

Optimalizace kombinované degradace celulózových materiálů ozářením a enzymovou hydrolýzou

V. DUCHÁČEK, — R. BLUŽOVSKÝ

Úvod

Příroda produkuje obrovské množství organické rostlinné hmoty, z velké části ve formě celulózy. Také městský a zemědělský odpad obsahuje značné procento celulózových látek. Tento fakt a současný celosvětový problém nedostatku potravin pro obyvatelstvo obrátily pozornost na celulózu jako na možný zdroj potravy pro člověka. Na rozdíl od strukturně velmi příbuzného polysacharidu, škrobu, je však celulóza obtížně hydrolyzovatelná. Proto byly hledány i další cesty degradace celulózových materiálů a mezi nimi je i použití ionizujícího záření.

V této souvislosti byla zařazena do státního plánu RVTi naše etapa „Výzkum a technicko-ekonomická studie využití radiační degradace přírodních polysacharidů v ČSSR“. Cílem výzkumu bylo nalezení technických parametrů ekonomicky výhodného ozařování zemědělského celulózového odpadu (pšeničné slámy). Ozařený odpad by pak sloužil jako složka krmiva pro dobytek buď přímo, nebo v podobě reakční směsi po dalším, enzymatickém, odbourávání.

V úvodní části výzkumných prací byl sledován vliv absorbované dávky záření gama na některé globální změny v čisté celulóze (zdravotnické vatě) [1]. Jednalo se zejména o snížení stupně polymerace (od dávky cca 300 kGy v podstatě konstantní desetinásobné snížení), vznik těkavých a rozpustných látek, karbonylových a karboxylových skupin a redukujících cukrů.

Další postup měl dva směry, studium ozařené čisté celulózy (modelovým materiálem byla opět zdravotnická vata) [2] a výzkum vlivu záření gama na zemědělský odpad (pšeničnou slámu) [3]. Po ozaření čisté celulózy dávkami 0–1 MGy byly ve vodném výluhu identifikovány tyto sacharidy: xylóza, arabinóza a glukóza. Mimo to výluh obsahuje ještě oligosacharidy, takže průměrný stupeň polymerace rozpustných cukrů je cca 3,5. Závislost obsahu redukujících cukrů ve vodném výluhu na dávce je blízká přímé úměře (při dávce 1 MGy přes 10 %). Ozařováním celulózy vzniká malondialdehyd [4], jehož množství je přímo úměrné dávce. Při nejvyšší použité dávce (1 MGy) bylo nalezeno 1,56 μmol $\text{OHC}-\text{CH}_2-\text{CHO}$ na gram celulózy. V rozpustné

i nerozpustné frakci ozářené celulózy byla zjištěna celá řada organických kyselin, z nichž byly některé identifikovány [2]. Vliv pH prostředí při ozařování celulózy není příliš významný a ozařování celulózy v prostředí 0,1 N NaOH, 0,01 N H₂SO₄ a ve vodném prostředí nepřináší v podstatě žádné výhody. Zejména stupeň polymerace substrátu není ovlivněn [5]. 24-hodinová enzymová hydrolýza ozářené celulózy dávkou 1 MGy dala tyto výsledky: ve formě sacharidů bylo uvolněno do roztoku přes 40 % hmotnosti substrátu za vzniku cca 5 % roztoku sacharidů v reakční směsi. Vzhledem k výsledku hydrolýzy neozařené celulózy je to asi sedminásobek [3].

Kvalitativní analýza pšeničné slámy před a po ozáření dala následující obraz [3]. Před ozářením byly nalezeny sacharidy glukóza, xylóza, arabinóza, stopy galaktózy a jeden neidentifikovaný monosacharid. Dále sláma obsahovala 7 látek fenolických a 5 frakcí lignanů. Po ozáření nebyly nalezeny podstatné změny v kvalitativním složení (vznik dalšího monosacharidu, dvou fenolů a destrukce jedné látky fenolové povahy). Kvantitativní analýza ozářené pšeničné slámy ukázala lineární zvestup rozpustnosti, množství sacharidů, malondialdehydu a ve vodě rozpustného ligninu na dávce. Při nejvyšší dávce (cca 1 MGy) byla rozpustnost kolem 40 % (téměř dvojnásobek vzhledem k čisté celulóze), množství redukujících sacharidů 2,7 % (asi polovina), celkově sacharidů 11,7 % (v podstatě totéž množství jako v celulóze), malondialdehydu 68,4 ppm (polovina) a 135 mg ligninu v rozpustné formě na gram substrátu. Enzymová hydrolýza ozářené slámy (1 MGy) trvající 24 hodin dala následující výtěžky: 32,5 % substrátu bylo konvertováno na cukry, které vytvořily 3,3 % roztok sacharidů v reakční směsi. Vzhledem k hydrolýze neozařené slámy je tento výtěžek šestinásobkem [6].

