

**ANALÝZA SACHARIDOV VZNIKAJÚCICH PRI HYDROLÝZE
DREVA *POPULUS* × *EURAMERICANA* 'I-214'**

**CARBOHYDRATES ANALYSIS ARISING AT WOOD HYDROLYSIS
OF *POPULUS* × *EURAMERICANA* 'I-214'**

František Kačík – Jaroslav Ďurkovič – Jozef Sivák

ABSTRACT

Poplar wood is a suitable raw material for bioethanol production. The first step in its making includes pre-treatment with water or dilute acids at an elevated temperature. In this step, the hemicelluloses are hydrolysed and make more accessible the crystalline part of cellulose for subsequent enzymatic hydrolysis. In this paper the carbohydrate composition of *Populus* × *euramericana* 'I-214' as well as the concentration of carbohydrates in hydrolysates arising at the hot water pre-treatment at 180 °C during 5, 10, 20, 50 and 70 minutes of hydrolysis are presented. Saccharides were analysed by the method of high performance liquid chromatography using Aminex HPX – 87P column according to the National Renewable Energy Laboratory (NREL) analytical procedure.

Wood of *Populus* × *euramericana* 'I-214' contains 50.98 % of glucose, 21.49 % of xylose, 3.43 % of mannose, 0.66 % of galactose and 0.54 % of arabinose, respectively. Optimum yields of carbohydrates were found at the hydrolysis time of 30 minutes ($5.93 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$), which represents 15.38 % of total carbohydrates in the native poplar wood.

In the early stages of the process, mainly polysaccharides are released into the aqueous solution which are further hydrolysed to monosaccharides and partially degraded to 2-furaldehyde. The predominant carbohydrate in solution was D-xylose, which is the main hemicellulose monosaccharide in poplar wood. The concentration of this carbohydrate in solution at 30-minute hydrolysis was $4.99 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, i.e. 46.44 % of xylose was released from the native wood.

Keywords: poplar, hydrolysis, liquid chromatography, saccharides.

ÚVOD

Rozvoj ľudskej civilizácie je v posledných desaťročiach spojený so vzrastajúcou spotrebou energie. Nové technológie priniesli síce zníženie mernej energie, vzrastajúca populácia a životná úroveň však zvyšujú požiadavky na celkové množstvo energie. Fosílna palivá, ktoré sú v súčasnosti hlavným zdrojom energie bude potrebné v budúcnosti nahradiť inými zdrojmi z dôvodu ich limitovaných zásob a negatívneho dopadu na životné prostredie. Využívanie jadrovej energie je rizikové a po problémoch vo Fukušime (Japonsko) niektoré krajiny uvažujú s obmedzením, resp. zastavením výroby energie v jadrových elektrárnach. Tieto perspektívy (zámery) ešte viac vyvolávajú potrebu náhrady

fosílnych zdrojov energie ich obnoviteľnými alternatívami. Podľa RAGAUSKASA *et al.* (2006) “Skôr ako zmrzneme v tme, musíme prejsť od neobnoviteľných zásob palív k obnoviteľným zdrojom“.

Perspektívnym obnoviteľným zdrojom energie v podmienkach Slovenska s vysokým technickým potenciálom sú lignocelulózy suroviny a odpady. Najmä rýchlorastúce dreviny, s krátkou dobou rotácie, sú nádejnou energetickou surovinou pre priame využitie a po úprave aj substrátom pre niektoré biotechnológie. Rastlinná biomasa môže byť premenená na rôzne typy energie (tepelná, elektrická, palivá v plynnom, kvapalnom aj tuhom skupenstve) a môže byť využitá aj ako zdroj pre výrobu rôznych chemikálií. V súčasnosti sa intenzívny výskum venuje najmä rýchlorastúcim drevinám, ktoré v krátkom čase poskytujú dostatok hmoty na ďalšie spracovanie. Medzi takého typu drevín patria rôzne topole, ktoré sa okrem rýchleho prírastku drevnej hmoty vyznačujú aj dobrou prispôsobivosťou rôznym lokalitám a majú vhodné chemické zloženie pre ich ďalšie využitie (KLAŠNJA *et al.* 2005, 2008, LAUROVÁ *et al.* 2009ab, SANNIGRAHI *et al.* 2010, KUČEROVÁ *et al.* 2011).

