

HORÚCOVODNÁ PREDÚPRAVA TOPOLOVÉHO A AGÁTOVÉHO DREVA PRE VÝROBU BIOETANOLU

HOT-WATER PRETREATMENT OF POPLAR AND BLACK LOCUST WOOD FOR BIOETHANOL PRODUCTION

František Kačík – Jaroslav Ďurkovič – Eva Zenková

ABSTRACT

Fast growing trees are 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' and *Robinia pseudoacacia* L. as well as the concentration of carbohydrates in hydrolysates arising at the hot water pre-treatment at 180 °C during 5, 10, 20, 30 and 50 minutes are presented. Saccharides were analysed by the method of high performance liquid chromatography according to the National Renewable Energy Laboratory (NREL) analytical procedure.

Wood of *Populus × euramericana* 'I-214' contain 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 g·dm⁻³), which represents 15.43% of total carbohydrates in the native poplar wood.

Wood of *Robinia pseudoacacia* L. contain 51.82 % of glucose, 16.26% of xylose, 2.25% of mannose, 2.74% of galactose and 1.28% of arabinose, respectively. Optimum yields of carbohydrates were found at the hydrolysis time of 20 minutes (5.24 g·dm⁻³), which represents 14.12 % of total carbohydrates in the native black locust 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 xylose, which is the main hemicellulose monosaccharide in poplar wood. From the comparison of both fast growing trees can be concluded that black locust wood releases comparable amounts of carbohydrates during aqueous pretreatment and would be suitable for this type of treatment.

Keywords: poplar, black locust, hydrolysis, liquid chromatography, saccharides.

ÚVOD

Hydrolyza biomasy je známa už od začiatku 19. storočia, kedy sa začala používať hydrolyza zriedenými aj koncentrovanými kyselinami s cieľom zhydrolyzovať celulózu na glukózu, ktorá sa spracovala na etanol (SEAMAN *et al.* 1945). Za týchto podmienok

hydrolýzy dochádza k rozkladu hemicelulóзовých sacharidov, preto sa začali používať miernejšie spôsoby predúpravy s cieľom získať ich maximálne výťažky a zachovať čo najmenej odbúravanú celulózu v pevnom zvyšku. Tento sa ďalej hydrolyzuje buď kyselinami alebo enzymaticky na monosacharidy a skvasuje na bioetanol. Predúprava biomasy za miernych podmienok sa ukázala byť výhodná na odstránenie hemicelulózy a narušenie celulózovej štruktúry pre jej ľahšiu hydrolýzu na glukózu (GRETHLEIN *et al.* 1991, WYMAN 2013).

Topoľové aj agátové drevo patrí do skupiny rýchlorastúcich drevín. V súčasnosti je veľký dôraz kladený najmä na spracovanie rôznych topoľových klonov na energetické účely (SANNIGRAHI *et al.* 2010, KAČÍK *et al.* 2012a, ĎURKOVIČ *et al.* 2013). Agátovému drevu je z tohto pohľadu venovaná oveľa menšia pozornosť a v literatúre je možné nájsť len niekoľko prác venovaných predúprave agátu (GARLOCK *et al.* 2012, CHUNDAWAT *et al.* 2013).

Vzhľadom na chýbajúce informácie o predúprave agátového dreva bolo našim cieľom vykonať jeho predúpravu za rovnakých experimentálnych podmienok ako v prípade topoľového dreva, porovnať výťažky sacharidov a zistiť vhodnosť vodnej predúpravy agátového dreva na jeho ďalšie spracovanie na bioetanol.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Zo vzoriek dreva topoľového klonu *Populus × euramericana* 'I-214' vo veku 16 rokov a dreva agátu bieleho (*Robinia pseudoacacia* L.) vo veku 28 rokov sme pripravili piliny, ktoré sme presitovali a na hydrolýzu sme použili častice s veľkosťou 0,5 až 1,0 mm, ktoré sme hydrolyzovali v reaktore PARR 4561 (KAČÍK *et al.* 2012b, 2014). 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 sme uzavreli a vyhriali na teplotu 180 °C v priebehu 20 minút, tlak v reakčnej nádobe bol 0,8 MPa. Dosiadnutú teplotu sme udržiavali počas 5, 10, 20, 30 a 50 minút, potom sme reakčnú nádobu čo najrýchlejšie ochladili v nádobe so studenou vodou a ľadom. Každú várku sme vykonali dvakrát a hydrolyzáty sme analyzovali paralelne, takže pri každej úrovni úpravy sme získali 4 výsledky.

