

# Stanovenie stupňa hydrolýzy lignocelulóзовých materiálov termofilnými baktériami

579.1 663.41

Ing. DARIA LONGAUEROVÁ, CSc., Doc. Ing. DUŠAN HALAMA, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT v Bratislave, Katedra biochemickej technológie, Ing. VLASTA LUŽÁKOVÁ, CSc., Katedra textilu, celulózy a papiera

**Kľúčové slova:** hydrolýza, kultivace, lignocelulóзовé materiály, hemicelulóza, termofilní baktérie, kukuřice, gelová permeační chromatografie, sacharidy.

Na využitie lignocelulóзовých materiálov ukázali sa vhodné i kombinované anaeróbne a aeróbne mikrobiologické procesy. Henry et al. [1] zistili, že je možné prekonať efektívnosť prežúvavcov z hľadiska tvorby proteínov. Otestovali dvojfázový spôsob využitia fytomasy. V prvej fáze sa tráva po zriedení vodou naočkuje bacherovou mikroflórou; pri vhodnej teplote prebehne zmesná anaeróbna fermentácia. Jej hlavnými produktami sú nižšie masné kyseliny (prevážne kyseliny octová, ale aj propionová a maslová a menšie množstvo vyšších kyselín). V druhej fáze na pôdach získaných takýmto kvasením je možné kultivovať kvasinkové mikroorganizmy, ktoré sú schopné využívať nižšie masné kyseliny ako zdroj uhlíka a energie. Ich biomasa je tvorená bielkovinami, ktoré sú bližšie živočíšnym ako rastlinným.

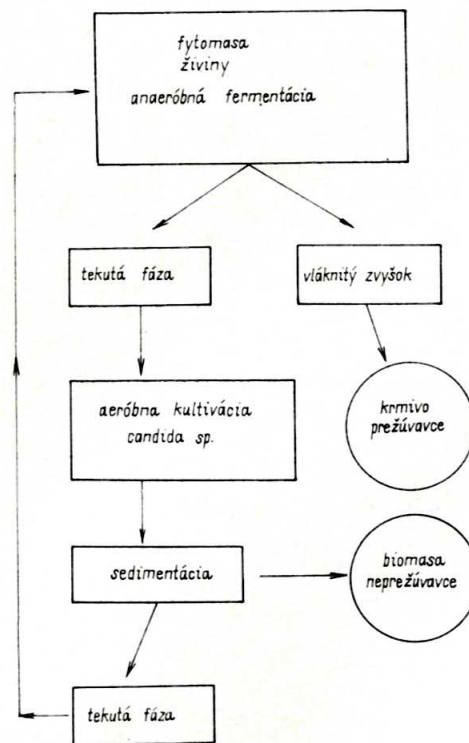
Overili sme použiteľnosť tejto metódy a rozšírili jej aplikáciu na lignocelulóзовé materiály so zanedbateľnou nutričnou hodnotou (drevné štiepky, kukuričné oklasky, slama). Inokulum z bacherového obsahu sme nahradili zmesnou termofilnou bakteriálnou kultúrou [2]. Súčasne sme preskúmali možnosť recyklizácie tekutej fázy, výsledkom čoho bola navrhnutá bezodpadová technológia využitia lignocelulóзовých materiálov mikrobiologickou cestou ([3], obr. 1).

Použitie termofilné anaeróby rozkladajú lignocelulóзовé materiály zrejme inak ako mezofilná bacherová mikroflóra [4]. Zvyšok po termofilnej úprave sa ňou hlbšie rozkladá. Sledujeme možnosti využitia aj takýchto kombinácií procesov.

Zamerali sme sa preto na hlbšie preskúmanie procesu odbúrania lignocelulóзовého materiálu, a to: 1. sledovaním odbúrania hemicelulózy chemickou analýzou, 2. použitím GPC (gélová permeačná chromatografia) analýzy pri štúdiu zmien distribúcie molekulových hmotností polysacharidového zvyšku po fermentácii drte kukuričných oklaskov.

Doposiaľ nie je uzavretá otázka spôsobu odbúrania celulóзовého podielu v priebehu enzýmovej hydrolýzy, či celulózy využívajú prednostne alebo výlučne amorfný podiel alebo aj kryštalický podiel, či odbúranie polysacharidov prebieha štatisticky. Mnohí autori považujú za li-

mitujúci faktor hydrolýzy veľkosť kryštalického podielu v celulóзовom materiáli, meranú ako index kryštalinity [5]. Z výsledkov röntgenografického štúdia kryštalického podielu a zmien molekulovej hmotnosti určenej vis-



Obr. 1. Bezodpadové spracovanie fytomasy

kozimetricky dospel Schurz [6] k uzáveru, že pri enzymovej hydrolýze celulózy dochádza k rovnomernému odlupovaniu jednotlivých makromolekúl celulózy tak z povrchu amorfných ako aj kryštalických elementárnych útvarov celulózy. Viskozimetrické štúdium umožňuje získať len priemerné hodnoty molekulovej hmotnosti polymérneho materiálu. Komplexný obraz o distribúcii molekulových hmotností poskytuje gélovopermeačná chromatografická analýza polydisperzného systému.

