

RADOSŁAW BIAŁACHOWSKI¹, DOMINIK PAUKSZTA², GRAŻYNA LEWANDOWICZ¹

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Politechnika Poznańska

WPLYW FAZY KRystalicznej CELULOZY SIARCZANOWEJ NA PROCES HYDROLIZY ENZYMATYCZNEJ*

EFFECT OF CRYSTALLINE PHASE OF SULPHATE (KRAFT) CELLULOSE
ON ENZYMATIC HYDROLYSIS PROCESS

Streszczenie. W pracy podjęto próbę oceny wpływu obecności frakcji krystalicznej celulozy siarczanowej na efektywność hydrolizy z zastosowaniem różnych komercyjnych preparatów enzymów celulolitycznych. W pierwszym etapie porównano wydajność procesu katalizowanego za pomocą celulazy z *Aspergillus* sp. oraz celulazy z *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Oceniono także wpływ dodatku β -glukozydazy (Novozym 188) na stopień konwersji celulozy. Stwierdzono, że celulaza z *T. reesei* jest znacznie bardziej efektywnym preparatem enzymatycznym niż enzym pochodzący z *Aspergillus* sp. Najwyższy stopień konwersji, równy 50%, uzyskano po 48 h z zastosowaniem 0,075 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* i 0,025 ml/g s.m. β -glukozydazy. W wyniku analizy metodą szerokokątowej dyfraktometrii rentgenowskiej stwierdzono, że frakcja celulozy pozostała po hydrolizie enzymatycznej ma wyższy stopień krystaliczności niż surowiec. Wskazuje to na większe powinowactwo stosowanych enzymów do amorficznej frakcji celulozy.

Słowa kluczowe: celuloza, hydroliza enzymatyczna, struktura krystaliczna

Wstęp

Proces produkcji bioetanolu II generacji, czyli wytwarzanego z surowców niespożywczych (głównie biomasy lignocelulozowej), przy obecnym stanie wiedzy nie jest konkurencyjny w stosunku do procesu wykorzystującego surowce skrobiowe (ziemniaki, zboża), a zwłaszcza cukrowe (trzcina, buraki cukrowe), jednak obserwowane na

*Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2011 (grant nr N N312 3114 37).

rynku produktów spożywczych negatywne zjawiska związane z produkcją biopaliw I generacji (otrzymywanych z surowców spożywczych) wskazują na konieczność intensyfikacji badań nad otrzymywaniem biopaliw II generacji (GUMIENNA i IN. 2009).

Biomasa lignocelulozowa, który ze względu na niską cenę i praktycznie nieograniczoną dostępność, jest najważniejszym potencjalnym surowcem do produkcji bioetanolu (KUMAR i IN. 2008). Na strukturę biomasy lignocelulozowej składają się trzy polimery o zróżnicowanej przydatności do produkcji etanolu: celuloza – homopolimer glukozy (frakcja najbardziej przydatna), hemiceluloza – kopolimer utworzony z różnych substancji cukrowych (frakcja przydatna tylko częściowo) oraz lignina – polimer zbudowany z pochodnych fenoli (frakcja zupełnie nieprzydatna) (GÓRECKA i IN. 2010). W procesie wytwarzania alkoholu etylowego z biomasy lignocelulozowej wyróżnia się cztery zasadnicze etapy: obróbkę wstępną, hydrolizę enzymatyczną, fermentację oraz separację produktów fermentacji (BALAT i IN. 2008). Kluczowym etapem całego procesu, a zarazem limitującym go, jest hydroliza frakcji celulozowej. Wynika to z budowy cząsteczkowej (obecność wiązań β -glikozydowych), jak i nadcząsteczkowej (obszary krystaliczne) włókien celulozowych (KOZŁOWSKA 2007). Opracowanie efektywnej metody hydrolizy frakcji celulozowej, w tym ograniczenie negatywnego wpływu struktur o budowie krystalicznej, mogłoby się przyczynić do zwiększenia efektywności ekonomicznej całego procesu produkcji bioetanolu z biomasy lignocelulozowej. W literaturze wskazuje się na istotny wpływ struktury krystalicznej celulozy na jej oporność na hydrolizę enzymatyczną (YOSHIDA i IN. 2008, DASHTBAN i IN. 2009, HALL i IN. 2010). Celem niniejszej pracy była ocena wpływu obecności frakcji krystalicznej celulozy na efektywność procesu jej hydrolizy z zastosowaniem komercyjnych preparatów enzymatycznych. Badaniom poddano komercyjną celulozę siarczanową, mogącą stanowić model frakcji celulozowej różnego typu biomasy lignocelulozowej.