Na základě takto získaných výsledků a předběžného ekonomického hodnocení (3) jsme dospěli k závěru, že ozařování zemědělského odpadu za účelem zvýšení jeho stravitelnosti je zejména při kombinaci ozařování s následnou enzymovou hydrolýzou technicky velmi výhodné, ale vzhledem k vysoké ceně enzymového preparátu ekonomicky neúměrně náročné. Proto jsme se snažili hledat další parametry, které by celý proces ještě zvýhodnily. To je také obsahem této práce. Zabývá se vlivem dávkového příkonu na snížení polymerace celulózy, sledováním "post effectu" rovněž vzhledem ke stupni polymerace celulózy, a to buď sušené nebo přirozeně vlhké a konečně stanovením optimálního hmotnostního poměru substrát : enzymový roztok při enzymové hydrolýze různých upravených vzorků pšeničné slámy.

Experimentální část

Použité přístroje, zařízení, chemikálie a ozařovaný materiál

K experimentům byly používány následující přístroje a zařízení:

- a) kobaltový ozařovač MRCH — gamma — 100, dávkový příkon k 1. 1. 1978 = 5,2063 kGy/h, nehomogenita ozařovacího prostoru max. \pm \pm 3,5 %, výrobek fy Izotop, SSSR;
- b) spektrální kolorimetř Spekol s přidavným zesilovačem Spekol ZV a nástavcem EK 5, výrobek fy Carl Zeiss, Jena, NDR;

- c) pH-metr typ PHM 26c, výrobek fy Radiometer, Copenhagen, Dánsko;
- d) thermostat U 10, výrobek fy VEB Prüfgeräte, Medingen, NDR;
- e) analytické váhy typ WA-30, výrobek fy Mera — Wag, Gdaňsk, PLR;
- f) stolní odstředivka LZ-207, výrobek MLR;
- g) laboratorní míchadlo LM III, výrobek fy Dioptra, Turnov, ČSSR;
- h) laboratorní šrotovnik, výrobek fy Distra, Stránčice, ČSSR;
- i) viskozimetr Ubbelohde, výrobek fy Kavalier, Sázava, ČSSR.

Použité chemikálie měly stupeň čistoty buď „p. a.“ nebo „chemicky čistý“.

K enzymovým hydrolýzám bylo použito kultivační kapaliny získané submersní kultivací *Trichoderma viride* 9123 o aktivitách: $c_x = 50$ mg redukujících látek na mililitr kultivační kapaliny, FPA = 9,8 mg redukujících látek na mililitr kultivační kapaliny a na gram substrátu.

Delignifikace byla prováděna patnáctiminutovým varem v nadbytku 2 % roztoku NaOH.

Ozařovaným materiálem byla obvazová vata skládaná, výrobce Rico, n. p., Veverská Bitýška, r. v. 1974 a pšeničná sláma z lokality Tábor, rok sklizně 1977. Vata byla použita buď bez další úpravy nebo byla sušena dle ČSN 56 01 46. Sláma nebyla před ozařováním sušena, byla však strojně sešrotována na kusy do velikosti 0,3 cm. Obsah vlhkosti v nesusušených materiálech byl 7,4%. Vzorky byly ozařovány v 20 ml skleněných ampulích.

Uvedené výsledky jsou aritmetickým průměrem nejméně tří měření, všechny jsou přepočtem na sušinu.

