

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**Fermentējamo cukuru iegūšana no lignocelulozes
atkritumiem biodegvielas ražošanai**

Bakalaura darbs

Autors: Anastasija Tolmačeva
Stud. apl.Nr. at12037
Darba vadītājs: Dr.sc.ing. Linda Mežule
Recenzents: Dr.biol. Uldis Kalnenieks

RĪGA 2016

SATURS

Ievads.....	5
1.Literatūras apskats	6
1.1. Biodegviela	6
1.2. Izmantojami substrāti	7
1.3. Pirmapstrādes veidi	8
1.4. Skābes pirmapstrāde	9
1.5. Hidrolīze.....	10
1.6. Fermentācija.....	11
2. Materiāli un metodes	12
2.1. Iekārtas	12
2.2. Materiāli un trauki	12
2.3. Reaģenti	13
2.4. Metodes	14
2.4.1. Mehāniskā pirmapstrāde.....	14
2.4.2. Skābes pirmapstrāde.....	14
2.4.3. Enzimātiskā hidrolīze	14
2.4.4. Cukuru standartšķīdumu pagatavošana	15
2.4.5. 3,5-dinitrosalicila skābes (DNS) metode.....	15
3. Rezultāti un diskusija.....	17
3.1. Cukura standartšķīdumu mērīšanas rezultāti	17
3.2. Cukuru daudzums pēc enzimātiskās hidrolīzes mehāniski apstrādātam substrātam	18
3.3. Cukuru iznākums šķīdumā pēc skābes pirmapstrādes	19
3.4. Cukuru mērīšanas rezultāti pēc enzimātiskās hidrolīzes uz mehāniski un ar skābi pirmapstrādātu substrātu	20
3.5. Kopējā iegūtu cukuru daudzumu rezultāti	21
4. Secinājumi	25
5. Pateicība.....	26
6. Literatūras saraksts	27
Pielikumi.....	32

KOPSAVILKUMS

Mūsu planēta ir bagāta ar derīgiem izrakteņiem, kur viens no svarīgākajiem ir nafta. Cilvēce to izmanto nepārtraukti un pieprasījums aug ar katru dienu. Zemes resursi nav atjaunojami vai atjaunojas ļoti lēni, kā rezultātā jau šajā gadsimtā mēs riskējam palikt bez naftas krājumiem. Mūsdienās daudzi zinātnieki pēta alternatīvas degvielas iegūšanas veidus, ar kuru palīdzību varēs aizvietot naftas produktus. Viens no degvielas ieguves veidiem ir tā ražošana izmantojot sadzīves un lauksaimniecības atkritumus. Celulozi (polisaharīdi), kas ir biomasas sastāvā, var sadalīt līdz glikozei (monosaharīdiem). No iegūtajiem cukuriem var iegūt šķidro biodegvielu, tai skaitā arī biobutanolu, ko fermentācijas laikā ražo *Clostridium* ģints baktērijas.

Bakalaura darba mērķis ir izpētīt pirmapstrādes efektivitāti un tās nepieciešamību pirms biomasas enzimatiskās hidrolīzes. Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti uzdevumi: veikt enzimatisko hidrolīzi uz substrātu kas tika a) pirmapstrādāts tikai mehāniski, un b) kas tika pirmapstrādāts mehāniski un ar skābi. Rezultāti tiek novērtēti pēc izdalīto cukuru daudzuma.

Iegūtie rezultāti parāda, ka efektīvai fermentējamu cukuru iegūšanai no biomasas papildus hidrolīzei jāveic pirmapstrādi. No 1 g siena bija iespējams iegūt 0.46 g/g (115% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma) glikozes un 0.38 g/g (81% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma) no 1 g salmu substrāta. Fermentējot iegūtos cukurus, teorētiski no 1 g siena substrāta ir iespējams iegūt 0,102-0.121 g/g biobutanola un 0,084-0.099 g/g no 1 g salmu.

Atslēgvārdi: alternatīva degviela, šķidra biodegviela, biobutanols, skābes pirmapstrāde, enzimatiskā hidrolīze, cukuru mērīšanā šķīdumos.

SUMMARY

Our planet is rich in fossil fuels, and the most important of them is the oil. Humanity uses it continuously, the requested amount grows every day and Earth's environment is getting worse. Planet's resources are not renewable, and human activity leads to that already in this century, we risk being left without natural oil. Scientists are studying alternative fuels, which will be able to replace gasoline. The most interesting is the fuel which is produced using household and agricultural waste. Cellulose (polysaccharides) that can be found in the biomass, can be transformed into glucose (monosaccharide). Received sugar can be used to produce biofuel - biobutanol, that is created during fermentation by *Clostridium* bacteria species.

The aim of this work was to investigate the effectiveness and the need for substrate pre-treatment before enzymatic hydrolysis. To achieve the aim several tasks were set up: to carry out enzymatic hydrolysis of the substrate that was a) pre-treated only mechanically, and b) what was pre-treated mechanically and by acid. The results were evaluated according to amount of divisional sugars.

The results showed, that to achieve higher amounts of fermentable sugars, in addition to the hydrolysis, a previous pre-treatment is required. From 1 g of hay it was possible to obtain 0,46 g/g (115% of theoretical maximum) glucose and 0,38 g/g (81% of theoretical maximum) from straw substrate. In theory using this results it is possible to produce 0,102-0,121 g/g biobutanol by fermentating sugars, that were obtained from 1 g of hay, or 0,084-0,099 g/g from 1 g of straw.

Keywords: alternative fuel, liquid biofuels, biobutanol, acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, sugar measurement in solutions.

IEVADS

Fosilās degvielas pakāpeniska aizvietošana ir visai pamatota. Mūsdienās arvien lielāka uzmanība tiek pievērsta otrās paaudzes biodegvielai, kuras ražošanai tiek izmantoti pārtikā neizmantojami biomas substrāti. Vislielākās grūtības ražošanai izraisa lignīns, kas notur celulozes ķēdes kopā un nedod tiem sadalīties hidrolīzes laikā. Tieši šī iemesla dēļ pirms hidrolīzes ir nepieciešams veikt pirmapstrādi, kuras rezultātā celuloze tiek atdalīta no lignīna.

Bakalaura darba mērķis ir izstrādāt tehnoloģiju lauksaimniecības atkritumproduktu mehāniskai/skābes pirmapstrādei un enzimatiskai hidrolīzei, lai ražotu šķidro biodegvielu, tai skaitā, biobutanolu. Darbā tika izmantoti biomasas materiāli: salmi un siens.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- Skābes pirmapstrādes efektivitātes novērtēšana pēc izdalīto cukuru daudzuma;
- Enzimātiskas hidrolīzes efektivitātes novērtēšana uz pirmapstrādāta substrāta pēc izdalīto cukuru daudzuma.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Biodegviela

Biodegviela ir šķidra vai gāzveida viela, ko var iegūt no lauksaimniecības produktiem un atkritumiem. Atšķirībā klasiskās degvielas, ko iegūst no neatjaunojamiem dabas resursiem – naftas un kūdras, biodegviela ir atjaunojams enerģijas avots. Galvenie biodegvielas veidi ir:

Bioūdeņradis, kas ir daudzsološs alternatīvās enerģijas nesējs ar augstu siltumietilpību un tīru degšanas produktu (ūdens). To ir iespējams iegūt biofotolīzes, foto-fermentācijas un tumsas fermentācijas laikā, kur pēdējais guvis lielu popularitāti, jo tas ir rentabls un vides draudzīgs process (Cheng et al, 2016).