Materialy i metody

Materiałem badanym były arkusze (formatu A4) komercyjnej celulozy sosnowej siarczanowej bielonej metodą ECF (wytwórca: International Paper S.A. w Kwidzynie). Hydrolizę prowadzono z zastosowaniem: celulazy z *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (3.2.1.4, Sigma-Aldrich), celulazy z *Aspergillus* sp. (3.2.1.4, Sigma-Aldrich) oraz β -glukozydazy z *Aspergillus niger* (Novozym 188; 3.2.1.21, Novozymes).

Oznaczenie zawartości suchej masy wykonano w trzech powtórzeniach metodą wagową w temperaturze 105°C, zgodnie z normą PN-75/C-04616.01.

Zawartość ligniny Klasona określono na podstawie metodyki przedstawionej w pracy RODRIGUESA i IN. (1999).

Hydrolizę celulozy prowadzono według zmodyfikowanej procedury zaproponowanej przez OHGRENA i IN. (2007). Nawązki celulozy w formie pasków o szerokości około 2-6 mm i długości około 1-3 cm w ilości 2 g s.s. wprowadzono do kolb stożkowych o pojemności 300 ml i zawieszono w 50-milimolowym buforze octanowym o pH 4,5, tak aby końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 ml. Otrzymaną zawiesinę ogrzewano w łaźni wodnej do temperatury 45°C, dodawano preparaty enzymatyczne i utrzymywano w tej temperaturze przez 0,5 h. Następnie stopniowo, w czasie 6 \pm 0,5 h, obniżano temperaturę do 30°C. Reakcję prowadzono, stosując wytrząsanie z intensywnym

nością 250 rpm. Próby kontrolne stanowiły zawiesiny celulozy obrabiane bez dodatku preparatów enzymatycznych. Próbki do analiz pobierano w wyznaczonych interwałach czasowych, z całej objętości kolby, chłodzono do temperatury około 0°C i przechowywano w temperaturze -20°C.

Zawartość glukozy i celobiozy oznaczano metodą HPLC za pomocą chromatografu Merck-Hitachi z detektorem RI Merck-Hitachi L-7490, wyposażonego w kolumny Aminex HPX-87H 300 × 7,8 mm (Biorad) oraz Aminex HPX-87P 300 × 7,8 mm (Biorad). W kolumnie HPX-87H jako eluent zastosowano 0,001 N H₂SO₄ przy przepływie izokratycznym 0,5 ml/min, a oznaczenia prowadzono w temperaturze 50°C. W kolumnie HPX-87P jako eluent zastosowano H₂O przy przepływie izokratycznym 0,6 ml/min, a oznaczenia prowadzono w temperaturze 85°C.

Badania struktury krystalicznej wykonano metodą WAXS z zastosowaniem sterowanego komputerem dyfraktometru TUR-M62 z goniometrem HZG-3. Napięcie anodowe wynosiło 30 kV, a natężenie prądu anodowego – 25 mA. Badania przeprowadzono w zakresie kątów 10-30° (dla kąta 2θ), przy kroku zliczania impulsów wynoszącym 0,04°. W badaniach zastosowano promieniowanie miedziowe CuKα, po monochromatyzacji filtrem (folią) Ni.

Wyniki i dyskusja

Badana celuloza siarczanowa zawierała 94,23 ± 0,13% suchej masy. Zgodnie ze specyfikacją producenta charakteryzowała się następującymi parametrami: białość – 88-89%, samozerwalność – ≥ 8,0 km, wskaźnik przepuklenia – ≥ 3,5 kPa(m²/g), zawartość cętek – ≥ 3,5 ppm. Był to preparat o dużej czystości, praktycznie nie zawierający ligniny (oznaczona wartość wynosiła 0,097 ± 0,006), zatem jego podatność na hydrolizę zależała jedynie od cech fizyczno-chemicznych (w tym strukturalnych) celulozy oraz aktywności badanych enzymów celulolitycznych.