Vliv dávkového příkonu na hmotnostně průměrnou relativní molekulovou hmotnost ozářené celulózy

Cerčitým dozimetrem byly stanoveny dávkové příkony ozařovače bez a s použitím olovených filtrů č. 1 až 3 (viz tab. 1). Vzorky celulózy byly pak ozářeny dávkou 300 kGy, jednak pouze ve skleněných ampulích, jednak za použití jednotlivých filtrů. Viskozita 0,1 % roztoků celulóзовých vzorků v Cadoxenu byla měřena na viskozimetru Ubbelohde při teplotě 25 °C. Výsledky byly extrapolovány na nulovou koncentraci s použitím Schulzeho—Blaschkeho rovnice [7]

$$\eta = \frac{\eta_{SP}/C}{1 + K_{SB} \cdot \eta_{SP}},$$

kde η_{SP} — specifická viskozita [1], C — koncentrace (g/ml), η — vnitřní viskozita (ml/g), K_{SB} — konstanta, $K_{SB} = 0,29$ [8].

Hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost byla vypočtena ze vztahu [8]

$$\eta = K \cdot M_w^a,$$

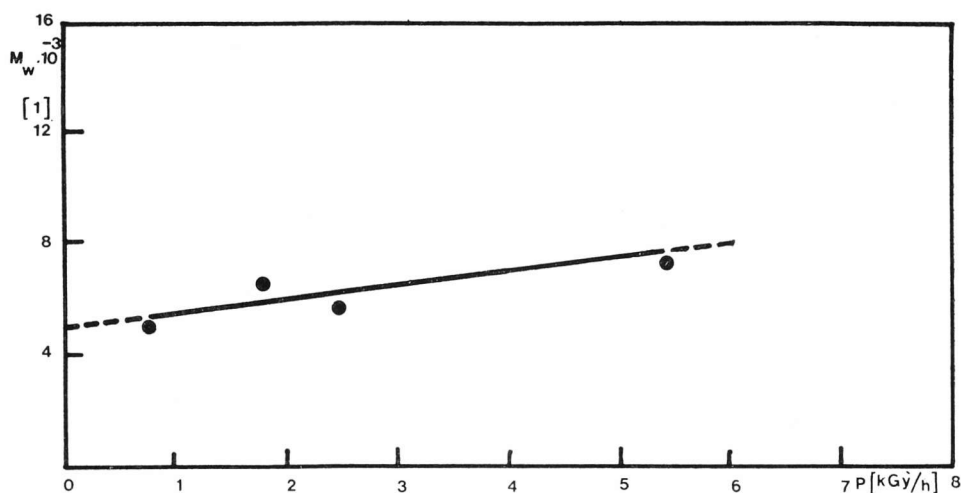
kde η — vnitřní viskozita (ml/g), K — konstanta, $K = 38,5 \cdot 10^{-3}$ [8], a — konstanta, $a = 0,76$ [8], M_w — hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost [1].

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1 a na obr. 1.

Tabulka 1. Vliv dávkového příkonu na hmotnostně průměrnou relativní molekulovou hmotnost ozářené celulózy (dávka 300 kGy)

Filtr. č.	P (kGy/h)	η (ml/g)	M_w [1]
0	5,43	33,7139	7439
1	2,49	27,0926	5579
2	1,68	30,9291	6641
3	0,71	24,6466	4926

P — dávkový příkon, η — vnitřní viskozita, M_w — hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost ozářené celulózy.



Obr. 1. Vliv dávkového příkonu na hmotnostně průměrnou relativní molekulovou hmotnost ozářené celulózy. M_w — hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost ozářené celulózy, P — dávkový příkon při ozařování celulózy

Závislost relativní molekulové hmotnosti ozářené celulózy na době skladování

Vzorky celulózy, ozářené dříve popsáním způsobem dávkou 100 kGy, byly rozpuštěny ve Schweitzerově činidle na 0,5 % roztoky. Viskozita těchto roztoků byla měřena viskozimetrem Ubbelohde při teplotě 20 °C, a to bezprostředně po ozáření a dále podobě t skladování. Ve všech případech byly měřeny sušené vzorky i celulóza přirozeně vlhká. Vnitřní viskozita byla určena extrapolací na nulovou koncentraci použitím Schulteho—Blaschkeho rovnice [7].

Hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost byla pak určena podle rovnice [9]:

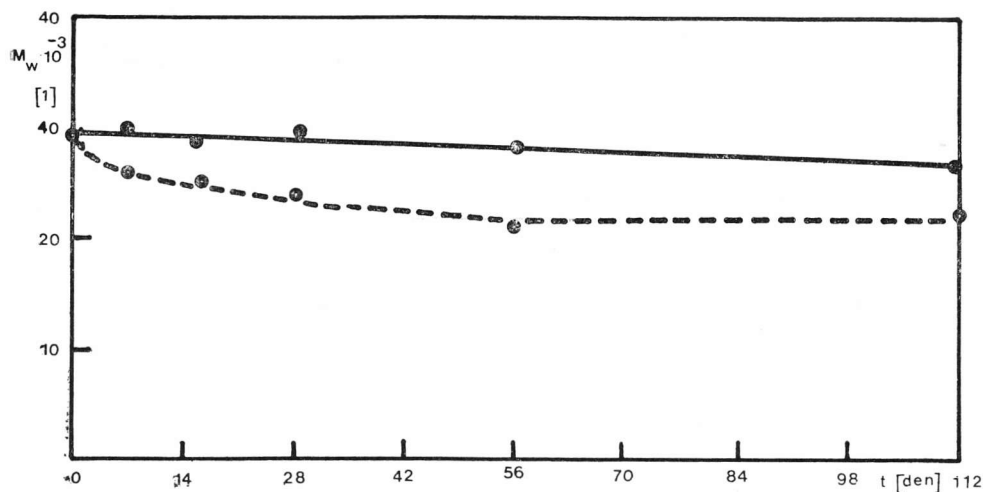
$$M_w = 132,84 + \eta 1,22 ,$$

Získané výsledky uvádí tabulka 2 a obr. 2.

Tabulka 2. Závislost relativní molekulové hmotnosti ozářené celulózy na době skladování (dávka 100 kGy)

V [I]	t (den)	η (ml/g)	M_w [1]
Nesušená	0	84,71	29 880
	7	85,49	30 220
	16	83,82	29 500
	29	84,93	29 980
	56	82,37	28 880
	112	77,12	26 650
Sušená	0	85,33	30 150
	7	75,74	26 070
	16	73,76	25 240
	29	72,37	24 660
	56	64,10	21 270
	112	66,00	22 040

V — druh vzorků, t — doba úschovy po ozáření, η — vnitřní viskozita, M_w — hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost ozářené celulózy.



Obr. 2. Závislost relativní molekulové hmotnosti ozářené celulózy na době skladování. M_w — hmotnostně průměrná relativní molekulová hmotnost ozářené celulózy, t — doba úschovy po ozáření, o — — — vzorky nesusušené celulózy (7,4 % H_2O), o — — — vzorky celulózy sušené dle ČSN 56 0146

Optimalizace poměru substrát—enzym při hydrolýze různě upravovaných vzorků pšeničné slámy

Vzorky pšeničné slámy byly hydrolyzovány buď bez úpravy, nebo po delignifikaci, či po ozáření dávkami 350, 800 a 1000 kGy, jak uvádí tab. 3.

Hydrolýza byla prováděna osmdesáti pěti mililitry enzymového roztoku

Tabulka 3. Optimalizace poměru substrát—enzym při hydrolýze různě upravených vzorků pšeničné slámy

V [l]	W (g)	C (%)	N(mg/ml)	P (%)
Neošetřená	15,0	3,33	8,5	100
	16,0	6,00	19,0	100
	17,0	2,65	15,0	100
Delignifikovaná	16,0	20,6	25,5	134
	17,0	25,3	29,5	197
	18,0	30,0	35,0	—
	19,0	25,3	25,0	—
Ozářená dávkou (kGy) 350	14,0	14,3	28,5	—
	15,0	17,3	35,5	417
	16,0	16,3	31,5	166
800	16,0	23,8	41,5	218
	17,0	21,8	42,5	238
	18,0	23,3	44,5	—
	19,0	22,6	33,5	—
1000	15,0	30,7	58,5	688
	16,0	35,6	60,0	316
	17,0	32,1	51,0	340

V — druh vzorku, W — navážka vzorku, C — procentové množství vzniklých cukrů, N — koncentrace těchto cukrů v reakční směsi, P — procento využití vzhledem k neozařenému substrátu.

