

BEITRAEGE ZUR ENZYMATISCHEN HYDROLYSE DES HOLZES NACH DER SÄURE-VORBEHANDLUNG¹⁾

Doz. Dr. Güneş UÇAR²⁾

Kurze Zusammenfassung

Gemahlene Mischholzproben wurden sowohl ohne Vorbehandlung als auch nach Behandlungen mit verdünnter Schwefelsäure in einem kontinuierlichen Strömungsreaktor enzymatisch (Cellulase) hydrolysiert. REM-Beobachtungen zeigen, dass die begünstigte enzymatische Hydrolyse hauptsächlich auf die Vergrößerung der Oberfläche des Holzes zurückzuführen ist. Das Lignin übt dabei eine störende Wirkung aus, weil es die Cellulosefibrillen bedeckt und dadurch den direkten Kontakt zwischen Enzym und Cellulose erschwert. Alpha-Cellulose, die einer Delignifizierung und Alkalibehandlung ausgesetzt ist, lässt sich beinahe quantitativ in seine monomeren Zucker umwandeln.

1. EINLEITUNG

Die Knappheit des Erdöls in den letzten Jahren und die Verteuerung seiner Produkte sowie der Energie, die daraus gewonnen wird, zeigten, dass die Vorräte der Fossil-Rohstoffe begrenzt sind, Deshalb wurde es notwendig, Wege zu finden, nach denen Alternativen zur Energiegewinnung sowie zur Herstellung chemischer Produkte möglich sind. Neben anderen bietet sich das Holz mit seinen günstigen Eigenschaften dafür an, zumal es sich in der Natur immer erneuert und auf der ganzen Erde verbreitete Form cellulosischer Biomasse darstellt.

Immerhin müssen zuerst wirksame Verfahren zur Umwandlung dieser Biomasse entwickelt werden, bevor ihr Potential aus dem vollen geschöpft wird. Eine solcher Methoden ist die enzymatische Hydrolyse, durch die Cellulose zu Glucose ohne Abbau des Produktes umgewandelt wird. Glucose bildet ihrerseits die Grundsubstanz für die Herstellung verschiedener Chemikalien und Polymere (Fengel, Wegener, 1984).

Die Cellulose ist mit ihrer komplexen Struktur ein unlöslicher wichtiger Bestandteil des Holzes und die Zugänglichkeit dieser Verbindung dem enzymatischen Angriff wird zum grossen Teil durch strukturelle Eigenschaften bestimmt. Viele strukturellen Besonderheiten der Cellulose, die die enz-

1) Diese Arbeit wurde im Institut für Holzforschung (München) durchgeführt. Der Autor bedankt sich beim Prof. Dr. D. Fengel herzlich.

2) I. Ü. Orman Fakültesi, Orman Ürünleri Kimyası ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

ymatische Hydrolyse beeinflussen, wurden von vielen Autoren bis ins Detail wiedergegeben (Cowling et al. 1975; Fan et al. 1981). Die Kristallinität der Cellulose mit der Grösse der Oberfläche der Cellulosefaser wurde als zwei wichtige Merkmale ins Auge gefasst.

Die langsame enzymatische Hydrolyse kann viel schneller in Gang gesetzt werden, wenn die cellulose Substanz auf geeignete Weise vorbehandelt wird. Eine grosse Anzahl von physikalischen und chemischen Vorbehandlungen wurde geprüft und für die enzymatische Hydrolyse der Cellulose vorgeschlagen (Dietrichs, Tshirnt, 1972; Millett et al, 1975; Chang et al. 1981 Knappert et al. 1981; Grous et al. 1986; Converse, Grethlein, 1987). Grethlein 1984 diskutierte fast alle bedeutsame Vorbehandlungsverfahren, indem er zur Aufklärung ihrer Wirksamkeit die Verteilung der Grösse geeigneter Poren als Basis nahm.

Die Vorbehandlung mit verdünnter Säure (H_2SO_4) in einem kontinuierlichen Strömungsreaktor erwies sich für verschiedene Laubhölzer wie Eiche, Pappel, Misch-Laubhölzer sehr erfolgreich, während mit Nadelhölzern weniger befriedigende Resultate erzielt wurden (Knappert et al. 1981; Uçar, 1982; Allen et al. 1983; Grethlein et al. 1984). Andererseits müssen die Bedingungen einer solchen Vorbehandlung ziemlich genau gehalten werden, um höhere Glucose-Ausbeuten bei der nachfolgenden enzymatischen Hydrolyse zu gewährleisten. Selbst kleine Abweichungen von optimalen Parametern liefern entweder keine brauchbaren Substanzen oder die Cellulose wird vorhydrolysiert. (Uçar, 1982).

In dieser Arbeit wurden gemischte Laubholzproben ohne Vorbehandlung und nach Behandlungen mit verdünnter Schwefelsäure in einem kontinuierlichen Strömungsreaktor bei 180, 200 und 220°C für 7.8 Sekunden untersucht. Diese Substanzen verhielten sich der enzymatischen Hydrolyse gegenüber ganz unterschiedlich. Zum ersten Mal wurde die Rasterelektronenmikroskopie angewendet, um die von der Behandlung verursachten Änderungen in der Struktur des Holzes zu beobachten.

Die Rückstände nach der enzymatischen Hydrolyse erfuhren dieselbe Art von REM-Beobachtungen zur Ermöglichung besseren Verständnisses über die Entwicklung der enzymatischen Wirkung inmitten des Holzes. Andererseits wurden die erforderlichen chemischen Analysen und DP-Bestimmungen auch durchgeführt, um das am besten geeignete Material für enzymatische Hydrolyse zu charakterisieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

Das gemischte Holzmehl (90 % Ahorn, 10 % Birke mit Teilchengrösse bis 0.25 mm) wurde als cellulose Substanz für die Untersuchungen verwendet. Die Säurevorbehandlungen wurden bei 180°, 200°, 220° C mit 1 %iger H_2SO_4 jeweils für 7.8 Sekunden in einem kontinuierlichen Reaktor durchgeführt und das vorbehandelte Holz wurde im nassen Zustand mit etwas Säure aufbewahrt¹⁾. Ein Teil des unbehandelten, lufttrockenen Holzes wurde bei 850°C in einem Muffelofen verascht, und ein zweiter Teil wurde mit Ethanol-Cyclohexan im Soxhletapparat extrahiert, um den Gehalt der anorganischen Komponente bzw. Extraktstoffe zu ermitteln. Für die Bestimmung des Polysacchariden-Anteils im Holz von der gesamten Hydrolyse-Methode mit Trifluoressigsäure (TFE) Gebrauch gemacht (Fengel, Wegener, 1979). Die einzelnen Zuckerbausteine wurden anschliessend mit Hilfe eines Zuckerelementanalyzers (Biotronic LC 2000) analysiert, bzw. mit Integrator berechnet.

Mit Säure vorbehandelte Proben wurden andererseits mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen, um die Schwefelsäure vollständig zu entfernen. Mit Aufmerksamkeit wurde dafür gesorgt

dass die Proben nie trocken werden. Der Überschuss des Wassers wurde abgesaugt und der Rückstand wurde gefriergetrocknet. Die Rückstände nach 2 bzw. 24 Stunden enzymatischer Hydrolyse wurden ebenfalls auf dieselbe Weise getrocknet. Beim Trocknen der Proben wurde mit grosser Vorsicht gearbeitet um das mögliche Zusammenschrumpfen zu vermeiden.

Elektronenmikroskopischen Untersuchungen des gefriergetrockneten Materials wurde mit der Absicht durchgeführt, die mögliche Änderungen der ganzen Struktur besonders der Oberfläche zu beobachten. Ausserdem die sogenannte EDXA-Methode wurde auch angeschlossen, um festzustellen, ob es zu einer Anhäufung mancher anorganischer Metallsalze gekommen ist, die sich aus der Legierung im Reaktor abtrennen und den enzymatischen Abbau hemmen können.

Der Ligningehalt wurde als unhydrolysiertes Rückstand nach Runkel und Wilke (1951) bestimmt. Für die Bestimmung durchschnittlichen Polymerisationsgrades (DP) müssten zuerst das Lignin und die Polyosen aus der Cellulose entfernt werden. Die Substanzen wurden deshalb mit angesäuerter Natriumchloritlösung (Gehalt an Aktivchlor 1.9 g/ g Probe, bei 70°C) delignifiziert. Weil sich der grösste Teil der Polyosen während der Vorbehandlungen im Reaktor auflösten und abtrennen, konnte auf weitere Extrahierung mit Alkali verzichtet werden. Die Ausnahme bildete hier nur das unbehandelte Holz, bei dem eine Behandlung mit 17.5 %igem NaOH notwendig war, um die Alpha-Cellulose herzustellen. Die isolierten Cellulosen wurden dann in Cadoxen-Lösung aufgelöst und die viskosimetrischen Messungen erfolgten in einem automatischen Kapillarviskosimeter bei 20°C. Die DP-Werte wurden nach Marx-Figini und Schulz (1962) errechnet.