Fyzikálno-chemická predúprava dreva parením alebo varením vo vode je aj dôležitým procesom celulózo-papierenskej a drevárskej výroby. Pri výrobe bioetanolu sa hydrotermickou predúpravou dendromasy alebo fytomasy dosiahne, aby následnými hydrolyznými postupmi sa získali monosacharidy schopné mikrobiálnej fermentácie s vysokým výťažkom produktu. Použitá predúprava suroviny prebieha bez prídavku chemických látok, čím je šetrná k životnému prostrediu. Po vyriešení niektorých technologických problémov a dosiahnutí vyššieho stupňa konverzie polysacharidov lignocelulózy zdrojov na etanol, môžu tieto suroviny druhej generácie čoskoro konkurovať tradičným uhlíkovým palivám.

Cieľom príspevku je informovať o horúcovodnej predúprave dreva *Populus × euramericana* 'I-214' v procese jeho spracovania na sacharidy.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Vzorku dreva topoľového klonu *Populus × euramericana* 'I-214' (registračné číslo klonu, ktorý bol vyšľachtený v Taliansku) vo veku 16 rokov, ktorý pochádza z populéta v lokalite Gabčíkovo, sme hydrolyzovali v reaktore PARR 4561. Do reakčnej nádoby sme navážili 10 g vzorky (v prepočte na absolútne suchú vzorku) a pridali 200 ml destilovanej vody (hydromodul 1:20). Reakčnú nádobu uzavreli a vyhriali na teplotu 180 °C v priebehu 20 minút. Počas hydrolyzného pôsobenia sme kontinuálne odoberali vzorku hydrolyzátu (2 ml) v časových intervaloch 5, 10, 30, 50 a 70 minút. Každá várka sa vykonala dvakrát a chromatografická analýza hydrolyzátovej bola vykonaná paralelne.

Stanovenie monosacharidov

Alikvotnú časť z hydrolyzátu sme odpipetovali do slzovitej banky a upravili jej hodnotu pH na 7 pridaním roztoku hydroxidu sodného (NaOH). Vzorku sme po filtrácii použili na chromatografické stanovenie monosacharidov v hydrolyzátoch (SLUITER *et al.* 2011).

Stanovenie monosacharidov, oligosacharidov a polysacharidov

V druhej časti hydrolyzátovej sme po zhydrolyzovaní glykozidových väzieb v uvoľnených nízkomolekulových fragmentoch polysacharidov stanovili celkový obsah uvoľnených sacharidov. K 5 ml hydrolyzátu sme pridali 0,42 ml koncentrovanej kyseliny sírovej (96 %), nasledovala 4-hodinová hydrolyza vo vriacom vodnom kúpeli pod spätným

chladičom. Po ochladiení sme vzorku preniesli do odmernej banky (25 ml) a doplnili destilovanou vodou po značku. Z odmernej banky sme odpipetovali 5 ml roztoku a pridaním roztoku hydroxidu sodného (NaOH) sme upravili pH na hodnotu 7. Potom sme vzorku prefiltrovali a použili na chromatografické stanovenie celkového množstva sacharidov v hydrolyzátach (SLUITER *et al.* 2011). Oligosacharidy sme stanovili ako rozdiel celkových sacharidov a monosacharidov (ARA – arabinóza, XYL – xylóza, MAN – manóza, GLC – glukóza, GAL – galaktóza).

