

Enzymatická hydrolýza saturovaného dreva paulovnie predspracovaného cyklickým zmrazovaním a rozmrazovaním

Štefan Boháček*, Michal Halaj, Andrej Pažitný, Jozefína Gallová
Výskumný ústav papiera a celulózy, a.s., Bratislava
bohacek@vupc.sk

Abstrakt

Predkladaný článok sa zaoberá vplyvom cyklického účinku zmrazovania a rozmrazovania dreva rýchlorastúcej dreviny na celkový výťažok monosacharidov. Počet cyklov zmrazovania 0, 5, 10, 15 a 20 pri teplote -20°C bol aplikovaný na výmladkové drevo frakcií > 5 mm a < 0.7 mm. Experimentálne porovnanie sa uskutočnilo na vzorkách viac saturovaných vodou získaných varením pri atmosférickom tlaku a vzorkách menej saturovaných získaných impregnáciou pri 50°C . Výťažky glukózy a xylózy boli sledované po 72 a 96 hod trvania enzymatickej hydrolýzy pri 15% zanáške enzýmu na celkový vstupný obsah celulózy. Maximálny výťažok bol 38.2 g/L monosacharidov frakcie < 0.7 mm po 20-tom cykle a 96 h enzymatickej hydrolýzy. Podiel konverzie pri najvyššom výťažku bol 43.7%.

Kľúčové slová: Cyklické zmrazovanie, predspracovanie, varenie, impregnácia vodou, paulovnia, enzymatická hydrolýza, monosacharidy, glukóza, xylóza.

Úvod

Jedná z metód sprístupnenia celulózy enzýmom je kryolýza. Malé kryštály ľadu na mikro a nano úrovni sa tvoria v lúmenoch vodou dokonale naimpregnovanej biomasy a zväčšovaním objemu pri zmene skupenstva a ostrými hranami rastúcich kryštálikov zároveň spôsobujú deštrukciu v substráte (Boháček et al. 2020). Účinku zmrazovania biomasy sa venovali viacerí autori (Chang et al. 2011, Deng et al. 2018, Wang et al. 2013, Rooni et al. 2017, Echeverria et al. 2018, Yuan et al. 2019, Li et al. 2019a, Yang et al. 2009, Smichi et al. 2016). Pre kompaktnjšiu drevnú hmotu (dendromasu) sa kombinuje zmrazovanie s anorganickými rozpúšťadlami (Jeong et al. 2016, Li et al. 2019b, Su and Fang 2017). Z pohľadu použitých teplôt je možné rozdeliť výskum kryolýzy na: mrazenie pri bežných teplotách pri -20°C (max. -30 až -40°C), čo je možné docieľiť konvenčnými výmenníkmi tepla, hlboké mrazenie (deep freezing) pri -80°C , čo je možné dosiahnuť napr. suchým ľadom a kryolycké mrazenie pri -196°C získaných pomocou chladiacej zmesi alebo kryogénnej kvapaliny. Ekvivalentný priemer ľadových kryštálov potom predstavuje hodnoty okolo $12,6$ μm ; $3,6$ μm a $1,2$ μm (Nesvadba 2008). Ľadové kryštály vznikajú z jadier kritickej veľkosti (nukleačné centrá), ktoré následne rastú. Pre predúpravu zmrazovaním má veľký význam extracelulárny ľad, ktorý vzniká v medzibunkových priestoroch. Preto je dostatočné preimpregnovanie drevného substrátu voľnou vodou (voda nachádzajúca sa v lúmenoch dreva) veľmi dôležitá. Zmrazená viazaná voda v dreve neexistuje až do teploty -80°C (Thygesen a kol. 2010). Z pohľadu deštrukcie ľadom je obsah vody v dreve významný iba v beľovej časti v určitom období roka a pohybuje sa nad hranicou 150%. Drevo po vyťažení vlhkosť stráca, pričom ako prvá sa stráti voľná voda. Problém pre opakovanú sorpciu už zoschnutého dreva je v uzatváraní vodivých ciest v jeho štruktúre.

Cyklické zmrazovanie a rozmrazovanie predstavuje možnosť ako zefektívniť účinok mrazenia pri nízkych teplotách bez použitia chemikálii. Obsah voľnej vody v substráte je však potrebné zvýšiť. V tomto prípade sme zvolili proces varenia pri atmosférickom tlaku.