Lufttrockene, gemischte Laubholz-Proben und Alpha-Cellulose einerseits, vorbehandelte, nasse, neutrale Substanzen andererseits wurden verwendet, um 2 %ige Suspensionen in 0.05 M Citratpuffer (pH=4.8) herzustellen. Die genau gewogene Menge der Cellulase aus *Penicillium funiculosum* (Sigma Chemical Co. Aktivität 15 U mg⁻¹) wurde hinzugefügt und die enzymatische Hydrolyse wurde in einem Schaukelbad bei 45°C durchgeführt.

Nach jeder gewünschter Reaktionszeit wurde die enzymatische Hydrolyse durch Ansäuern mit 2ml 25 %iger Schwefelsäure unterbrochen. Die Zuckerbausteine in Hydrolysaten wurden wiederum anhand des Zuckerelementanalyzers determiniert. Die Rückstände wurden durchaus mit destilliertem Wasser gewaschen und für die weitere, u.a. elektronenmikroskopische Versuche aufgehoben.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Tabelle 1 wurden die Ergebnisse der Analyse von verschiedenen Substanzen zusammengefasst.

Verbindung	vorbehandelt ¹⁾			
	unbehandelt (%)	180°C (%)	200°C (%)	220°C (%)
Rhamnose	0.6	0.5	0.2	0.1
Mannose	3.0	2.1	1.0	0.9
Arabinose	0.7	—	—	—
Galactose	1.1	0.5	0.3	0.2
Xylose	23.4	12.3	2.8	1.1
Glucose	42.5	59.5	67.2	63.2
Lignin	20.3	25.6	29.1	34.5
Summe	91.6 ²⁾	100.5	100.6	100.0

1) S. Material und Methoden

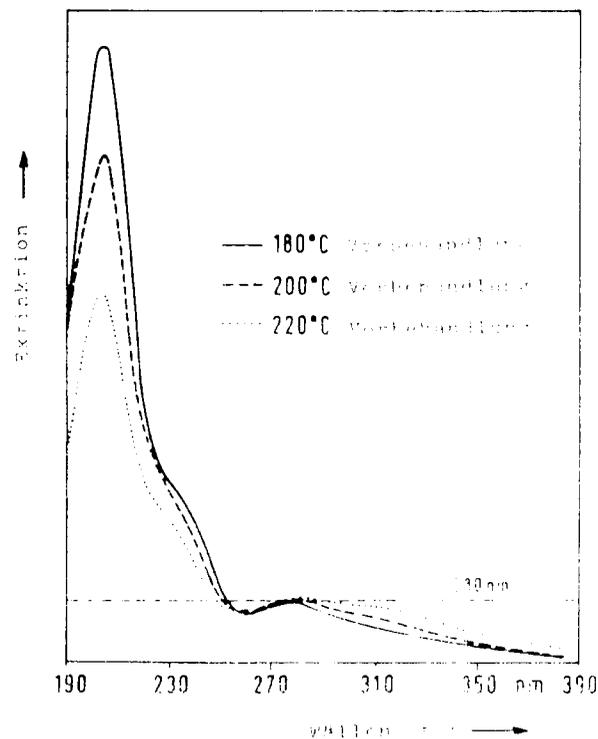
2) Wegen Uransäuren, Acetylgruppen und Asche zeigt die Summe einen Fehlbetrag von 100 %.

1) Für die Sendung der in Reaktor vorbehandelten Proben bin ich Professor H. Grethlein (Dartmouth College, New Hampshire U.S.A.) zum besten Dank verpflichtet, G. Uçar.

Beim ersten Blick ist eine Anreicherung an Glucose in den vorbehandelten Substanzen zu erkennen, was auf die stärker werdende Hydrolyse der Polyosen zurückzuführen ist. Trotz der strengen Bedingungen bei 220°C bleiben immer noch kleine Anteile an Xylose und Mannose im Holz zurück. Für das Verhalten der Cellulose und des Lignins konnte eine einfache Umrechnung zur Andeutung herangezogen werden, denn keine näheren Angaben waren vorhanden, die zeigen, zu welchem Umfang die Cellulose und das Lignin während Vorbehandlungen in Lösung gegangen sind. Wenn man aus dem Verhältnis zwischen Glucose und Lignin im unbehandelten Holz (2.09) ausgeht und dieses den selben Verhältnissen gegenüberstellt, die für verschiedene, vorbehandelte Substanzen kalkuliert sind, so werden die gleichen Werte zeigen, dass entweder mit keinen Verlusten oder mit Verlusten in ähnlicher Höhe zu rechnen sind. Für die Proben von 180°C und 200°C -Vorbehandlungen wurden die Werte von 2.32 und 2.31 gefunden, die nur etwas höher liegen als 2.09. Dies würde bedeuten, dass für die beiden Fälle am wenigstens höhere Ligninverluste entstehen zum Vergleich mit Cellulose.

Aus den früheren Versuchen ist auch bekannt, dass sich ein kleiner Teil der Cellulose unter den vergleichbaren Umständen sofort hydrolysieren lässt (Grethlein et al 1980, Saeman, 1945 Fagan et al. 1971). Andererseits liefert die Vorbehandlung bei 220°C ein Glucose: Lignin-Verhältnis von 1.83 und zeigt damit einen Abbau der Cellulose bei diesen extremen Bedingungen.

Während die Vorbehandelten Proben mit destilliertem Wasser neutral ausgewaschen wurden, wurde ein Teil der Filtrate getrennt und die Absorption im UV-Spektralphotometer gemessen. Alle Filtrate gaben typische Lignin-Spektren mit zwei Maxima bei 204 nm und 280 nm und einer Schulter bei 230 nm (Abb. 1). Jedes Filtrat wurde soweit verdünnt, dass bei 280 nm fast denselben Extinktion-Wert haben.

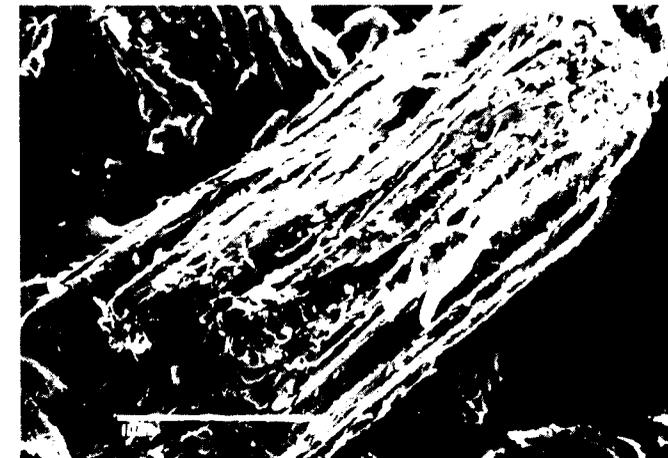


(Abb. 1: UV-Spektren der Filtrate aus vorbehandelten Proben)

In Abb. 1 wurden drei UV-Absorptionspektren übereinandergezeichnet, die bei 204 nm unterschiedliche Extinktion zeigen. Der Bereich der Kurven bei 204 nm offenbart wahrscheinlich die strukturelle Änderungen des Ligninmoleküls, das löslich wird und auch die Intensität der Vorbehandlungen.