Stanovenie sacharidov v topoľovom dreve

V topoľovom dreve sme sacharidy stanovili po dvojstupňovej hydrolyze kyselinou sírovou (FOSTON, RAGASKAUS 2010). V prvom stupni sme polysacharidy hydrolyzovali 72 % kyselinou sírovou 1 hodinu pri teplote 30 °C, v druhom sme roztok kyseliny sírovej zriedili na koncentráciu 3 % a hydrolyzu sme vykonali 1 hodinu pri teplote 121 °C. Výsledný roztok sme ochladili na laboratórnu teplotu a po neutralizácii sme sacharidy analyzovali metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Prítomné sacharidy v hydrolyzátach aj v dreve boli stanovené podľa metódy NREL (SLUITER *et al.* 2011) vysokoúčinnnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) za nasledovných podmienok:

Kolóna:	Aminex HPX – 87P
Detektor:	RI
Mobilná fáza:	deionizovaná voda
Prietok mobilnej fázy:	0,6 ml·min ⁻¹
Teplota:	80 °C
Injekovaný objem:	50 µl

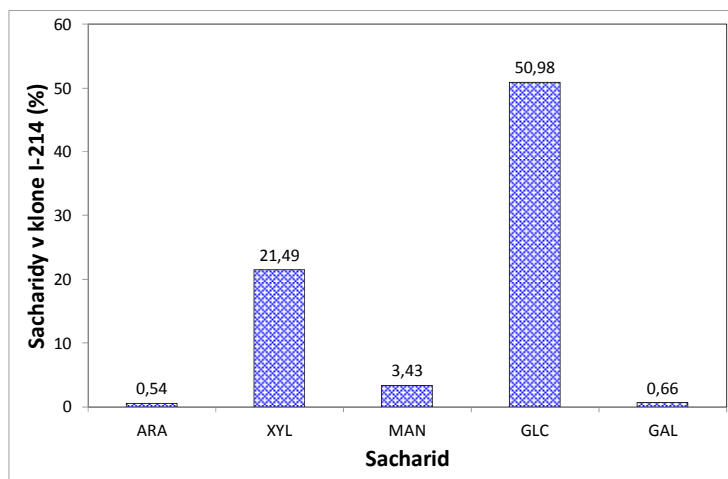
Množstvo jednotlivých sacharidov bolo stanovené metódou externého štandardu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

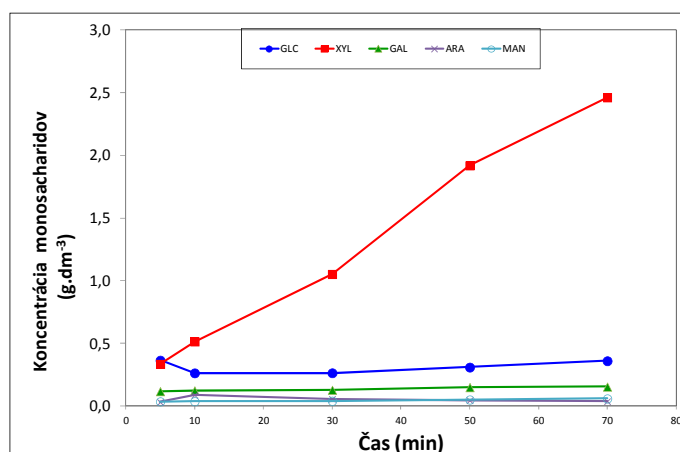
Pri hydrolyze topoľového dreva prechádzajú do roztoku jednotlivé monosacharidy v závislosti od ich množstva v pôvodnej vzorke, prístupnosti hydrolytického činidla a ľahkosti hydrolyzy. Výsledky stanovenia sacharidov v topoľovom klone 'I-214' (obr. 1) sú v dobrej zhode s údajmi iných autorov. SANNIGHARI *et al.* (2010) uvádzajú pre jednotlivé sacharidy nasledovné hodnoty v 9 rôznych druhoch topoľov: arabinán 0,41–0,89 %, xylán 13,07–18,71 %, manán 1,70–3,90 %, galaktán 0,60–1,50 %, glukán 39,23–48,95 %.

