

Ionos folyadékok a mezőgazdasági hulladékok hasznosításában: úton az egylépéses előkezelés és cellulóz hidrolízis felé II

Application of ionic liquids in the utilization of the agricultural wastes: towards to the one step pretreatment and cellulose hydrolysis II

Megyeri Gábor,

Bélafiné Bakó Katalin, Nemestóthy Nándor

Pannon Egyetem; Mérnöki Kar;

Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet

8200 Veszprém, Egyetem utca 10.

Summary

As we demonstrated previously the ionic liquids disrupt the structure of cellulose so it will be suitable for enzymatic hydrolysis [1]. The aim of the presented work was to continue the research and carry out the pretreatment and the hydrolysis of lignocellulosic material in the same ionic liquid solvents (1-n-butyl-3-methyl-imidazolium-chloride ([Bmim]Cl), 1-n-butyl-3-methylimidazolium-acetate ([Bmim]Ac)). Straw and mixture of corn (*Zea mays*) leaf and stover were used in the experiments. As a result of the pretreatment, the Cellic® CTec2 and Cellic® HTec2 enzyme complexes from NOVOZYMES (Denmark) were able to produce reducing sugars in high yield.

Key words: lignocellulose, hydrolysis, ionic liquid, enzyme

Bevezetés

Korábbi munkánk során már említettük, hogy a második generációs bioüzemanyag gyártás egyik kulcs lépése a lignocellulóz tartalmú biomassza előkezelése, mely a manapság elterjedt technológiákkal nehézkesen valósítható meg. Az általunk választott mezőgazdasági hulladékok jelenthetik az egyik forrását a bioüzemanyagoknak, mivel megújuló nyersanyagforrásnak számítanak, és nem jelentenek veszélyt az élelmiszerellátásra, míg az ionos folyadékok zöld oldószereknek tekinthetők [1].

Ionos-folyadék:

Általános jellemző:

Az ionos folyadékok olyan alacsony olvadáspontú sók [2], melyek kizárólag ionokból állnak, magas hőmérsékleten sem párolognak, nem illékonyak, nem gyúlékonyak [2-6], hőstabilak és kémiaiilag is stabilak [7]. A legtöbb folyadékkal jól elegyednek [6]. Az alacsony olvadáspont az aszimmetrikus szerves kationnak köszönhető, mely csökkenti a rácsenergiát [5].

Ionos folyadékok szinte korlátlan variációban állíthatóak elő [8,9], mivel a felépítő anionok és kationok száma nagy és tetszőlegesen kombinálhatóak.

1-n-butil-3-metil-imidazolium-klorid ([Bmim]Cl):

Az általunk használt 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid imidazolium szerves kationt és szervesetlen klorid aniont [6] tartalmazó hidrofíli ionos folyadék [7]. Összegképlete:

$C_8H_{15}ClN_2$, moláris tömege pedig 174,68 g/mol. Olvadáspontja 60°C körül van, a tisztított cellulózt 100°C-on 20 tömeg %-ig oldja.

A cellulóz származékok képződése nélkül oldódik benne [7]. Feltételezhetően a klorid ionok aktivitása játszik jelentős szerepet a hidrogén híd kötések felbontásában [7, 8]. Ezzel lehet a legnagyobb mértékben oldani a cellulózt [4, 8], ezért esett a választásunk erre az ionos folyadéokra.

1-n-Butil-3-metil-imidazolium-acetát

A másik általunk vizsgált ionos folyadék az 1-butil-3-metil-imidazolium-acetát ([Bmim]Ac) szintén imidazolium szerves kationt tartalmaz, de az előzőhöz képest szerves acetát anion van benne. Szintén hidrophil, összegképlete: $C_{10}H_{18}N_2O_2$, moláris tömege 198,26 g/mol, olvadáspontja -20°C körül van.

Irodalmi adatok alapján az várható, hogy az enzimeket kevésbé dezaktiválja [10], ezért vontuk be ezt az ionos folyadékot a munkánkba.

Célkitűzésünk:

Munkánk célja az 1-butil-3-metil-imidazolium-kloridban és acetátban történő lignocellulóz tartalmú biomassza oldás, majd hidrolízis volt anélkül, hogy a fellazult cellulózt tisztítási eljárásnak vetettük volna alá. A cellulóz oldása után a hidrolízist ugyanabban a reakcióterben végeztük el, így két lépést sikerült összevonni.