W pierwszym etapie pracy porównano aktywności komercyjnie dostępnych celulaz: celulazy z *T. reesei* i celulazy z *Aspergillus* sp. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1. Największe stężenie glukozy – 1,33 g/l – zaobserwowano w hydrolizatach otrzymanych z użyciem 0,05 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei*. Odpowiada to konwersji na poziomie 7,4% (tab. 1). Celulaza z *Aspergillus* sp. praktycznie nie wykazywała aktywności w stosunku do badanego surowca celulozowego. Zawartość glukozy po zastosowaniu dawki celulazy z *T. reesei* 0,05 ml/g s.m. była ponad 160 razy większa w porównaniu z hydrolizą z 0,05 ml/g s.m. z dodatkiem celulazy z *Aspergillus* sp. Może to świadczyć o niezwykle małym powinowactwie celulazy z *Aspergillus* sp. do stosowanego substratu na skutek silnego wiązania enzymu przez substrat i/lub zbyt wysokiego stopnia krystaliczności substratu (CONVERSE i IN. 1988, SUN i CHENG 2002). Przyczyną mogła być również podatność enzymu na obecność w substracie pochodnych degradacji ligniny (BERLIN i IN. 2006), jest to jednak mało prawdopodobne ze względu na małą zawartość ligniny w stosowanym surowcu. Inną przyczyną zahamowania reakcji hydrolizy z zastosowaniem celulazy z *Aspergillus* sp. mogła być inhibicja produktem pośrednim – celobiozą lub/i β-oligosacharydami. Ze względu na znacznie lepsze rezultaty uzyskane z użyciem celulazy z *T. reesei* dalsze badania prowadzono wyłącznie z użyciem tego enzymu.

Tabela 1. Stężenie glukozy w roztworze po 24 h inkubacji z zastosowaniem różnych preparatów enzymatycznych

Table 1. Glucose concentration in the solution after 24 h of incubation with different enzyme preparations

Enzym Enzyme	Dawka (ml/g s.m.) Dose (ml/g d.m.)	Stężenie glukozy Glucose concentration (g/l)
Celulaza z <i>Aspergillus</i> sp. Cellulase from <i>Aspergillus</i> sp.	0,005	0
	0,025	0
	0,05	0,008 ±0,002
Celulaza z <i>Trichoderma reesei</i> Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i>	0,005	0,34 ±0,08
	0,025	1,00 ±0,30
	0,05	1,33 ±0,05

W celu zwiększenia konwersji substratu do glukozy w procesie katalizowanym celulazą z *T. reesei* zastosowano dodatek β -glukozydazy z *Aspergillus niger* (Novozym 188) w różnych dawkach (tab. 2). Novozym 188 jest β -glukozydazą popularnie stosowaną w reakcji hydrolizy celulozy do glukozy o aktywności 421 U/ml (KADAR i IN. 2004). Największe stężenie glukozy – 10 g/l (co odpowiada 50-procentowej konwersji substratu) – zaobserwowano w przypadku zastosowania 0,075 ml/g s.m. dodatku celulazy z *T. reesei* oraz 0,025 ml/g s.m. β -glukozydazy z *A. niger* (tab. 2). W przypadku procesu prowadzonego bez dodatku β -glukozydazy z *A. niger* stężenie glukozy wyniosło 3,5 g/l, co odpowiada wydajności procesu 17,5%.

Tabela 2. Stężenie glukozy i celobiozy w roztworach po 48 h inkubacji z różnymi dawkami celulazy z *Trichoderma reesei* i β -glukozydazy z *Aspergillus niger*Table 2. Glucose and cellobiose concentration in the solutions after 48 h of incubation with different doses of cellulase from *Trichoderma reesei* and β -glucosidase from *Aspergillus niger*

Dawka celulazy (ml/g s.m.) Dose of cellulase (ml/g d.m.)	Dawka β -glukozydazy (ml/g s.m.) Dose of β -glucosidase (ml/g d.m.)	Stężenie glukozy Glucose concentration (g/l)	Stężenie celobiozy Cellobiose concentration (g/l)
0,005	–	0,226 ±0,003	0,7 ±0,1
0,05	–	1,7 ±0,1	1,85 ±0,05
0,005	0,005	1,4 ±0,2	0,06 ±0,03
0,05	0,05	7 ±2	–
0,025	0,075	3,5 ±0,6	0
0,075	0,025	10 ±2	0,04 ±0,01
0,075	–	3,5 ±0,2	2,4 ±0,3

