

# VYUŽITÍ ODPADNÍCH MATERIÁLŮ NA BÁZI LIGNOCELULÓZY JAKO SUROVINY PRO VÝROBU BIOETANOLU

PAULOVÁ L., PAVLOVÁ E., OLŠAN V., JAISAMUT K., LIPOVSKÝ J., RYCHTERA M., MELZOCH K.

Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Praha, leona.paulova@vscht.cz

Ratifikací Kjótského protokolu na sebe Česká republika přijala závazek snížit závislost dopravy na ropě a v souladu se Směrnicí o podpoře využití biopaliv nebo dalších obnovitelných hmot v dopravě [1] do roku 2010 dosáhnout 5,75% nahrazení fosilních paliv biopalivy. Během dalších deseti let se předpokládá nárůst podílu biopaliv až na 20 % celkové spotřeby, což s sebou nutně přinese další rozšíření jejich produkce v rámci EU. V ČR se v současnosti uplatňují biopaliva první generace, a to především bioetanol a methylestery vyšších mastných kyselin získávané převážně z řepkového oleje. Výrobu bioetanolu v České republice zajišťují v současné době dva lihovary, a to společnost Cukrovary a lihovary TTD, a.s. v Dobručce, která jako surovinu používá cukrovou řepu a lihovar společnosti PLP, a.s. v Tmčicích, zde se bioetanol vyrábí z obilí, případně z kukuřice [2]. Od roku 2006, kdy byla v ČR zahájena výroba bioetanolu, jeho produkce neustále roste; v minulém roce se ho v ČR vyrobilo 118 milionů litrů (Tab. 1), což představuje 10. místo v rámci EU [3].

Tab. 1 – Produkce bioetanolu v rámci států EU od roku 2004 v milionech litrů [3]

Země	2009	2008	2007	2006	2005	2004
Francie	1250	1000	539	293	144	101
Německo	750	568	394	431	165	25
Španělsko	465	317	348	402	303	254
Rakousko	180	89	15	0	0	0
Švédsko	175	78	120	140	153	71
Polsko	165,5	200	155	120	64	48
Maďarsko	150	150	30	34	35	0
Belgie	143,2	n.a.	0	0	0	0
Slovensko	118	94	30	0	0	0
Česká republika	112,5	76	33	15	0	0
Itálie	72	60	60	128	8	0
Anglie	70	75	20	0	0	0
Litva	30	20	20	18	8	0
Lotyšsko	15	20	18	12	12	12
Finsko	4	50	0	0	13	3
Irsko	1,6	10	7	0	0	0
Holandsko	0	9	14	15	8	14
<b>Celkem</b>	<b>3701,18</b>	<b>2816</b>	<b>1803</b>	<b>1608</b>	<b>913</b>	<b>528</b>

Stejně jako v ČR, tak i ve světě se v současnosti pro výrobu bioetanolu využívají převážně škrobnaté a cukernaté zemědělské suroviny, což sice pro zemědělskou výrobu představuje určitou záruku odbytu, ale v posledních letech evokuje též etické otázky týkající se produkce biopaliv na úkor jejich potravinářského využití. Výroba tzv. biopaliv druhé generace, které jako surovinu využívají zemědělské energetické plodiny či odpady na bázi celulózy a lignocelulózy, by tyto pochybnosti pomohla odstranit.

## Charakteristika lignocelulózových materiálů

Materiály na bázi celulózy, mezi něž patří zemědělské odpady (obilná a kukuřičná sláma, kukuřičné oklasky), dřevo a dřevní štěpky, piliny, odpadní papír, energetické plodiny a komunální odpad, představují perspektivní surovinu pro výrobu biopaliv. Vzhledem k tomu, že se z velké části jedná buď o odpadní materiály nebo části rostlin, které nemají potravinářské využití, jejich zdroje jsou obnovitelné a jejich cena je v porovnání se zemědělskými surovinami velmi nízká, mohly by teoreticky představovat ideální surovinu pro navazující biotechnologický proces.

Hlavní překážkou masivního využití odpadní fytomasy je však zejména komplexita materiálu, který kromě celulózy obsahuje i hemicelulózu a lignin, jež jsou vzájemně pevně provázány a tvoří komplexní rigidní matici. Kromě těchto tří hlavních složek se v malém množství vyskytují též proteiny, pektiny, minerální látky, taniny nebo tuky [4], struktura a zastoupení jednotlivých složek se liší v závislosti na typu biomasy, stanovišti a klimatických podmínkách oblasti, v níž byly vypěstovány.