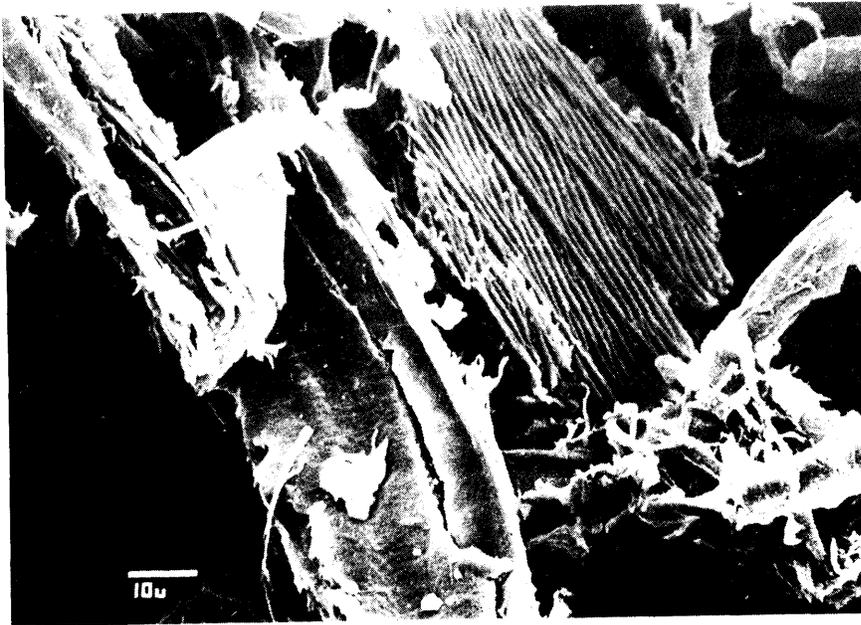
Bevor die Substanzen enzymatisch hydrolysiert werden, wurden sie im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Es gibt mehrere Arbeiten, die auf gute Korrelation zwischen Oberflächeneigenschaften cellulosischen Materials und Diffusionsvermögen der Enzyme hinweisen (Fan et al., 1980; Gharpuray et al. 1983). Grethlein (1985) betont, dass unabhängig von der Substanz die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse mit Cellulase aus *Trichoderma reesei* zu der Größe der Poren in der cellulosischen Biomasse, in die Enzymmoleküle passen, in einer linearen Wechselbeziehung steht. Die entsprechende Größe der Poren müsste mindestens zwischen 5 und 10 nm liegen, weil die Enzyme vom Typ der Cellulase diesen molekularen Durchmesser aufweisen. Der Zweck der elektronenmikroskopischen Untersuchungen war deshalb zuerst die Oberflächenmerkmale der Substanzen festzustellen und dann miteinander bezüglich ihrer enzymatischen Anfälligkeit zu vergleichen.

Das unbehandelte, gemahlene Laubholzgemisch besteht vorwiegend aus Zellbündeln von unterschiedlichen Größen (bis zu 0.2 mm dick und bis etwa 1 mm lang), mit einzelnen Zellen und Zellbruchstücken, die unter den Bündeln verteilt sind (Abb. 2).

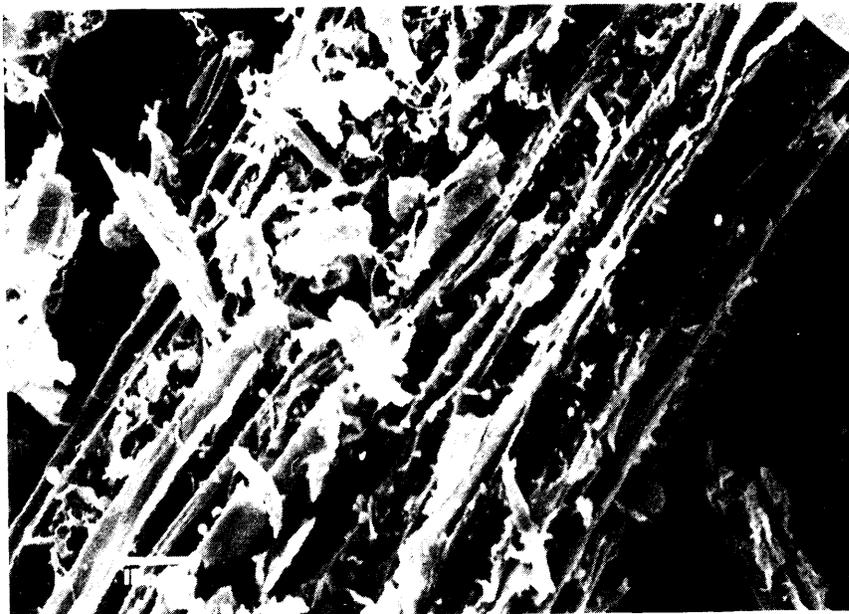


(Abb. 2: Unbehandeltes Laubholzmehl (Mischung von Ahorn und Birke), REM-Aufnahme)

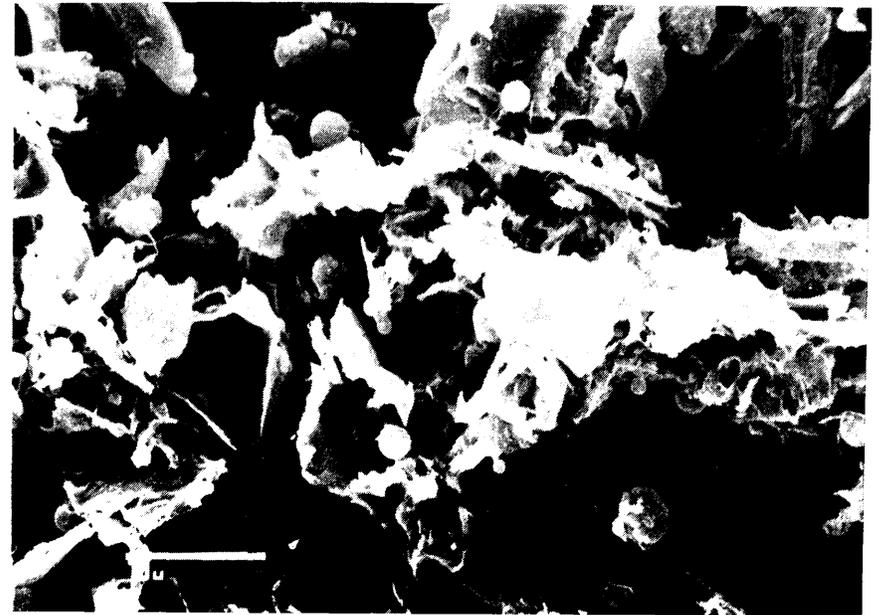
Diese Bündel sind ziemlich aufgeraut und rissig, was sicher mit Mahlwirkung und Sieben zu tun hat und die rauhe Erscheinung macht sich besonders an den longitudinalen Enden bemerkbar. Die Säurevorbehandlung bewirkt, dass die Zellbündel erst in Stücke und dann in Zellfragmente brechen, wobei die Strenge der Bedingungen massgebend ist. Ziemlich einheitliche Faserbunde haften dabei recht gut aneinander, so dass sie in der Vorbehandlung bei 180°C bis zu ihren ungefähr halbierten Dimensionen durchhalten (Abb. 3). Noch strengere Vorbehandlung bei 200°C kann jedoch zu einem fast ganzen Zusammenbruch der meisten Bunde führen (Abb. 4). Milder Erhöhung der Temperatur können nicht nur alle Zellbündel bersten, sondern vergrößert sich auch die Menge der Zellfragmente und -wände beachtlich (Abb. 5). Je mehr Zellbündel brechen bzw. sich zerspalten und dadurch mehr einzelne Zellfragmente entstehen, desto größer wird ihre Oberfläche. Folglich müsste eine Steigerung der Hydrolysierbarkeit mit Enzym in unmittelbarer Beziehung zu der Strenge der Vorbehandlung erwartet werden. In Zusammenhang mit Verlusten an Cellulose neigten sich die Oberflächen der Zellbruchstücke rauher zu werden (Abb. 6).



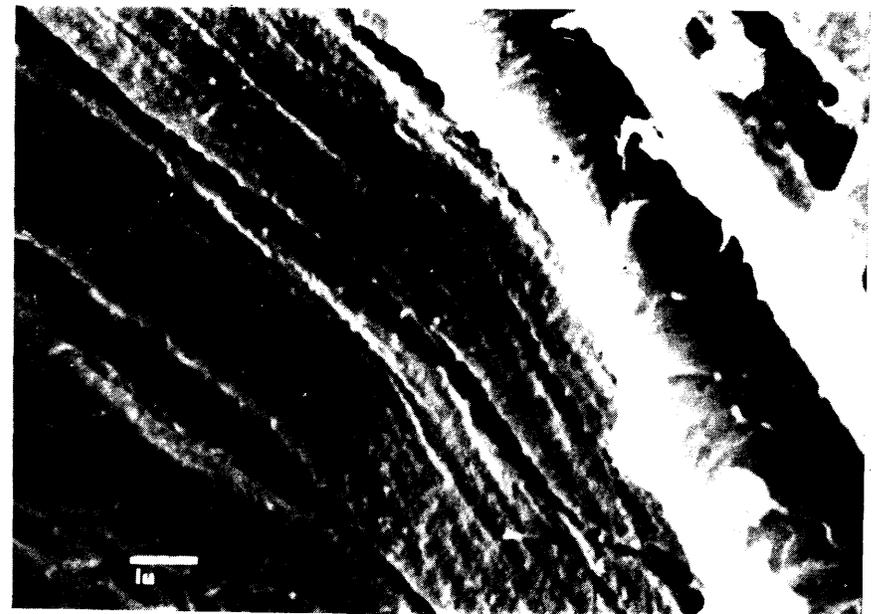
(Abb. 3: Bei 180°C vorbehandelte Laubholzprobe, REM-Aufnahme)