Materiál a metódy

Laboratórne vzorky

Na experimentálne vyšetovanie bola použitá drevina paulovnia. Paulovnia bola obstaraná vo forme mladých výmladkov do priemeru 4,5 cm z regiónu Bratislava a okolie. Odkôrnené vzorky boli štiepkované na laboratórnom diskovom štiepkovači 2,8 kW s jedným nožom. Vzniknutá frakcia bola sitovaná a delená na hrubšiu a jemnejšiu frakciu a pedsušaná pri laboratórnej teplote. Následne sa uvedená frakcia mlela na nožovom mlyne (Brabender®, GmbH & Co. KG, Nemecko) so sitom 0.7 mm. Na experimenty boli použité frakcie > 5 mm a < 0.7 mm. Vzorky boli uskladnené v uzavretom polypropylénovom sáčku.

Na sušinových váhach Denver IR 35 bola stanovená sušina vzorky 94,2%. Na kvantifikáciu jednotlivých zložiek dreva (Tab. 1) boli použité bežné analytické metódy. Obsah popola sa stanovil podľa normy ISO 1762, obsah extraktívnych látok v dichlórmetáne podľa normy Tappi T 204 cm-94 a v horúcej vode podľa normy Tappi T 207 cm-08. Obsah Klasonovho lignínu sa stanovil podľa normy Tappi T 222 om-98 a lignínu rozpustného v kyseline podľa normy Tappi UM 250. Obsah glukánu, xylánu, manánu, galaktánu a arabinánu sa vypočítal na základe koncentrácií glukózy, xylózy, manózy, galaktózy a arabinózy v hydrolyzáte po stanovení lignínu.

Stanovenie monosacharidov HPLC metódou

Pred stanovením monosacharidov bol hydrolyzát po stanovení lignínu spracovaný so 4% H₂SO₄ pri 121°C po dobu 2 h, aby prebehla hydrolyza oligosacharidov. Následne bol hydrolyzát zneutralizovaný s BaCO₃. Na stanovenie monosacharidov sa použil chromatografický systém HPLC od spoločnosti CHROMSERVIS SK s.r.o. s kolónou Rezex ROA H⁺. Mobilná fáza pozostávala z 0,0025 M roztoku kyseliny sírovej v deionizovanej vode. Vzorky zneutralizovaných hydrolyzátov sa prefiltrovali pretlačením pomocou injekčnej striekačky cez jednorazový teflónový filter (MS PTFE, veľkosť pórov 0,22 µm). Po prefiltrovaní sa z každej vzorky odobral objem 0,5 ml, ktorý sa zriedil deionizovanou vodou 20-krát na konečný objem 10 ml. Takto upravená vzorka sa dávkovala do kolóny. Analýzy sa uskutočňovali pri teplote 30°C a prietoku 0,5 ml/min. Každá analýza bola vykonaná minimálne dvakrát.

Tab. 1: Chemické zloženie výmladkového dreva paulovnie.

paulovnia- mladé drevo	Monosacharidy	Lignín	Extraktívne látky	Popol
	(%)			
	62,9	27,2	6,2	0,5

Impregnácia vodou a varenie

Na porovnanie experimentálnych výsledkov sa pripravili vzorky: a) prevarené, b) neprevarené. Na impregnáciu vzoriek sa použil pomer 12.5 g vzorky a 100 mL teplej

destilovanej vody. Zmes sa vložila do trepačky ES-20/60 (BioSan Ltd., Lotyšsko) na 24 h pri teplote 60°C. Následne sa určené vzorky prevarili pod refluxom počas 30 min.

Cyklické zmrazovanie

Vzorky impregnované vodou boli premiestnené do sáčikov a umiestnené do mraziaceho boxu s teplotou -20°C. Po dokonalom zmrazení boli vzorky rozmrazované v mikrovlnnej rúre. Procedúru zmrazovania a rozmrazovania sme opakovali 5, 10, 15 a 20 krát. Vzorka s označením „0“ nebola podrobená zmrazovaniu. Vzorky pred enzymatickou hydrolýzou boli zomleté na Jokro mlyne, frakcia > 5 mm sa mlela počas 45 min a frakcia < 0.7 mm počas 30 min.

