

Zdzisław TARGOŃSKI, Bohdan ACHREMOWICZ

Optimalizacja warunków wstępnego przygotowania trocin bukowych za pomocą wodno-dioksanowych roztworów wodorotlenku sodowego dla enzymatycznej hydrolizy celulozy

Оптимализация условий вступительной обработки буковых опилок при помощи водно-диоксановых растворов гидроокиси натрия для ферментативного гидролиза целлюлозы

Optimalization of Conditions for the Pretreatment of Beech Sawdust with Water-Dioxan Solutions of Sodium Hydroxide for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose

Wykorzystanie substratów lignocelulozowych w biotechnologii związane jest nieodłącznie z ich wstępnym przygotowaniem. Celem tego procesu jest między innymi redukcja krystaliczności celulozy, zwiększenie jej powierzchni właściwej oraz rozbitcie kompleksu lignocelulozowego. W ostatnich kilku latach szczególnie dużo uwagi poświęcono wstępnemu przygotowaniu substratów lignocelulozowych na drodze parowania i autohydrolizy w temperaturach 190–260°C oraz poprzez delignifikację substratu za pomocą rozpuszczalników organicznych z dodatkiem katalizatorów, tj. kwasów lub zasad (5, 6, 7, 9). Wymienione metody pozwalają nie tylko na otrzymanie masy celulozowej ulegającej enzymatycznemu scukrzeniu w 100%, ale także rozdzielają substrat lignocelulozowy na trzy frakcje: rozpuszczalną w H_2O zawierającą hydrolizaty hemiceluloz, frakcję ligninową rozpuszczalną w rozpuszczalnikach organicznych lub roztworach wodorotlenku sodowego i frakcję celulozową nierozpuszczalną w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Z celulozy i hemiceluloz w procesach fermentacyjnych można otrzymać różne związki chemiczne, jak etanol, butanol, aceton, aldehyd octowy, octan etylu i inne, a także biomasę zawierającą do 50% białka mikrobiologicznego. Lignina natomiast może być wykorzystana poprzez przekształcenia chemiczne do produkcji mas plastycznych, jonowymieniaczy czy produkcji aromatycznych związków organicznych (11).

Celem badań przedstawionych w tej pracy była optymalizacja warunków wstępnego przygotowania trocin bukowych z zastosowaniem wodno-dioksa-

nowych roztworów wodorotlenku sodowego dla enzymatycznej hydrolizy celulozy zawartej w tych trocinach. Zarówno obecność rozpuszczalnika organicznego, jak i wodorotlenku sodowego pozwalała nie tylko na usunięcie znacznej ilości ligniny z substratu, ale także wydatnie zwiększyła powierzchnię właściwą celulozy w porównaniu do np. celulozy otrzymanej w wyniku delignifikacji trocin bukowych kwaśnym roztworem wodnym dioksanu (dane nie publikowane).

METODY BADAŃ

WSTĘPNE TRAKTOWANIE TROCIN BUKOWYCH

Trociny bukowe ogrzewano w stalowym autoklawie o pojemności 250 cm³ zanurzonym w łaźni olejowej w temperaturze 140–170°C. Przed ogrzewaniem trociny zadawano wodnym roztworem dioksanu i wodorotlenku sodowego w stosunku roztwór do trocin jak 5:1. Stężenie NaOH stosowano w zakresie od 1 do 4%. Po osiągnięciu przez mieszaninę żądanej temperatury mierzono czas obróbki, a po zakończeniu procesu autoklaw chłodzono pod bieżącą wodą. Otrzymaną masę odsączano, przemywano wodą destylowaną, a następnie zobojętniano kwasem fosforowym do pH około 5,0.

