

MAŁGORZATA SMUGA-KOGUT¹, DARIA SZYMANOWSKA², GRAŻYNA LEWANDOWICZ²,
KAZIMIERA ZGÓRSKA¹

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii
Politechnika Koszalińska

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

OTRZYMYWANIE BIOETANOLU Z SUROWCÓW ZAWIERAJĄCYCH CELULOZĘ Z WYKORZYSTANIEM CIECZY JONOWEJ

RECEIVING OF BIOETHANOL FROM RAW MATERIALS
CONSISTING OF CELLULOSE WITH THE IONIC LIQUID UTILISATION

Streszczenie. Celem pracy była ocena wpływu obróbki wstępnej celulozy mikrokrystalicznej i bawełny octanem 1-etylo-3-metyloimidazolu na strukturę krystaliczną oraz wydajność hydrolizy i fermentacji etanolowej tych surowców. Ponadto wstępnie oceniono przydatność tej cieczy jonowej do obróbki słomy żytniej. Wykazano, że wstępna obróbka surowców celulozowych: bawełny i celulozy mikrokrystalicznej octanem – cieczą jonową powoduje rekrytalizację tych materiałów od struktury I do struktury II oraz zmniejszenie krystaliczności względnej, jednak nie wpływa na efektywność produkcji etanolu. Octan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy nie hamuje rozwoju komórek drożdży oraz nie wpływa negatywnie na żywotność komórek. Obróbka słomy żytniej cieczą jonową umożliwia hydrolizę enzymatyczną tego surowca, jednak wydajność etanolu z 1 g tak uzyskanej glukozy jest dwukrotnie mniejsza niż w przypadku celulozy mikrokrystalicznej i bawełny.

Słowa kluczowe: bioetanol, słoma żytnia, bawełna, celuloza mikrokrystaliczna, hydroliza enzymatyczna

Wstęp

Głównymi gatunkami roślin będącymi surowcami do produkcji bioetanolu w świecie są: trzcina cukrowa – w Ameryce Południowej (w tym głównie w Brazylii), kukurydza – w USA i Kanadzie, kukurydza, zboża, burak cukrowy (melasa) i ziemniaki –

w krajach UE (NOWACKI 2007, GUMIENNA i IN. 2009, SZYMANOWSKA i GRAJEK 2009). O wyborze poszczególnych gatunków w każdym kraju powinny decydować głównie lokalne warunki klimatyczne i glebowe, koszty uprawy, konkurencyjność innych rynków zbytu, wydajność spirytusu uzyskiwana z jednostki powierzchni uprawy oraz potencjał i stabilność plonowania każdego z gatunków. Z tych powodów wydaje się, iż perspektywnymi surowcami do produkcji bioetanolu są materiały lignocelulozowe. Należą one do biomasy roślinnej, która zajmuje kluczową pozycję wśród surowców odnawialnych. Ich roczna produkcja wynosi około 170 mld t, z czego około 75% stanowią węglowodany, 20% lignina, a pozostałe składniki zaledwie 5% (BURCZYK 2009). Najpopularniejsze źródła surowca celulozowego, takie jak: drewno, słoma zbóż, trawy i odpady przemysłu owocowo-warzywnego zawierają znaczne ilości hemicelulozy (24-40%) i ligniny (18-25%). Zawartość celulozy mieści się w granicach 40-55% (MALHERBE i CLOETE 2002, SUN i CHENG 2002). Za najpoważniejsze ograniczenie w wykorzystaniu ligninocelulozy jako surowca do produkcji bioetanolu uważa się problemy z hydrolizą celulozy do cukrów podlegających fermentacji alkoholowej. Dostępność substratu celulozowego dla enzymów zależy przede wszystkim od jego struktury, ilości miejsc amorficznych, w których enzymy łatwiej trawią wiązania β -1,4-glikozydowe, stopnia polimeryzacji i zawartości ligniny. Lignina nieodwracalnie wiąże miejsca aktywne enzymów celulolitycznych, istotnie zmniejszając wydajność reakcji hydrolizy celulozy (BERLINI i IN. 2006). Z tego względu niezbędnym pierwszym etapem pozyskiwania etanolu z surowców lignocelulozowych jest obróbka wstępna mająca na celu zwiększenie dostępności celulozy dla enzymów celulolitycznych. Obiecującym sposobem przeprowadzenia obróbki wstępnej może być zastosowanie cieczy jonowych. Związki te, określane jako sole o temperaturze topnienia poniżej temperatury wrzenia wody, zbudowane są zasadniczo z dużych kationów organicznych o małej symetrii oraz mniejszych anionów zarówno organicznych, jak i nieorganicznych (DADI i IN. 2007, FUKAYA i IN. 2008, ZHAO i IN. 2009). Ciecze jonowe mogą być wykorzystywane jako rozpuszczalniki surowców lignocelulozowych. Po zastosowaniu nierozpuszczalnika, którym najczęściej jest woda, ale mogą być również metanol lub etanol, następuje wytrącenie tzw. regenerowanej celulozy (DADI i IN. 2007). Taka obróbka wstępna przyczynia się do rozluźnienia struktury celulozy. Użyte w taki sposób ciecze jonowe nie hamują hydrolizy enzymatycznej i można ich powtórnie używać w następnych procesach obróbki wstępnej materiałów lignocelulozowych (FUKAYA i IN. 2008). Wadą znacznej części cieczy jonowych (głównie zawierających jony chlorkowe) jest ich duża lepkość w temperaturze pokojowej, co sprawia, iż obróbkę celulozy należy prowadzić w podwyższonej temperaturze. Z kolei niskolepkie mrówczany są relatywnie nietrwałe w podwyższonej temperaturze i rozkładają się z wydzieleniem ditlenku węgla (FUKAYA i IN. 2008).