při teplotě 50 °C po dobu 24 h. Všechny vzorky byly během enzymové hydrolýzy míchány stejným způsobem v týchž nádobách. Při předběžných experimentech se ukázalo, že nejvhodnější je zahájit hydrolýzu se standardními 10 g substrátu a po 7 hodinách přidat jednorázově zbytek vzorku (4 až 9 g); tímto způsobem byly provedeny všechny hydrolýzy. Po skončení enzymové hydrolýzy byl odebrán 0,5 ml vzorku a 10 min centrifugován při zrychlení cca 7000 g. V supernatantu byla po zředění (500 ×) stanovena koncentrace cukrů v roztoku antronovým činidlem [2] — hodnota N. Nato byla celá hydrolyzační směs zředěna na 1 l a v tomto roztoku po filtraci a zředění (100 ×) stanoveno antronovým činidlem celkové množství cukrů. Tato hodnota vztažena na navážku substrátu dává stupeň jeho využití — C a je zároveň procentovým množstvím cukrů vzniklých ze substrátu. V tabulce 3 jsou kromě těchto veličin uvedeny ještě hodnoty P, udávající v procentech, kolik cukrů přešlo do roztoku v daném případě ve srovnání s neošetřenou slámou za týchž podmínek.

Výsledky a závěry

Vliv dávkového příkonu na hmotnostně průměrnou relativní molekulovou hmotnost ozářené celulózy

Z tab. 1 a ještě zřetelněji z obr. 1 je vidět, že závislost stupně polymerace celulóзовých vzorků ozářených dávkou 300 kGy na dávkovém příkonu (ve zkoumaném rozmezí 0,71 až 5,43 kGy/h) je vcelku přímková. Jak bylo lze

očekávat vzhledem k efektu rekombinace u vyšších dávkových příkonů, je degradace substrátu nižší. Tento jev je ovšem poměrně nevýrazný bez dopadu na praktickou použitelnost.

Závislost relativní molekulové hmotnosti ozářené celulózy na době skladování

Jak plyne z tab. 2 a obr. 2, není post effect příliš výrazný. U nesusušené celulózy se markantně projeví až po 112 dnech (11 % pokles stupně polymerace). 56 denní skladování se téměř neprojeví (4 % pokles je v rámci chyby stanovení). O něco výraznější je u sušených vzorků, kde pokles stupně polymerace dosáhne už po 56 dnech skladování 29 %, dalším skladováním se už téměř nemění. Z technologického hlediska jsou však uvedené výsledky bezvýznamné.

Optimalizace poměru substrát-enzym při hydrolýze různých upravovaných vzorků pšeničné slámy

Tabulka 3 ukazuje, že nejvýhodnější hmotnostní poměr substrát-enzymový roztok je asi 1 : 5; tento poměr se málo liší v závislosti na provedené předúpravě slámy (a zřejmě i dalších parametrech). Nejvyššího využití substrátu a vzniku největšího množství cukrů bylo dosaženo při nejvyšší dávce (35,6 % při 1000 kGy).

Poměrně vysoké využití substrátu u delignifikované slámy (až 30 %) se dalo očekávat. Delignifikovaná sláma totiž obsahuje cca 58 % celulózy, zatím co neošetřená a ozářená pouze 44 %, [10].

Dosažená koncentrace cukrů v roztoku stoupá v řadě: sláma neošetřená, delignifikovaná, ozářená 350, 800, 1000 kGy. Při nejvyšší dávce a nejvýhodnějším poměru substrát—enzym dosahuje 60 mg/ml.

Závěrem lze konstatovat, že optimalizace poměru enzym—substrát proces enzymatické hydrolýzy pšeničné slámy zvyhodňuje. Vezmeme-li však v úvahu výsledky ekonomického hodnocení kombinovaného procesu radiační a enzymové degradace pšeničné slámy [11], zjistíme, že nalezený rozdíl mezi 35,6 a 32,5 % využití substrátu a mezi 6 a 3,3 % cukrů v reakční směsi podstatně neovlivní ekonomickou stránku konverze, takže v současné době zůstává procesem technologicky nerelizovatelným.

Souhrn

Byl sledován vliv dávkového příkonu (0,71 až 5,43 kGy/h) na stupeň polymerace celulózy ozářené dávkou 300 kGy. Byl shledán nevýrazným. Bylo provedeno studium post effectu projevujícího se dalším snížením stupně polymerace celulózy ozářené dávkou 100 kGy. U sušené celulózy byl nalezen po 56 dnech až 30 % pokles stupně polymerace, u nesusušené po 112 dnech 11 % pokles stupně polymerace. Byl nalezen optimální hmotnostní poměr substrát—enzymový roztok pro hydrolýzu pšeničné slámy (1 : 5). Hydrolýza pšeničné slámy ozářené dávkou 1 MGy dala tyto výsledky: obsah vzniklých cukrů v substrátu 35,6 %; koncentrace cukrů v reakční směsi 60 mg/ml. V zá-

věru poukázáno na ekonomickou náročnost procesu a tudíž nerealizovatelnost.