#### Materiál a metódy

**Mikroorganizmy:** Termofilné zmesné bakteriálne kultúry sa získali postupným nahromaďovaním (pôvodné inokulum: exkrementy, bahno, voda z teplovodného potrubia) na 4% suspenzii lignocelulóзовých substrátov v minerálnej DMA pôde podľa Pirta [7] pri 60 °C a pH 6,8. Sú udržiavané v tekutej pôde pri izbovej teplote. Kultivácia je statická za nie striktné anaeróbnych podmienok. *Candida tropicalis* CCY 29-7-33 bola izolovaná nahromaďovaním na hydrolyzátoch odpadov živočíšnej výroby. Pre kultivačné pokusy sa použila tekutá fáza po anaeróbnej fermentácii lignocelulóзовých materiálov. Kultivácia pri 30 °C, pH 6 na rotačnej trepačke.

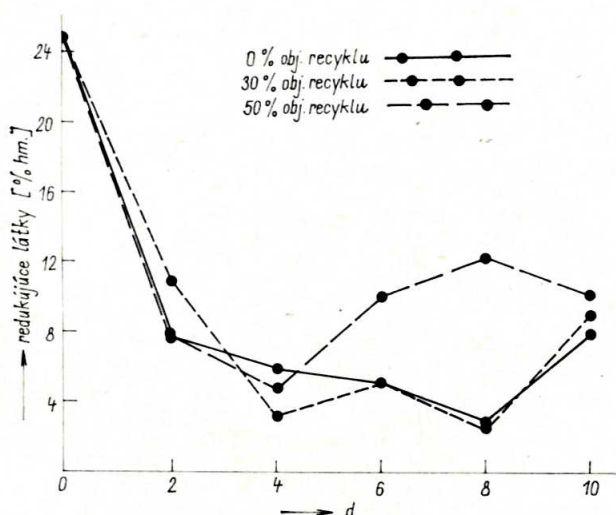
**Analytické metódy:** Hemicelulózy sa stanovili po kyslej hydrolýze pevného zvyšku ako redukujúce látky podľa Schoorla. Hydrolýza sa robila s 1% HCl pri 100 °C v 10násobnom nadbytku; kukuričné oklásky 1 hodinu a drevné štiepky 2 hodiny. Sledovali sme % utilizácie takto stanovitelných sacharidov.

**Distribúcia** molekulových hmotností a kukuričných okláskov sa sledovala GPC analýzou na prístroji ALC/GPC firmy Watters, model R-401. Štyri nerezocelové kolóny o vnútornom priemere 0,775 cm a dĺžke 60 cm boli naplnené Styragelom s vylučovacím limitom  $10^{-5}$  m a zrnitosťou 3,7–7,5 nm. Rýchlosť prietoku bola 1 ml·min<sup>-1</sup>. Vzorky sa nitrovali a rozpustili v eluente - tetrahydrofuráne, resp. sa pevný podiel pred nitráciou delignifikoval.