Celem pracy była ocena wpływu obróbki wstępnej celulozy mikrokryształicznej i bawełny octanem 1-etylo-3-metyloimidazolu na strukturę krystaliczną oraz wydajność hydrolizy i fermentacji etanolowej tych surowców. Ponadto wstępnie oceniono przydatność tej cieczy jonowej do obróbki słomy żytniej.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiły: celuloza mikrokrystaliczna Avicel PH 101 firmy BASF, bawełna surowa z firmy ZPB „Frotex” S.A. oraz słoma żytnia pochodząca z gospodarstwa rolnego w Krytnie (woj. zachodniopomorskie), w którym stosuje się konwencjonalne metody uprawy zbóż. Surowce poddano rozdrobnieniu w młynku koloidalnym do konsystencji proszku o wielkości ziaren nie przekraczającej 100 μm .

Obróbkę wstępną prowadzono za pomocą octanu 1-etylo-3-metyloimidazolu (Sigma Aldrich) zgodnie z procedurą zaproponowaną przez ZHAO i IN. (2009). W tym celu do 100 mg surowca dodawano 5 ml cieczy jonowej i inkubowano całość w temperaturze 120°C przez 30 min. Uzyskany lepki roztwór chłodzono do temperatury pokojowej, dodawano 5 ml wody dejonizowanej i wytrząsano przez 30 min. Otrzymany układ dwufazowy separowano poprzez wirowanie (15 min, 5000 obr/min). Procedurę wytrząsania i odwirowywania powtarzano trzykrotnie, aż do momentu całkowitego usunięcia cieczy jonowej. Tak przygotowany materiał zawieszano w 10 ml wody i poddawano hydrolizie enzymatycznej z użyciem preparatu enzymatycznego celulazy z *Trichoderma reesei* firmy Sigma Aldrich dawce 50 μg na 100 mg surowca. W procesie fermentacji alkoholowej wykorzystano szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* rasy Red Star Ethanol Red. Fermentację prowadzono przez 72 h w temperaturze 35°C.