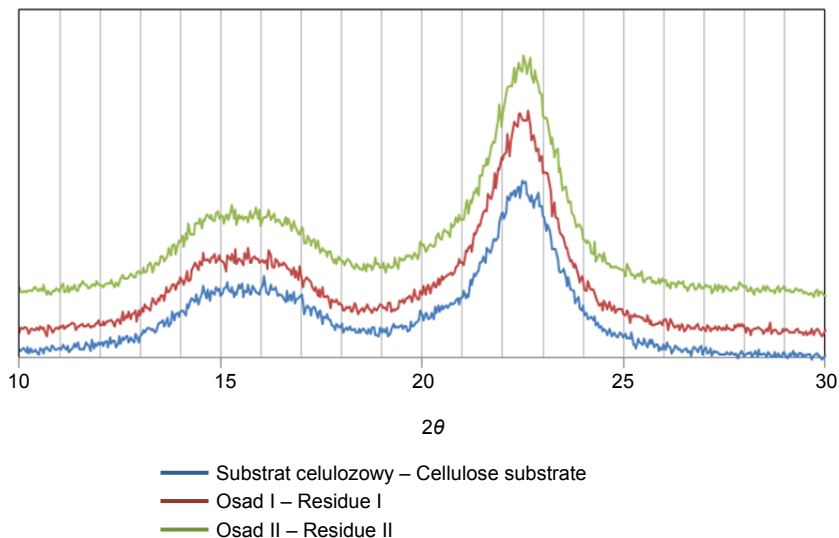
Otrzymane wyniki wskazują na silną inhibicję celulazy z *T. reesei* przez celobiozę, bowiem już niewielki dodatek β -glukozydazy znacząco poprawił wydajność reakcji hydrolizy celulozy do glukozy (tab. 2). Towarzyszył temu znaczący spadek stężenia celobiozy po 48 h inkubacji, w każdym układzie z dodatkiem β -glukozydazy. Znaczący wpływ dodatku β -glukozydazy potwierdza fakt uzyskania stężeń glukozy na podobnym poziomie podczas reakcji hydrolizy w układzie z zastosowaniem 0,05 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* oraz podczas reakcji w układzie z zastosowaniem 0,005 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* i 0,005 ml/g s.m. β -glukozydazy (tab. 2). Efekt ten jest jeszcze bardziej widoczny przy porównaniu układu z dodatkiem 0,075 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* oraz układu z dodatkiem 0,075 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* i 0,025 ml/g s.m. β -glukozydazy. Niewielki dodatek β -glukozydazy spowodował ponad dwukrotny wzrost stężenia glukozy w hydrolizacie (tab. 2). Z powyższych wyników można wywnioskować również, że istotny wpływ na przebieg hydrolizy ma nie tylko końcowe stężenie poszczególnych aktywności, lecz także ich proporcja w układzie reakcyjnym. GHOSE i DAS (1971) w swoich badaniach również zaobserwowali silniejszą inhibicję produktem hydrolizy celulozy z zastosowaniem *Trichoderma viride* wobec celobiozy niż wobec glukozy. W pracy ITAVAARY i IN. (1999) dodatek β -glukozydazy przyczyniał się do zwiększenia stężenia glukozy w hydrolizacie, znosząc tym samym inhibicję powodowaną przez celobiozę.

Obecność w hydrolizacie cukrów innych niż celobioza i glukoza mogłaby świadczyć o zanieczyszczeniach w stosowanym substracie celulozowym w formie pozostałości frakcji hemicelulozy. Z tego powodu dla układów z dodatkiem celulazy z *T. reesei* w ilości 0,05 ml/g s.m. wykonano analizę zawartości innych cukrów w hydrolizacie. Analizowano zawartość cukrów charakterystycznych dla składu frakcji hemicelulozowej drewna sosnowego, tj.: ksylozy, arabinozy, mannozy, galaktozy i ramnozy. Jednak na podstawie stężeń uzyskanych po 48 h inkubacji można wnioskować, że pozostałość ta jest niewielka. Zawartość ksylozy nie przekraczała 0,39 g/l, sumaryczna zawartość arabinozy i mannozy nie przekraczała 0,13 g/l, a galaktozy i ramnozy – 0,08 g/l.