Biodīzeļdegvielu iegūst no augu eļļām, pārsterificējot to ar etanolu sārma katalizatora klātbūtnē (Lee et al. 2011). Šīs biodegvielas lielākie trūkumi: pie zemas temperatūrām (0°C līdz -5°C) var rasties uzglabāšanas problēmas, jo biodīzeļdegviela bioloģiski noārdās (Berrios et al. 2008), un tā var veidot sastrēgumus filtros.

Biogāze veidojas anaerobās fermentācijas procesā no biomasas un bioloģiski noārdāmām atkritumu frakcijām (Bora et al. 2015). Biogāzi ražojošu iekārtu uzstādīšana vispirms lietderīga tur, kur ir vislielākā atkritumu koncentrācija, piemēram, pie mājlopu fermām (Falde et. al. 2015).

Bioetanolu un biobutanolu iegūst raudzēšanas ceļā no lauksaimniecības izejvielām vai blakusproduktiem (Bio-NETT 2007). Bioetanolu galvenokārt iegūst, izmantojot raugu. Parasti bioetanolu kā degvielu izmanto maisījumos ar benzīnu dažādās proporcijās (Dürre 2007).

Biobutanolam, salīdzinot ar bioetanolu, ir daudzas priekšrocības, piemēram, augsta enerģijas blīvuma rādītāji, laba sajaukšanās spēja un nav nepieciešams aprīkojums pret koroziju (Yang et al. 2014). To plaši var izmanto rūpniecībā kā tauku šķīdinātāju (Carvalho et al. 2012) un kā izejvielu smaržīgu vielu ieguvei (McGinty et al 2010). Biobutanola izmantošana samazina naftas un dabasgāzes patēriņu, kā arī kaitīgo gāzu izplūdi gaisā (Dürre 2008). Biobutanols, pateicoties savām fizikālajām īpašībām, var tikt izmantots kā daļējs vai pilnīgs benzīna (vai arī benzīna un bioetanola sajaukuma) aizstājējs (Kalniņš u.c. 2009).

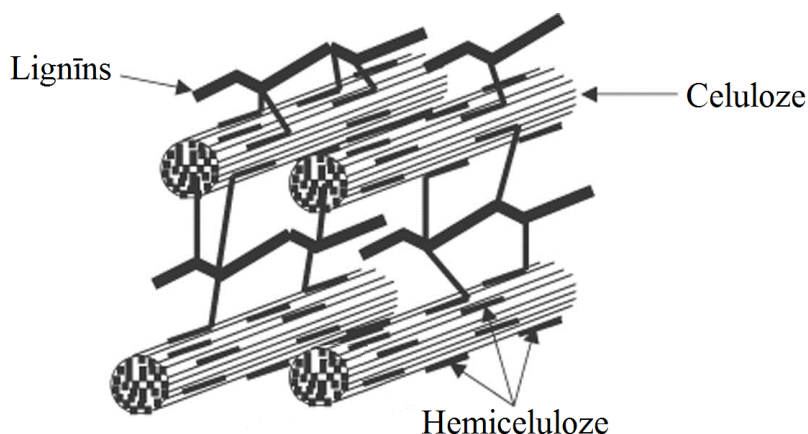
Kopējais ražošanas process šķidrās biodegvielas ieguvei no mežsaimniecības un lauksaimniecības izcelsmes biomasas un atkritumiem ietver sekojošus 4 etapus:

- Pirmapstrāde. Bioreaktorā vai nažu dzirnavās ievadāmās biomasas pirmatnējā apstrāde, kura laikā celuloze daļēji atbrīvojas no lignīna, jo tas tiek sagrauts (Kumar et al. 2009).

- Hidrolīze. Izmantojot enzīmus vai sērskābi, hidrolīzes laikā celuloze un hemiceluloze sadalās līdz vienkāršiem monosaharīdiem (Zheng et al. 2009);
- Fermentācija. Spirtu veidošanās mikroorganismu “augšanas” laikā. Piemēram: *Clostridium sp.* (Kiyoshi et al. 2015);
- Spirtu atdalīšana, izmantojot, piemēram, destilāciju. (Kalniņš u.c. 2009).

1.2. Izmantojami substrāti

Lignocelulozes biomasu galvenokārt veido trīs veidu polimēri: celuloze, hemiceluloze un lignīns (Krause et al. 2003) (1. att.). Celuloze ir lineārs polimērs, kas sastāv no daudzām glikozes vienībām, kas hidrolīzes laikā atdalās viens no otra (Hu et al. 2015). Mikroorganismi izmanto iegūtos monosaharīdus kā barības vielas un metabolisma rezultātā kā blakusproduktus veido spirtus, piemēram, biobutanolu (García et al. 2011).



1 attēls. Lignīna, hemicelulozes un celulozes telpiskais izvietojums substrātā (Adaptēts no Krause et al. 2003).

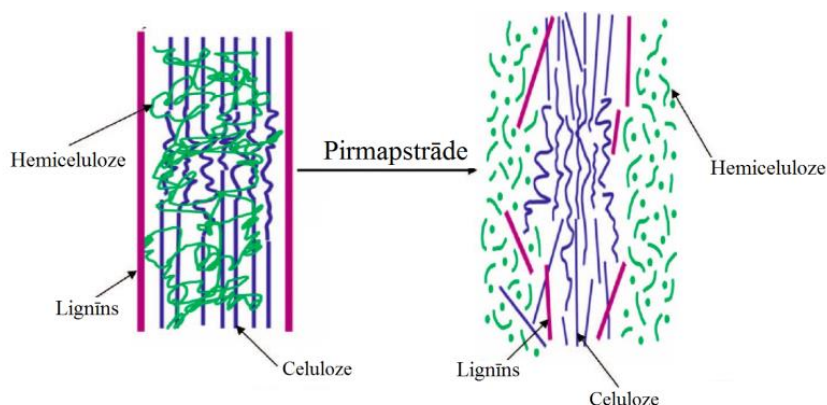
Figure 1. Spatial location of lignin, hemicellulose and cellulose in substrate (Adapted from Krause et al. 2003).

Biobutanola ražošanai var izmantot celulozi saturošus: lauksaimniecības atkritumus (graudu salmus (Bellido et al. 2014), rīsu salmus (Gottumukkala et al. 2013, Ranjan et al. 2013), kokosu čaulas (Mendu et al. 2012)), rūpniecības un ražošanas atkritumus (cietkoku atliekas (Mechmech et al. 2015, Tippkötter et al. 2014), kā arī ikdienas atkritumus (makulatūru (Brummer et al. 2014), ēdienu atkritumus (Stoeberla et al. 2011)). Daudzi metodi parādīja, ka ir iespējams iegūt līdz 90% glikozes no teoretiskas celulozes masas. Salmi teorētiski satur apmēram 0,47 g (Yin et al. 2016) siens 0,40 g (Kumar et al. 2009) celulozes.

Monosaharīdu iznākums ir atkarīgs no izvēlētā procesa veida, kā arī no celulozes, hemicelulozes un lignīna daudzuma substrātā.