Na enzymatickú hydrolýzu sa použil Cellic CTec od spoločnosti Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark) priamo určený na degradáciu lignocelulóзовých materiálov na fermentovateľné monosacharidy. Aktivita enzýmu bola laboratórne stanovená na 1.700 BHU/g. Zanáška enzýmu predstavovala 15%. Vzorky boli uložené v plastových uzavretých bankách a vložené do inkubátora s vyhrievaním na 50°C a otáčkami 150 min⁻¹. Odoberanie vzoriek sa uskutočnilo po 72 a 96 hod.

Koncentrácia monosacharidov bola stanovená pomocou procedúry National Renewable Energy Laboratory (Sluiter et al. 2008). Monosacharidy (glukóza, xylóza) boli stanovené použitím metódy HPLC s kolónou Rezex ROA (organic acid) H⁺ column. Mobilná fáza predstavovala 0.0025 M, prietok kyseliny sírovej 0.5 ml/min pri teplote do 30°C. Chromatografické dáta boli spracované softvérom Clarity version 5.3.0.180 (DataApex Ltd., Česká republika).

Výsledky a diskusia

Paulownia pochádza z Číny a je rozšírená po celom svete. Jej drevo je ľahké a pevné a preto sa používa v nábytkárskom, leteckom priemysle, na výrobu preglejok, hračiek a hudobných nástrojov a tiež aj ako rýchlorastúca drevina na energetické využitie s krátkym optimálnym rubným vekom. Taktiež je vhodná aj na obnovenie lesov na pôdach chudobných na živiny a je odolná voči suchu (Ipekci, & Gozukirmizi, 2003; Yan, Joshee, & Liu, 2016).

V tejto práci sa sledovala závislosť výťažku od veľkosti častíc dreva (pod 0.7 mm a nad 5 mm) a tiež závislosť od predspracovania varením materiálu počas 30 min. Výsledky sú uvedené v tab. 1 a tiež sú znázornené na obr. 1-3.

Výsledky ukazujú, že výraznejší vplyv na výťažok má veľkosť častíc než spracovanie varom, dokonca v prípade glukózy vo frakcii <0.7 mm po prevarení a 72 h hydrolýzy bol výťažok nižší oproti neprevarenej vzorke po 20 cykloch zmrazovania-rozmrazovania. Podobne aj rozdiely vo výťažkoch medzi hydrolýzou počas 72 až 96 h sú takmer zanedbateľné (dokonca po 96 h boli aj nižšie výťažky oproti 72 h hydrolýzy). Maximálny výťažok monosacharidov sa dosiahol pri frakcii <0.7 mm po prevarení, 20 cykloch zmrazovania-rozmrazovania a 96 h hydrolýzy (38.2 g/L), čo je oproti výťažku pri frakcii <0.7 mm neprevarenej vzorky po 0 cykloch a 72 h hydrolýzy o 37% vyšší a oproti neprevarenej frakcii >5 mm 0 cykloch a 72 h hydrolýzy o 57% vyšší. Podiel konverzie pri maximálnom výťažku bol 43.7% použitím rovnice (1) Stankovska a kol. (2018):

$$\text{konverzia (\%)} = \frac{C_{\text{monosacharidov}} \times V \times 0.9}{X_{\text{monosacharidov}} \times m} \times 100, \quad (1)$$

kde: v čitateli sa dosadzuje koncentrácia monosacharidov ($C_{\text{monosacharidov}}$) pri výťažku, objem hydrolyzačného (V) výluhu, 0.9 je faktor konverzie a v menovateli podiel monosacharidov v materiáli ($X_{\text{monosacharidov}}$) a dávka materiálu (m).

V práci Jeong a kol. (2016) po kryolýze a dvojstupňovej hydrolýze biomasy mongolského duba dosiahli podiel konverzie monosacharidov až vyše 90%. V práci Boháček a kol. (2020) sa autori venovali rozmrazovaniu a zmrazovaniu beľovej časti topoľového dreva (*Populus alba*), kde sledovali rozdiely medzi predspracovaním naimpregnovaného dreva vodou a dreva bez impregnácie. Výsledky v tomto experimente ukázali malé rozdiely vo výťažkoch monosacharidov (35.5 g/L pre „suché“ drevo a 37.2 g/L pre naimpregnované drevo). V tejto práci sa taktiež sledovalo aj cyklické zmrazovanie-rozmrazovanie topoľového dreva a podiel konverzie po 20. cykle zmrazovania-rozmrazovania a 48 h enzymatickej hydrolýzy bol podobný ako v tejto práci, 42.6%.