Po dokonaniu oceny skutków hydrolizy wybranych wariantów reakcji substrat oraz osady otrzymane jako pozostałość poddano analizie strukturalnej metodą szerokokątowej dyfrakcji promieni rentgenowskich (WAXS). Osady pochodziły z dwóch wariantów: z procesu z zastosowaniem dodatku celulazy z *T. reesei* w ilości 0,05 ml/g s.m. i dodatku β -glukozydazy z *A. niger* w ilości 0,05 ml/g s.m. oraz z procesu z zastosowaniem dodatku celulazy z *T. reesei* w ilości 0,075 ml/g s.m. i dodatku β -glukozydazy z *A. niger* w ilości 0,025 ml/g s.m. Obie reakcje prowadzono przez 48 h. Wyniki przedstawiono na rysunku 1.

Celuloza może występować w czterech odmianach polimorficznych. Celuloza zawarta w takich roślinach, jak len, konopie, ramia, bawełna, drewno, to celuloza I, wykazująca w badaniu rentgenowskim trzy charakterystyczne piki dla kątów 2θ : 15° , 17° i $22,7^\circ$ (BORYSIAK i DOCZEKALSKA 2005, PAUKSZTA i BORYSIAK 2006). Strukturę II ma celuloza regenerowana lub merceryzowana (sztuczny jedwab, celofan itp.). Pozostałe dwie formy – III i IV – zostały utworzone w drodze modyfikacji fizyczno-chemicznych (PROSIŃSKI 1984). Przyjmuje się, że w drewnie zawartość celulozy krystalicznej wynosi 70%, a amorficznej – około 30% (DOMAŃSKI i IN. 2007).

Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno surowa celuloza siarczanowa, jak i pozostałości po jej hydrolizie dokonanej za pomocą komercyjnych preparatów celulo-litycznych, wykazują strukturę celulozy I, charakterystycznej dla drewna (w tym drewna



Rys. 1. Rentgenogramy substratu celulozowego i osadów pohydrolitycznych pozostałych po 48-godzinnej hydrolizie z zastosowaniem 0,05 ml/g s.m. celulazy z *Trichoderma reesei* i 0,05 ml/g s.m. β -glukozydazy z *Aspergillus niger* (osad I) oraz po hydrolizie z zastosowaniem 0,075 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* i 0,025 ml/g s.m. β -glukozydazy z *A. niger* (osad II)

Fig. 1. X-ray diffraction patterns of the cellulose substrate and the residues after hydrolysis, remaining after 48 h of hydrolysis with 0.05 ml/g d.m. cellulase from *Trichoderma reesei* and 0.05 ml/g d.m. β -glucosidase from *Aspergillus niger* (residue I) and after hydrolysis with 0.075 ml/g d.m. cellulase from *T. reesei* and 0.025 ml/g d.m. β -glucosidase from *A. niger* (residue II)

osnowego, z którego produkowana jest celuloza siarczanowa). Na rentgenogramach wszystkich trzech badanych próbek dominujące maksimum przy kącie 2θ równym 22° . Analizę numeryczną obrazów rentgenowskich wykonano metodą Hindeleha-Johnsona (HINDELEH i JOHNSON 1971, 1974), zmodyfikowaną i opracowaną przez RABIEJA (1991). Na podstawie pól powierzchni przypisanych maksimum dyfrakcyjnych oraz pola powierzchni pochodzącego od obszaru amorficznego obliczono stopień krystaliczności celulozy w badanych preparatach.