Stanovenie monosacharidov

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

Stanovenie oligosacharidov a polysacharidov

V druhej časti hydrolyzátoch 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 hydrolýza vo vriacom vodnom kúpeli pod spätným chladičom. Po ochladení sme vzorku preniesli do odmernej banky (25 ml) a doplnili destilovanou vodou. 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 hydrolyzátoch (SLUITER *et al.* 2011). Oligosacharidy sme stanovili ako rozdiel celkových sacharidov

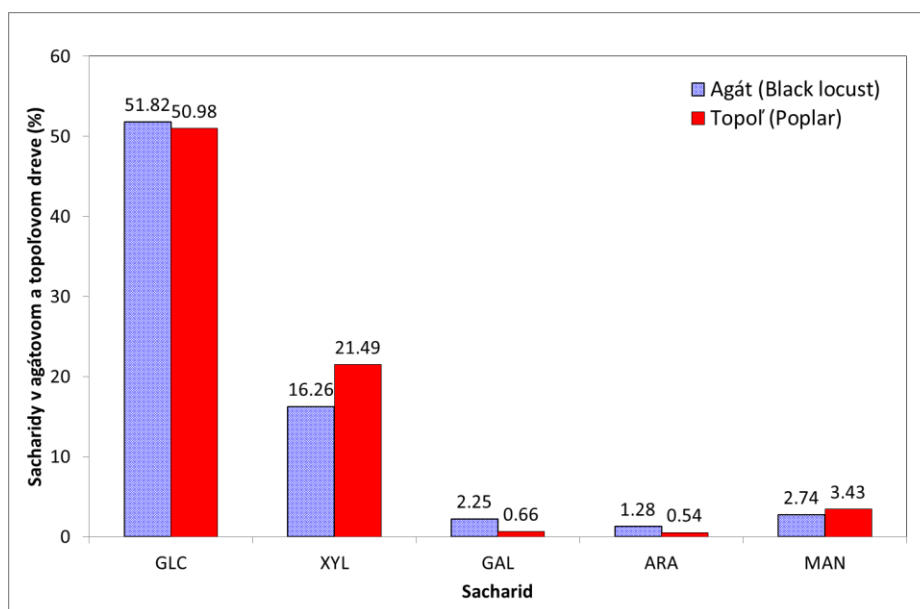
a monosacharidov (ARA – arabinóza, XYL – xylóza, MAN – manóza, GLC – glukóza, GAL – galaktóza).

Stanovenie sacharidov v dreve

V topoľovom aj agátovom 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. Sacharidy v hydrolyzátoch z dreva boli stanovené podľa metódy NREL (SLUITER *et al.* 2011) vysokoúčinnnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC).