Biotechnologicky nejdůležitější složkou fytomasy je celulóza, která je lineárním polymerem složeným z D-glukózových jednotek vázaných β-1,4 glykosidovými vazbami a v rostlinném materiálu se vyskytuje převážně v krystalické a v menší míře i amorfni formě. Jednotlivá celulózová vlákna jsou organizována do fibril, zpevněna vodíkovými vazbami a asociována s dalšími ochrannými polymerními strukturami, které jsou tvořeny zejména ligninem a hemicelulózou [5]. Hemicelulóza zprostředkovává spojení mezi celulózovými vlákny a ligninem a je složena převážně z pentos, hexos a uronových kyselin, přičemž převažující složkou jsou xylany a glukomanany [6]. Lignin, amorfni heteropolymer složený převážně z fenylpropanových jednotek (p-kumarylalkoholu, konyferylalkoholu a sinapylalkoholu) tvoří nepropustnou prostorovou strukturu odolnou vůči mikrobiálnímu rozkladu a oxidaci a z tohoto důvodu představuje i hlavní překážku degradace lignocelulózového materiálu. Aby bylo možné tento materiál využít pro mikrobiální výrobu biopaliv, je nutné tuto komplexní matici narušit a upravit tak, aby byly získány fermentovatelné cukry, které mohou být mikroorganismy využity pro růst a produkci metabolitů.

## Fyzikálně-chemické předúpravy lignocelulózových materiálů

Vzhledem k již zmiňované komplexitě materiálu jeho zpracování obvykle sestává z několika navazujících kroků, v nichž dojde nejprve k mechanickému a poté fyzikálně-chemickému narušení jeho struktury, přičemž dochází k hydrolyze, případně i destrukci hemicelulózy, zvýšení obsahu amorfni celulózy a uvolnění ligninu. Existuje široká škála možností, jakým konkrétním způsobem tuto předúpravu provést, mezi nejvíce zmiňované lze zahrnout kyselou nebo alkalickou hydrolyzu, parní explozi, explozi za přítomnosti amoniaku nebo oxidu siřičitého, ozonolyzu a další, které se od sebe liší efektivitou a cenou v závislosti na použitém činidle, výchozí surovině a potřebném zařízení. Aby byly získány fermentovatelné sacharidy, je nutno takto upravený materiál podrobit ještě enzymové hydrolyze pomocí celulólytických preparátů. Zatím nejpoužívanější forma delignifikace je hydrogensířičitanový způsob, který se používá při výrobě celulózy, po jejím oddělení jsou v odpadu (sulfitových vyluzích) přítomny většinou monosacharidy vzniklé z hemicelulózy.

Proces ovšem vyžaduje poměrně dlouhé vaření dřevných štěpků ve varné kyselině siřičité pod tlakem za vysoké teploty.

Jelikož je proces úpravy lignocelulóзовých materiálů poměrně komplikovaný a nákladný, právě on představuje ekonomickou bariéru, která brání širšímu využití fyto-masy jako suroviny pro výrobu biopaliv. Na druhou stranu je nezbytné tyto úpravy provést, neboť narušení komplexní matrice a delignifikace vedou k významnému zvýšení výtěžku z kvasitelných cukrů v následné enzymové hydrolyze v porovnání s neupravenými materiály.

### Enzymová hydrolyza lignocelulóзовých materiálů

Lignocelulóзовý materiál, který byl předupraven jednou z výše zmiňovaných fyzikálně-chemických metod, je nutno v dalším kroku podrobit působení celololytických enzymových preparátů, které jsou komerčně dostupné a které jsou schopné rozložit polymerní řetězec celulózy tak, aby vznikly redukující cukry, které jsou využitelné v následné fermentaci.

Při rozkladu celulózy se uplatňují nejvíce tři typy enzymů – endoglukanázy, které štěpí polysacharidový řetězec uvnitř a produkují směs oligosacharidů o různé molekulové hmotnosti, exoglukanázy, které štěpí koncové řetězce poly- a oligosacharidů a uvolňují z nich celobiozu a glukózu, zatímco  $\beta$ -glukosidázy hydrolyzují vzniklou celobiozu [7]. Ačkoli výrobce většinou udává doporučené podmínky pro použití enzymového preparátu, je často výhodné provést jejich optimalizaci vzhledem k poměru substrátu a enzymu, pH, teplotě a prostředí (přítomnost látek ovlivňujících adsorpci a desorpci enzymu na substrát, přítomnost inhibitorů) tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší celololytické aktivity a tím i nejvyšší výtěžnosti z kvasitelných sacharidů.