Z obr. 2 vyplýva, že pri hydrolyze topoľového dreva dochádza k zvyšovaniu koncentrácie monosacharidov v hydrolyzátach s predlžujúcim sa časom pôsobenia. Dominantným sacharidom je xylóza, ktorá sa uvoľňuje hydrolyzou xylánov, v menšej miere sa v hydrolyzátach nachádza glukóza, ktorá vzniká z hemicelulóz glukánového typu a hydrolyzou amorfnej časti celulózy. Ostatné sacharidy sa vyskytujú v nižších koncentráciách, čo je spôsobené ich menším zastúpením vo východiskovej surovine (obr. 1).

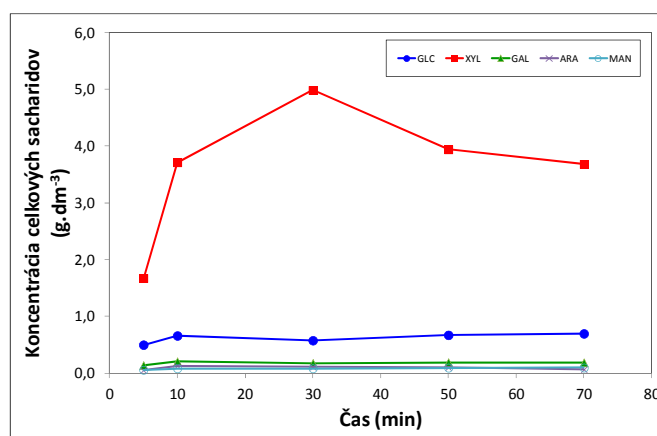
Pri hydrolyze topoľového dreva do roztoku prechádzajú monosacharidy aj polysacharidy (t. j. celkové množstvo uvoľnených sacharidov), ich sumárne hodnoty koncentrácií sú znázornené na obr. 3. Z grafu vyplýva, že množstvo xylózy prechádza maximom, koncentrácie ostatných sacharidov sa mierne zvyšujú. Pokles xylózy môže byť spôsobený hydrolyzou xylánov na monométnu formu ako aj čiastočnou dehydratáciou xylózy na 2-furaldehyd. Podobné závislosti boli pozorované pri hydrolyze rôznych druhov biomasy (GARROTE *et al.* 1999ab, 2001, GARROTE, PARAJÓ 2002, LAUROVÁ *et al.* 2009c, KAČÍK, LAUROVÁ 2010).



Obr. 1 Množstvá sacharidov v dreve topoľového klonu 'I-214'.
Fig. 1 Amounts of saccharides in poplar hybrid 'I-214'.



Obr. 2 Koncentrácie monosacharidov v hydrolyzátoch z topoľového klonu 'I-214'.
Fig. 2 Concentration of monosaccharides in hydrolysates of poplar hybrid 'I-214'.

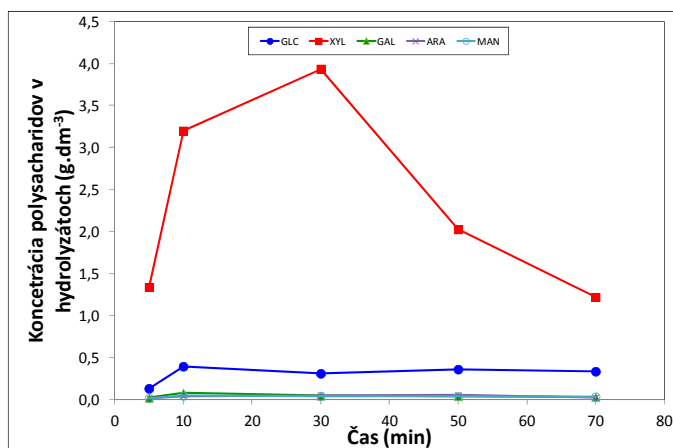


Obr. 3 Koncentrácie celkových sacharidov v hydrolyzátoch z topoľového klonu 'I-214'.
Fig. 3 Concentration of total saccharides in hydrolysates of poplar hybrid 'I-214'.