1.3. Pirmapstrādes veidi

Pirms hidrolīzes bieži tiek veikta pirmapstrāde (Nieves et al. 2015), jo lignīns kavē celulozes dalīšanu (2. attēls). Tā var būt mehāniska (frēzēšana, malšana u.c.) (Motte et al. 2015), fizikāla (tvaika un spiediena apstrāde) (Bura et al. 2009), ķīmiskā (sārmaina vai skābes pirmapstrāde vai skābe) (Qin et al. 2012). Izmantojot dažādas pirmapstrādes kopā, var sasniegt labākus rezultātus. Piemēram: veicot sārmas pirmapstrādi papildus gammas apstarošanai nodrošina par līdz ~20% augstāku iznākumu (Yin et al. 2016).



2 attēls. Pirmapstrādes laikā hemiceluloze un celuloze tiek atbrīvotas no lignīna. (Adaptēts no Kondo T. 1997)

Figure 2. Biomass pretreatment. Separation of cellulose and hemicellulose from lignin. (Adapted from Kondo T. 1997)

Mehāniskās pirmapstrādes laikā lignīns tiek sadalīts un rezultāta celulozes un hemicelulozes tiek atbrīvotas (Verardi et al. 2012). Šiem nolūkiem var izmantot malšanu, frēzēšanu, drupināšanu un slīpēšanu (Niemi et al. 2012). Malšanai bieži tiek izmantotas mehāniskās dzirnavas ar asmeņiem. Substrāta samalšana deformē šūnāpvalku (Sasaki et al. 2015).

Tvaika pirmapstrādes metodes laikā biomasa tiek strauji uzsildīta pie palielināta spiediena (Kumar D., et al. 2011). Spiediena strauja samazināšana (normalizēšana) izjauc šūnu sienīņu struktūru, jo tvaiks, ātri paplašinoties, sadala lignocelulozi uz celulozi, hemicelulozi un lignīnu (Mabee et al. 2006). Šī metode atbrīvo substrātu no lignīna, hidrolizē tajā esošo hemicelulozi un palielina pieejamas virsmas platību celulozes hidrolīzei. Tvaika pirmapstrāde var būt bīstams process, jo tiek izmantots augsts spiediens. Procesā laikā hemicelulozes bieži tiek hidrolizētas ar organiskām skābēm, piemēram, etiķskābi, kura

veidojas no biomasas. Šīs vielas ne tikai iedarbojas uz mikroorganismiem kā inhibitori (Jorgensen et al. 2007), bet arī noārda cukurus (Allen et al. 2001). Skābos apstākļos notiek cukuru noārdīšana, tāpēc ir svarīgi atdalīt biomasu no kondensāta vai saglabāt pH starp 5 un 7 (Weil et al. 1998).

Nātrijs, kālijs, kalcijs un amonija hidroksīdi ir visbiežāk izmantotie reaģenti sārmu pirmapstrādei (Singh et al. 2015). Sārmi labi atbrīvo celulozi un hemicelulozi no lignīna, rezultātā, hidrolīzes laikā tiek iegūta augsta cukuru koncentrācija (McIntosh et al. 2010). Tāpat kā tvaika sprādziena laikā, atšķaidīts nātrijs hidroksīds palielina virsmas laukumu sekojošai celulozes hidrolīzei, samazina polimerizācijas pakāpi (sadala polisaharīdu uz mazākām ķēdēm, kurus tālāk būs vieglāk sadalīt līdz glikozei), sadala saites starp lignīnu un ogļhidrātiem, kā arī sagrauj lignīna struktūru (Taherzadeh et al. 2008). Sārmainas pirmapstrādes būtisks trūkums ir sāļu veidošana, kurus nav iespējams izmantot atkārtoti (Hedriks et al. 2009).

1.4. Skābes pirmapstrāde

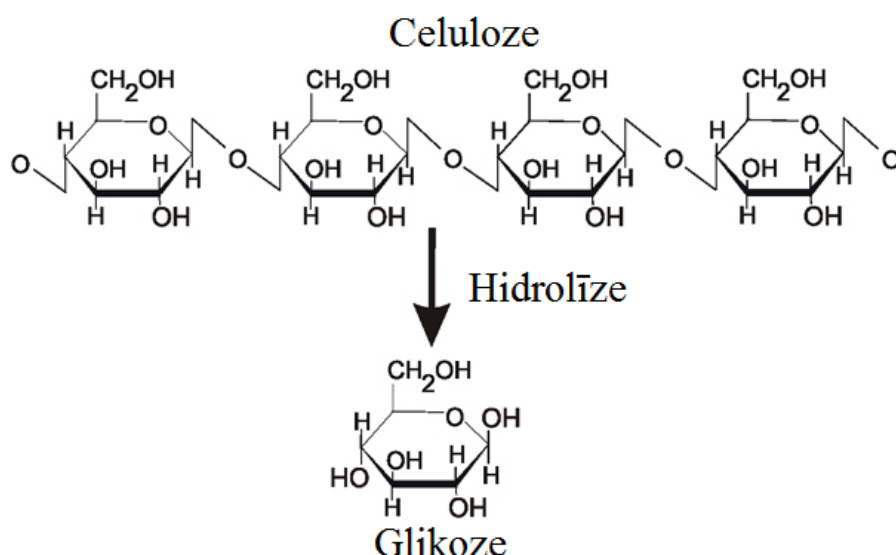
Viena no populārākajām pirmapstrādes metodēm ir skābes izmantošana, lai iegūtu maksimāli augstu cukura iznākumu no lignocelulozes saturošas biomasas (Camesasca et al. 2015; Geng et al. 2015; Jiang et al. 2015). Skābes pirmapstrādei var izmantot dažādas skābes, piemēram, slāpekļskābi, sālsskābi, fosforskābi, per-etikskābi, skābeņskābi u.c. (Singh et al. 2015). Gan atšķaidīta (Martín et al. 2015), gan koncentrēta skābe (Wijaya et al. 2014) tiek izmantota biomasas apstrādei, tomēr koncentrētas skābes izmantošana ir toksiskāka, bīstamāka un nepieciešami korozijas izturīgāki reaktori (Talebnia et al. 2010). Strādājot ar koncentrētu skābi, process ir arī ekonomiski neizdevīgāks (Sun et al. 2002), kur iegūto masu pēc hidrolīzes ir grūtāk apstrādāt, jo rodas problēmas ar pH neitralizēšanu.

Atšķaidītas skābes pirmapstrādei var izmantot dažādu biomasu, piemēram, skujkokus, zālaugu, lauksaimniecības, kā arī papīru un sadzīves atkritumus (Chung et al. 2005). Visplašāk tiek izmantota sērskābe (Ji et al. 2015; Hernández et al. 2013; Sun et al. 2011). Pirms tiek veikta skābes pirmapstrāde, tiek pagatavots zemas koncentrācijas (<10%) skābes atšķaidījums. Pēc skābes biomasas apstrādes nepieciešams neitralizēt iegūto hidrolizātu pirms fermentācijas sākšanas, citādi šķīdums būs skābs un nepiemērots fermentējošiem mikroorganismiem (Brummer et al. 2014). Kā atšķaidītas sērskābes metodes izmantošanas priekšrocību var minēt, ka tai ir zemākas izmaksas (salīdzinot ar koncentrētas sērskābes izmantošanu), tā ir ļoti plaši pieejama, un salīdzinot ar tvaika un spiediena apstrādi, tās izmantošana neprasa īpaši paaugstinātu drošības līmeni.

Izmantojot mehānisko pirmapstrādi pirms skābes apstrādes, var sasniegt vēl labākus rezultātus, nekā izmantojot vienu pirmapstrādes veidu (Zoulikha et al. 2015). Mehāniskā malšanas pirmapstrāde sadala lignīna struktūras, savukārt ķīmiskā skābes apstrāde noārda hemicelulozi un palielina reakcijas virsmas platību, padarot substrātu enzīmiem un citam vielām pieejamāku. (Wang et al. 2011).