V práci Pažitný et al. (2020) sa autori venujú rozdielom v beľovej a jadrovej časti dreviny *Populus alba* s porovnaním jednoročného výmladku toho istého druhu. Ako metódu predspracovania použili parnú explóziu, rozdiely sa preukázali pri výťažku monosacharidov, v prípade jadrovej časti (90 g/L), beľovej časti (85 g/L) a výmladku (77 g/L).

Tab. 1: Výťažky monosacharidov pre vzorky mladého dreva paulovnie frakcií <0.7 a >5 mm po 72 hod enzymatickej hydrolýzy.

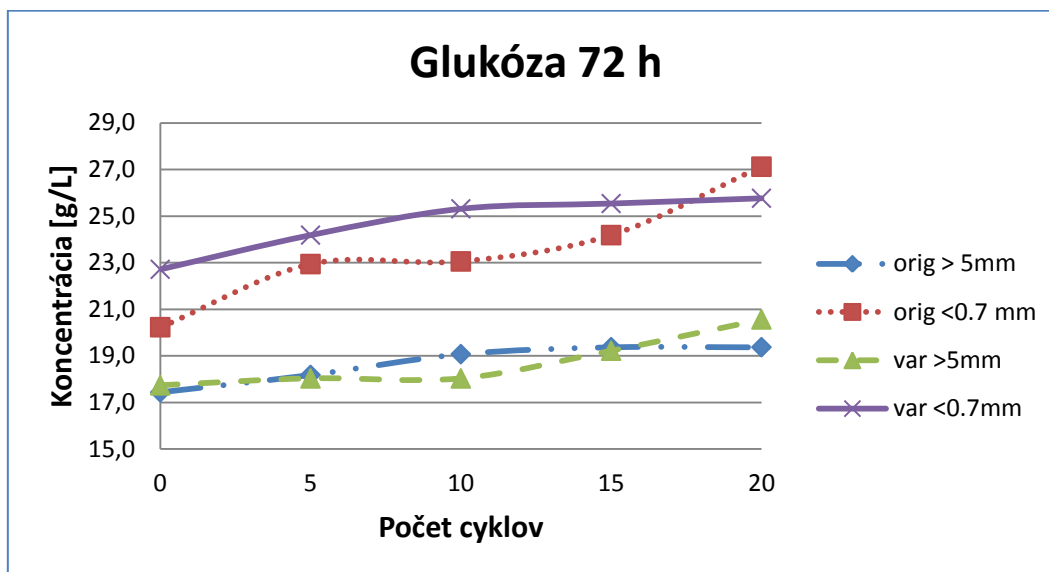
Zmrazovanie - rozmrazovanie (počet cyklov)	Neprevarené 72 hod					
	Glukóza (g/L)		Xylóza (g/L)		Spolu (g/L)	
	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm
0	17.4	20.2	7.0	7.7	24.4	27.9
5	18.2	22.9	7.3	7.7	25.5	30.7
10	19.1	23.1	7.5	8.5	26.5	31.5
15	19.4	24.2	7.7	9.5	27.1	33.7
20	19.4	27.1	7.7	9.5	27.1	36.6
	Prevarené 72 hod					
	Glukóza (g/L)		Xylóza (g/L)		Spolu (g/L)	
	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm
0	17.7	22.7	6.7	8.9	24.4	31.6
5	18.0	24.2	6.9	8.9	24.9	33.1
10	18.0	25.3	7.2	9.0	25.2	34.4
15	19.2	25.5	7.3	9.3	26.5	34.8
20	20.6	25.8	7.7	9.6	28.3	35.4

Tab. 2: Výťažky monosacharidov pre vzorky mladého dreva paulovnie frakcií <0.7 a >5 mm po 96 hod enzymatickej hydrolýzy.