Felhasznált anyagok és technikák:

Felhasznált anyagok:

Kukorica szár és levél; szalmaszár; ionos folyadék: 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid ([Bmim]Cl) ($C_8H_{15}ClN_2$; M=174,68 g/mol; Io-Li-Tec O. p.: 60°C; Lot.: J02031.1.4), 1-butil-3-metil-imidazolium-acetát ([Bmim]Ac) ($C_{10}H_{18}N_2O_2$; M=198,26 g/mol; Io-LiTec O. p.: -20°C; Lot.: K0013.1); enzimek: Cellic HTec2 (VHN00002); Cellic CTec2 (VCPI0006) Gyártó: Novozymes (Dánia); orto-toluidin (TO01201000, Scharlau, Spanyolország); ecetsav (11110601, Scharlau, Spanyolország); NaOH (Gy.sz.:09040407; Spektrum 3D); nátrium acetát puffer: 2,8 ml ecetsavat oldottam desztillált vízben, a pH-t NaOHal 5-ös értékre állítottam be, majd desztillált vízzel 1 l-re töltöttem fel

Használt eszközök:

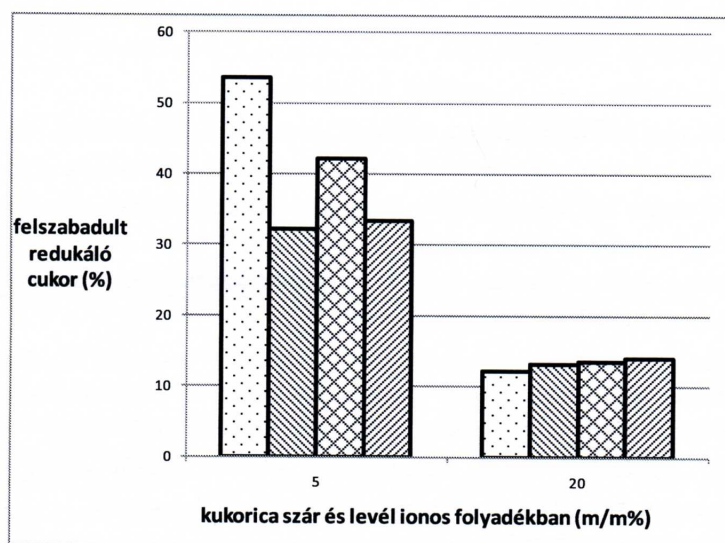
Külső keverők (RW16 basic, RW20 DZM, EVROSTAD digital, IKA-Labortechnik, Staufen, Németország); fotométer (DR3900, HACHLANGE); centrifuga (Sigma 4K10, B. Braun Biotech International); főzőlapok (Velp Scientifica, Arex Heating Magnetic Stirrer; RCT basis, IKA-Labortechnik, Staufen, Németország)

A mérés menete:

Munkánk során szalmából valamint kukorica szárából és leveléből készült őrleménnyel dolgoztunk. Mindkettőt tömegállandóságig szárítottuk, majd megőröltük őket, végül szitason szétválogattuk a különböző szemcseméretű frakciókat. Munkánk során a 0,5 mm alatti szemcseméretű frakcióval dolgoztunk. 0,5 g ionos folyadékban oldottuk fel a mintákat 5 illetve 20 tömegszázalékos koncentrációban. Az összemérés után 100°C-os olajfürdőbe tettük a mintákat tartalmazó kémcsöveket és lassan kevertettük 10 percig. Ezt követően 3 ml acetát puffert és 15 µl enzimek készítményt adtunk hozzá. 2 órán keresztül 50 °C-on inkubáltuk a

mintákat intenzív keverés mellett. Az enzim hidrolízis végén orto-toluidin reagens segítségével fotometriás úton mértük a felszabaduló redukáló cukor mennyiségét.