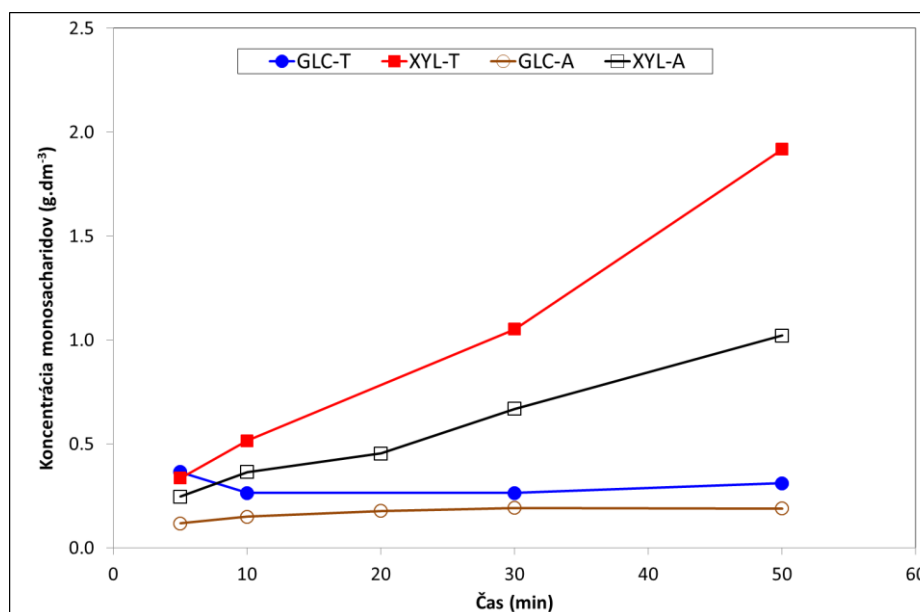
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri hydrolyze topoľového aj agátového 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' aj v dreve agátu bieleho (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 %. Podľa Fengela a Wegenera (2003) agát obsahuje 50,1 % celulózy, 23,7 % pentózanov, 20,6 % lignínu, 2,8 % extraktívnych látok a 0,3 % popola. Celkový polysacharidový podiel (holocelulóza) dosahuje hodnotu 81,7 %. Z neglukózových sacharidov sa v hemicelulózach agátového dreva vyskytuje manóza (2,2 %), xylóza (16,7 %), galaktóza (0,8 %) a arabinóza (0,4 %). Z našich analýz vyplýva, že topoľové drevo obsahuje menej celulózy a viac hemicelulóz ako agátové drevo.



Obr. 1 Množstvá sacharidov v topoľovom a agátovom dreve (%).
Fig. 1 Amounts of saccharides in poplar and black locust wood (%).

Z obr. 2 vyplýva, že pri vodnej predúprave dochádza k zvyšovaniu koncentrácie monosacharidov v hydrolyzátoch s predlžujúcim sa časom pôsobenia. Dominantným sacharidom je xylóza, ktorá sa uvoľňuje hydrolýzou xylánov, v menšej miere sa v hydrolyzátoch nachádza glukóza, ktorá vzniká z hemicelulóz glukánového typu a hydrolýzou amorfnej časti celulózy. Ostatné sacharidy sa vyskytujú v nižších koncentráciách, čo je spôsobené ich menším zastúpením vo východiskovej surovine (obr. 1) a pre prehľadnosť nie sú v ďalších grafoch prezentované.



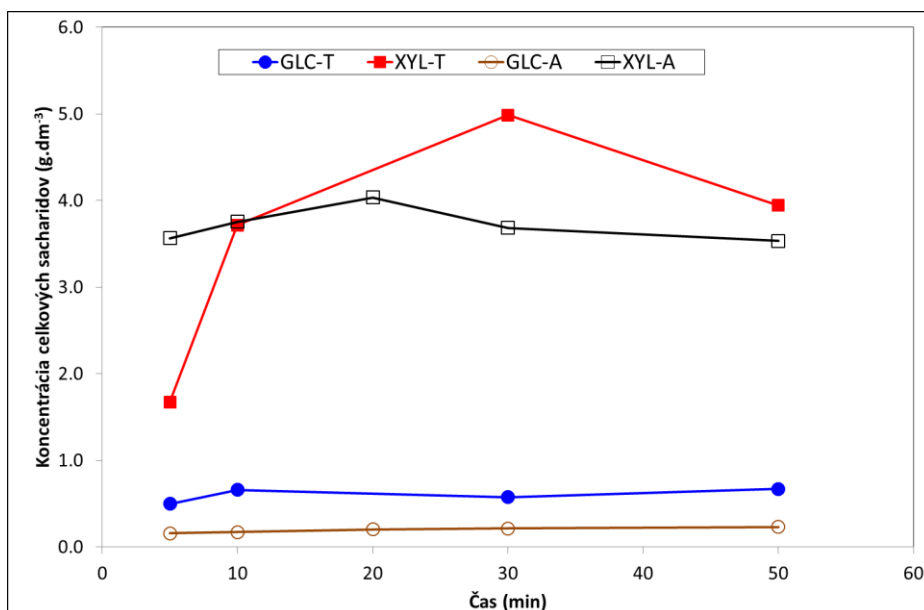
Obr. 2 Koncentrácie monosacharidov xylózy (XYL) a glukózy (GLC) v hydrolyzátoch (T-topoľ, A-agát).
Fig. 2 Concentration of monosaccharides xylose (XYL) and glucose (GLC) in hydrolysates (T-poplar, A-black locust).