ENZYMATYCZNA HYDROLIZA MASY CELULOZOWEJ

2 gramy otrzymanej masy celulozowej (w przeliczeniu na suchą masę) umieszczano w kolbach Erlenmayera o pojemności 100 cm³, dodawano 10 cm³ buforu octanowego 0,05 M o pH 5,2, zawierającego 0,05% NaN₃ i 0,1% mocznika oraz 30 cm³ roztworu enzymów celulolitycznych otrzymanych w wyniku hodowli *Fusarium sp.* 27 z 2% dodatkiem bibuły filtracyjnej i 0,2% kielków słodowych w pożywce (8). Zageszczony płyn pohodowlany wykazywał aktywność 0,8 jednostki FPU (Filter Paper Activity). Po dodaniu enzymów celulolitycznych mieszaninę inkubowano w temperaturze 45°C przez 24 godziny, okresowo pobierano próbki w celu określenia zawartości cukrów redukujących. Stopień scukrzenia polisacharydów zawartych w badanej masie celulozowej obliczano z następującej zależności:

$$\frac{\text{ilość cukrów redukujących w hydrolizacie} \times 0,9}{\text{zawartość polisacharydów w masie celulozowej}}$$

Zawartość węglowodanów w masie celulozowej oznaczano metodą Updegraffa (10), a zawartość cukrów redukujących w reakcji z kwasem 3,5-dwunitrosalicylowym wg Millera (4). Aktywność enzymów celulolitycznych oznaczano wg Mandeles i wsp. (2).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Stosunek woda : dioksan. W celu określenia wpływu dioksanu na proces wstępnego przygotowania trocin bukowych do enzymatycznej hydrolizy ogrzewano je w temperaturze 160°C z 4% wodnym roztworem wodorotlenku sodowego, a następnie z 4% wodno-dioksanowym roztworem NaOH (tab. 1).

Tab. 1. Wpływ stosunku dioksanu do wody na wydajność i stopień enzymatycznego scukrzenia masy celulozowej, otrzymanej po wstępnym przygotowaniu trocin bukowych
The influence of the proportion of dioxan to water on the efficiency and degree of enzymatic saccharification of cellulosic mass after the pretreatment of beech sawdust

Stosunek dioksan : woda	Wydajność masy w %	Stopień scukrzenia masy celulozowej w % po:	
		1 godzinie	24 godzinach
0 : 100	70,2	14,2	38,2
20 : 80	69,5	15,0	41,2
40 : 60	62,3	25,5	75,0
60 : 40	67,2	19,6	49,3
80 : 20	76,5	10,4	34,1

Temperatura obróbki 160°C, stężenie NaOH w roztworze 4%, czas działania 45 min.

Tab. 2. Wpływ temperatury obróbki trocin bukowych na wydajność i stopień scukrzenia masy celulozowej
The influence of the temperature of pretreatment of beech sawdust on the efficiency and degree of enzymatic saccharification of cellulosic mass

Temperatura °C	Wydajność masy w %	Stopień scukrzenia masy celulozowej w % po:	
		1 godzinie	24 godzinach
140	68,1	20,0	65,1
160	62,3	25,6	75,0
170	58,8	26,2	80,2

Stężenie NaOH w roztworze 4%, stosunek dioksan : woda 2 : 3, czas obróbki 45 min.

Okazało się, że zarówno wysoka zawartość dioksanu (80% roztwór), jak i jego brak, wpływają negatywnie na zwiększenie podatności otrzymanej masy lignocelulozowej na enzymatyczną hydrolizę. Najlepsze wyniki uzyskano, gdy stosunek dioksanu do wody wynosił 4:6.

Shimizu i Usami (7) badając wpływ metanolu na delignifikację substratów lignocelulozowych stwierdzili, że optymalny stosunek metanolu do wody w zależności od rodzaju drewna, wahał się od 4:1 do 1:1. Gdy stężenie metanolu wynosiło mniej niż 40% obserwowano gwałtowne obniżenie stopnia delignifikacji substratu lignocelulozowego i stopnia scukrzenia celulozy.