1.5. Hidrolīze

Ir labi zināms, ka celuloze ir lineārs polimērs, kas sastāv no daudzām glikozes vienībām (Liang et al. 2011, Morales-delaRosa et al. 2014). Starp tām pastāv ūdeņraža saites, kas rada sarežģītu struktūru, kuras rezultātā, celuloze ir augsti izturīga pret mehānisko iedarbību (Yuan et al. 2015), kā arī nešķīst ūdenī un daudzos organiskos šķīdumos (Himmel et al. 2007). Hidrolīzes laikā, ūdeņraža saites sabrūk, un polisaharīds (celuloze) sadalās līdz monosaharīdiem (glikozei) (Hu et al. 2015) (3. attēls). To var veikt ķīmiski (Palme et al. 2016), fizikāli (Bura et al. 2009), un/vai enzimatiski (El-Nasser et al. 1994, Jiang et al. 2015, Zhang et al. 2016). Īpašu interesi izraisa enzimatiskā hidrolīze, jo tā piedāvā dažas priekšrocības, piemēram, viegli sasniedzami nosacījumi (pH 4.5 – 5 un temperatūra 45 – 50 °C) (Saha et al. 2016, Sun et al. 2002), un pretēji skābes hidrolīzei, neizraisa aprīkojuma koroziju un neveido inhibitorus (Dee et al. 2011). Veicot hidrolīzi pēc malšanas, ir iespējams iegūt ~16 g/g glikozes no sākotnējās masas (Mezule et al. 2016).



3. attēls. Celulozes (polisaharīdu) hidrolīzes rezultātā rodas glikoze (monosaharīdi). (Adaptēts no P. Held. 2012.)

Figure 3. Hydrolysis of cellulose polymers, resulting in the sugar molecule glucose. (Adapted from P. Held. 2012.)

1.6. Fermentācija

Biobutanols ir šķidrā biodegviela, ko veido *Clostridium* ģints baktērijas acetona-butanola-etanola (ABE) fermentācijas laikā (Kiyoshi et al. 2015) proporcijā attiecīgi 3:6:1. Teorētiski no 1 g glikozes ir iespējams saražot 0.22-0.26 g biobutanola (Du et al. 2016; Al-Shorgani et al. 2015). Ģenētiski modificējot *Clostridia* ģints baktērijas un citus organismus, piemēram, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida* un *Bacillus subtilis*, var palielināt biobutanola daudzumu (Kumar M., et al. 2011). Īpašu interesi izraisa *Clostridium* ģints baktērijas, kas spēj fermentācijas laikā izmantot gan heksozes, gan pentozes cukurus (Ni et al. 2009). Mūsdienās arvien vairāk notiek pētījumi, lai noskaidrotu, kā efektīvāk ražot biobutanolu no lauksaimniecības biomasas (Chenga et al. 2012, Gottumukkala et al. 2013, Tippkötter et al. 2014). Lai ABE process būtu efektīvs *Clostridium* fermentācijas procesam jānotiek sterilos apstākļos un biobutanolu jāizdala no reaktora tā rašanās laikā, jo tas ir toksisks bioloģiskām sistēmām pat pie zemas koncentrācijām (<2.0% vol/vol) (Kanno et al. 2013). Kā arī fermentācijas procesā veidojas daudz notekūdeņu, kurus ir nepieciešams apstrādāt un pārstrādāt (Jones et al. 1986). Ražošanas izmaksas galvenokārt nosaka substrāta izmaksas (Lynd et al. 1999).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Iekārtas

1. Svari AEJ 220-4M (Kern, Lielbritānija)
2. Ūdens attīrīšanas iekārta Crystal E Bio (ADRONA, Latvija)
3. Vorteks V-1 plus 230VAC 50/60 Hz Euro plug (Biosan, Latvija)
4. Centrifūga Eppendorf (Sigma-Aldrich, Germany)
5. Mehāniskās dzirnavas ar asmeni GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Vācija)
6. Sildīšanas krāsns FD series 115 L (Binder, Vācija)
7. Velkmes skapis Standard ClassII (Kojair, Somija)
8. Automātiskā pipete 1-10 ml (Finnpipette™, Thermo Scientific, Lietuva)
9. Automātiskā pipete 100-1000 µl (Finnpipette™, Thermo Scientific, Lietuva)
10. Spektrofotometrs M501 (Camspec, Lielbritānija)
11. Ph mērītājs Multi 3400i (WTW, Vācija)
12. Autoklāvs HS-9041 (Hanshin, Dienvidkoreja)
13. Inkubators ar kratītāju (Biosan, Latvija)
14. Krāsns Dentamatic 6000 (Tokmet, Bulgarija)

2.2. Materiāli un trauki

1. Stikla pudele 100 ml - 1000 ml (Simax® Glassware, Čehija)
2. Vārglāze 1000 ml (Technische Glaswerke Ilmenau, Vācija)
3. Mērcilindrs 100 ml (Technische Glaswerke Ilmenau, Vācija)
4. Stikla mēģene 12 ml (Aptaca, Itālija)
5. Sterili polipropilēna konteineri 50 ml (Aptaca, Itālija)
6. Pipešu uzgali 100-1000 µl, 1-10 ml (Finnpipette™, Thermo Scientific, Lietuva)
7. Mēģene 12 mm x 75 mm (Simax® Glassware, Čehija)
8. Ūstīve 3 ml (Bibby Scientific Limited, Lielbritānija)
9. Ūstīve 2 ml (Bibby Scientific Limited, Lielbritānija)
10. Siets no nerūsējošā tērauda (ICA AB, Zviedrija)
11. Mikromēģenes 1 ml (Sarstedt, Vācija)

2.3. Reāģenti

1. Nātrija hlorīds NaCl (Panreac AppliChem, Vācija)
2. D-(+)-Glikoze C₆H₁₂O₅ (Sigma-Aldrich, Germany)
3. 3,5-dinitrosalicila skābe (O₂N)₂C₆H₂-2-(OH)CO₂H (Sigma-Aldrich, Germany)
4. Rošela sāls KOCOCH(OH)CH(OH)COONa · 4H₂O (Sigma-Aldrich, Germany)
5. Fenols C₆H₅OH (Sigma-Aldrich, Germany)
6. Nātrija metabisulfīts Na₂S₂O₅ (Sigma-Aldrich, Germany)
7. Citronskābes monohidrāts HOC(COOH)(CH₂COOH)₂ · H₂O (Sigma-Aldrich, Germany)
8. Sērskābe H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Germany)
9. Nātrija hidroksīds 10 M NaOH (Sigma-Aldrich, Germany)
10. Enzīms 0.2 FPUml⁻¹, Mezule et al. 2015
11. Siens (savākts 2014. gada vasarā, Latvijā)
12. Salmi (savākts 2014. gada vasarā, Latvijā)

2.4. Metodes

2.4.1. Mehāniskā pirmapstrāde

Izmantotais siens un salmi (kas bija savākti 2014. gada vasarā) tiek samalti, izmantojot mehāniskās dzirnavas ar asmeni. Siens tiek malts 20 sek 4000 apgr/min, bet salmi – 66 sek 8500 apgr/min.