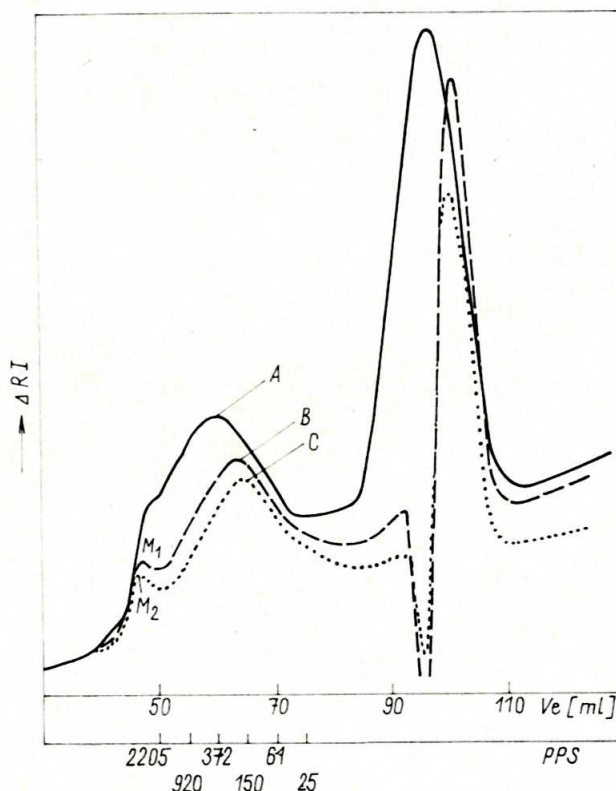
#### Výsledky a diskusia

Typický priebeh utilizácie hemicelulózy, ktorý sme určovali z bilancie redukujúcich látok po čiastočnej hydrolýze, je znázornený na obr. 2 a 3. V prvej časti anaeróbnej fermentácie množstvo redukujúcich látok klesá a po určitom čase fermentácie sa jeho množstvo zvyšuje. Z toho sa dá usúdiť, že počas anaeróbnej fermentácie lignocelulóзовého materiálu sa mení nadmolekulová štruktúra celulóзовého podielu. Presnejšiu analýzu mala poskytnúť GPC analýza.

GPC analýzou roztokov nitrátov vzoriek kukuričných okláskov pred a po fermentácii sme získali príslušné elučné krivky (obr. 4), ktoré reprezentujú distribúciu molekulových hmotností v sledovaných vzorkách. Z priebehu elučných kriviek je zrejme, že u všetkých skúma-

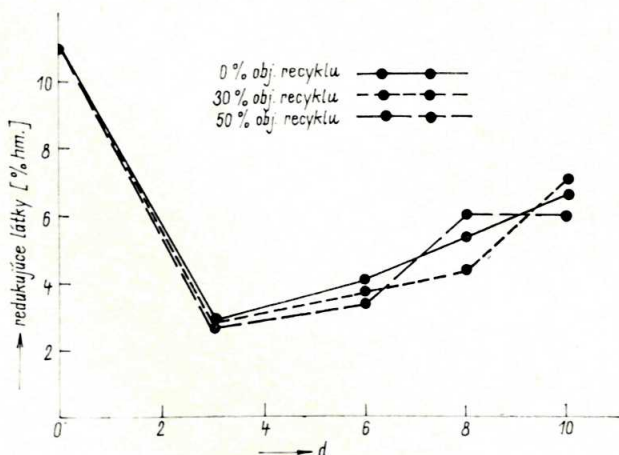


Obr. 3. Redukujúce látky (po hydrolýze) v priebehu anaeróbnej termofilnej fermentácie lignocelulóзовých materiálov zmesnou bakteriálnou kultúrou kukuričné oklásky (40 g.l<sup>-1</sup>), fosfátový tlmivý roztok + NH<sub>4</sub>Cl + % tekutej fázy po aeróbnej fermentácii, pH 6,8



Obr. 4. Elučné krivky získané GPC analýzou kukuričných okláskov

Fermentácia: kukuričné oklásky (40 g.l<sup>-1</sup>), fosfátový tlmivý roztok + NH<sub>4</sub>Cl, pH 6,8, teplota 60 °C, 6 dní  
A — pred fermentáciou delignifikované, po nitrácii rozpustené v tetrahydrofuráne na 100 %  
B — po fermentácii nesporulujúcou kultúrou, po nitrácii rozpustené v tetrahydrofuráne na 60 %  
C — po fermentácii sporulujúcou kultúrou, po nitrácii rozpustené v tetrahydrofuráne na 48 %



Obr. 2. Redukujúce látky (po hydrolýze) v priebehu anaeróbnej termofilnej fermentácie lignocelulóзовých materiálov zmesnou bakteriálnou kultúrou drevné štiepky (40 g.l<sup>-1</sup>), fosfátový tlmivý roztok o pH 6,8 + NH<sub>4</sub>Cl + % tekutej fázy po aeróbnej fermentácii

ných vzoriek sa jedná o polydisperzný systém so širokou distribúciou molekulových hmotností. Krivka A reprezentujúca pôvodné kukuričné oklásky má výrazný bimodálny charakter s vysokomolekulovým podielom v oblasti 40–75 ml elučného objemu, s maximom priemerného polymerizačného stupňa (PPS) v oblasti hodnôt 370 a s níz-



komolekulovým podielom tvoreným oligomernými zložkami v oblasti 85—110 ml elučného objemu. U oboch vzoriek (krivka *B* a *C*) po fermentácii sa v oblasti najvyšších molekulových hmotností, resp. PPS vysokomolekulového podielu objavilo maximum  $M_1$ , resp.  $M_2$ , pričom súčasne došlo k posunu maxima vysokomolekulového podielu k nižším hodnotám PPS.

Z výsledkov GPC analýzy skúmaných vzoriek možno usudzovať, že došlo k degradácii oligomerných zložiek, čo vyplýva z posunu príslušného maxima elučných kriviek *B* a *C* k nižším hodnotám PPS ako aj k celkovému úbytku oligomerných sacharidov v pevnom zbytku. V procese termofilnej anaeróbnej fermentácie drte kukuričných oklások sa degradoval aj vysokomolekulový polysacharidický podiel, pričom jeho malá časť reprezentovaná píkmí  $M_1$ , resp.  $M_2$  sa nemenila.