Zawartość cukrów prostych i etanolu oznaczano techniką chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografii cieczowej Merck-Hitachi (zestaw: automatyczny podajnik prób Merck-Hitachi L-7250, pompa Merck-Hitachi L-7100 z detektorem RI Merck-Hitachi L-7490). Do oznaczeń użyto kolumny Aminex HPX-87P 300 \times 7,8 mm (Bio-Rad). Jako eluent stosowano H₂O, przy przepływie 0,6 ml/min, izokratycznie. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 85°C. Do oznaczeń etanolu i kwasów organicznych użyto kolumny Rezex ROA-Organic Acid H+ 300 \times 7,8 mm (Phenomenex). Jako eluent stosowano 0,001M H₂SO₄, przy przepływie 0,6 ml/min, izokratycznie. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 50°C. W obydwu przypadkach próby nanoszono na kolumnę w ilości 30 μl . Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików (pomiar i integracja komputerowa z zastosowaniem Chromatography Data Station Software, Merck-Hitachi).

Liczebność i żywotność drożdży w inokulacie i zacierze odfermentowanym oznaczano metodą bezpośrednią, pod mikroskopem świetlnym z zastosowaniem komory Thoma, z użyciem roztworu błękitu metylenowego o stężeniu 0,01%.

Strukturę krystaliczną badano metodą szerokokątowej dyfraktometrii rentgenowskiej za pomocą aparatu Bruker AXS D8 Advance monochromatorem germanowym i detektorem paskowym krzemowym. Próby skanowano w zakresie kątów 2θ od 5 do 30° (krok: 0,02 2θ , czas na krok: 3 s). W badaniach zastosowano promieniowanie miedziowe CuK α .

Wydajność etanolu (Y_{EtOH}) obliczono zgodnie ze wzorem:

$$Y_{\text{EtOH}}(\%) = \text{EtOH}/G \cdot 100\%$$

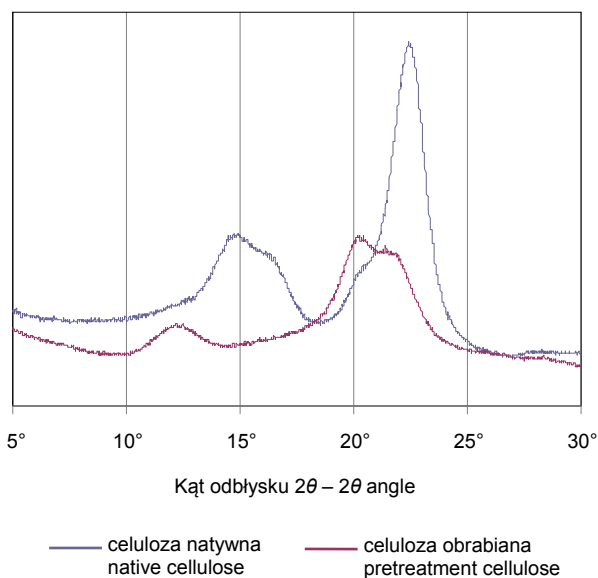
gdzie:

EtOH – przyrost stężenia etanolu w zacierze (g/l),

G – ilość glukozy w zacierze (g/l).