### Fermentační výroba bioetanolu

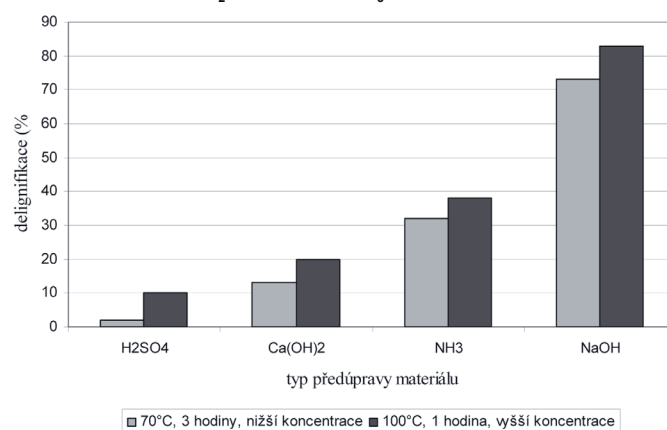
Lignocelulóзовé materiály jsou po ukončení enzymové hydrolyzy použity pro přípravu médií pro navazující biotechnologický proces. Jelikož však často obsahují velmi zředěné roztoky z kvasitelných sacharidů (zejména kvůli vysokému hydromodulu, který je nutno použít při předúpravách) a jsou chudé i na zdroje ostatních živin (dusík, fosfor, stopové prvky, vitamíny), které jsou nezbytné pro metabolismus mikroorganismů, je nutné tyto živiny doplnit např. přidáním kukuřičných výluhů nebo kvasničného extraktu [8] před tím, než je do média zaočkována produkční kultura. Základním aspektem pro výběr mikrobiálního producenta etanolu je schopnost dosahovat vysokých výtěžností na asimilovaný substrát, tolerance vůči produktu a možným přítomným inhibitorům a genetická stabilita. Tradičně je pro tyto účely používána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, z bakterií je jako producent etanolu vhodná *Zymomonas mobilis*, často je zmiňována i termofilní anaerobní bakterie *Clostridium thermocellum*, která je vzhledem k přítomnosti celulosomu schopna využít jak glukosu, tak i celobiozu a celulózu, její nevýhodou je však nízká tolerance k vznikajícímu etanolu. V některých případech lze proces fermentace spojit s předchozím krokem (enzymovou hydrolyzou). Tento proces nazývaný současná sacharifikace a fermentace (SSF) by s sebou měl přinést zkrácení doby trvání výroby, sníženou pravděpodobnost inhibice celololytických enzymů produktem reakce (glukózou), problémem by však mohl být negativní vliv vznikajícího ethanolu na aktivitu enzymů [9].

### Využití pšeničné slámy jako suroviny pro fermentační výrobu etanolu

V naší práci byla jako modelový lignocelulóзовý materiál použita pšeničná sláma, která obsahovala 37 % celulózy, 16 % hemice-lulózy a 23 % ligninu [10]. Tento materiál byl nejprve nařezán a poté bylo jeho přesné množství podrobena kyselému ( $H_2SO_4$ ) nebo alkalickému ( $NaOH$ ,  $NH_3$ ,  $Ca(OH)_2$ ) hydrolyze za různých podmínek (koncentrace činidla, teplota, doba působení). Při předúpravě suroviny byly záměrně zvoleny nižší koncentrace činidel tak, aby sice došlo k co nejvyššímu rozrušení matrice, ale zároveň aby byla minimalizována pravděpodobnost tvorby inhibičních látek (např. furfuralu, hydroxybenzaldehydu, vanilinu), jež mohou v dalších

krocích ovlivnit účinnost enzymové hydrolyzy a metabolismus mikroorganismů v navazujícím fermentačním procesu. Celý proces probíhal tak, že se mechanicky narušený materiál nechal 24 hodin botnat v roztoku zvoleného činidla (2% nebo 5% roztok  $NaOH$ , 3% nebo 7% roztok  $NH_3$ , 1% nebo 2%  $Ca(OH)_2$ , 0,5% nebo 2% roztok  $H_2SO_4$ ) a poté byl podroben hydrolyze za různých podmínek, které se lišily teplotou (70 nebo 100 °C) a dobou reakce (1 nebo 3 hodiny). Účinnost fyzikálně-chemické hydrolyzy byla hodnocena na základě úbytku množství ligninu v porovnání s výchozím materiálem (obr. 1). Ve všech případech byly lepší výsledky získány při použití koncentrovanějšího činidla a vyšší teploty reakce, alkalická předúprava poskytovala obecně lepší výsledky než kyselá hydrolyza. Nejvyššího stupně delignifikace (83 %) byl dosaženo, pokud byl materiál hodinu zahříván na 100 °C s 5% roztokem  $NaOH$ .