Temperatura. Trociny bukowe były ogrzewane w 4% wodno-dioksanowym roztworze wodorotlenku sodowego przez 45 min. w temperaturze 140, 160 i 170°C. Wyniki wydajności masy celulozowej i jej podatności na enzymatyczną hydrolizę przedstawiono w tabeli 2. Wzrostowi temperatury towarzyszyło obniżenie się wydajności masy celulozowej, a jednocześnie wzrastała podatność celulozy na enzymatyczną hydrolizę. Dalsze zwiększanie temperatury było niecelowe, ponieważ następowały znaczne ubytki masy celulozowej. Marton i Granzow (3) stosując wodno-etanolowy roztwór 1:1 wodorotlenku sodowego do otrzymywania pulpy celulozowej najlepsze wyniki uzyskali w zakresie temperatur 160–175°C.

Tab. 3. Wpływ czasu obróbki trocin bukowych 4% wodno-dioksanowym roztworem NaOH na wydajność masy celulozowej i stopień jej scukrzenia

The influence of the time of pretreatment of beech sawdust with 4% water-dioxan solution of NaOH on the efficiency and degree of enzymatic saccharification of cellulosic mass

Czas obróbki min	Wydajność masy w %	Stopień scukrzenia masy celulozowej w % po:	
		1 godzinie	24 godzinach
20	73,6	21,3	66,5
45	62,3	26,2	80,2
90	58,8	30,1	93,7
180	55,2	28,8	91,9

Temperatura obróbki 170°C, stosunek dioksan : woda 2 : 3.

Tab. 4. Wpływ stężenia roztworu wodorotlenku sodowego na wydajność i stopień scukrzenia masy celulozowej otrzymanej z trocin bukowych

The influence of concentration of the solution of sodium hydroxide on the efficiency and degree of enzymatic saccharification of cellulosic mass obtained from beech sawdust

Stężenie NaOH w roztworze %	Wydajność masy w %	Stopień scukrzenia masy celulozowej w % po:	
		1 godzinie	24 godzinach
1	76,6	8,7	30,4
2	68,8	7,9	31,9
3	64,5	25,0	62,5
4	62,3	29,3	88,0

Czas obróbki 120 min., stosunek dioksan : woda 1 : 1, temperatura działania 160°C.

Czas obróbki. W tabeli 3 podano wpływ czasu obróbki trocin bukowych w temperaturze 170°C wodno-dioksanowym roztworem NaOH na wydajność i podatność otrzymanej masy celulozowej na enzymatyczną hydrolizę. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano podczas 90 minutowego działania roztworem, gdyż przy wydajności 58,8% uzyskano 93,7% scukrzenia węglowodanów zawartych w masie celulozowej. Wydłużenie czasu działania powodowało obniżenie wydajności masy celulozowej, a nie wywoływało wzrostu dynamiki scukrzenia celulozy enzymami celulolitycznymi.

Stężenie wodorotlenku sodowego. Wodorotlenek sodowy spełnia decydującą rolę w procesie wstępnego przygotowania celulozy trocin bukowych do enzymatycznej hydrolizy. Powoduje on delignifikację substratu lignocelulozowego stymulowaną obecnością rozpuszczalnika organicznego, jak również pęcznienie celulozy, co związane jest ze wzrostem jej powierzchni właściwej, a tym samym większym kontaktem enzymów z celulozą. Z danych przedstawionych w tabeli 4 wynika, że stężenie NaOH w roztworze do 2%, przy module trocin do roztworu 1 : 5, pozwalało na enzymatyczne scukrzenie celulozy tylko w 31,9%. Dopiero wzrost stężenia NaOH do 3%, a następnie do 4% spowodował wydatny wzrost scukrzenia celulozy trocin bukowych.