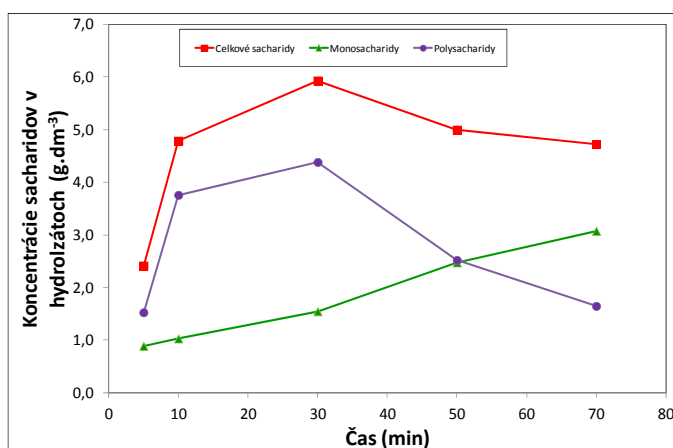
Na obr. 4 sú prezentované koncentrácie jednotlivých sacharidov v ich polymérnej forme. Z uvedených údajov vyplýva, že xylóza sa v začiatkových fázach hydrolyzy

uvoľňuje do roztoku najmä vo forme polysacharidov, predĺženie hydrolyzy spôsobuje pokles prítomnosti xylánov v hydrolyzáte. Podobné závery dosiahli aj iní autori (JOSEFSSON *et al.* 2002, NEGRO *et al.* 2003, SUN, CHENG 2005).

Na obr. 5 sú znázornené sumárne koncentrácie sacharidov v hydrolyzátoch topoľového dreva v rôznych formách. Z nameraných hodnôt vyplýva, že v prvých etapách hydrolyzného pôsobenia do roztoku prechádzajú sacharidy prevažne vo svojej polymérnej forme, neskôr sa začínajú rýchlejšie hydrolyzovať na monométnu formu a čiastočne aj degradovať na 2-furaldehyd. Medzi karbonylovými zlúčeninami v hydrolyzátoch rôznych druhov drevín boli plynovou, resp. kvapalinovou chromatografiou identifikované látky z benzenoidnej časti dreva, ale aj zlúčeniny vznikajúce rozkladom sacharidov: vanilín, syringaldehyd, 2-furaldehyd, 5-hydroxymetyl-2-furaldehyd, kyselina levulová, p-hydroxybenzaldehyd, kyselina vanilová, kyselina syringová a p. (ESTEGHLALIAN *et al.* 1997, KAČÍK 2002, KAČÍK *et al.* 2006). Cieľom horúcovodnej predúpravy je v prvom rade získať maximálne množstvo monosacharidov z hemicelulóz (pri ich minimálnej degradácii) a zároveň narušiť štruktúru celulózy pre následnú enzymatickú hydrolyzu.



Obr. 4 Koncentrácie polysacharidov v hydrolyzátoch z topoľového klonu 'I-214'.
Fig. 4 Concentration of polysaccharides in hydrolysates of poplar hybrid 'I-214'.



Obr. 5 Sumárne koncentrácie sacharidov v hydrolyzátoch z topoľového klonu 'I-214'.
Fig. 5 Sum of concentrations of saccharides in hydrolysates of poplar hybrid 'I-214'.

