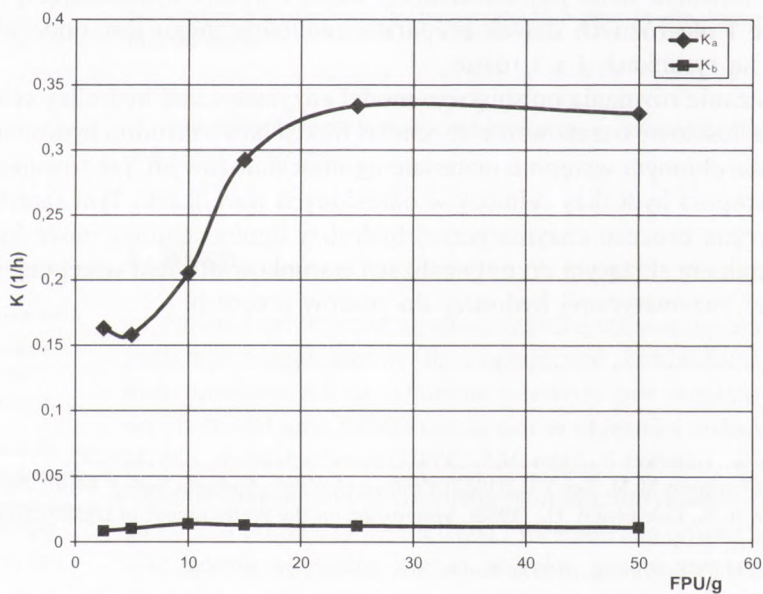


Rys. 2. Stałe szybkości reakcji enzymatycznej hydrolizy frakcji łatwo i trudno hydrolizującej celulozy słomy pszennej poddanej uprzednio wstępnej obróbce w temp. 185°C w ciągu 12 min wobec 1,5% HNO<sub>3</sub>.





Rys. 3. Procentowa zawartość frakcji łatwo  $C_a$  i trudno hydrolizującej  $C_b$  w celulozie słomy pszennej poddanej uprzednio wstępnej obróbce w temp.  $185^{\circ}\text{C}$  w ciągu 18 min wobec  $1,5\% \text{HNO}_3$ .



Rys. 4. Stałe szybkości reakcji enzymatycznej hydrolizy frakcji łatwo i trudno hydrolizującej celulozy słomy poddanej uprzednio obróbce wstępnej w temp.  $185^{\circ}\text{C}$  w ciągu 18 min wobec  $1,5\% \text{HNO}_3$ .

Zwiększenie czasu obróbki wstępnej słomy pszennej w temperaturze 185°C z 12 do 18 minut przyczyniło się do zwiększenia udziału frakcji łatwo hydrolizującej celulozy. Wyliczenie procentowego udziału tej frakcji i celulozy trudno hydrolizującej wymaga, podobnie jak w poprzednim przypadku, użycia preparatu celulaz o aktywności powyżej 20 jednostek FPU/g. Taka dawka celulaz gwarantowała uzyskanie zbliżonych wartości  $C_a$  i  $C_b$  oraz  $K_a$  i  $K_b$  niezależnie od zastosowanej dawki.

Ponadto o zwiększaniu się ilości frakcji  $C_a$  wraz z przedłużeniem czasu obróbki wstępnej, może świadczyć porównanie wartości stałych szybkości reakcji  $K_a$  i  $K_b$  frakcji łatwo i trudno hydrolizującej (rys. 2 i 4). Dla 18 minut, w zależności od dawki enzymów, stałe  $K_a$  przyjmują wartości największe z przedziału od 0,163 do 0,334 1/h, a dla 12 minut obróbki najmniejsze z przedziału od 0,111 do 0,295 1/h. Niewielkie wartości stałych szybkości reakcji  $K_b$  dla obydwu czasów obróbki wstępnej świadczą o wysokim stopniu krystaliczności frakcji celulozy  $C_b$ . Pożądaný przebieg enzymatycznej hydrolizy celulozy obydwu frakcji celulozy zaznaczał się dopiero od dawki enzymów wynoszącej od 15 do 20 jednostek FPU/g.

Przyczyn tego zjawiska należy upatrywać zarówno w skomplikowanej strukturze biomasy otrzymanej po obróbce słomy pszennej zawierającej celulozę, hemicelulozy i ligninę, a także w złożoności kompleksu celulaz i różnym oddziaływaniem poszczególnych składników celulaz z polimerami zawartymi w biomasie przy różnych dawkach preparatu enzymatycznego. Ponadto zastosowany model matematyczny nie uwzględniał wszystkich skomplikowanych oddziaływań typu „celulazy-celuloza” w układzie heterogennym, jaki stanowiła biomasa przygotowanej wstępnie słomy pszennej. Również samo pojęcie celulozy łatwo i trudno hydrolizującej jest mało precyzyjne i dla różnych dawek preparatu celulolitycznego jest ono, jak wynika z danych na rysunkach 1 i 3 różne.

Rozwiązanie równania opisującego model enzymatycznej hydrolizy celulozy pozwoliło na ilościowe oszacowanie obecności frakcji łatwo i trudno hydrolizującej celulozy w obrobionym wstępnie materiale ligninocelulozowym, jak również prognozowanie stopnia hydrolizy celulozy w określonych warunkach. Tym samym analiza matematyczna procesu enzymatycznej hydrolizy ligninocelulozy może być właściwym czynnikiem służącym do optymalizacji warunków obróbki wstępnej, jak i późniejszej jej enzymatycznej hydrolizy do cukrów prostych.

## Literatura

1. Excofer G., Toussaint B., Vigon M.R., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 279-292.
2. Fan L., Gharpuray M. M., Lee Y-H., (1987), *Cellulose Hydrolysis*, Springer-Verlag, Berlin, Haidelberg.
3. Grethlin H. E., Converse A. O., (1986), *Symposium on the Pretreatment of Ligninocellulosic Materials*, Graz, 8-15.
4. Okazaki M., Moo-Young., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 637-649.
5. Ratkowsky D. A., (1983), *Nonlinear Regression Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 4, 61-89.
6. Targoński Z., Rogalski J., Leonowicz A., (1992), *Acta Microbiologica Polonica*, 21, 158-162.