Na rentgenogramach większą powierzchnię maksimum dyfrakcyjnych obliczono dla obu osadów niż dla substratu wyjściowego, co świadczy o większym udziale fazy krystalicznej (tab. 3). Zaobserwowane zjawisko potwierdza większą podatność regionu amorficznego na hydrolizę przez endoglukanazy (DASHTBAN i IN. 2009). W badaniach YOSHIDY i IN. (2008) zauważono, że podczas hydrolizy biomasy z *Miscanatus sinensis* z zastosowaniem celulazy z *T. reesei* (Celluclast 1.5 L) i β -glukozydazy (Novozym 188) wraz obniżeniem stopnia krystaliczności substratu rosło stężenie glukozy w hydrolizacie. Zaobserwowano również większe początkowe stężenia glukozy w biomacie zawierającej więcej frakcji amorficznej. W badaniach HALLA i IN. (2010), gdzie substratem była celuloza mikrokrystaliczna (Avicel), zaobserwowano

Tabela 3. Stopień krystaliczności (X_c) substratu celulozowego i osadów pohydrolitycznych pozostałych po 48-godzinnej hydrolizie z zastosowaniem 0,05 ml/g s.m. celulazy z *Trichoderma reesei* i 0,05 ml/g s.m. β -glukozydazy z *Aspergillus niger* (osad I) oraz po hydrolizie z zastosowaniem 0,075 ml/g s.m. celulazy z *T. reesei* i 0,025 ml/g s.m. β -glukozydazy z *A. niger* (osad II)

Table 3. Degree of crystallinity (X_c) of the cellulose substrate and the residues after hydrolysis, remaining after 48 h of hydrolysis with 0.05 ml/g d.m. cellulase from *Trichoderma reesei* and 0.05 ml/g d.m. β -glucosidase from *Aspergillus niger* (residue I) and after hydrolysis with 0.075 ml/g d.m. cellulase from *T. reesei* and 0.025 ml/g d.m. β -glucosidase from *A. niger* (residue II)

Substrat celulozowy Cellulose substrate	Osad I Residue I	Osad II Residue II
0,51	0,59	0,58

mniejszą podatność na hydrolizę enzymatyczną substratu o wyższym stopniu krystaliczności oraz mniejszą początkową wydajność reakcji hydrolizy. Stwierdzono również, że opisany w wielu doniesieniach wzrost stopnia krystaliczności podczas hydrolizy enzymatycznej jest niewspółmierny z obserwowaną inhibicją reakcji. Postawiono wniosek o potrzebie uwzględnienia w badaniach innych czynników mogących powodować inhibicję reakcji.

Wnioski

Przeprowadzone wstępne badania wykazały, że celulaza z *T. reesei* jest znacznie bardziej efektywnym preparatem enzymatycznym niż enzym pochodzący z *Aspergillus* sp. Zastosowanie odpowiedniej kompozycji komercyjnych preparatów enzymatycznych (celulazy z *T. reesei* oraz β -glukozydazy) pozwala na scukrzenie 50% celulozy.

Pozostałości po hydrolizie enzymatycznej w wybranych wariantach reakcji celulozy mają wyższy stopień krystaliczności niż surowiec, co wskazuje na istotne znaczenie struktury krystalicznej w oporności na działanie enzymów celulolitycznych.

Literatura

- BALAT M., BALAT H., OZ K., 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energ. Combust. Sci.* 34: 551-573.
- BERLIN A., MAXIMENKO V., GILKES N., SADDLER J., 2006. Optimization of enzyme complexes for lignocelluloses hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 2: 287-296.
- BORYSIK S., DOCZEKALSKA B., 2005. X-ray diffraction study of pine wood treated with NaOH. *Fibres Text. East. Eur.* 13: 87-89.
- CONVERSE A., MATSUNO R., TANAKA M., TANIGUCHI M., 1988. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 1: 38-45.
- DASHTBAN M., SCHRAFT H., QIN W., 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5: 578-595.
- DOMAŃSKI M., DZURENDA L., JABŁOŃSKI M., OSIPIUK J., 2007. Drewno jako materiał energetyczny. Wyd. SGGW, Warszawa.