2.4.2. Skābes pirmapstrāde

Pēc mehāniskas pirmapstrādes tiek iesvērti 3 g izmantotā substrāta un pievienots attiecīgi nepieciešamais destilētais ūdens un sērskābes daudzums (2.tabula)

Destilēta ūdens un sērskābes nepieciešamu vielu daudzumus atšķaidītas skābes pagatavošanai.

1.tabula

Quantities of sulphuric acid and distilled water for making dilute acid

Table 1

Skābes koncentrācija	H ₂ O	H ₂ SO ₄
10%	89.70	10.30
3%	96.90	3.10
0,5%	99.48	0.52

Pēc skābes un ūdens pievienošanas, substrāts tiek likts krāsni uz attiecīgo laiku. Pēc termiskas apstrādes, substrātu atdzesē līdz ~20°C. Tālāk, izmantojot nātrija hidroksīdu, tiek veikta pH regulēšana līdz pH 5. Kad nepieciešamais pH tiek sasniegts, hidrolizāts (šķidrā daļa), izmantojot filtrēšanas metodi, tiek atdalīts no substrāta.

2.4.3. Enzimātiskā hidrolīze

Pēc filtrēšanas, uz sietiņa palikušī masa tiek noskalota ar destilētu ūdeni, kamēr pēc skalošanas ūdens sasniedz pH 7. Tālāk substrāts tiek likts žāvēties 24 h 60 °C. Pēc žāvēšanas nosvērtiem 0,3 g substrāta pievieno 0,05 M 10 ml citrāta buferšķīdsuma (2. pielikums), 0,1 ml enzīma un atstāj inkubatorā uz kratītāja 24 h 30°C temperatūrā. Pēc inkubēšanas, tiek paņemti paraugi.

2.4.4. Cukuru standartšķīdumu pagatavošana

Tiek pagatavoti 6 dažādas koncentrācijas cukura standartšķīdumi ar zināmu cukura koncentrāciju paraugā. Tie tiek mērīti ar DNS metodi (sk. 2.4.5). Koncentrētu standartšķīdumu pagatavo pievienojot iesvērtiem 100 mg glikozes 10 ml destilēta ūdens. Tālāk tiek pagatavoti šķīduma atšķaidījumi.

2. tabula

Destilēta ūdens un koncentrēta standartšķīduma daudzums standartšķīdumu pagatavošanai.

Table 2

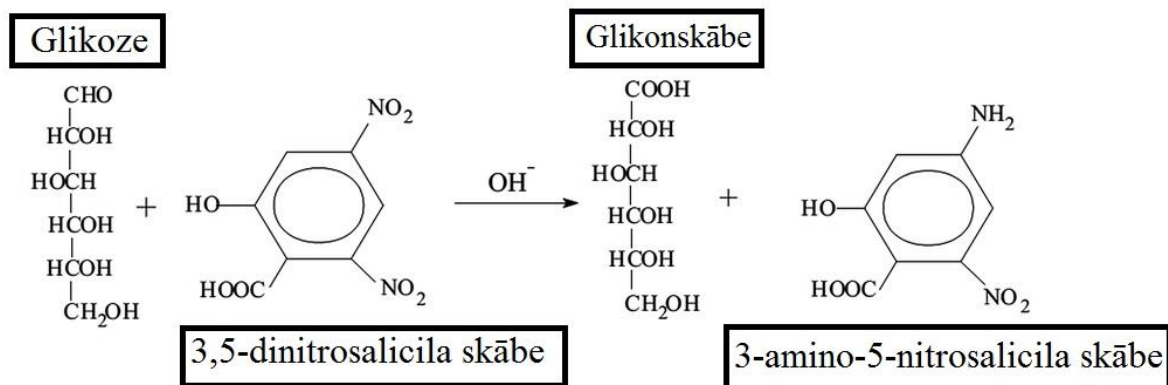
Quantities of distilled water and concentrated standard solution for making standard solution.

Cukura kon. g/l	Konc. Standartšķīdums, μ l	H ₂ O, μ l
1	100	900
2	200	800
3	300	700
4	400	600
5	500	500
6	600	400
7	700	300

Izmantojot cukuru standartšķīdumu absorbcijas datus, "MS Excel" programmā tiek izveidots grafiks, kur uz x asis ir iegūtie absorbcijas dati pie 540 nm, un uz y ir glikozes koncentrācijas daudzums. Izmantojot iegūtās līknes formulu, ir iespējams noteikt hidrolizātos esošo cukuru koncentrāciju.

2.4.5. 3,5-dinitrosalicila skābes (DNS) metode

Nogulšņu atdalīšanai 1 ml hidrolizāta pārnes mikromēģenē un centrifugē 2 min 10000 apgr/min. Mēģenē iepilda 100 μ l 0,05 M citrāta buferšķīduma, 600 μ l DNS reaģenta (2. pielikumā), 100 μ l hidrolizāta (vai cukura standartšķīduma) un vāra 5 min. Pēc vārīšanas tos ātri atdzesē. Tas nepieciešams, lai apturētu monosaharīdu (glikozes) reakciju ar DNS (4. att.)



4. attēls. Glikozes un 3,5-dinitrosalicila skābes reakcija, kura rezultātā veidojas glikonskābe un 3-amino-5-nitrosalicil skābe (Adaptēts no Xia et al. 2015).

Figure 4. Glucose and 3,5-dinitrosalicylic acid reaction, which results in formation of gluconic and 3-Amino-5-nitrosalicylic acid (Adapted from Xia et al. 2015).

Kad mēģenes ir atdzesētas, tām pievieno 4 ml destilēta ūdens. Iegūtos šķīdumus mēra, izmantojot spektrofotometru pie 540nm. Spektrofotometra kalibrēšanai hidrolizāta vietā pievieno destilētu ūdeni.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Cukura standartšķīdumu mērīšanas rezultāti

Visi monosaharīdi un maltozes ir reducējošie cukuri, bet saharoze un ciete ir nereducējošie ogļhidrāti. Sārma klātbūtnē un paaugstinātas temperatūras apstākļos monosaharīdi reaģē ar DNS, un veido 3-amino-5-nitrosalicilā skābi, kurai maksimālā absorbcija ir pie 540 nm. Reakcijas laikā reducējošie cukuri pārvēršas par glikonātu un tā daudzums ir proporcionāls krāsas intensitātei. Izmantojot spektrofotometru, var izveidot cukuru standartlīkni, ar kuras palīdzību iespējams noskaidrot reducējošo cukuru daudzumu citos (analizējamos) šķīdumos (Saqib et al. 2011). Cukuru noteikšanai var izmantot arī citas metodes, piemēram HPLC (augstas veiktspējas šķīdumu hromatogrāfija) vai gāzes hromatogrāfiju (Givry et al. 2007), tomēr DNS metode ir salīdzinoši lēta un vienkārša.

Pirms paraugu cukuru iznākuma noteikšanas, tika veikti absorbcijas mērījumi dažādiem pagatavotiem cukuru standartiem (4. tab.). Visi mērījumi tika veikti 3 atkārtojumos.

3.tabula.