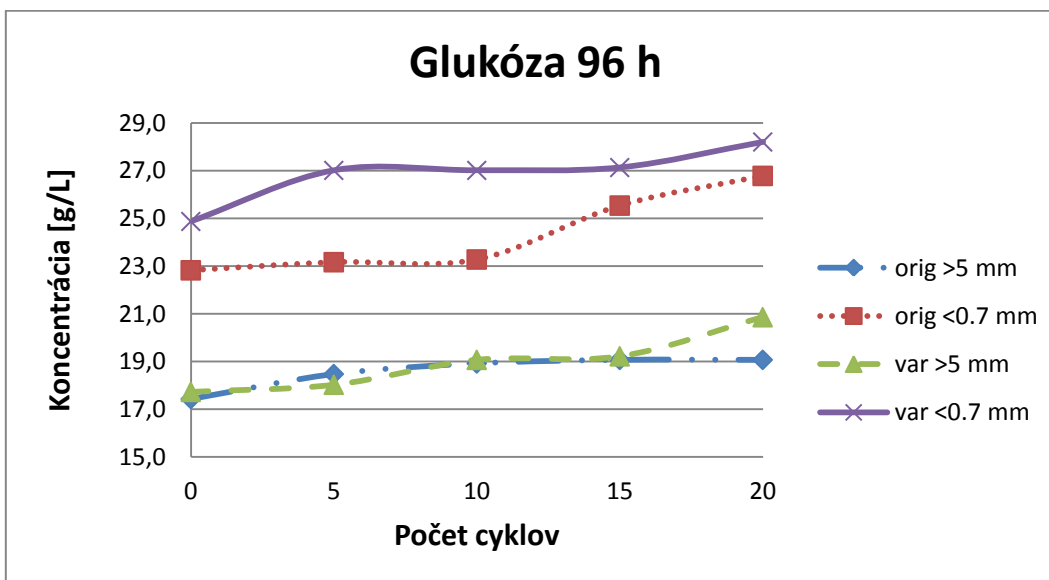
Zmrazovanie - rozmrazovanie (počet cyklov)	Neprevarené 96 hod					
	Glukóza (g/L)		Xylóza (g/L)		Spolu (g/L)	
	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm
0	17.4	22.8	7.2	8.0	24.6	31.2
5	18.5	23.2	7.6	8.5	26.1	31.3
10	18.9	23.3	7.7	8.6	26.7	31.8
15	19.1	25.5	7.7	9.3	26.8	34.8

20	19.1	26.8	7.7	9.4	26.8	36.2
	Prevarené 96 hod					
	Glukóza (g/L)		Xylóza (g/L)		Spolu (g/L)	
	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm	> 5 mm	< 0.7 mm
0	17.7	24.9	6.3	9.2	24.0	33.9
5	18.0	27.0	6.9	9.8	24.9	36.9
10	19.1	27.0	7.0	9.9	26.1	36.9
15	19.2	27.1	7.5	10.0	26.7	37.0
20	20.9	28.2	7.9	10.0	28.8	38.2

a)

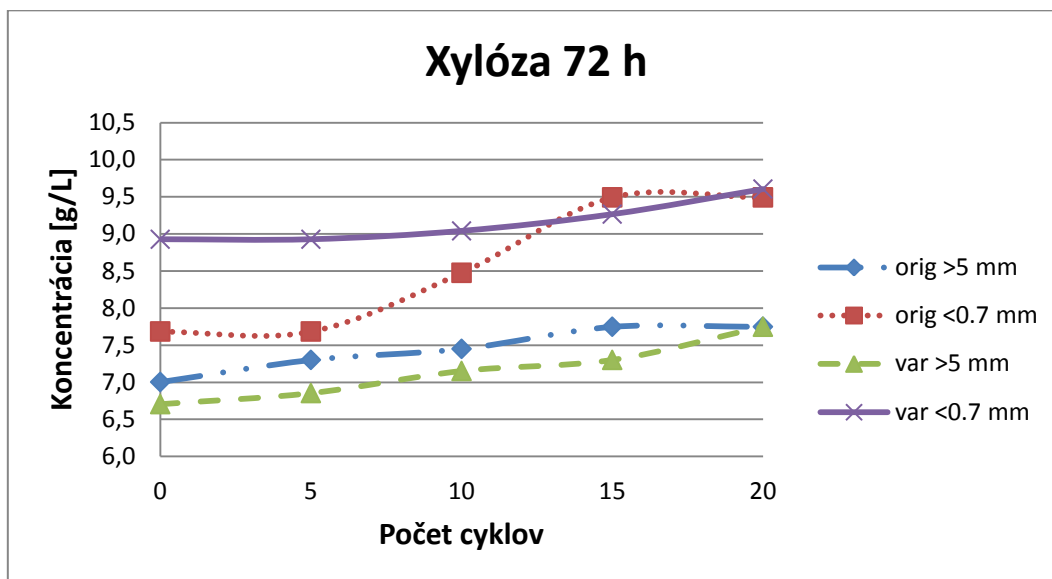


b)