Do roztoku prechádzajú monosacharidy aj polysacharidy (t.j. celkové množstvo uvoľnených sacharidov), čo sa vyjadruje ich sumárnymi hodnotami (obr. 3). Z grafu vyplýva, že množstvo xylózy prechádza maximom, koncentrácie glukózy zostávajú prakticky rovnaké. Xylóza pri predúprave agátového dreva dosahuje vysoké koncentrácie už pri krátkych časoch pôsobenia, jej množstvo dosahuje maximum rýchlejšie ako pri topoľovom dreve. Celkové množstvo xylózy uvoľnené z topoľového dreva je však takmer o 24 % vyššie ako z agátového dreva. Pokles xylózy môže byť spôsobený čiastočnou dehydratáciou xylózy na 2-furaldehyd. Podobné závislosti boli pozorované pri hydrolýze rôznych druhov biomasy (GARROTE *et al.* 1999ab, 2001, GARROTE, PARAJÓ 2002).

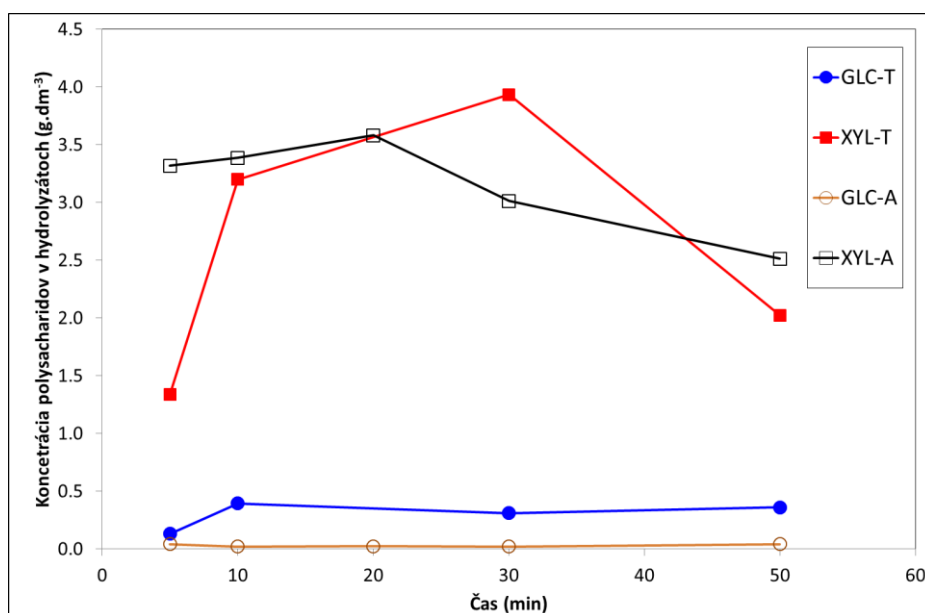
Z koncentrácií sacharidov v polymérnej forme (obr. 4) vyplýva, že xylóza sa v začiatkových fázach hydrolýzy uvoľňuje do roztoku najmä vo forme polysacharidov, predĺženie hydrolýzy spôsobuje pokles prítomnosti xylánov v hydrolyzáte. Podobné závery dosiahli aj iní autori (JOSEFSSON *et al.* 2002, NEGRO *et al.* 2003, SUN, CHENG 2005). Podobne ako v prípade monosacharidov, aj pri ich celkovom množstve sa xylóza začína uvoľňovať rýchlejšie z agátového dreva, vyššie výťažky (o takmer 10 %) sa dosiahli pri topoľovom dreve.