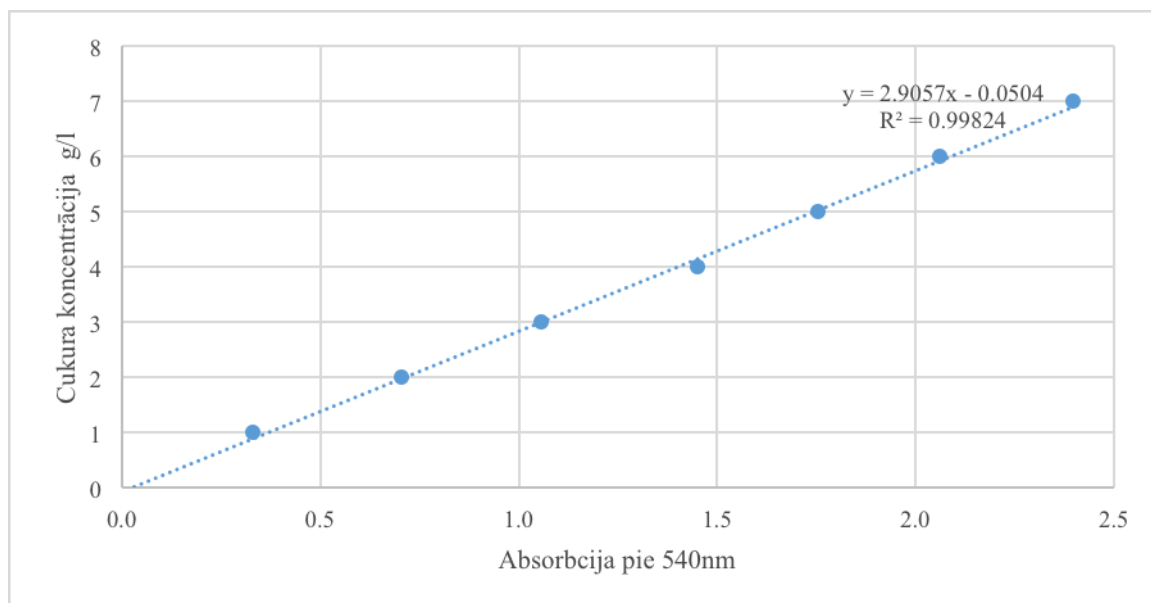
Cukura standart šķīdumu absorbcija pie 540nm.

Table 3.

Absorption of sugar solutions at 540nm.

Std. koncentrācija g/l	Absorbcija	STDEV
1	0.329	0.022
2	0.705	0.017
3	1.058	0.027
4	1.451	0.052
5	1.754	0.027
6	2.062	0.075
7	2.392	0.114

Izmantojot datus no 4. tabulas, tika uztaisīta cukuru standartlīkne (5. att.), kur uz x ir iegūti absorbcijas dati pie 540 nm, un uz y ir teorētiskais glikozes koncentrācijas daudzums. Visi turpmākie aprēķini tika veikti izmantojot izveidoto standartlīkni. Ieliekot formulā ($y = 2.9057x - 0.0504$) x vietā absorbcijas mērījumu vērtību, iespējams noteikt cukuru koncentrāciju hidrolizātā.



5. attēls. Cukura standartšķīdumu absorbcijas grafiks pie 540 nm

Figure 5. Absorption of sugar solutions at 540 nm in a chart

3.2. Cukuru daudzums pēc enzimatiskās hidrolīzes mehāniski apstrādātam substrātam

Teorētiskais glikozes iegūšanas maksimums salmiem no sākotnējās masas ir 0,47 g/g, sienam šis skaitlis ir 0,40 g/g. Bez skābes pirmapstrādes hidrolītiskie enzīmi slikti iedarbojās uz siena substrātu (0,195 g/g glikozes), un īpaši slikti uz salmiem (tikai 0.095 g/g glikozes). Neskatoties uz to, ka salmos teorētiski ir vairāk celulozes, no siena bija iespējams iegūt vairāk glikozes. Šie rezultāti ir tālu no literatūrā minētiem, tāpēc substrātiem ir nepieciešama papildus pirmapstrāde.

4.tabula.

Iegūtā glikozes koncentrācija no 1 g substrāta veicot enzimatisko hidrolīzi bez skābes pirmapstrādes.

Table 4.

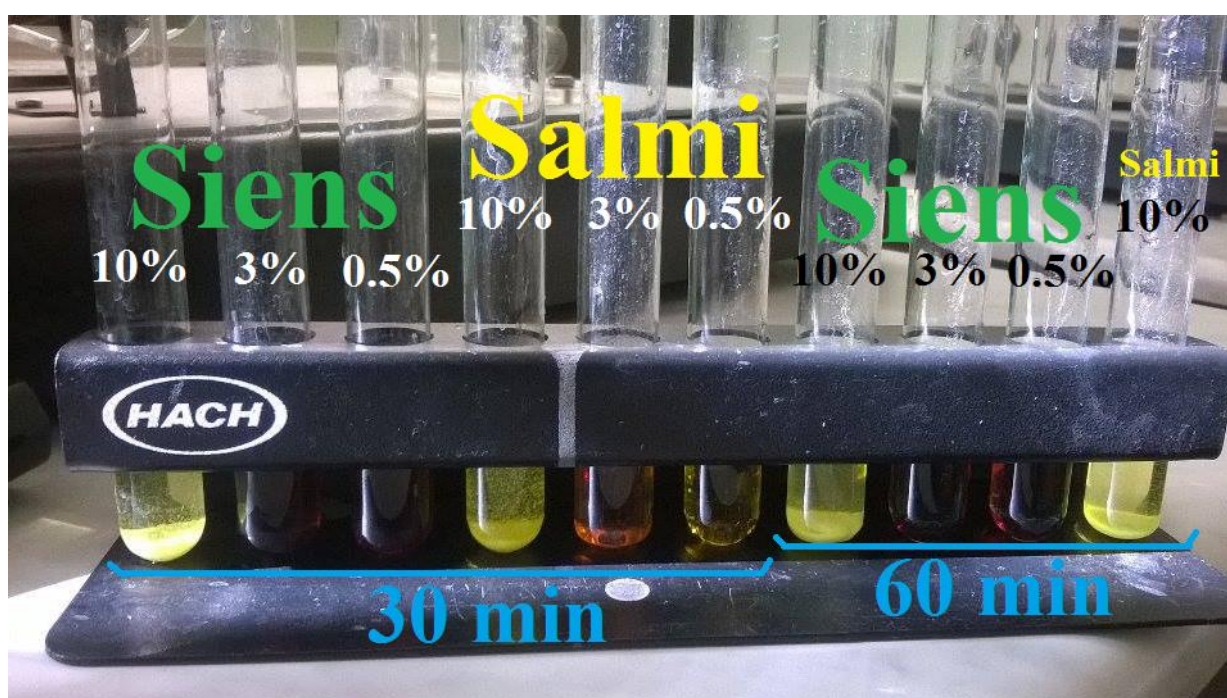
The concentration of obtained glucose from 1 g of substrate after enzymatic hydrolysis without acid pre-treatment.

Substrāts	Hidrolīze	Glik.g/g sub	STDEV	%
Sienis	Pirms	0.0678	0.064	6.78
	Pēc	0.1951	0.146	19.51
Salmi	Pirms	0	0	0
	Pēc	0.0954	0.125	9.54

3.3. Cukuru iznākums šķīdumā pēc skābes pirmapstrādes

Lai iegūtu pēc iespējas augstāku cukura iznākumu (lielāku koncentrāciju), svarīgi novērtēt ķīmiskas pirmapstrādes efektivitāti izmantojot dažādas sērskābes koncentrācijas (10, 3 un 0,5 %), apstrādes laikus (30, 60 min) un biomasas veidus (salmi un siens) (Bouza et al. 2016, Jeong et al. 2016, Li K. et al 2016, Li P. et al. 2016, Verma et al. 2016, Zhang et al. 2011).