Wysoki stopień scukrzenia celulozy trocin bukowych otrzymanych po

działaniu wodno-dioksanowym roztworem wodorotlenku sodowego przy stosunkowo niewielkim zużyciu preparatu celulolitycznego wskazuje na dużą skuteczność tej metody obróbki substratów lignocelulozowych. Wadą tej metody jest jednak znaczne zużycie NaOH oraz konieczność regeneracji dioksanu. Dioksan można zastąpić również innymi rozpuszczalnikami organicznymi, jak metanol, etanol czy aceton (7), o niższej temperaturze wrzenia niż dioksan. Efekty enzymatycznej hydrolizy otrzymanej masy celulozowej będą podobne. Jeżeli wodorotlenek sodowy zastąpimy innymi katalizatorami przyspieszającymi delignifikację substratu lignocelulozowego jak np. NH_4OH , HCl , AlCl_3 i inne, efekty związane ze zwiększeniem powierzchni właściwej celulozy w porównaniu do NaOH będą znacznie mniejsze. Konsekwencją tego będzie wydłużenie czasu enzymatycznej hydrolizy dla osiągnięcia tego samego stopnia scukrzenia celulozy lub konieczność stosowania preparatu celulolitycznego o kilkakrotnie wyższej aktywności.

Optymalne warunki wstępnego przygotowania substratów lignocelulozowych rozpuszczalnikami organicznymi zależą zarówno od rodzaju tych substratów, jak i warunków działania. Lipiński (1) podaje następujące parametry działania: temperatura 165–225°C, stosunek cieczy do ciała stałego 4:1 i 20:1, zawartość alkoholu w użytej mieszaninie około 50%, czas ogrzewania 0,5–12 godzin. Szczególnie trudne w obróbce są trociny drzew iglastych, dlatego zastosowano wysoką temperaturę obróbki, przy niższych temperaturach wydłuża się czas trwania procesu.

W wyniki przeprowadzonych badań określono optymalne warunki dla wstępnego przygotowania trocin bukowych do enzymatycznej hydrolizy celulozy. Proces ten prowadzono z zastosowaniem wodno-dioksanowego roztworu wodorotlenku sodowego, stosując następujące parametry: stosunek dioksanu do wody 2:3, moduł trociny — roztwór 1:5, stężenie wodorotlenku sodowego 4%, czas ogrzewania 90 min., temperatura obróbki 170°C. Enzymatyczną hydrolizę masy celulozowej otrzymanej w wyniku przedstawionego procesu obróbki wstępnej, prowadzono za pomocą enzymów celulolitycznych otrzymanych z hodowli *Fusarium sp.* 27, uzyskując ponad 90% scukrzenia celulozy.

PIŚMIENNICTWO

1. Lipiński E. S.: Disruption and Fractionation of Lignocellulose Wood and Agricultural Residues. Edited by Saltes. Ed. J. Academic N.Y. 489, 1983.
2. Mandels M., Andreotti R., Roche C.: Measurement of Saccharifying Cellulase. Biotech. Bioeng. Symp. 21, 1976.
3. Marton R., Granzow W.: Ethanol-alkali pulping. Tappi 66, 103, 1982.
4. Miller G. L.: Use of DNSA Reagent for Determination of Reducing Sugars. Annal. Chem. 31, 426, 1959.

5. Murphy V. G., Linden J. G., Moreira A. R., Dockrey K.: Use of Geothermal Hot Water to Pretreat Lignocellulosic Materials. Second Chemical Congress of the N. America. Las Vegas, 1980.
6. Phillips J. A., Humphrey A. E.: Process Technology for the Biological Conversion of Lignocellulosic Materials to Fermentable Sugars and Alcohols. Wood and Agricult. Residues. Edited by Saltes. Ed. J. Academic N. Y. 503, 1983.
7. Shimizu K., Usami K.: Enzymatic hydrolysis of wood. III. pretreatment of wood with acidic methanol-water mixture. Mokuzai Gakkaishi 24, 632, 1978.
8. Targoński Z.: Enhanced cellulolytic enzymes biosynthesis of *Fusarium* sp. strain by mutation and optimalization of culture conditions. Acta Microbiol. Pol. 32, 153, 1983.
9. Targoński Z.: Enzymatyczna hydroliza celulozy i wstępne przygotowanie drewna bukowego celulazami *Fusarium* sp. 27. Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny 27(9), 7, 1983.
10. Updegraff D. M.: Semimicro determination of cellulose in biological materials. Analyt. Biochem. 32, 420, 1969.
11. Wayman M.: Alcohol from Cellulose: the Autohydrolysis-extraction Process. IV Intern. Symposium on Alcohol Fuels Technology. Guarujá (Brazil) 1980.