Eredmények és tárgyalásuk:



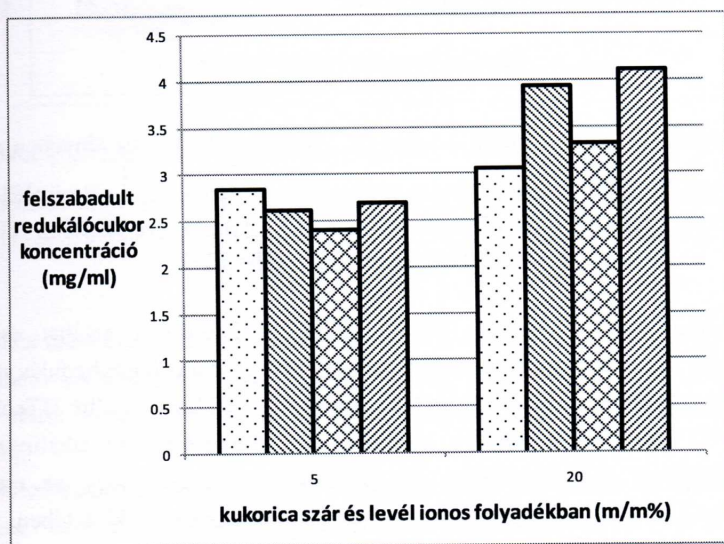
1. ábra. Felszabadult cukor változása a kukorica koncentrációjának függvényében az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén (□ - [Bmim]Cl és Cellic HTec2; ▨ - [Bmim]Cl és Cellic CTec2; ▩ - [Bmim]Ac és Cellic HTec2; ▧ - [Bmim]Ac és Cellic CTec2)

A maximálisan kinyerhető redukáló cukormennyiséghez képest cukorfelszabadulás arányát ábrázolva (1. ábra) elmondható, hogy a kukorica őrlemény mennyiségét növelve csökken a cukor felszabadulás. 5 m/m%-os koncentráció esetében a legjobb eredményt a [Bmim]Cl és Cellic HTec2 enzim kombinációjával értük el, ami megfelel a várakozásainknak, hiszen klorid ionot tartalmazó ionos folyadék hatékonyabb az előkezelésben, és az enzim szubsztrátspecifitása is a biomassa hatékonyabb bontása irányába mutat. A legrosszabb eredményt a Cellic CTec2 enzimmel értük el, függetlenül az alkalmazott ionos folyadéktól. Ez a jelenség az enzimek eltérő szubsztrátspecifitásának köszönhető.

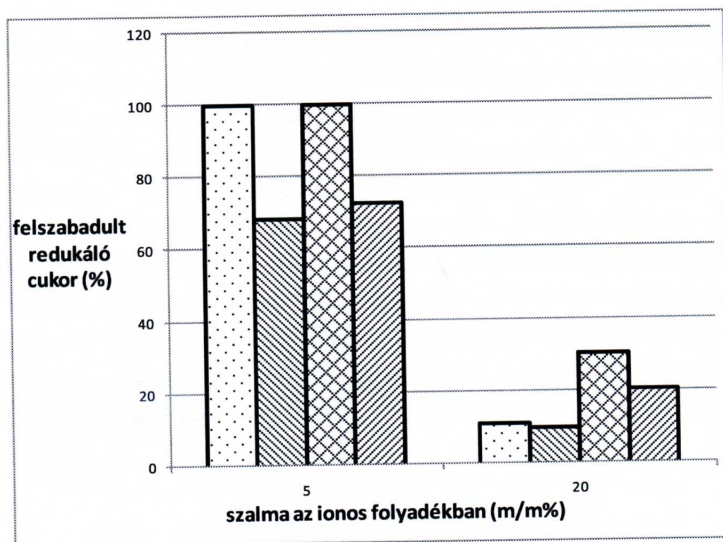
20 m/m%-os koncentráció esetében minden minta hasonló eredményt mutatott. Ez az ionos folyadékos előkezelés nehézségeivel, bonyolultságával és tökéletlenségeivel magyarázható, ugyanis ekkora mennyiségben nehéz beoldani a lignocellulóz tartalmú biomasszát az ionos folyadékba. A keverésnek nagyon nagy szerepe van.