**Obr. 1 – Stupeň delignifikace pšeničné slámy v závislosti na typu fyzikálně-chemické předúpravy. Použité koncentrace činidel:  $H_2SO_4$  – 0,5% a 2%,  $Ca(OH)_2$  – 1% a 2%,  $NH_3$  – 3% a 7%,  $NaOH$  – 2% a 5%**



Takto upravený materiál byl poté odstředěn a pevná fáze, která obsahovala převážně celulózu, byla dále podrobena enzymové hydrolyze celololytickými preparáty firmy Novozyme (NS-50010 a NS-50013). Před jejich aplikací na předupravenou pšeničnou slámu bylo provedeno několik pokusů, jejichž cílem bylo nalezení optimálních podmínek pro průběh enzymové reakce. Jako substrát byla použita mikrokrytalická celulóza (Avicel), reakce probíhala 48 hodin při 30 °C v prostředí 5 mM citrátového pufru, testované rozmezí pH (4,5–6,0) bylo zvoleno tak, aby odpovídalo podmínkám, které vyhovují mikroorganismu, který je dále využit při konverzi vzniklé glukosy na etanol. Enzymová aktivita komplexu byla vyjádřena jako množství vzniklé glukózy vztahované na jednotku objemu za čas (rychlost hydrolyzy) a byla hodnocena též výtěžnost reakce (množství glukózy vzniklé z původní celulózy). Nejvyšší výtěžnosti a současně i nevyšší rychlosti enzymové reakce bylo dosaženo při pH 4,5 [11], výtěžek enzymové reakce byl dále zvýšen, pokud reakce probíhala při 50 °C (Tab. 2).

**Tab. 2 – Vliv pH prostředí na výtěžnost a rychlost enzymové hydrolyzy**

pH	Výtěžnost při 30 °C (%)	Rychlost hydrolyzy při 30 °C ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ )	Výtěžnost při 50 °C (%)	Rychlost hydrolyzy při 50 °C ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ )
4,5	20	7,6	46	17,7
5,0	17	6,8	44	16,5
5,5	11	4,2	32	11,5
6,0	7	2,7	16	5,9

Za těchto podmínek (pH 4,5 a teplota 50 °C) poté proběhla hydrolyza předupravené pšeničné slámy v prostředí citrátového pufru po dobu 48 hodin. U všech hodnocených vzorků došlo k významnému zvýšení výtěžku glukózy v porovnání se slámou, která nebyla před enzymovou hydrolyzou předupravena (Tab. 3),

*Dokončení na další straně*

vyšší koncentrace glukózy byla získána u vzorků, jejichž fyzikálně-chemická předúprava probíhala za mírnějších podmínek (70 °C) s nižší koncentrací činidla, zřejmě díky nižšímu množství vzniklých inhibitorů enzymové reakce. Nejvyšší výtěžnosti glukózy na vnese-nou celulózu (45 %) bylo dosaženo u vzorku, který byl podroben hydrolýze pomocí 2% hydroxidu sodného, proto byl tento materiál použit pro přípravu médií pro fermentační testy.

**Tab. 3 – Výtěžnost enzymové hydrolýzy předupravené pšeničné slámy hodnocená jako množství vzniklé glukózy po enzymové hydrolýze vztážená na vstupní koncentraci celulózy a její porovnání s nepředupravenou slámou**

Podmínky fyzikálně-chemické předúpravy vzorku	Obsah celulózy ve vzorku po provedené fyzikálně-chemické úpravě (%)	Výtěžnost glukózy na celulózu po enzymové hydrolýze (%)
Bez předúpravy	n.a.	2
2% NaOH, 70 °C, 3 h	61	45
5% NaOH, 100 °C, 1 h	59	35
3% NH <sub>3</sub> , 70 °C, 3 h	46	23
7% NH <sub>3</sub> , 100 °C, 1 h	45	22
1% Ca(OH) <sub>2</sub> , 70 °C, 3 h	38	13
2% Ca(OH) <sub>2</sub> , 100 °C, 1 h	36	13
0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 70 °C, 3 h	52	17
2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100 °C, 1 h	48	10