РЕЗЮМЕ

Были установлены оптимальные условия вступительной подготовки буковых опилок для ферментативного гидролиза целлюлозы. Процесс подготовки опилок проводился с применением водно-диоксанового раствора гидроокиси натрия, приготовленного в следующих пропорциях: соотношение диоксана и воды 2:3, концентрация гидроокиси натрия 4%, модуль опилок раствор 1:5. Опилки, на которые воздействовал водно-диоксановый раствор гидроокиси натрия, обогревались затем в течение 90 минут в температуре 170°C в стальном автоклаве емкостью 250 см³, погруженном в масляную ванну. Ферментативный гидролиз целлюлозной массы, полученной в результате представленного здесь процесса вступительной обработки, проводился с помощью целлюлярных ферментов из культуры штамма *Fusarium* sp. 27. Было получено свыше 90% осахарения целлюлозы.

SUMMARY

Optimum conditions for pretreatment of beech suwdust for enzymatic hydrolysis of cellulose, were determined. The process of preparing the sawdust was going on using water-dioxan solution of sodium hydroxide which was prepared in the following proportions: dioxan : water = 2:3, concentration of sodium hydroxide of 4%, modulus of sawdust : solution = 1:5. Beech sawdust flooded with water-dioxan solution of sodium hydroxide, was heated for 90 minutes in the temperature of 170°C in a steel autoclave with the volume of 250 cm³ immersed with oil bath. Enzymatic hydrolysis of cellulose mass obtained in this pretreatment, was carried out with the help of cellulosic enzymes from the culture of the *Fusarium* strain, sp. 27, obtaining over 90% of saccharification of cellulose.



ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XL

SECTIO B

1983

21. M. Wilczek, T. Olczak: The Influence of Weather and Soil Conditions on the Growth of Sesuvella Seeds (Oenothera lutea, var.) in the Lublin Region.
22. J. Borowicz, J. Magieraki: Description of the Mechanical Fractures of the Soil Formed from Different Polymers.
23. J. Kaniuczak, E. Turak: The Influence of Agrostis on the Fertility of Phosphorus and Potassium of the Soil in the Lublin Region of the Podlaskie Voivodeship.
24. M. Mitrzal, H. Smał: Translocation of Nitrogen, Phosphorus and Potassium in Soil Profile in Shallow Underground Water.
25. T. Skowrońska: The Influence of PAB on the Activity of Soil Fungi and Coliforms and Ammonification on Zinc.
26. J. Furczak: Microbiological Changes of Soil in the Presence of the Heavy Metals: Manganese and Lead.
27. A. Szwed: Antagonistic Effect of Atrilla Rhizomorphs on Soil Fungi. Part I. Introductory Selection of Bacteria Species Growing on Atrilla Rhizomorphs.
28. K. Gostkowska: Microbiological Development of Soil Profile. Part I. Occurrence of Microorganisms Degrading Dinitrochlorobenzene in Soil and Industrial Wastes.
29. H. Górecka, S. Rujak, Z. Targoński: Fungicide Activity of Atrilla Rhizomorphs of Different Concentration of the Extract.
30. B. Achremowicz: Tests of the Synthesis of Proteins of the Microbiological Raw Products Submitted to the Pretreatment Influence of Atrilla.
31. J. Lipiecki, J. Wierzyńska, J. Seliwa: The Influence of Atrilla Rhizomorphs on the Fertilizing of Hardwood Cuttings of Red Currant of *Cornus sanguinea* L. in the Tropics.
32. J. Lipiecki, E. Stanczyk: The Influence of the Species and Growth of Hardwood Cuttings on Their Rooting and Some Physiological Parameters.
33. Z. Kalinowski: The Influence of Bacteria Rhizomorphs on the Growth and Rooting of Malus Apple Trees.