(Abb. 4: Bei 200°C vorbehandelte Laubholzprobe, REM-Aufnahme)



(Abb. 5: Bei 220°C vorbehandelte Laubholzprobe, REM-Aufnahme)



(Abb. 6: Laubholz, vorbehandelt bei 220°C, raue Oberfläche, REM-Aufnahme)

Ein spektroskopisches Verfahren mit Röntgenstrahlen (EDXA) wurde auf die Substanzen angewendet, um die Verteilung mancher anorganischer Verbindungen, besonders Metallsalze zu prüfen. Die Salze von Quecksilber, Silber, Kupfer, Chrom und Zink hemmen allgemein die enzymatischen Abbaureaktionen (Gascoigne, Gascoigne, 1960). Grethlein et al. (1980) berichteten, dass manche Metalle in der Legierung des Reaktors sich unter den Bedingungen der Vorbehandlung auflösen und hauptsächlich in Form ihrer Sulfatsalze in der Lösung vorkommen. Im Holz wurden keine Metalverbindungen ermittelt, deren Anteil wesentlich zu sein scheint. Nach EDXA-Analysen kan das Zinn in einigen Mengen aufgefunden werden, das möglicherweise aus der Reaktorlegierung stammt. Der Gehalt am Zinn und noch mehreren Elementen nimmt mit der Erhöhung der Temperatur ab und sie sind nach 220°C-Vorbehandlung spurenweise zu finden. Das höhere Zinn der Vorbehandlung bei 180°C lässt sich die Salzbildung mit den Carboxylgruppen restlichen 4-O Methylglucuronoxylans vermuten.

Die Tabellen 2 und 3 umfassen die analytischen Angaben, die während enzymatischer Hydrolysen ermittelt wurden. Ausserdem wurde die Wechselbeziehung zwischen Ausbeute an Glucose und Dauer der Hydrolyse graphisch dargestellt, um ein besseres Verständnis und leichteren Vergleich zu ermöglichen (Abb. 7).

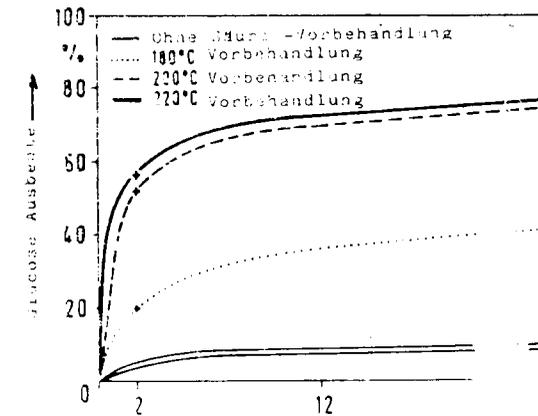
(Tabelle 2: Die Zusammensetzung der einzelnen Zucker in den Enzymhydrolysaten der unbehandelten und mit 1 %igem H₂SO₄ vorbehandelten Substanzen)

Substanz	Dauer der Hydrolyse (h)	Rhamnose (%)	Mannose (%)	Xylose (%)	Glucose (%)	Cellobiose (%)
unbehandelt unextrahiert	24	Spuren	0.3	1.2	3.4	—
unbehandelt extrahiert	24	0.1	0.3	1.2	4.1	—
180°C	2	—	—	1.1	11.8	0.3
	24	—	0.3	2.9	24.2	—
200°C	2	—	—	1.0	34.7	1.5
	24	—	0.2	1.4	49.6	—
220°C	2	—	—	0.2	35.2	0.8
	24	—	—	0.5	48.1	—

(Tabelle 3: Die Ausbeute an Glucose während enzymatischer Hydrolysen (Bez. auf die gesamte Glucose in Substanz))

Dauer der Hydrolyse (h)	unbehandelt		vorbehandelt		
	unextrahiert (%)	extrahiert (%)	180°C (%)	200°C (%)	220°C (%)
2	*	*	19.8	51.6	55.7
24	8.0	9.6	40.7	73.8	76.1

* nicht bestimmt



(Abb. 7: Der zeitliche Verlauf der Glucoseausbeute bei den enzymatischen Hydrolysen)

Die Cellulase aus *Penicillium funiculosum* ist nicht sehr Substrat-spezifisch und zeigt daher manche Aktivität für Xylane und Mannane. Weil die vorbehandelte Holzproben nur geringe Mengen an Polyosen enthielten, wurde dieser Beschaffenheit keine praktische Bedeutung beigemessen.

Wie die anderen Cellulasen, die z. B. von *Trichoderma sp.* oder ähnlichen Mikroorganismen abgesondert werden, hat die Cellulase aus *Penicillium funiculosum* wenig Wirkung auf die Cellulose im originalen Holz. Die Entfernung der Extraktstoffe aus dem Holz bringt nur eine schwache Verbesserung mit sich.

Weil die Konzentration der Schwefelsäure (1 %) und die Reaktionszeit (7.8 Sek.) während der Vorbehandlungen konstant gehalten wurden, beeinflusste nur die Erhöhung der Temperatur die Umwandlungsgeschwindigkeit in Glucose beim enzymatischen Angriff. Die Vorbehandlung bei 180°C reicht sicher nicht aus, denn mehr als die Hälfte der Cellulose bleibt noch im Rückstand unhydrolysiert zurück. Andererseits wurde die höchste Zugänglichkeit mit einer Vorbehandlung bei 220°C erreicht. Aber die Cellulose erleidet Verluste bei dieser Behandlung.

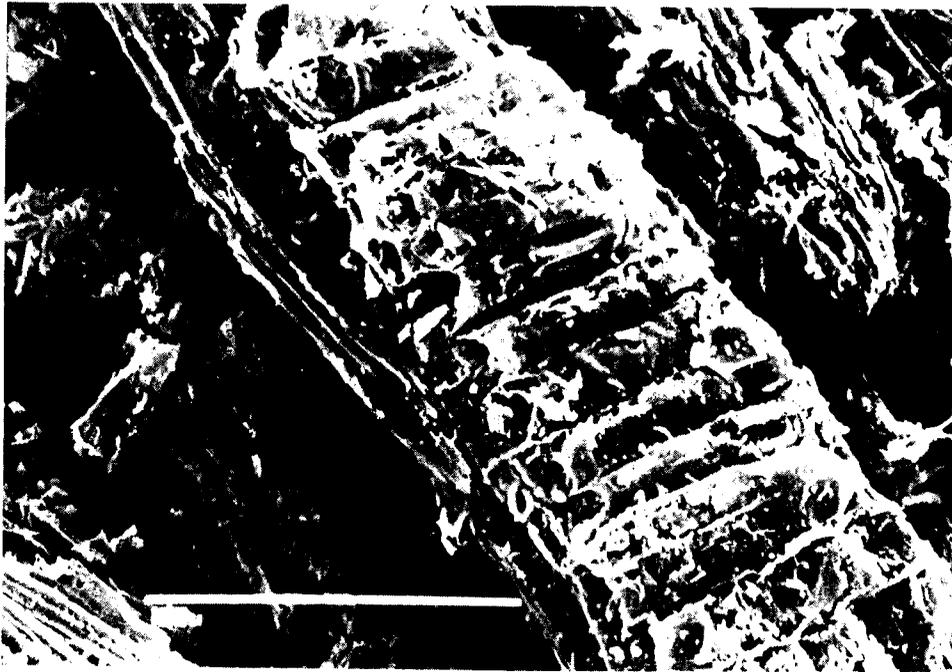
Die Hydrolysate, die aus Säure-Vorbehandlungen und anschließenden enzymatischen Hydrolysen erhalten wurden, zeigen ziemlich einheitliche Zusammensetzungen, wenn die Pentosen und Glucose in Betracht gezogen werden. Die Substanz von der Vorbehandlung bei 200°C zeigt beinahe gleichhohe Empfänglichkeit wie die bei 220°C vorbehandelte, während die erstere auf Cellulose schonend wirkt.