A cukorkoncentrációk változását bemutató ábráról (2. ábra) leolvasható, hogy a minta koncentrációját növelve nő a redukáló cukor koncentráció is, ami a több kiindulási anyagnak köszönhető. 5 m/m%-os koncentráció esetében a mért értékek közel vannak

egymáshoz, míg 20 m/m%-os koncentráció esetében a Cellic CTec2 enzimmel hidrolizált minták mutatták a jobb eredményt, ami nem illik bele az eddigiekben tapasztalt szubsztrátspecifitási képbe. Az is elmondható, hogy a [Bmim]Ac ionos folyadékot tartalmazó minták kicsit jobb eredményt mutatnak a [Bmim]Cl ionos folyadékot tartalmazókhöz képest. Még nem találtunk olyan irodalmat, amiben ilyen nagy tömegszázalékos koncentrációban oldották volna be a lignocellulóz tartalmú mintát az ionos folyadékba és hasonlították össze, ezért ennek a jelenségnek a magyarázata még nincs egyértelműen bizonyított válaszuk. Egy megoldás lehet, hogy töményebb mintáknál másképpen viselkednek az ionos folyadékok, mint a hígabbaknál. Egy másik ok pedig az lehet, hogy a [Bmim]Ac kevésbé csökkenti az enzimek aktivitását, ezért azok jobban tudnak hidrolizálni. Az ok pontos kiderítéséhez további vizsgálatok elvégzése szükséges.



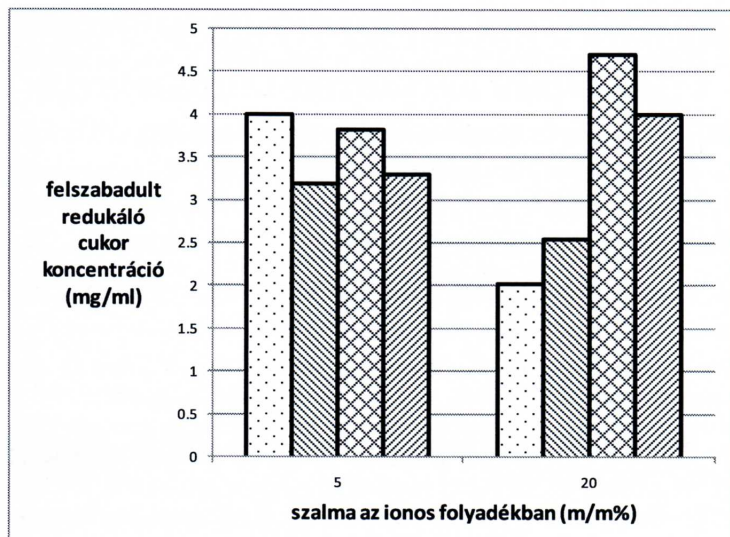
2. ábra. Cukor koncentráció változása a kukorica koncentrációjának függvényében, az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén (□) -[Bmim]Cl és Cellic HTec2; (▨) -[Bmim]Cl és Cellic CTec2; (⊠) -[Bmim]Ac és Cellic HTec2; (▧) -[Bmim]Ac és Cellic CTec2)



3. ábra. Felszabadult cukor változása a szalma koncentrációjak függvényében az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén (□-[Bmim]Cl és Cellic HTec2; ▨-[Bmim]Cl és Cellic CTec2; ▩-[Bmim]Ac és Cellic HTec2; ▧-[Bmim]Ac és Cellic CTec2)

A felszabaduló redukáló cukor arányát tekintve (3.ábra) a szalma esetében is elmondható, hogy növelve a minta mennyiségét csökken a cukorfelszabadulás mértéke. 5 m/m%-os koncentrációban oldva a szalmát az ionos folyadékban a Cellic HTec2 enzimet tartalmazó minták mutatták a legjobb eredményeket függetlenül az alkalmazott ionos folyadéktól, hasonlóan a kukoricához. Az ábráról leolvasható, hogy az eredmények páronként nagyon közel vannak egymáshoz az alkalmazott enzimek tekintetében.

20 m/m%-os koncentráció esetében az eredmények már nincsenek olyan közel egymáshoz, mint a kukorica esetében. Ebben az esetben a [Bmim]Ac ionos folyadékot tartalmazó minták mutatták a jobb eredményeket, ezen belül is a Cellic HTec2 enzimet tartalmazó. A kukoricához képesti eltérés a szalma eltérő lignocellulóz felépítésével magyarázható.



4. ábra. Cukor koncentráció változása a szalma koncentrációjának függvényében az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén (□-[Bmim]Cl és Cellic HTec2; ▨-[Bmim]Cl és Cellic CTec2; ▩-[Bmim]Ac és Cellic HTec2; ▧-[Bmim]Ac és Cellic CTec2)

A hidrolízis utáni cukorkoncentrációkat tekintve (4. ábra) elmondható, hogy az 5 m/m%-os koncentráció esetében a Cellic HTec2 enzimet tartalmazó minták jobb eredményt mutatnak a másik enzimet tartalmazó mintákhoz képest, függetlenül az alkalmazott ionos folyadékoktól.