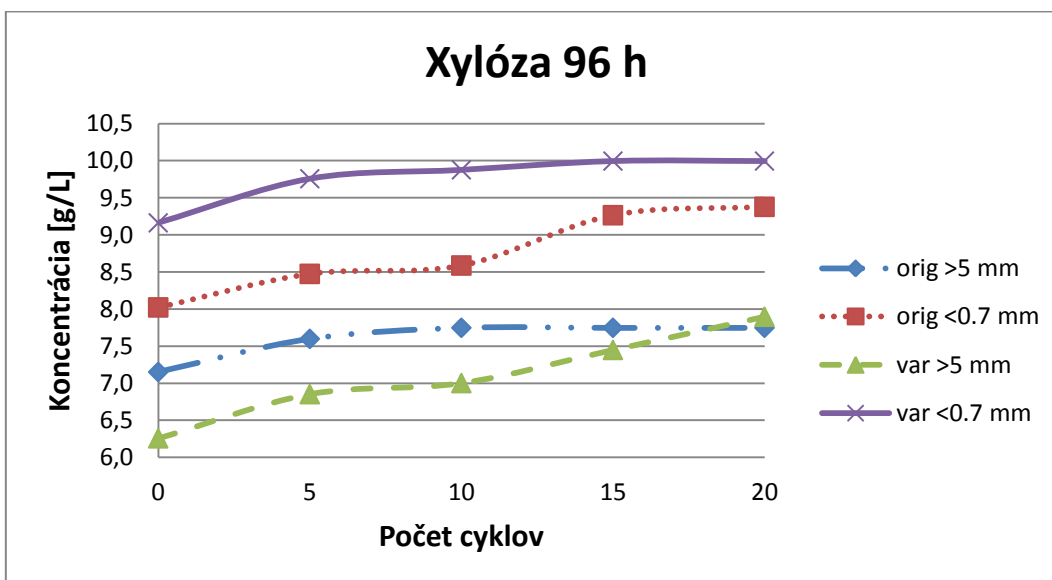


Obr. 1: Obsah glukózy v mladom dreve paulovnie frakcií >5 mm a <0.7 mm neprevarenej (orig) prevarenej vzorky (var) po 72hod (a) a 96 hod (b) enzymatickej hydrolyze v závislosti od počtu cyklov predspracovania zmrazovaním a rozmrazovaním.

a)

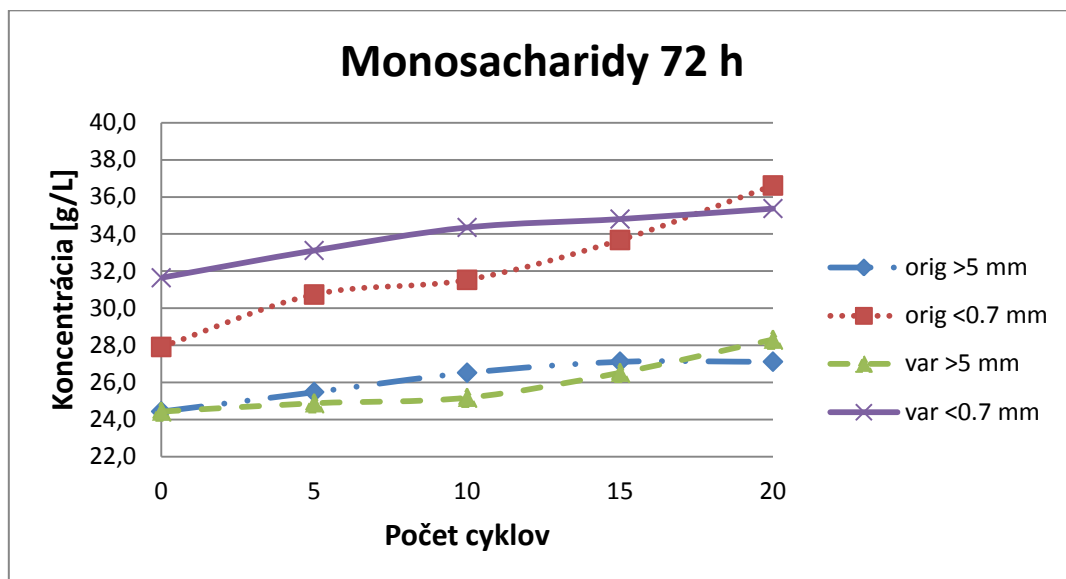


b)