Wyniki i dyskusja

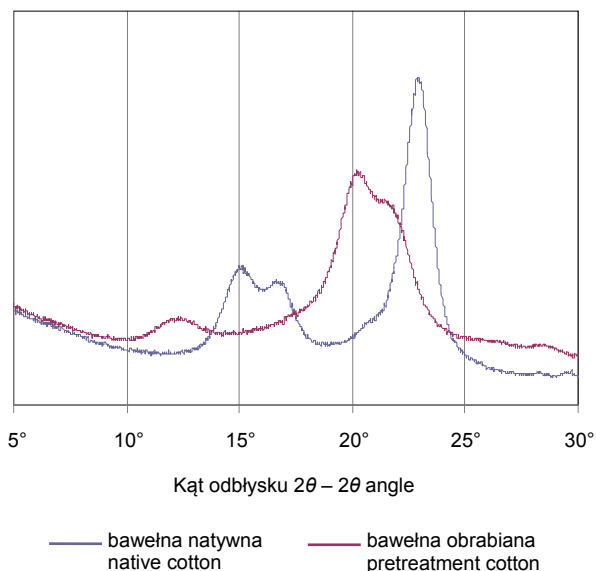
Struktura krystaliczna celulozy jest uważana za jeden z kluczowych czynników ograniczających jej podatność na hydrolizę. Bardzo duża krystaliczność włókien celulozy powoduje ograniczenie dostępu enzymów celulolitycznych do ich wnętrza i zmniejsza w ten sposób efektywność hydrolizy. Obróbka przeprowadzona za pomocą octanu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego spowodowała znaczące zmiany w strukturze krystalicznej bawełny i celulozy mikrokrystalicznej. Obydwa surowce w postaci natywnej to tzw. celuloza I wykazująca w badaniu rentgenowskim trzy charakterystyczne piki dla kątów odbłyску 2θ : 15° , 17° i $22,7^\circ$ (BORYSIĄK i DOCZEKAŁSKA 2005). Po obróbce wstępnej nastąpiło nie tylko zmniejszenie stopnia krystaliczności badanych surowców, lecz także ich rekryształizacja. Na rentgenogramach celulozy i bawełny poddanych obróbce cieczą jonową (rys. 1 i 2) występowały piki przy kątach odbłyску 2θ $12,5^\circ$, 20° i 22° , co odpowiada strukturze tzw. celulozy II (BORYSIĄK i DOCZEKAŁSKA 2005). Krystaliczność względna, definiowana jako stosunek pola powierzchni pików w widmie rentgenowskim (NARA i IN. 1978) polisacharydów obrobionych cieczą jonową do ich natywnych odpowiedników, wynosiła $52,2\%$ dla celulozy i $86,4\%$ dla bawełny.



Rys. 1. Rentgenogramy celulozy mikrokrystalicznej natywnej i obrabianej cieczą jonową

Fig. 1. X-ray diffraction patterns of microcrystalline cellulose native and after treatment with ionic liquid

DADI i IN. (2007) w wyniku obróbki celulozy za pomocą chlorku 1-butylo-3-metyloimidazoliowego lub 1-alkilo-3-metyloimidazoliowego uzyskali zmniejszenie stopnia jej krystaliczności bądź pełną morfizację w zależności od stężenia w czasie obróbki. ZHAO i IN. (2009) również donoszą o zmniejszeniu stopnia krystaliczności celulozy



Rys. 2. Rentgenogramy bawełny natywnej i obrabianej cieczą jonową

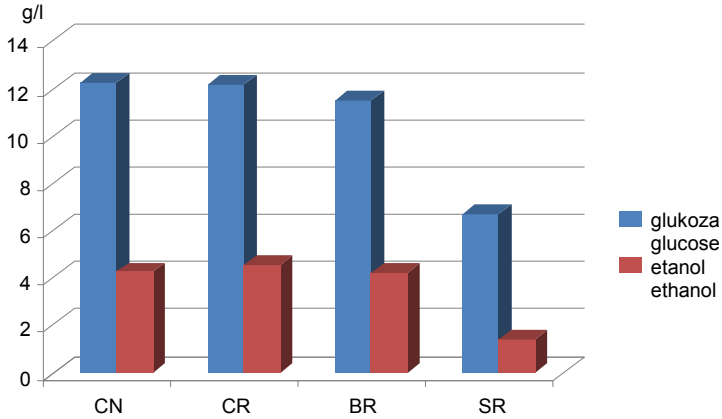
Fig. 2. X-ray diffraction patterns of cotton native and after treatment with ionic liquid

o 58-75% w wyniku jej obróbki różnymi cieczami jonowymi, jednak wydaje się, iż dla podatności materiału celulozowego na hydrolizę enzymatyczną redukcja stopnia krystaliczności ma mniejsze znaczenie niż sam fakt obróbki cieczą jonową (ZHAO i IN. 2009, DADI i IN. 2007). Potwierdzają to również PARK i IN. (2010), wskazując na kluczową rolę rozwinięcia powierzchni celulozy.