Es ist also auffallend, dass besonders die Substanzen mit der besseren Zugänglichkeit für Enzyme durch kleine Mengen der Cellobiose gekennzeichnet sind. Nach der Ermittlung des Glucosegehaltes in Rückständen wurden die Summenbilanzen für Glucose aufgestellt (Tabelle 4). Die Erklärung der Fehlbeiträge konnte man darin suchen, dass parallel zum zunehmenden Ligningehalt der Rückstände die Cellulose mit TFE nicht mehr quantitativ zu hydrolysieren ist. Je höhere Anteile an Cellulose von Enzym verbraucht wird und dadurch in Form von Glucose in Lösung geht, desto kleiner wird die zurückgebliebene Cellulose im Rückstand und folglich vermindert sich der Fehler der quantitativen Bestimmung. Wenn diese Aspekte im Auge behalten werden, können die analytischen Angaben als zufriedenstellend angesehen werden.

Tabelle 4: Glucose-Summenblanzen nach den enzymatischen Hydrolysen unterschiedlich vorbehandelter Substanzen

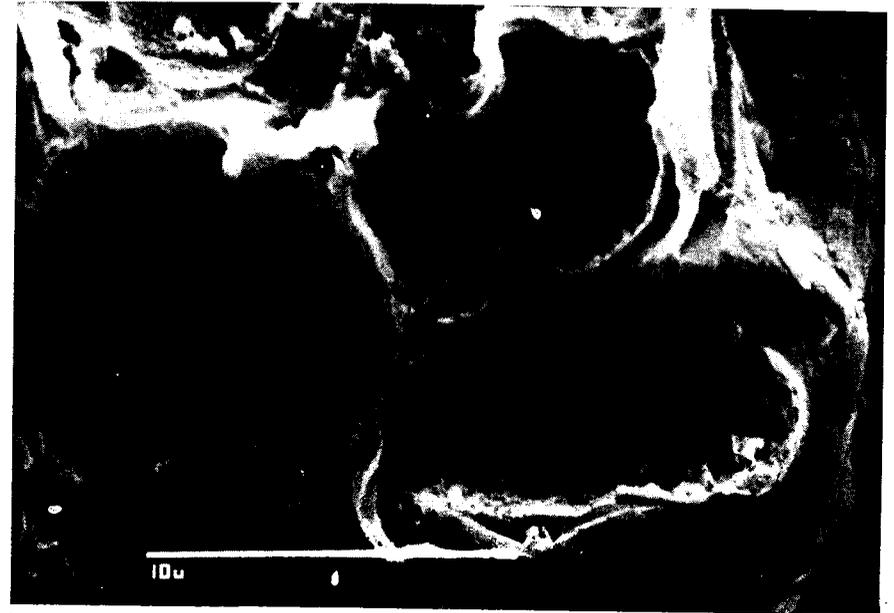
Glucose in	180°C		200°C		220°C	
	2 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h
Filtrat	19.8	40.7	51.6	73.8	55.7	76.1
Rückstand	81.8	62.5	48.1	22.0	29.9	19.4
Summe	101.6	103.2	99.7	95.8	84.6	93.5

Die Laubholzproben, die keine Vorbehandlung ausgesetzt waren und bei der enzymatischen Hydrolyse nur etwa 1/10 ihrer Cellulose verloren, lassen sich keine merklichen Strukturänderungen erkennen. Nach der zwei stündigen Hydrolyse des bei 180°C vorbehandelten Holzes kann die bevorzugte Zugänglichkeit der dünnwandigen Paranchymzellen (Strahlparanchym) beobachtet werden, während die Holzfaser mit ihren mittleren bis dicken Zellwänden recht unversehrt erscheinen (Abb.8).



(Abb. 8: Der Rückstand nach zwei stündiger enzymatischer Hydrolyse bei 180°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)

Das ganze Ausmass der Celluloselösung aus dem Holz hat zur Folge, dass die einzelnen Schichten der Paranchymzellen anfangen sich zu trennen (Abb. 9). Die Zellwandbruchstücke der Gefässe (Ahorn) mit ihren Verdickungen können leicht identifiziert werden (Abb. 10).

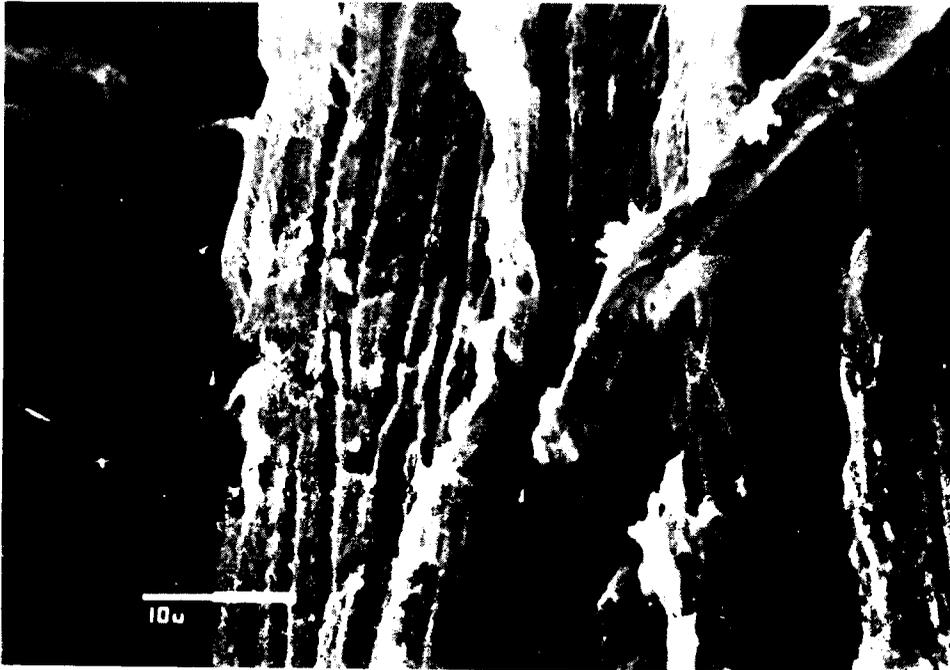


(Abb. 9: Der Rückstand nach 24 stündiger enzymatischer Hydrolyse bei 180°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)



(Abb. 10: Der Rückstand nach 24 stündiger enzymatischer Hydrolyse bei 180°C vorbehand. Laubholzes, REM-Aufnahme)

Die Faser spalten sich weiter in ihrer Längsachse auf und an ihren Zellwänden sind die Vertiefungen und kleine Löcher sichtbar (Abb. 11). Die Verdickungen der Gefäße enthalten möglicherweise viel Lignin und können deshalb der Hydrolyse recht gut widerstehen. Sie sind teilweise zerrissen und haben Fransenähnliche Enden (Abb. 10).

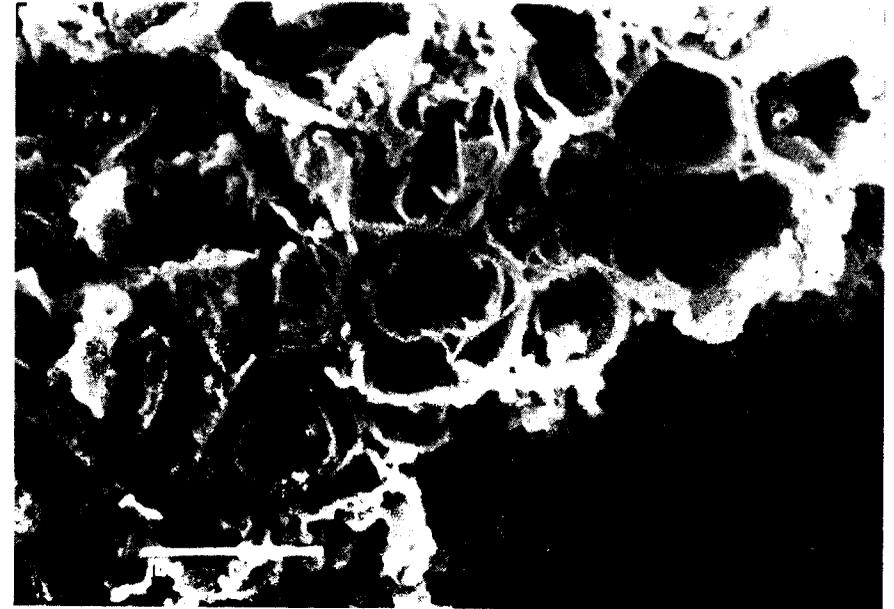


(Abb. 11: Der Rückstand nach 24 stündiger enzymatischer Hydrolyse bei 180°C vorbehand. Laubholzes, REM-Aufnahme)