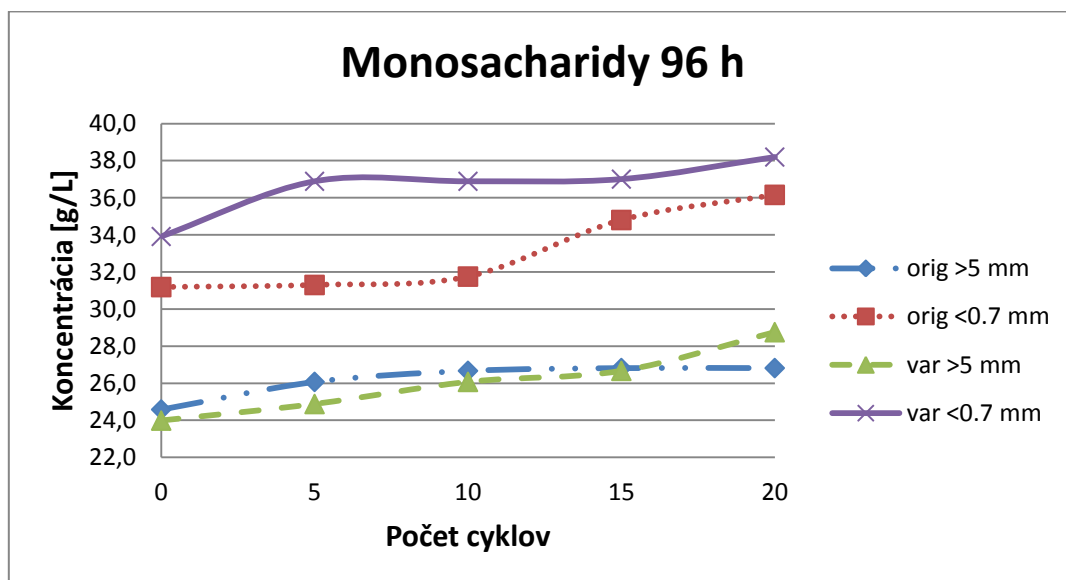


Obr. 2: Obsah xylózy v mladom dreve paulovnie frakcií >5 mm a <0.7 mm neprevarenej (orig) a prevarenej vzorky (var) po 72 (a) a 96 (b) hod enzymatickej hydrolýze v závislosti od počtu cyklov predspracovania zmrazovaním a rozmrazovaním.

a)



b)



Obr. 3: Celkový obsah monosacharidov v mladom dreve paulovnie frakcií >5 mm a <0.7 mm neprevarenej (orig) a prevarenej vzorky (var) po 72 (a) a 96 (b) hod enzymatickej hydrolyzy v závislosti od počtu cyklov predspracovania zmrazovaním a rozmrazovaním.

Záver

Drevný materiál použitý v tejto práci bol získaný z mladej dreviny *Paulownia elongata* s dvomi veľkostnými frakciami, <0.7 a >5 mm. Materiál sa predspracovával varením počas 30 min a následným cyklickým zmrazovaním- rozmrazovaním pri -20°C . Výsledky ukázali, že veľkosť častíc má zásadný vplyv na výtťažok a varenie má slabý vplyv. S počtom cyklov sa zvyšoval výtťažok a najvyšší sa dosiahol pri 20. cykle. Podiel konverzie hydrolyzy bol 43.7%.

Pod'akovanie

„Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na Základe Zmluvy č. APVV-18-0533“.