- GHOSE A., DAS K., 1971. *Advances in biochemical engineering*. Vol. 1. Springer, Berlin.
- GÓRECKA D., PACHOLEK B., DZIEDZIC K., GÓRECKA M., 2010. Raspberry pomace as a potential fiber source for cookies enrichment. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 9, 4: 451-462.
- GUMIENNA M., LASIK M., CZARNECKI Z., SZAMBELAN K., 2009. Applicability of unconventional energy raw materials in ethanol production. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 8, 4: 17-24.
- HALL M., BANSAL P., LEE J.H., REALFF M.J., BOMMARIUS A.S., 2010. Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *FEBS J.* 277: 1571-1582.
- HAMELINCK C., HOOIJDONK G., FAAIJ A., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long term. *Biomass Bioenergy* 28: 384-410.
- HINDELEH A.M., JOHNSON D.J., 1971. The resolution of multipeak data in fiber science. *J. Phys. D Appl. Phys.* 4: 259-263.
- HINDELEH A.M., JOHNSON D.J., 1974. Crystallinity and crystallite size measurement in cellulose fibres: 2. Viscose rayon. *Polymer* 15: 697-705.
- ITAVAARA M., SIIKA-AHO M., VIKARI L., 1999. Enzymatic degradation of cellulose-based materials. *J. Environ. Polymer Degrad.* 7: 67-73.
- KADAR ZS., SZENGYEL ZS., RECZEY K., 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crops Prod.* 20: 103-110.
- KOZŁOWSKA M., 2007. Struktura i funkcjonowanie rośliny. W: *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*. Red. M. Kozłowska. PWRiL, Poznań: 26-35.
- KUMAR R., SINGH S., SINGH O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 5: 377-391.
- OHGREN K., VEHEMAANPERA J., SIIKA-AHO M., GALBE M., VIKARI L., ZACCHI G., 2007. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 607-613.
- PAUKSZTA D., BORYSIK S., 2006. Structural modification of natural lignocellulosic materials caused by alkali treatment. *e-Polymers* P15. [www.e-polymers.org].
- PN-75/C-04616.01. Woda i ścieki. Badania specjalne osadów. Oznaczanie zawartości wody, suchej masy, substancji organicznych i substancji mineralnych w osadach ściekowych. PKNMiJ, Warszawa.
- PROSIŃSKI S., 1984. *Chemia drewna*. PWRiL, Warszawa.
- PRZYGOCKI W., WŁOCHOWICZ A., 2006. Uporządkowanie makrocząstek w polimerach i włóknach. WN-T, Warszawa.
- RABIEJ S., 1991. A comparison of two X-ray diffraction procedures for crystallinity determination. *Eur. Polymer J.* 27: 947-954.
- RODRIGUES J., FAIX O., PEREIRA H., 1999. Improvement of the acetyl bromide method for lignin determination within large scale screening programmes. *Holz Roh- u. Werkst.* 57: 341-345.
- SUN Y., CHENG J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biosource Technol.* 83: 1-11.
- YOSHIDA M., LIU Y., UCHIDA S., KAWARADA K., UKAGAMI Y., ICHINOSE H., KANEKO S., FUKUDA K., 2008. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 805-810.

EFFECT OF CRYSTALLINE PHASE OF SULPHATE (KRAFT) CELLULOSE ON ENZYMATIC HYDROLYSIS PROCESS

Summary. The influence of cellulose crystalline structure occurrence on effectiveness of the commercial cellulolytic enzyme preparations for the hydrolysis of sulphate (Kraft) cellulose was investigated. In the first step, efficiency of the process catalysed by the cellulase from *Aspergillus* sp., as well as from *Trichoderma reesei* ATCC 26921, was compared. The effect of the addition of the β -glucosidase (Novozym 188) on the conversion of the substrate was also investigated. It was found that cellulase from *T. reesei* ATCC 26921 is significantly more effective than cellulase from *Aspergillus* sp. The highest conversion was obtained by the use of 0.075 ml/g d.m. of cellulase from *T. reesei* and 0.025 ml/g d.m. of β -glucosidase from *A. niger*. X-ray diffraction experiment proved that the residue after enzymatic hydrolysis reveals higher crystallinity than the raw material. This fact indicates greater ability to hydrolysis of amorphous fraction of cellulose by used cellulases.

Key words: cellulose, enzymatic hydrolysis, crystalline structure

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Radostaw Białachowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Poland, e-mail: rbialach@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

13.01.2012

Do cytowania – For citation:

Białachowski R., Paukšta D., Lewandowicz G., 2012. Wpływ fazy krystalicznej celulozy siarczanowej na proces hydrolizy enzymatycznej. *Nauka Przyr. Technol.* 6, 2, #29.