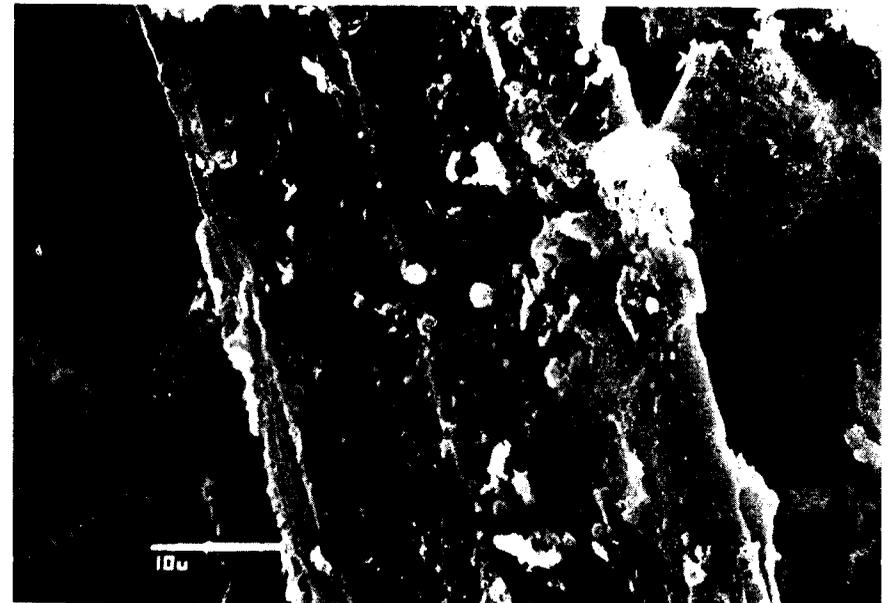
Die Vorbehandlungen bei 200°C und 220°C liefern die Substanzen, die sich viel leichter enzymatisch hydrolisieren lassen. Nach 2 und 24 stündigen Hydrolysen wurden 1/2 bzw. 3/4 der Cellulose aus dem Holz entfernt. Übriggebliebene Zellwände der Paranchyme zeigen mehr oder weniger aufgelöste Schichten. Da sich der höchste Gehalt an Cellulose in der Sekonderwand findet, können nach der Hydrolyse Ring-ähnliche Hohlräume im Querschnitt beobachtet werden (Abb. 12).

Die Tertiärwände der Zelle sind wahrscheinlich mehr widerstandsfähig gegen den enzymatischen Angriff, da die Lumenseiten der offenen Zellfragmente wenig strukturelle Änderungen zeigen (Abb. 13). Die Tüpfelfelder und beiföte Tüpfel in den Holzproben, die wirkungsvoll vorbehandelt waren und danach enzymatisch hydrolysiert wurden, befinden sich noch im recht guten Zustand (Abb.14).

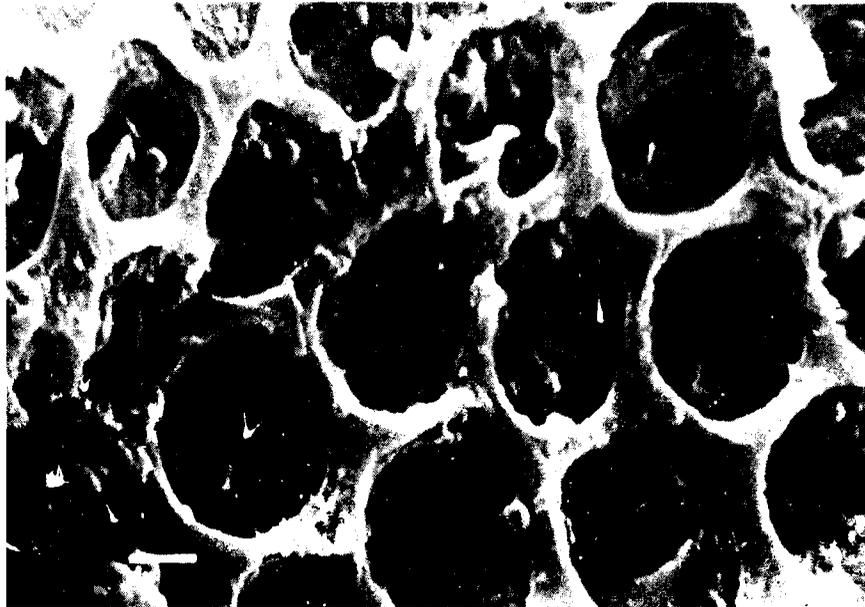
Die Spiralverdickungen der Gefäße können am besten gegen Enzym Widerstand leisten, während sich die wahre Zellwand zu einem gewissen Grad auflöst (Abb. 15). Nach der 24 stündigen Hydrolyse sind auch die Bruchstücke von abgebauten einzelnen Zellwänden sowie dünne, Membranen ähnliche Teile zu sehen, die vermutlich Lignin-reiche Lamellen der Zellwände darstellen (Abb.16).



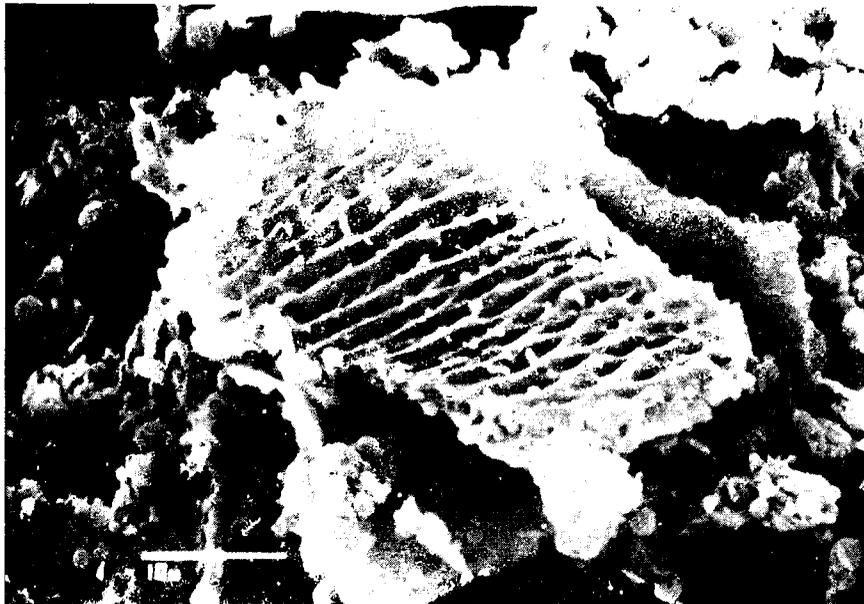
(Abb. 12: Der Rückstand nach 24 stündiger enzym. Hydrolyse bei 220°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)



(Abb. 13: Der Rückstand nach 24 stündiger enzymatischer Hydrolyse bei 220°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)



(Abb. 14: Der Rückstand nach 24 stündiger enzym. Hydrolyse bei 200°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)



(Abb. 15: Der Rückstand nach 24 stündiger enzym. Hydrolyse bei 220°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)



(Abb. 16: Der Rückstand nach 24 stündiger enzym. Hydrolyse bei 200°C vorbehandelten Laubholzes, REM-Aufnahme)

Aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass ein effektvoller Aufschluss der cellulosischen Substanz notwendig ist, um möglichst grosse Oberflächen zu schaffen, wo die Cellulose mit dem Enzym in Berührung kommt, ohne vom Lignin gehindert zu werden. In einer früheren Arbeit wurde es gezeigt, dass sich die Grösse der Poren, in die die Diffusion der Enzymmoleküle möglich ist, während der enzymatischen Hydrolyse beachtlich vermehrt, jedoch die Geschwindigkeit der Hydrolyse abnimmt (Uçar, 1982). Es wird angenommen, dass die Entfernung der Cellulose aus dem Holz für die neuen Hohlräume, Poren, Risse in den Zellwänden verantwortlich ist. In diesem Punkt müsste man also nach den anderen Faktoren suchen, die möglicherweise auf die enzymatische Wirksamkeit einen negativen Einfluss ausüben.

Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP) wurde hier in Betracht gezogen (Tabelle 5). Die abnehmenden DP-Werte spiegeln die Auswirkung der Vorbehandlungen auf die Substanzen wieder.