Przeprowadzone badania procesu hydrolizy i fermentacji wykazały, że obróbka celulozy mikrokrystalicznej cieczą jonową miała niewielki wpływ na efektywność produkcji etanolu (rys. 3 i 4). Z wszystkich surowców zawierających czystą celulozę uzyskano po procesie hydrolizy stężenie glukozy na poziomie 11,5-12,3 g/l oraz stężenie etanolu po fermentacji 4,2-4,4 g/l (rys. 3). Słoma żytnia, która w postaci natywnej była w ogóle niepodatna na hydrolizę, w wyniku obróbki cieczą jonową uzyskała podatność na działanie celulazy, jednak w tym przypadku uzyskano stężenie glukozy jedynie na poziomie 6,7 g/l i stężenie etanolu 1,4 g/l (rys. 3).

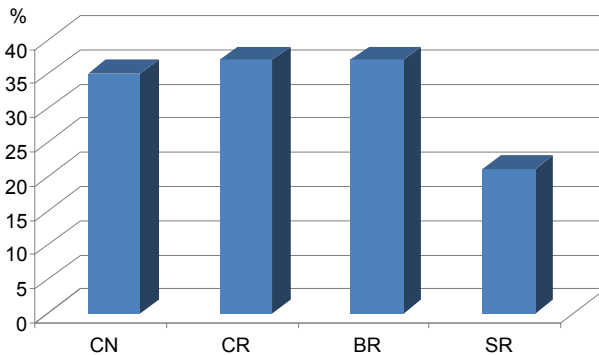
Obróbka cieczą jonową nie miała negatywnego wpływu na przebieg fermentacji, na co wskazują uzyskane wartości liczebności komórek drożdżowych (tab. 1). Jednak zaobserwowano dość małe wartości żywotności drożdży, co było prawdopodobnie związane z quasi-głodowymi warunkami wzrostu (małe stężenie glukozy, brak źródła azotu).

Wydajność etanolu z jednostki masy glukozy uwolnionej z surowca (rys. 4) przekroczyła wartość 35% jedynie w przypadku surowców niezawierających komponentu ligninowego. W przypadku słomy żytniej uzyskano jedynie 0,2 g etanolu z 1 g glukozy. Było to związane prawdopodobnie z niepełnym usunięciem ligniny w wyniku obróbki cieczą jonową.



Rys. 3. Stężenie glukozy po hydrolizie i etanolu po fermentacji różnych surowców: CN – celuloza natywna, CR – celuloza obrabiana cieczą jonową, BR – bawełna obrabiana cieczą jonową, SR – słoma żytnia obrabiana cieczą jonową

Fig. 3. Concentration of glucose after hydrolysis and ethanol after fermentation of different raw materials: CN – native cellulose, CR – cellulose after treatment with ionic liquid, BR – cotton after treatment with ionic liquid, SR – rye straw after treatment with ionic liquid



Rys. 4. Wydajność etanolu z glukozy powstałej w wyniku hydrolizy różnych surowców: CN – celuloza natywna, CR – celuloza obrabiana cieczą jonową, BR – bawełna obrabiana cieczą jonową, SR – słoma żytnia obrabiana cieczą jonową

Fig. 4. Ethanol yield from glucose released by hydrolysis of different raw materials: CN – native cellulose, CR – cellulose after treatment with ionic liquid, BR – cotton after treatment with ionic liquid, SR – rye straw after treatment with ionic liquid

Tabela 1. Liczebność i żywotność komórek drożdżowych po 72 h fermentacji
Table 1. Cell number and viability of yeast after 72 h of fermentation process

Próbka Sample	Liczebność (jtk/ml) Number (cfu/ml)	Żywotność Viability (%)
Celuloza natywna Native cellulose	$6,84 \cdot 10^8$	74,4
Celuloza obrabiana cieczą jonową Cellulose after treatment with ionic liquid	$2,1 \cdot 10^9$	81,6
Bawełna obrabiana cieczą jonową Cotton after treatment with ionic liquid	$3,1 \cdot 10^9$	94,2
Słoma żytnia obrabiana cieczą jonową Rye straw after treatment with ionic liquid	$2,41 \cdot 10^9$	12,8

Wnioski

1. Wstępna obróbka surowców celulozowych: bawełny i celulozy mikrokrystalicznej octanem 1-etylo-3-metyloimidazoliowym powoduje rekrytalizację tych materiałów od struktury I do struktury II oraz zmniejszenie krystaliczności względnej.