Hydrolyzáty získané po hydrotermickom pôsobení na lignocelulóзовú biomasu môžu vďaka svojmu zloženiu slúžiť ako surovina pre získanie technicky a priemyselne

dôležitých látok (napríklad xylitolu). Z perspektívnych možností ich zhodnotenia je potrebné uviesť aj výrobu bioetanolu, enzymatickou fermentáciou uvoľnených pentóz a hexóz (Ollson, Hahn-Hägerdal 1996, Košíková, Bučko 1999, Sreenath, Jeffries 2000, Sun, Cheng 2002, United States Patent 2002, Hahn-Hägerdal *et al.* 2006, Canilha *et al.* 2008, Sánchez, Cardona 2008).

ZÁVER

Topoľové drevo je vhodnou surovinou na výrobu bioetanolu. Prvým krokom pri jeho výrobe je predúprava vodou alebo zriedenými kyselinami za zvýšenej teploty. V tomto stupni sa hydrolyzujú hemicelulózy a sprístupňuje sa kryštalický podiel celulózy pre následnú enzymatickú hydrolyzu.

V predloženom príspevku je prezentované zloženie sacharidov v topoľovom klone 'I-214' a v hydrolyzátoch po horúcovodnej predúprave pri teplote 180 °C a trvaní 5, 10, 30, 50 a 70 minút. Drevo topoľového klonu 'I-214' obsahovalo 50,98 % glukózy, 21,49 % xylózy, 3,43 % manózy, 0,66 % galaktózy a 0,54 % arabinózy (spolu 77,10%). Optimálne koncentrácie sacharidov boli zistené pri trvaní hydrolyzy 30 minút (5,93 g·dm⁻³), čo predstavuje 15,38 % celkových sacharidov v skúmanej vzorke. V prvých etapách pôsobenia sa do hydrolyzátu uvoľňovali najmä polysacharidy, ktoré sa vo vodnom roztoku ďalej hydrolyzovali na monomérnu formu a pravdepodobne aj čiastočne degradovali na 2-furaldehyd. Dominantným sacharidom v roztoku bola D-xylóza, ktorá je aj hlavným monosacharidom v hemicelulózach topoľového dreva a jej koncentrácia v roztoku bola pri 30 minútovej hydrolyze 4,99 g·dm⁻³, t.j. z pôvodného dreva sa uvoľnilo 46,44 % xylózy.

LITERATÚRA

- CANILHA, L., CARVALHO, W.; FELIPE, M., SILVA, J. B. 2008. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2): 333–336.
- ESTEGHLALIAN, A., HASHIMOTO, A. G., FENSKE, J. J., PENNER, M. H. 1997. Modeling and optimization of the dilute - sulfuric - acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology*, 1997, 59: 129–136.
- FOSTON, M., RAGAUSKAS, A. 2010. Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of *Populus* and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*, 34: 1885–1895.
- GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. 1999a. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh – und Werkstoff*, 57(3): 191–202.
- GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. 1999b. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(11): 1101–1109.
- GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. 2001. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochemistry*, 36(6): 571–578.
- GARROTE, G., PARAJÓ, J. C. 2002. Non-isothermal autohydrolysis of Eucalyptus wood. *Wood Science and Technology*, 36: 111–113.
- HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F., LIDÉN, G., ZACCHIA, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12): 549–556.
- JOSEFSSON, T., LENNHOLM, H., GELLERSTEDT, G. 2002. Steam explosion of aspen wood. Characterisation of reaction products. *Holzforschung* 56: 289–297.