Tabelle 5: DP-Werte aus unbehandelter und vorbehandelter Holzproben

Proben	DP
Unbehandelt, delignifiziert, und mit Alkali extrahiert	1840
180°C, delignifiziert	800
200°C, delignifiziert	400
220°C, delignifiziert	190

Die aus dem Holz isolierten Alpha-Cellulose liefert den Bezugswert von 1840. Ausgehend von der Tatsache, dass der grösste enzymatische Erfolg nach der Behandlung bei 220°C erreicht wurde, könnte sogar gefolgert werden, dass eine Wechselbeziehung zwischen der DP-Abnahme und Empfänglichkeit des Enzyms existiert. Alle drei vorbehandelte Substanzen enthielten erhebliche Mengen des Lignins, das die Zugänglichkeit der Cellulose bis zu einem gewissen Umfang beeinträchtigen könnte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass selbst in für die Hydrolyse am meisten verwertbare Substanz recht intakte Zellfragmente vorhanden sind, die reich am Lignin zu sein erscheinen. Um die Rolle des Lignins auszuschliessen, wurden 2%ige Suspensionen mit Alpha-Cellulose hergestellt, die aus der Holoellulose durch Alkaliextraktion mit Ausbeute von 39.8% (bezogen auf Holz) isoliert war. Die analytischen Werte der enzymatischen Hydrolyse sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Zusammensetzung der einzelnen Zucker im Hydrolysat der Alpha-Cellulose

Zucker	bezogen auf Alpha-Cellulose (%)	bezogen auf unextrahiertes Holz (%)
Mannose	0.4	0.2
Xylose	2.1	0.8
Glucose	100.6	40.0

Besonders in der zweiten Hälfte der Hydrolyse löste sich die Substanz vollständig auf und die Ausbeute an einzelnen Zuckern beträgt 103.1%. Die Alpha-Cellulose hatte sicher kleine Mengen von Ligninreste, die nach beinahe totaler Hydrolyse nicht mehr fähig waren, den enzymatischen Angriff zu hindern. Nach der vollkommener Zerstörung der Struktur wurde die sogenannte Abschirmungswirkung des Lignins behoben und der direkte physikalische Kontakt zwischen Enzymmolekülen und der Cellulose gesichert. Mehrere Forscher befassten sich auch mit der enzymatischen Hydrolyse solcher cellulosischer Substanz, die mit ihrem wenigen Ligningehalt der Alpha-Cellulose ähneln. In meisten Fällen waren strenge Vorbehandlungen (Wie spezielle Mahlmethoden, Pyrolyse, Alkalibehandlungen) erforderlich, hohe Glucoseausbeuten aus nachfolgender enzymatischer Hydrolyse zu erlangen (Fan et al. 1981; Ryu et al. 1982; Saddler et al. 1982; Neilson et al. 1983). Die Umwandlung der Cellulose I in Cellulose II wurde mit Alkalibehandlung vollbracht und dadurch wurde der enzymatische Abbau der Cellulose in zweier Hinsicht verbessert; die hohe Ausbeute an Glucose und die erhöhte Geschwindigkeit der Hydrolyse (Dietrichs, Tschirt, 1972; Norwald et al. 1977; Uçar, 1982; Grethlein, 1984). Eine totale Umwandlung der Cellulose in Glucose blieb jedoch aus. Die Ursache der Verbesserung wurde darin gesehen, dass durch quellende Wirkung der Alkalilösung sich ganz enge Poren zu weiten vermochten und dadurch die Anzahl der geeigneten Poren stark zunahm. Aus diesem Grund wurden unter den meisten Umständen die Substanzen feucht bis nass aufbewahrt, um ein mögliches Zusammenschrumpfen zu vermeiden. In unserem Fall mit Alpha-Cellulose aus Laubholz war dagegen die Probe in der Luft bis zu einem Wassergehalt von 7% getrocknet. Auf diese Weise ist wahrscheinlich der gequollene Zustand zurückgegangen, während nach der Trennung von Lignin und Polyosen zusätzliche Oberflächen und Poren geschaffen wurden. Bei der fast quantitativen Hydrolyse der Cellulose müsste deshalb die Delignifizierung im Vordergrund stehen, wenn dieser Fall mit den enzymatischen Tätigkeiten Alkali-behandelter Substanzen verglichen werden will.

Andererseits weist die Alpha-Cellulose im Gegensatz zu ihrer ganzen Hydrolisierbarkeit mit Enzym den höchsten DP-Wert auf. Folgerichtig könnte eine Beziehung zwischen DP und der Hydroly-

segeschwindigkeit dann in Frage kommen, wenn das Material beide Komponente, d. h. Lignin und Cellulose enthält.

4. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Elektronenmikroskopische Beobachtungen der vorbehandelten Substanzen zeigen, dass die Verbesserung der enzymatischen Hydrolyse hauptsächlich auf die Zunahme der Oberfläche des cellulosischen Materials zurückgeführt werden kann.

Unter drei Fällen, die hier untersucht wurden, kann die Säurevorbehandlung bei 220°C mit grösstem Erfolg ihren Zweck erfüllen. Verschiedene einzelne Mahlmethoden wurden für die cellulosische Biomasse als wirkungsvolle Vorbehandlung vorgeschlagen, weil mit immer kleiner werdenden Teilchen eine enorme Vergrösserung der oberfläche erreicht wird.

Die Änderungen in Porengrösse bzw. der Verteilung der Poren nach den Vorbehandlungen konnte leider nicht sichtbar gemacht und verfolgt werden, weil die geeignete Porengrösse mit 5-10 nm in der Auflösungsgrenze des REM liegt.

Das Lignin hat eine hemmende Wirkung auf das Enzym, weil die Cellulosefibrillen mit dem Lignin überzogen werden. Dadurch wird der Kontakt zwischen Cellulose und Enzym erschwert. Nach dem Delignifizierungsprozess ist eine Alkalibehandlung besonders wirksam und die auf solche Weise dargestellte Alpha-Cellulose kann mit dem Enzym fast quantitativ in monomere Zucker umgewandelt werden.

ODUNUN ENZİMATİK HİDROLİZİNDE ASİD ÖN İŞLEMLERİNİN ETKİSİ

Doç. Dr. Güneş UÇAR

Kısa Özet

Sürekli tekdüze akış reaktöründe seyreltik sülfat asidi ile ön işlem görmüş yapraklı ağaç odunu enzimatik yoldan hidrolize edilmiştir.

Elektron mikroskopunda yapılan gözlemlerden, 200°C-220°C'de gerçekleştirilen ön işlemlerle odun strüktürünün açılarak iç yüzey alanının büyük ölçüde arttığı anlaşılmaktadır. Bu durum enzimatik hidrolizin yüksek bir verimle sonuçlanmasını sağlamaktadır.

Odun ve bitkisel biyokütleinin önemli bir bölümünü oluşturan selulozu kimyasal açıdan çeşitli şekillerde değerlendirmek mümkündür. Doğal bir polimer olan bu madde anhidroglukoz birimlerinden oluşmakta, glukoz ise çok sayıda kimyasal maddenin üretiminde kullanılmaktadır. Selulozun, yapraklı taşları olan bu monomer şeker birimlerine ayrılmasına genel anlamda hidroliz veya sakkarifikasyon denilmektedir. Bu işlem mineral asitlerin katalizi ile yapılabileceği gibi, yenilerde üzerinde önemle durulan enzimatik yöntemlere göre selulazların etkisi altında da gerçekleştirilebilmekte, burada ürünün dekompozisyonu sorunu ortadan kalkmaktadır.

Enzimlerin seluloza etkimesi yavaş yürüyen bir proses olduğu için, ya çok daha aktif enzim türleri üretilerek veya selulozik materyali bir ön işlemde geçirerek enzimatik hidrolizi hızlandırma yolları araştırılmaktadır. Ön işlem şekilleri fiziksel ve kimyasal karakterde olabilmektedir.

Akçaağaç ve huş odunu karışımı sürekli tekdüze akış reaktöründe % 1'lik sülfat asidi ile 180°C, 200°C, 220°C sıcaklıklarda 7.8 saniye süre ile ön işleme sokulmuş, enzimatik hidrolize hazırlanmak istenmiştir. Analitik veriler özellikle 200° ve 220°C sıcaklıklarda odunda bulunan polyosların hidrolize olduğunu, 180°C ve 200°C ön işlemlerinin selüloz açısından koruyucu sayılabileceğini, 220°C'de ise selülozun bir kısmının da hidrolize olduğunu göstermektedir. Ön işlem görmüş örneklerin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesinden, lif demetleri ya da başka hücre topluluklarının 180°C'de az olmakla birlikte, sıcaklığın yükselmesiyle giderek artan bir şekilde uzunluğuna yarıldığı, enine bölündüğü, kısaca hücre çeperlerine kadar varan parçalanmalarla çok sayıda hücre fragmentlerine dönüştüğü gözlenmektedir (Abb. 2-6). Ön işlem sırasında ligninin bir kısmı çözünür hale geçmekte, burada yüksek sıcaklık lignin UV-spektrumlarında değişikliğe neden olmaktadır.