Použitá literatúra

1. Boháček, Š., Balberčák, J., Schwartz, J., Pažitný, A., Bombilajová, K., Kuňa, V., 2020: Predspracovanie biomasy kryolýzou. In: Zborník výskumných prác. Január 2020. Centrum pre rozvoj drevárskeho, nábytkárskeho a celulózo-papierenského priemyslu. Bratislava. Str. 15-21. Dostupné online: www.centrumdp.sk.
2. Boháček, Š., Pažitný, A., Halaj, M., Balberčák, J., Kuňa, V., 2020: Freeze-thaw pretreatment of poplar sapwood dust. *Wood Research* 65(6): 905-916.
3. Deng, Y., Qiu, L., Yao, Y., Qin, M., 2018: A technology for strongly improving methane production from rice straw: freeze–thaw pretreatment. *RSC Adv.* (8): 22643-22651.
4. Echeverria, C., Bazan, G., Gonzalez, J.S., Lescano, L., Pagador, S., Linares, G., 2018: Pre-treatment by Acidification and Freezing on Corn cob Polymers and its Enzymatic Hydrolysis. *Asian Journal of Scientific* 11(2): 222-231.
5. Chang, K.L., Thitikorn-amorn, J., Hsieh, J.F., Ou, B.M., Chen, S.H., Ratanakhanokchai, K., Huang, P.J., Chen, S.T., 2011: Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and Bioenergy* 35(1): 90-95.
6. Ipekci, Z., Gozukirmizi, N., 2003: Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant cell reports* 22(1): 16-24.
7. Jeong, H.S., Jang, S.K., Kim, H.Y., Yeo, H., Choi, J.W., Choi, I.G., 2016: Effect of freeze storage on hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis by dilute-acid pretreatment of Mongolian oak. *Fuel* Volume 165: 145-151.
8. Li, J., Wachemo, A.Ch., Yuan, H., Zuo, X., Li, X., 2019a: Natural freezing-thawing pretreatment of corn stalk for enhancing anaerobic digestion performance. *Bioresource Technology* 288: 121518.
9. Li, J., Wachemo, A.Ch., Yu, G., Li, X., 2019b: Enhanced anaerobic digestion performance of corn stalk pretreated with freezing-thawing and ammonia: An experimental and theoretical study. *Journal of Cleaner Production*, Available online 2 November 2019, 119112.
10. Nesvadba, P., 2008: Thermal properties and ice crystal development in frozen foods. Chapter 1. In: Judith A. Evans (ed.): *Frozen Food Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd.
11. Pažitný, A., Russ, A., Boháček, Š., Stankovská, M., Ihnát, V., Šutý, Š., 2020: Effect of steam explosion on enzymatic hydrolysis of various parts of poplar tree. *Wood research* 65(4): 579-590.
12. Rooni, V., Raud, M., Kikas, T., 2017: The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries. *Energy* 139: 1-7.
13. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008: Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO, USA.

14. Smichi, N., Messaoudi, Y., Moujahed, N., Gargouri, M., 2016: Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. *Renewable Energy* 85: 1357-1361.
15. Stankovská, M., Fišerová, M., Gigac, J., Pažitný, A., 2018: Effect of alkaline extrusion pretreatment of wheat straw on filtrate composition and enzymatic hydrolysis. *Cellulose Chemistry and Technology* 52(9-10): 815-822.
16. Su, T.CH., Fang, Z., 2017: One-pot microwave-assisted hydrolysis of cellulose and hemicellulose in selected tropical plant wastes by NaOH-freeze pretreatment. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2017, 5, 6: 5166-5174.
17. Thygesen, L. G., Tang Engelund, E., Hoffmeyer, P., 2010: Water sorption in wood and modified wood at high values of relative humidity. Part I: results for untreated, acetylated, and furfurylated Norway spruce.
18. Wang, X.M., Wang, L.J., Yu, M., Chen, H., 2013: Freeze-thaw and sulfuric acid pretreatment of wheat straw for fermentable sugar release. *Advanced Materials Research* (724-725) : 257-260.
19. Yan, J., Joshee, N., Liu, S., 2016: Utilization of hardwood in biorefinery: a kinetic interpretation of pilot-scale hot-water pretreatment of *Paulownia elongata* woodchips. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 10(5): 339-348.
20. Yang, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., Cheng, J., 2009: Saccharification and fermentation of dilute-acid-pretreated freeze-dried switchgrass. *Energy Fuels* 23(11): 5626-5635.
21. Yuan, H., Lan, Y., Zhu, J., Wachemo, A.Ch., Li, X., Yu, L., 2019: Effect on anaerobic digestion performance of corn stover by freezing–thawing with ammonia pretreatment. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 27(1): 200-207.