- KAČÍK, F. 2002. Tvorba a chemické zloženie hydrolyzáto v systéme drevo – voda - teplo. Vedecké štúdie 7/2001/A. Zvolen : Technická univerzita vo Zvolene, 75 s. ISBN 80-228-1098-3.
- KAČÍK, F., LAUROVÁ, M. 2010. Vplyv kvality dreva na vlastnosti produktov hydrolyzy rýchlorastúcich drevín. In.: Kurjatko, S. et al.: Parametre kvality dreva určujúce jeho finálne použitie. Zvolen : TU vo Zvolene, 2010, s. 128–145. ISBN 978-80-22
- KAČÍK, F., LAUROVÁ, M., VÝBOHOVÁ, E. 2006. Chromatografická analýza karbonylových zlúčenín vznikajúcich pri hydrolyze biomasy. In.: Environmentálne inžinierstvo. Košice : Technická univerzita v Košiciach. 2006, s. 19–22, ISBN 80-8073-607-3
- KLAŠNJA, B., ORLOVIC, S., GALIC, Z. 2005. Chemical composition variability of juvenile wood of selected poplar clones. Wood Research 50(1): 19–26.
- KLAŠNJA, B., ORLOVIC, S., GALIC, Z. *et al.* 2008. Poplar biomass of high density short rotation plantations as raw material for energy production. Wood Research 53(2): 27–38.
- KOŠÍKOVÁ, B., BUČKO, J. 1999. Biotechnológie a využitie biomasy. Vysokoškolská učebnica. Zvolen : Technická univerzita vo Zvolene, 162 s. ISBN 80-228-0862-8.
- KUČEROVÁ, V., JAĎUDOVÁ, K., HALAJOVÁ, L., LAUROVÁ, M. 2011. Hydrolysis of recycled fibers. Chem. Listy, 105: 871–1072.
- LAUROVÁ, M., KAČÍK, F., SIVÁK, J. 2009a. Hydrolyzne procesy dreva rýchlorastúcich drevín. Zvolen : Technická univerzita vo Zvolene, 77 s. ISBN 978-80-228-2088-2.
- LAUROVÁ, M., KAČÍK, F., SIVÁK, J. 2009b. Vodná predhydrolyza vybraných druhov rýchlorastúcich drevín. In.: Vybrané procesy pri spracovaní dreva. Zvolen : TU vo Zvolene, ISBN 978-80-228-2006-6.
- LAUROVÁ, M., KAČÍK, F., SIVÁK, J. 2009c. Water prehydrolysis of willow (*Salix alba* L.). Acta Facultatis xylogologiae Zvolen, Zvolen : Technická univerzita vo Zvolene, 51(1): 19–26, ISBN 1336-3824.
- NEGRO, M.J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I., OLIVA, J.M., CABANAS, A., BALLESTEROS, M. 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. Appl. Biochem. Biotechnol. 105: 87–100.
- OLLSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology, 18(5): 312–331.
- SÁNCHEZ, ÓSCAR J., CARDONA, CARLOS A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology, 99(13): 5270–5295.
- SANNIGRAHI, P., RAGAUSKAS, A., TUSKAN, G. 2010. Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 4(2): 209–226.
- RAGAUSKAS, A., WILLIAMS, C., DAVISON, B., BRITOVSEK, G., CAIRNEY, J., ECKERT, C. *et al.* 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. Science, 311: 484–489.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. 2011. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42618. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. Dostupné na internete: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>> (21.8.2011).
- SREENATH, H. K., JEFFRIES, T. W. 2000. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. Bioresource Technology, 72(3): 253–260.
- SUN, Y., CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 2002. 83: 1–11.
- SUN, Y., CHENG, J.J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Bioresource Technology, 96: 1599–606.
- UNITED STATES PATENT 6130076. 2000. Ethanol production using a soy hydrolysate-based medium or a yeast autolysate-based medium.

Pod'akovanie

Táto štúdia / publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie centra excelentnosti: Adaptívne lesné ekosystémy, ITMS: 26220120049, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

Adresa autorov

Prof. RNDr. František Kačík, PhD.
Ing. Jozef Sivák
Technická univerzita vo Zvolene
Drevárska fakulta
Katedra chémie a chemických technológií
T. G. Masaryka 24
960 53 Zvolen
Slovensko
kacik@tuzvo.sk
sivak@tuzvo.sk

Dr. Mgr. Jaroslav Ďurkovič
Technická univerzita vo Zvolene
Lesnícka fakulta
Katedra fytoológie
T. G. Masaryka 24
960 53 Zvolen
Slovensko
durkovic@vsld.tuzvo.sk