Šķīdums ar 10% sērskābi netika noregulēts līdz pH 5, jo bija nepieciešams izmantot ļoti daudz NaOH. Pievienojot citrāta buferšķīdumu, ir redzams, ka daļa no sērskābes reaģēja ar to un kopā tie veidoja nogulsnes (sāls) (5. att., 1,4,7,10 mēģenes).



6. attēls. Nogulšņu (sāls) veidošanās cukuru mērīšanas laikā.

Figure 6. Precipitate (salt) formation during sample preparation for sugar measurements preparation.

Pēc rezultātiem (6. tabula) ir redzams, ka palielinot skābes koncentrāciju, reakcijas laiku un temperatūru, palielinās arī iegūto cukuru koncentrācija skābes pirmapstrādes laikā. Vislielākā koncentrācija no abiem substrātiem tika iegūta pie 170°C, 60 minūšu apstrādes, izmantojot 3% sērskābi. Pie šiem apstākļiem skābe sadalīja 0.315 g/g siena (79% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma) un 0.274 g/g salma (58% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma) līdz glikozei.

Pēc iegūtiem datiem var secināt, ka pie augstas temperatūras (170°C) un skābes koncentrācijas (3%) reakcijas laiks būtiski neietekmē ($p > 0,05$) iegūstamā cukura koncentrāciju.

No salmiem iespējams izdalīt ļoti maz cukura (salīdzinot ar datiem pie citiem apstākļiem), kad tie tiek apstrādāti pie zemas temperatūras un koncentrācijas (0,5%). Pie 121°C un 0,5% skābes, 30 minūšu laikā bija iespējams iegūt 0.008g/g (2% no literatūrā minētā teorētiskā maksimuma) substrāta, kas ir ļoti zems rādītājs.

5.tabula.

Iegūtā glikozes koncentrācija no 1 g substrāta pēc skābes pirmapstrādes

Table 5.

The concentration of obtained glucose from 1 g substrate after acid pre-treatment.

Skābes. pirms. t	Skābes kon.	121 °C			140 °C			170 °C		
		Glik. g/g subst.	STDEV	%	Glik. g/g subst.	STDEV	%	Glik. g/g subst.	STDEV	%
Siens										
30 min	3%	0.156	0.004	15.64	0.214	0.012	21.41	0.292	0.016	29.22
	0,5%	0.127	0.014	12.71	0.139	0.012	13.94	0.195	0.001	19.51
60 min	3%	0.212	0.018	21.17	0.273	0.008	27.27	0.315	0.02	31.55
	0,5%	0.147	0.022	14.7	0.185	0.017	18.55	0.244	0.025	24.44
Salmi										
30 min	3%	0.043	0.012	4.3	0.117	0.015	11.69	0.245	0.018	24.48
	0,5%	0.008	0.003	0.85	0.046	0.004	4.57	0.081	0.007	8.15
60 min	3%	0.111	0.025	11.13	0.199	0.013	19.87	0.274	0.02	27.35
	0,5%	0.035	0.011	3.51	0.053	0.006	5.28	0.128	0.011	12.77

3.4. Cukuru mērīšanas rezultāti pēc enzimatiskās hidrolīzes uz mehāniski un ar skābi pirmapstrādātu substrātu

Skābes pirmapstrāde pozitīvi ietekmēja salmu enzimatisko hidrolīzi. Veicot enzimatisko hidrolīzi bez pirmapstrādes, no 1 g salmu substrāta veidojās ~0.095 g/g cukura, bet, piemēram, izmantojot to (apstākļi: 140°C 30 min, 3% w/v H₂SO₄), no 1 g veidojas ~0.135 g/g (1.52 reizēm vairāk). (7. tab.).

Izņemot gadījumu, kad hidrolīze tika veikta pēc pirmapstrādes pie 121°C un 0,5% skābes koncentrācijas (~0,12 g/g celulozēs no 1 g substrāta), sienam rezultāti būtiski

nemainījās ($p > 0,05$) atkarībā no izmantotiem pirmapstrādes apstākļiem (~0,15 g/g celulozes no 1 g substrāta). Šis skaitlis ir mazāks salīdzinot ar kontroles paraugu (~0,19 g/g celulozes no 1 g substrāta), kad hidrolīze tika veikta bez skābes pirmapstrādes. Visticamāk pirmapstrādes laikā substrāts tiek atbrīvots no brīvās glikozes (kas izdalās hidrolīzes laikā kad substrāts netiek pirmapstrādāts), un tā nerasniedz hidrolīzes etapu.

Pēc skābes pirmapstrādes substrātiem samazinājās blīvums un palielinājās reakcijas laukums. Šo iemeslu dēļ cukuri kļuva pieejamāki enzīmiem. Līdzīgi darbojas arī tvaika sprādziena pirmapstrāde (Verardi et al. 2010).

6.tabula.

Iegūtā glikozes koncentrācija no 1 g substrāta veicot enzimatisko hidrolīzi pēc skābes pirmapstrādes.

Table 6.

The concentration of obtained glucose from 1 g of substrate after enzymatic hydrolysis and acid pre-treatment.

Skābes. pirms. t	Skābes kon.	121 °C			140 °C			170 °C		
		Glik g/g subst.	STDEV	%	Glik. g/g subst.	STDEV	%	Glik. g/g subst.	STDEV	%
Siens										
30 min	3%	0.144	0.002	14.45	0.156	0.005	15.61	0.152	0.013	15.16
	0,5%	0.126	0.004	12.64	0.164	0.003	16.4	0.159	0.012	15.94
60 min	3%	0.155	0.007	15.55	0.153	0.008	15.29	0.148	0.012	14.84
	0,5%	0.121	0.01	12.13	0.157	0.003	15.71	0.153	0.005	15.34
Salmi										
30 min	3%	0.114	0.014	11.44	0.135	0.008	13.53	0.121	0.003	12.13
	0,5%	0.08	0.007	8.04	0.11	0.012	10.98	0.117	0.002	11.69
60 min	3%	0.122	0.005	12.15	0.118	0.003	11.79	0.108	0.001	10.79
	0,5%	0.097	0.01	9.67	0.125	0.003	12.48	0.124	0.005	12.35

3.5. Kopējā iegūto cukuru daudzumu rezultāti

Izmantojot enzimatisko hidrolīzi kopā ar skābes pirmapstrādi (pie 170 °C, 60 minūšu apstrādes, izmantojot 3% sērskābi) no 1 g siena tika iegūti 0.46 g/g glikozes (115% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma), un 0.38 g/g (81% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma) no 1g salmu. Siena rezultāti uzrāda, ka 1) iespējams sienam ir lielāka celulozes

koncentrācija, nekā 0.4 g/g), 2) siena substrātā pastāv daudz brīvas glikozes, 3) pirmapstrādes laikā sadalījās arī citas vielas. Rezultātus ar citiem pirmapstrādes apstākļiem var apskatīt 8. tabulā.

7.tabula.

Kopējā iegūto cukuru koncentrācija izmantojot skābes pirmapstrādi un enzimatisko hidrolīzi.