Roztok získaný po enzymové hydrolýze byl nejprve přizhven (10 g/l kvasničného extraktu a 20 g/l peptonu), vysterilován a poté zaočkován rostoucí kulturou *Saccharomyces cerevisiae* 03/26 ze sbírky mikroorganismů Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha. Kultivace probíhala staticky v termostatu při 30 °C po dobu 48 hodin. Po ukončení experimentu bylo dosaženo 25% výtěžnosti etanolu (vztážená na obsah celulózy v chemicky předupraveném vzorku), což by při 59% obsahu celulózy v předupraveném vzorku a 36% úbytku homotnosti vzorku během předúpravy představovalo produkci zhruba 118 l etanolu z 1 tuny pšeničné slámy.

## Závěr

Lignocelulózové materiály představují perspektivní surovinu pro výrobu biopaliv druhé generace. Hlavní překážkou jejich masivního využití je však vyšší cena vyrobeného etanolu, která se v roce 2009 pohybovala kolem 2,65 \$ za galon (tj. zhruba 14 Kč za litr). Snížení nákladů na předúpravu fytomasy (optimalizace podmínek fyzikální a chemické předúpravy a enzymatického rozkladu) spolu s redukcí ceny komerčně dostupných celulytických enzymů a využitím vedlejších produktů této výroby k pokrytí energetické spotřeby během procesu (např. spalování ligninu a lihovarských výpalků) by mohlo představovat cestu k rozšíření tohoto typu výroby.

*Poděkování: Tato studie vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programového projektu výzkumu a vývoje Kontakt ME10146 a výzkumného záměru MŠM6046137305.*

## Literatura

- [1] SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2003/30/ES ze dne 8. května 2003 o podpoře a užívání biopaliv nebo jiných obnovitelných pohonných hmot v dopravě.
- [2] REINBERGR O.: *Podpora rozvoje a užití bioetanolu v České republice*. Listy cukrovarnické a řepařské 125, 7–8, 2009.
- [3] PRODUCTION OF BIOETHANOL IN THE EU. European Bioethanol Fuel Association: Press Release, 28.7.2010, on-line. <http://www.ebio.org/uploads/100728%20PR%20on%20P&C%202009%20def.pdf>, staženo 9. 8. 2010.
- [4] PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J.: *Fyziologie rostlin*, Academia Praha, 1998, ISBN 80-200-0586-2
- [5] HENDRICKS A. T., ZEEMAN G.: *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. Bioresource Technology, 100, 10–18, 2009.
- [6] SÁNCHEZ C.: *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*. Biotechnology Advances 27 (2), 185–194, 2009.
- [7] SUN A., CHENG J.: *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology 83, 1–11, 2002.
- [8] HAMELINCK C.N., HOOIJDONK G., FAAIJ A.: *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term*. Biomass and Bioenergy 28, 384–410, 2005.
- [9] PRASAD S., SINGH A., JOSHI H.C.: *Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues*. Resources, Conservation and Recycling 50, 1–39, 2007.
- [10] OLŠAN V.: *Chemická a biochemická předúprava lignocelulózových materiálů pro jejich biotechnologické využití. Hodnocení účinnosti předúpravy*. Diplomová práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2010.
- [11] PAVLOVÁ E.: *Zpracování lignocelulózových materiálů na bioethanol*. Diplomová práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2010.

## Abstract

### LIGNOCELLULOSE BASED MATERIALS AS FEEDSTOCKS FOR BIOETHANOL PRODUCTION

**Summary:** In an effort to decrease a dependence on the fossil fuels, humanity seeks for alternative sources of energy, one of them being bioethanol produced via microbial fermentation. Whereas lignocellulose based materials can be prospectively exploited as renewable feedstocks, wheat straw was tested as a raw material for bioethanol production. To disturb the cellulose-hemicellulose-lignin complex, wheat straw was pretreated using acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and alkaline (NaOH, NH<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>) methods, delignification was taken as a criterion to evaluate efficiency of the process. Solid fraction of material containing mainly cellulose was then enzymatically hydrolyzed using Novozymes Biomass Kit enzymes to obtain fermentable sugars. The mild pretreatment of wheat straw with 2% NaOH was evaluated as a method leading to the highest yield of glucose after enzymatic treatment. After nutrient supply it was used as medium for *Saccharomyces cerevisiae* yeast. 48-hour fermentation resulted in 25% ethanol yield, which would mean 118 litres of ethanol from 1 ton of wheat straw.

**Key words:** bioethanol, renewable feedstocks, lignocellulose, fermentation