20 m/m%-os koncentráció esetében a [Bmim]Ac ionos folyadékot tartalmazó mintáknál nőtt a cukor koncentráció, ami egybeesik a várakozásainkkal és a kukoricánál tapasztaltakkal, viszont a [Bmim]Cl ionos folyadékot tartalmazó minták esetében csökkent. Ennek magyarázata lehet a szalma kukoricához képest eltérő lignocellulóz tartalma és szerkezete, amit alátámaszt, hogy a szalma maximális redukáló cukor tartalma kevesebbnek bizonyult, mint a kukoricáé.

Összefoglalás:

Mindkét kiindulási anyagnál elmondható, hogy a mintamennyiséget növelve csökken a maximálisan kinyerhető redukáló cukormennyiséghez képest a felszabaduló cukor aránya, ami az előkezelés nehézségeire utal (keverés). Ez a csökkenés valamivel kisebb mértékű a kukorica esetében, mivel az 5 tömegszázalékos koncentrációjú mintáknál nem érte el a 100%-ot a szalmával ellentétben. 20 tömegszázalékos koncentráció esetében az értékek közel esnek egymáshoz, ami arra utal, hogy nagyobb koncentráció esetében csökken az ionos folyadékos előkezelés hatékonysága, függetlenül a vizsgált ionos folyadéktól és szubsztráttól.

Ezzel egy időben viszont növekszik a hidrolízis végén mérhető cukor koncentrációja, ami a nagyobb mintamennyiségnek tulajdonítható. Ettől csak a szalma [Bmim]Cl ionos

folyadékban történő előkezelése tér el, mivel ott a töményebb mintákban csökkent a cukor koncentráció az enzimes hidrolízis végén. Ezt a jelenséget a szalma eltérő struktúrája okozhatja.

Érdekes megfigyelés, hogy a szalma esetében nagyobb mértékű volt a redukáló cukor felszabadulás, és ezáltal a hidrolízis végén mért cukor koncentrációk is magasabbak voltak.

Irodalomjegyzék

- [1] Megyeri G., Nemestóthy N., Bélafi Bakó K., Csanádi Zs., Gubicza L. (2013) *Műszaki Kémiai Napok '13, Proceedings, Veszprém*, 84-90
- [2] Zhu S., Wu Y., Chen Q., Yu Z., Wang C., Jin S., Ding Y., Wu G. (2006) *Green Chemistry* 8: 325-327
- [3] Wang Y., Radosevich M., Hayes D., Labbé N. (2010) *Biotechnology and Bioengineering* 108: 1042-1048
- [4] Auxenfans T., Buchoux S., Djellab K., Avondo C., Husson E., Sarazin C. (2012) *Carbohydrate Polymers* 90: 805-813
- [5] Lozano P., Bernal B., Bernal J.M., Pucheault M., Vaultier M. (2011) *Green Chemistry* 13: 1406-1410
- [6] Łuczak J., Hupka J., Thöming J., Jungnickel (2008) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 329: 125-133
- [7] Szentgyörgyi Cs., Bélafiné B. K., Nemestóthy N., Bakonyi P., Gubicza L. (2011) *Műszaki Kémiai Napok '11, Proceedings, Veszprém*, 241-246
- [8] Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D., and Rogers R. D. (2002) *JACS Communications* 124: 4974-4975
- [9] Fehér E. (2008) Oldószerternőkség alkalmazása izoamil-acetát enzimátikus előállítására (Doktori Értekezés, Pannon Egyetem)
- [10] Bahcegul E., Apaydin S., Haykir N. I., Tatli E., Bakir U. (2012) *Green Chemistry* 14: 1896-1903

Köszönetnyilvánítás:

Köszönetünket szeretnénk kifejezni Márkus Béláné vegyésztechnikusnak a munka közbeni segítségért. Köszönjük a NOVOZYMES cégnek, hogy rendelkezésünkre bocsátották az enzimműanyagokat (Celluclast, Cellic CTec2, Cellic HTec2).

A munka a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0071 és a TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0017 projektek keretében készült. A projektek a Magyar Állam és az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósulnak meg.