Herhangi bir işlem görmemiş odunun enzimatik hidrolizi % 8 gibi çok düşük bir verimle sonuçlanırken, 220°C'de yapılan ön işlem sonrası aynı koşullar altında selülozun 3/4'ünden fazlası hidrolize olmaktadır. 200°C ön işlemi ile de bu başarıya yakın bir enzimatik etkinlik sağlanabilmiştir. Glukoz verimleri Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1: İşlem görmemiş ve farklı koşullarda ön işlem görmüş odunun enzimatik hidrolizinde glukoz verimleri.

Hidroliz süresi (saat)	Ekstrakt		Ön İşlem Görmüş		
	Edilmiş (%)	Edilmemiş (%)	180°C (%)	200°C (%)	220°C (%)
2	*	*	19.8	51.6	55.7
24	9.6	8.0	40.7	73.8	76.1

* belirlenmedi.

2 ve 4 saatlik enzimatik hidrolizler sonrası hücrelerin durumu yine elektron mikroskobu ile incelenmiş, tercihen hangi hücrelerin veya hücre çeperi kısımlarının hidrolize olduğu araştırılmıştır. 180°C'de ön işlemde geçirilmiş örneklerden elde edilen hidroliz kalıntılarında ince çeperli paranchym hücrelerinin enzimatik etkiye hassas olduğu görülmektedir. Burada kalın çeperli denebilecek lif hücreleri pek zarara uğramamakla birlikte hidrolizin ilerlemesiyle hücre çeperlerinde daha çok uzunluğuna çatlaklar, oyuklar ve çok küçük delikler göze çarpmaktadır (Abb. 8, 11). 200°C ve 220°C'de ön işlemde geçmiş ve başarılı şekilde hidrolize edilmiş kalıntılarda enzimatik etkiye özellikle lignince zengin hücre tabakalarının dayanıklı olduğu dikkati çekmektedir. Tersiyer tabaka, basit ve kenarlı geçitlerin bulunduğu bölgeler ve trahelerdeki spiral kalınlaşmalar hidrolizden az etkilenmektedir (Abb. 13, 14, 15).

Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler enzimatik hidrolizin iyi bir verimle sonuçlanması için ön işlemler sırasında odunun tane büyüklüğü çok küçük parçacıklara ayrılması ve böylece iç yüzeyinin büyük ölçüde artırılması gerektiğini göstermektedir. Öte yandan yine ön işlemler sırasında selülozun polimerizasyon derecesinde büyük düşmeler olduğu dikkati çekmektedir. Odundan elde edilen alfa selülozda 1840 olan DP değeri, 180, 200, 220°C -ön işlemler sonrası sıra ile, 800, 400, 190'a düşmüştür. Böylece selülozun bu tür degradasyonunun enzimatik hidroliz üzerine olumlu etki yapabileceği akla gelmektedir. Bir başka açıdan ligninin selüloz fibrillerini örterek enzimle olan fiziksel teması engelleme rolünü ortadan kaldırmak ve yüksek DP-değerinin enzimatik hidrolizi ne ölçüde etkilediğini görmek amacı ile alfa selüloz aynı koşullarda enzimin etkisine bırakılmıştır. Alfa selülozun neredeyse kantitatif denebilecek ölçüde çok yüksek bir verimle glukoz dönüşmüş olması odunda ligninin bir tür izolator etkisi göstererek enzimin selüloza ulaşmasını engellediğini ve bu faktörün hiç de küçümsenmemesi gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- ALLEN D. C., GRETHLEIN H. E., CONVERSE A. O., 1983, *Process Studies for Enzymatic Hydrolysis Using High Solids Slurries of Acid Pretreated Mixed Hardwood*, *Biotechnol. and Bioeng. Symp. No: 13*, Pp. 99-111.
- CHANG M. M., CHAU T. Y., TSAO G. T., 1981, *Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose*, *Adv. Biochem. Eng. 20*, Pp. 15-42.
- CONVERSE A. O., GRETHLEIN H. E., 1987, *On the Use of an Adsorption Model to Represent the Effect of Steam Explosion Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Substances*, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 9, 79-82.
- COWLING E. B., 1975, *Physical and Chemical Constraints in the Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic Materials*, *Biotechnol. Bioeng. Symp. 5*, 163-182.
- DIETRICH S. H., TSCHRINT K. I., 1972, *Untersuchungen über den enzymatischen Abbau von Hollocellulosen in Vitro. Holz als Roh- und Werkstoff*, 30, 66-74.
- FAGAN R. D., GRETHLEIN H. E., CONVERSE A. O., PORTEOUS A., 1971, *Kinetics of Acid Hydrolysis of Cellulose found in Paper Refuse*, *Environmental Sci. Technol.*, 5, Pp. 545-547.
- FAN L. T., LEE Y. H., BEARDMORE D. H., 1980, *Mechanism of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Effects of Major Structural Features of Cellulose on Enzymatic Hydrolysis*, *Biotechnol. Bioeng.* 22, Pp. 177-199.
- FAN L. T., LEE Y. H., BEARDMORE D. H., 1981, *The Influence of Major Structural Features of Cellulose on Rate of Enzymatic Hydrolysis*, *Biotechnol. Bioeng.* 23, Pp. 419-424.
- FENGEL D., WEGENER G., 1979, *Hydrolysis of Polysaccharides with Trifluoroacetic acid and its Application to Rapid Wood and Pulp Analysis* *Adv. Chem. Ser. No: 181*, Pp. 142-158.
- FENGEL D., WEGENER G., 1984, *Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, Pp. 534-543.
- GASCOIGNE J. A., GASCOIGNE M. M., 1960, *Biological Degradation of Cellulose*, Butterworth London.
- GHARPURAY M. M., LEE Y. H., FAN L. T., 1983, *Structural Modification of Lignocellulosics by Pretreatments to Enhance enzymatic Hydrolysis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 25, Pp. 157-172.
- GRETHLEIN H. E., 1984, *Pretreatment for Enhanced Hydrolysis of Cellulosic Biomass*, *Biotech. Adv.* Vol. 2, Pp. 43-62.
- GRETHLEIN H. E., 1985, *The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates*, *Biotechnol. Feb.* 155-160.
- GRETHLEIN H. E., CONVERSE A. O., MCPARLAND J. J., SMITH P. C., 1980, *acid Hydrolysis of Cellulosic Biomass in a Continuous Plug Flow Reactor. Final Report for U. S. Dept. of Energy/SERI, Thayer School of Eng., Dartmouth College.*
- GRETHLEIN H. E., ALLEN D. C., CONVERSE A. O., 1984, *A Comparative Study of the Enzymatic Hydrolysis of Acid-Pretreated White Pine and Mixed Hardwood*, *Biotechn. Bioeng.* 26, Pp. 1498-1505.
- GROUS W. E., CONVERSE A. O., GRETHLEIN H. E., 1986, *Effect of Steam Explosion Pretreatment on Pore Size and Enzymatic Hydrolysis of Poplar*, *Enzyme Microb. Technol.* 8, Pp. 274-280.
- KNAPPERT D. R., GRETHLEIN H. E., CONVERSE A. O., 1981, *Partial Acid Hydrolysis of Poplar Wood as a Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11, 66-77.
- MARX-FIGINI M., SCHULZ G. V., 1962, *Die Viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung von Cellulosen und Cellulosenitraten*, *Macromol. Chem.* 54, 102-118.
- MILLETT M. A., BAKER A. J., SATTER L. D., 1975, *Physical and Chemical Pretreatments for Enhancing Cellulose Saccharification*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 5, 193-319.
- NEILSON M. J., SHAFIZADEH F., AZIZ S., SARKANEN K. V., 1983, *Evaluation of Organosolv Pulp as a Suitable Substrate for Rapid Enzymatic Hydrolysis*, *Biotechnol. Bioeng.* 25, Pp. 609-612.
- NORWALD N., WALLICK J., HARER J. M., 1977, *Pretreatment of Cellulosic Wastes to Increase Enzyme Reactivity*, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 326-336.
- RYU D. D. Y., LEE S. B., TASSINARI T., MACY C., 1982, *Effect of compression Milling on Cellulose Structures and on Enzymatic Hydrolysis Kinetics*, *Biotechnol. Bioeng.* 24, Pp. 1047-1067.
- SADDLER J. N., BROWNELL H. H., CLERMENT L. P., LEVITIN N., 1982, *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Various Pretreated Wood Fractions*, *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1389-1402.