#### Literatúra

- [1] HENRY, D. P. et al.: *Nature*, **274**, 1978, 619.
- [2] LONGAUEROVÁ, D. - HAĽAMA, D. *Kvas. prům.* **29**, 1983, č. 10—12
- [3] HAĽAMA, D. - LONGAUEROVÁ, D.: 3rd Symposium of Soc. Count. on Biotechn., 25—29/4/1983 Bratislava.
- [4] KNOTKOVÁ, E.: Diplomová práca, ČHTF SVŠT v Bratislave 1983.
- [5] THOUART, P. - PAQUOT, M. - MOTTET, A.: *Holzforchung*, **33**, 1979, s. 197—202.
- [6] SCHURZ, J.: Ústne sdelenie (prednáška na ČHTF SVŠT) 1984.
- [7] PIRT, S. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **47**, 1967, s. 181.

**Longauerová, D., Lužáková, V., Haľama, D.: Stanovenie stupňa hydrolýzy lignocelulóзовých materiálov termofilnými baktériami.** *Kvas. prům.* **32**, 1986, č. 4, s. 84—86.

Nahromadené zmesné kultúry termofilných anaeróbnych baktérií boli kultivované pri 60 °C na kukuričných oklásokoch vo fosfátovom tlmivom roztoku o pH 6,8. Gélovou permeačnou chromatografiou sa zistilo, že po 6 dňoch kultivácie bola väčšina oligomerných sacharidov utilizovaná a čiastočne došlo aj k degradácii vysokomolekulového sacharidického podielu. Hemicelulózy (stanovené ako redukujúce sacharidy po čiastočnej hydrolýze) boli z väčšej časti utilizované. Pevný zvyšok po termofilnej fermentácii má väčšiu akcesibilitu (v porovnaní pred fermentáciou) voči zmesnej bachorovej mikroflore.

**Лонгауерова, Д., Лужакова, В., Галяма, Д.: Определение степени гидролиза лигноцеллюлозных материалов термофильными бактериями.** *Квас. прум.* **32**, 1986, № 4, стр. 84—86.

На кукурузных почерыхках (без предварительной об-

работки за исключением грубого размельчения) были культивированы накопительные культуры анаэробных бактерий; температура: 60°. Среда: фосфатный буфер, pH 6,8. После 6 дней большинство олигомеров было бактериями использовано, а высокополимерная фракция полисахаридов была частично гидролизирована до олигомеров, как показала геловая хроматография. Гемцеллюлозы были практически использованы полностью (умеренный кислотный гидролиз). В сравнении с начальным состоянием материал после обработки термофильными бактериями быстрее разлагался мезофильными организмами рубца.

**Longauerová, D., Lužáková, V., Haľama, D.: Estimation of hydrolysis of lignocellulosics by thermophilic bacteria.** *Kvas. prům.* **32**, 1986, No. 4, pp. 84—86.

Corncoobs coarsely cut without other pretreatment was suspended in pH 6.8 phosphate buffer, and inoculated by 10% volume of mixed thermophiles under (semi-) anaerobic conditions at 60 °C. After 6 days cultivation the most part of oligomers was utilized by bacteria, and polysaccharides partially decomposed to oligomers, as shown by gel permeation analysis (GPC). The most part of hemicellulose (as estimated by mild hydrolysis as reducing sugars) was utilized. The residual material after thermophilic treatment was more accesible (in comparision with original one) to mesophilic mixed rumen flora.

**Longauerová, D. - Lužáková, V. - Haľama, D.: Bestimmung des Grades der Hydrolyse von Lignozellulose-Materialien durch thermophile Bakterien.** *Kvas. prům.* **32**, 1986, Nr. 4, S. 84—86.

Angehäufte Mischkulturen thermophiler anaerober Bakterien wurden bei 60 °C auf Maiskleien in hemmender Phosphatlösung mit pH 6,8 kultiviert. Mittels Gel-Permeationschromatographie wurde festgestellt, daß nach 6 Tagen Kultivation der überwiegende Teil der oligomeren Sacharide utlisiert war und es verlief teilweise auch die Degradation des hochmolekularen saccharidischen Anteils. Die Hemicellulosen (die als reduzierende Saccharide nach teilweiser Hydrolyse bestimmt wurden) waren grösstenteils utlisiert. Der feste Rückstand nach der thermophilen Fermentation weist eine höhere Akzessibilität (im Vergleich vor der Fermentation) gegenüber der Pansen- Mischmikroflora auf.