Z nameraných hodnôt sacharidov v hydrolyzátoch v rôznych formách (obr. 5) vyplýva, že v prvých etapách hydrolýzneho pôsobenia do roztoku prechádzajú sacharidy prevažne vo svojej polymérnej forme, neskôr sa začínajú rýchlejšie hydrolyzovať na monomérnu formu a čiastočne aj degradovať na 2-furaldehyd a iné karbonylové zlúčeniny. 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 hydrolýzu, preto jej podmienky (teplota, čas) treba zvoliť pre každú drevinu osobitne.



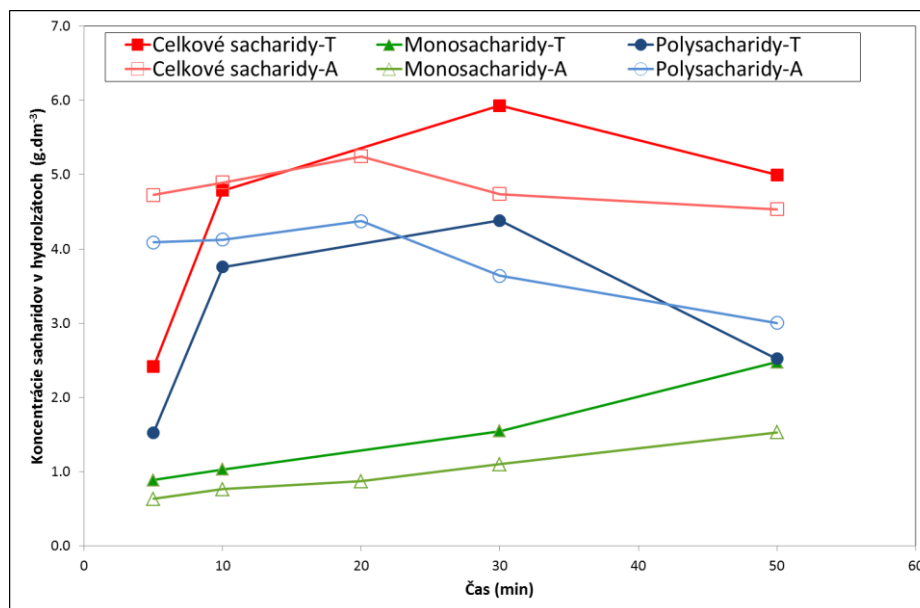
Obr. 3 Koncentrácie celkových sacharidov v hydrolyzátoch (T-topoľ, A-agát).
Fig. 3 Concentration of total saccharides in hydrolysates (T-poplar, A-black locust).



Obr. 4 Koncentrácie polysacharidov v hydrolyzátoch (T-topoľ, A-agát).
Fig. 4 Concentration of polysaccharides in hydrolysates (T-poplar, A-black locust).

Hydrolyzáty získané po hydrotermickom pôsobení na lignocelulóзовú biomasu môžu vďaka svojmu zloženiu slúžiť ako surovina pre získanie technicky a priemyselne dôležitých látok, napr. xylitolu (CANILHA *et al.* 2008). Z perspektívnych možností ich zhodnotenia je potrebné uviesť aj výrobu bioetanolu enzymatickou fermentáciou

uvoľnených pentóz a hexóz (OLLSON, HAHN-HÄGERDAL 1996, SREENATH, JEFFRIES 2000, SÁNCHEZ, CARDONA 2008).



Obr. 5 Koncentrácie sacharidov v hydrolyzátoch topoľového a agátového dreva (T-topoľ, A-agát).
Fig. 5 Concentrations of saccharides in hydrolysates of poplar and black locust wood (T-poplar, A-black locust).

ZÁVER

Rýchlorastúce dreviny sú 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 predložennom príspevku je prezentované zloženie sacharidov v topoľovom klone 'I-214' a v dreve agátu bieleho a v hydrolyzátoch po horúcovodnej predúprave pri teplote 180 °C a trvaní 5, 10, 30 a 50 minút. Topoľové drevo obsahovalo 50,98 % glukózy, 21,49 % xylózy, 3,43 % manózy, 0,66 % galaktózy a 0,54 % arabinózy (spolu 77,10 %), agátové drevo 51,82 % glukózy, 16,26 % xylózy, 2,25 % manózy, 2,74 % galaktózy a 1,28 % arabinózy (spolu 74,34 %). Optimálne koncentrácie sacharidov boli zistené pre topoľové drevo pri trvaní predúpravy 30 minút (5,93 g·dm⁻³), čo predstavuje 15,43 % celkových sacharidov v skúmanej vzorke, pre agátové drevo pri 20 minútovej predúprave (5,24 g·dm⁻³), čo predstavuje 14,12 % 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 čiastočne degradovali na 2-furaldehyd a ďalšie karbonylové zlúčeniny. Dominantným sacharidom v roztoku bola 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, pri agátovom dreve to bolo po 20 minútovej predúprave 4,03 g·dm⁻³, t.j. z pôvodného dreva sa uvoľnilo 49,57 % xylózy.