Literatura

1. DUCHÁČEK, V. — BLUĐOVSKÝ, R. — JIRÁNEK, V.: Vliv ionizujícího záření na škrob a celulózu. Dílčí závěrečná zpráva. Praha, VÚPP 1975.
2. DUCHÁČEK, V. — BLUĐOVSKÝ, R.: Výzkum a technicko-ekonomická studie využití radiační degradace přírodních polysacharidů v ČSSR. Dílčí závěrečná zpráva. Praha, VÚPP 1976.
3. DUCHÁČEK, V. — BLUĐOVSKÝ, R.: Výzkum a technicko-ekonomická studie využití radiační degradace přírodních polysacharidů v ČSSR. Dílčí závěrečná zpráva. Praha, VÚPP 1977.
4. BLUĐOVSKÝ, R. — DUCHÁČEK, V.: Some Aspects of Mechanism of Radiolysis of Cellulose. Radiochem. Radioanal. Lett., v tisku.
5. DUCHÁČEK, V. — BLUĐOVSKÝ, R.: Gamma Irradiation of Cellulose and Some Problems of Its Utilisation. Radiochem. Radioanal. Lett., v tisku.
6. BLUĐOVSKÝ, R. — DUCHÁČEK, V.: Využití ionizujícího záření při zpracování odpadní celulózy. Prům. Potravin, v tisku.
7. VOLLMERT, B.: Základy makromolekulární chemie. Praha, Academia 1970.
8. BIKALES, N. M. — SEGAL, L.: Cellulose and Cellulose Derivatives. New York, J. Wiley a. Sons, Inc. 1971.
9. PALMA, A.: Makromol. Chem., 1974, s. 2895.
10. OPICHAL, M.: Nejvhodnější úprava slámy k úhradě části jadrných krmiv, D 10 — 80 058. Praha, Ústav vědecko-technických informací 1966.
11. DUCHÁČEK, V. — BLUĐOVSKÝ, R.: Výzkum a technicko-ekonomická studie využití radiační degradace přírodních polysacharidů v ČSSR. Závěrečná zpráva. Praha, VÚPP 1978.

Оптимизация комбинированной деградации целлюлозных материалов облучением и ферментным гидролизом

Выводы

Было исследовано влияние количества дозы потребляемой мощности (с 0,71 кВу) в час до 5,43 кВу (в час) на степень полимеризации целлюлозы облученной дозой 300 кВу. Влияние дозы оказалось невыразительным. Было сделано изучение пост-эффекта проявляющегося дальнейшим понижением степени полимеризации целлюлозы облученной дозой 100 кВу. В случае сушеной целлюлозы после 56 дней показалось 30 % понижение степени полимеризации, пока в случае несущенной целлюлозы после 112 дней — 11 % понижение. Было определено оптимальное массовое отношение субстрат-раствор фермента для гидролиза пшеничной соломы (1 : 5). Гидролиз пшеничной соломы облученной дозой 1 МВу привел к этим результатам: содержание возникших сахаров в субстрате было 35,6 %; концентрация сахаров в реакционной смеси 60 мг/мл. Были сделаны выводы, которые показали на экономическую требовательность процесса и тем и невозможность его реализации.

Combined degradation optimization of cellulose materials through ionization and enzyme hydrolysis

Summary

The influence of dose power (0,71 kGy/h to 5,43 kGy/h) on degree of cellulose polymerization with dose of 300 kGy irradiated was followed. It was inexpressive. Post effect study appearing as further lowering of cellulose polymerization degree irradiated with

100 kGy was executed. In dried cellulose after 56 days as much as 30% decline of polymerization degree was found, in not dried after 112 days 11% decline of polymerization degree. Optimum mass ratio substrate — enzyme solution for wheat straw hydrolysis (1 : 5) was found. Hydrolysis of wheat straw irradiated with dose of 1 MGy has given these results: the capacity of resulted sugars in substrate 35,6%; sugars concentration in reactive mixture 60 mg/ml. As conclusion it was referred to a economic requirement of process and therefore unrealizability.