2. Obróbka celulozy mikrokrystalicznej cieczą jonową nie wpływa na efektywność produkcji etanolu z tego surowca.

3. Octan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy nie hamuje rozwoju komórek drożdży oraz nie wpływa negatywnie na żywotność komórek.

4. Obróbka słomy żytniej cieczą jonową umożliwia hydrolizę enzymatyczną tego surowca, jednak wydajność etanolu z 1 g tak uzyskanej glukozy jest dwukrotnie mniejsza niż w przypadku celulozy mikrokrystalicznej i bawełny.

Literatura

- BERLIN A., BALAKSHIN M., GILKES N., KADLA J., MAXIMENKO V., KUBO S., SADDLER J., 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* 125: 198-209.
- BORYSIK S., DOCZEKALSKA B., 2005. X-ray diffraction study of pine wood treated with NaOH. *Fibres Text. East. Eur.* 13: 87-89.
- BURCZYK B., 2009. Biorafinerie: ile w nich chemii? *Wiad. Chem.* 63, 9-10: 742-744.
- DADI A.P., SCHALL C.A., VARANASI S., 2007. Mitigation of cellulose recalcitrance of enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment. *Biochem. Biotechnol.* 136-140: 407-412.
- FUKAYA Y., HAYASHI K., WADA M., OHNO H., 2008. Cellulose dissolution with polar ionic liquids under mild conditions: required factors for anions. *Green Chem.* 10: 44-46.
- 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.
- MALHERBE S., CLOETE T.E., 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and application, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 105-114.

- NARA S., MAORI A., KOMIYA T., 1978. Study on relative crystallinity of moist potato starch. *Starch/Stärke* 30, 4: 111-114.
- NOWACKI W., 2007. Przyrodnicze i ekonomiczne uwarunkowania wykorzystania krajowej bazy surowcowej do produkcji bioetanolu. *Rocz. Nauk. SERiA* 9, 1: 338-339.
- PARK S., BAKER J.O., HIMMEL M.E., PARILLA P.A., JOHNSON D.K., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Bio-technol. Biofuels* 3: 10.
- SUN Y., CHENG J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.
- SZYMANOWSKA D., GRAJEK W., 2009. Fed-batch simultaneous saccharification and ethanol fermentation of native corn starch. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 8, 4: 5-16.
- ZHAO H., JONES C.L., BAKER G.A., XIA S., OLUBAJO O., PERSON V.N., 2009. Regenerating cellulose from ionic liquid for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139: 47-45.

RECEIVING OF BIOETHANOL FROM RAW MATERIALS CONSISTING OF CELLULOSE WITH THE IONIC LIQUID UTILISATION

Summary. The main purpose of the work was to evaluate the influence of the pretreatment of microcrystalline cellulose and cotton with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate on the hydrolysis and ethanol fermentation of these raw materials. Moreover, the usability of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate for the pretreatment of rye straw was estimated. It was found that the pretreatment of cotton and microcrystalline cellulose with the ionic liquid results in recrystallization of these materials from the structure of cellulose I to the cellulose II, as well as in the reduction of their relative crystallinity. However, no effect on the effectiveness of ethanol production has been found. 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate does not inhibit the growth of the yeast cells, and does not negatively influence their viability. Pretreatment of the rye straw with ionic liquid enables the enzymatic hydrolysis of this raw material. Nevertheless, the ethanol productivity from 1 g of glucose obtained that way was twice lower than in the case when microcrystalline cellulose or cotton were used as raw materials.

Key words: bioethanol, rye straw, cotton, microcrystalline cellulose, enzymatic hydrolysis

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Małgorzata Smuga-Kogut, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Koszalińska, ul. Raclawicka 15-17, 75-620 Koszalin, Poland, e-mail: m.smuga@interia.eu

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

13.01.2012

Do cytowania – For citation:

*Smuga-Kogut M., Szymanowska D., Lewandowicz G., Zgórska K., 2012. Otrzymywanie bioetanolu z surowców zawierających celulozę z wykorzystaniem cieczy jonowej. *Nauka Przyr. Technol.* 6, 2, #33.*