Z výsledkov vyplýva, že výťažky sacharidov pri vodnej predúprave agátového dreva sú porovnateľné s výťažkami z topoľového dreva a je preto možné predpokladať, že uvedený spôsob je vhodný na využitie agátu bieleho na jeho spracovanie na bioetanol.

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.
- ĐURKOVIČ, J., KAŇUCHOVÁ, A., KAČÍK, F., MAMOŇOVÁ, M., LENGYELOVÁ, A. 2013. Wood ontogeny during the first year of hybrid poplar development. *Biologia Plantarum*, 57(3): 591–596.
- 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*, 59: 129–136.
- FENGEL, D., WEGENER, G. 2003. *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Remagen: Verlag Kessel, 613 pp. ISBN 3-935638-39-6.
- 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.
- GARLOCK, R. J., WONG, Y. S., BALAN, V., DALE, B. E. 2012. AFEX pretreatment and enzymatic conversion of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) to soluble sugars. *BioEnergy Research*, 5(2): 306–318.
- 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.
- GRETHLEIN, H.E., CONVERSE, A.O. 1991. Continuous acid hydrolysis of lignocelluloses for production of xylose, glucose, and furfural. In *Food, Feed, and Fuel from Biomass* (ed. D.S. Chahal), Oxford & IBH Publishing Company, New Delhi, pp. 267–279.
- CHUNDAWAT, S. P. S., BALS, B., CAMPBELL, T., SOUSA, L., GAO, D., JIN, M., ERANKI, P., GARLOCK, R., TEYMOURI, F., BALAN, V., DALE, B. E. 2013. Primer on Ammonia Fiber Expansion Pretreatment, In *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals* (ed C. E. Wyman), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 169–200, doi: 10.1002/9780470975831.ch9
- JOSEFSSON, T., LENNHOLM, H., GELLERSTEDT, G. 2002. Steam explosion of aspen wood. Characterisation of reaction products. *Holzforschung* 56: 289–297.
- KAČÍK, F., ĐURKOVIČ, J., KAČÍKOVÁ, D. 2012a. Chemical Profiles of Wood Components of Poplar Clones for Their Energy Utilization. *Energies*, 5: 5243–5256.
- KAČÍK, F., ĐURKOVIČ, J., SIVÁK, J. 2012b. Analýza sacharidov vznikajúcich pri hydrolýze dreva *Populus × euramericana* 'I-214'. *Acta Facultatis Xylogologiae Zvolen*, 54(2): 23–30.
- KAČÍK, F., KAČÍKOVÁ, D., ZENKOVÁ, E. 2014. Vodná predúprava agátového dreva pri teplote 180 °C. *Acta Facultatis Xylogologiae Zvolen*, 56(1): 59–66.
- 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. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105(1–3): 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, pp. 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>> (11.12.2014).

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.J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 96: 1599–1606.

WYMAN, C. E. 2013. Introduction. In *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals* (ed C. E. Wyman), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–15.

Pod'akovanie

Autori ďakujú agentúre VEGA za finančnú podporu pri riešení projektu 1/0454/12 a 1/0149/15, v rámci ktorých vznikol prezentovaný príspevok.

Adresa autorov

Prof. RNDr. František Kačík, PhD.
RNDr. Eva Zenková
Technická univerzita vo Zvolene
Drevárska fakulta
Katedra chémie a chemických technológií
T. G. Masaryka 24
960 53 Zvolen
Slovensko
kacik@tuzvo.sk
xzenkova @ is.tuzvo.sk

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