Tłoczono w Zakładzie Poligrafii AR, zam 551/89 n.700

Wydrukowano w lutym 1990 roku

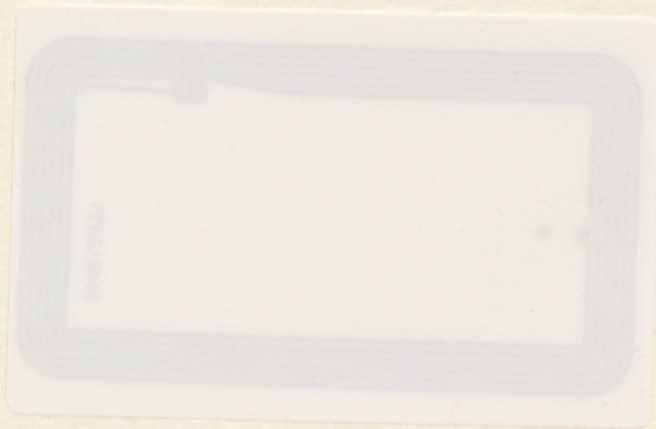
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XL

SECTIO E

1985

21. M. Wilczek, T. Olszak: The Influence of Weather and Soil Conditions on the Crops of Serradella Seeds (*Ornithopus Sativus* Brot.) in the Lublin Region.
22. J. Borowiec, J. Magierski: Distribution of Boron in Particular Mechanical Fractions of the Soils Formed from Different Parent Rocks.
23. J. Kaniuczak, R. Turski: The Influence of Agrotechnology on the Fertility in Phosphorus and Potassium of the Soils in the Central Part of the Podkarpackie Depression.
24. M. Misztal, H. Smal: Translocation of Potassium, Sodium and Phosphorus in Soil Profiles to Shallow Underground Water.
25. T. Skowrońska: The Influence of NaCl on the Sensitivity of Some Fungi and Cellulolytic Antinomycetes on Zinc.
26. J. Furczak: Microbiological Changes of Cellulose in the Presence of Argillaceous Minerals and Lead.
27. A. Szwed: Antagonistic Effect of Alfalfa Rhizosfera Bacteria on Some Soil Fungi. Part I. Introductory Selection of Bacteria Species Antagonistically Effecting Soil Fungi.
28. K. Gostkowska: Microbiological Decomposition of Nitrophenols. Part I. Occurrence of Microorganisms Degrading Dinitroalkalophenols in Soils and Industrial Waters.
29. H. Górecka, S. Bujak, Z. Targoński: Fermentative Activity of Apple Juices of Different Concentration of the Extract.
30. B. Achremowicz: Tests of the Synthesis of Protein (SCP) on Ligno-cellulolytic Raw Products Submitted to the Pretreatment Influence of Alkalies.
31. J. Lipecki, J. Wieniarska, J. Selwa: The Influence of Gesatop 50 and IBA on the Rooting of Hardwood Cuttings of Red Currant of Jonkheer van Tets Variety.
32. J. Lipecki, R. Stanek: The Influence of the Spacing and the Periods of Planting Softwood Cuttings on Their Rooting and Some Physiological Indicators.
33. Z. Kalinowski: The Influence of Bouche-Thomas Lattice Crown and Loose Palmette on the Growth and Fruiting of MACOUN Apple Tree.



BIBLIOTEKA GŁÓWNA
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

91485

1986

Adresse:

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

BIURO WYDAWNICTW

Plac Marii

Curie-Skłodowskiej 5

20-031 LUBLIN

POLOGNE

Cena zł 750,-