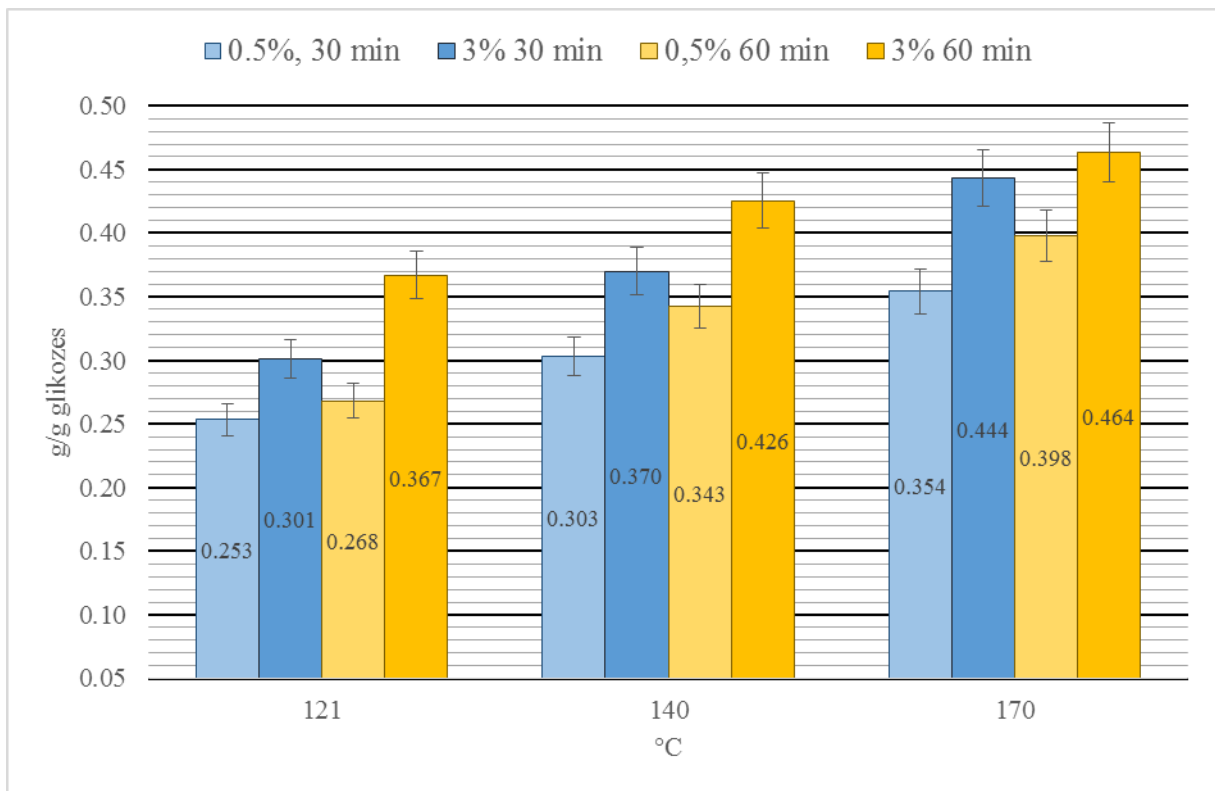
Table 7.

The overall concentration of obtained glucose from 1 g of substrate after enzymatic hydrolysis and acid pre-treatment.

Skābes. pirms. t	Skābes kon.	121 °C			140 °C			170 °C		
		Glik g/g subst.	STDEV	%	Glik. g/g subst.	STDEV	%	Glik. g/g subst.	STDEV	%
Siens										
30 min	3%	0.301	0.003	30.09	0.37	0.017	37.02	0.444	0.012	44.38
	0,5%	0.253	0.017	25.35	0.303	0.013	30.33	0.354	0.013	35.45
60 min	3%	0.367	0.026	36.72	0.426	0.014	42.56	0.464	0.012	46.39
	0,5%	0.268	0.031	26.83	0.343	0.018	34.26	0.398	0.019	39.78
Salmi										
30 min	3%	0.157	0.015	15.75	0.252	0.008	25.22	0.366	0.018	36.61
	0,5%	0.089	0.008	8.89	0.155	0.015	15.55	0.198	0.008	19.84
60 min	3%	0.233	0.029	23.28	0.317	0.012	31.66	0.381	0.02	38.14
	0,5%	0.132	0.02	13.18	0.178	0.007	17.76	0.251	0.007	25.12

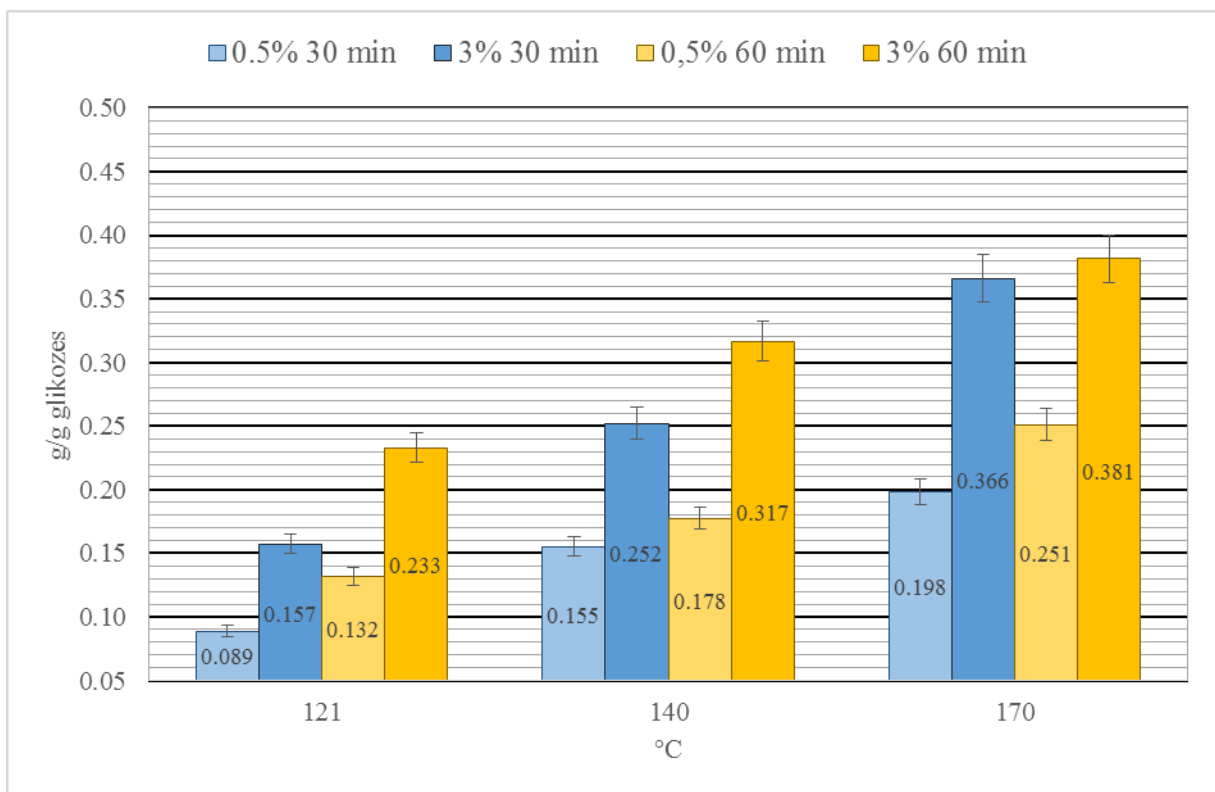
Pēc diagrammas ir redzams (6.att.), ka pie zemas temperatūras (121°C) un skābes koncentrācijas (0,5%) siena substrātam pirmapstrādes laiks nav būtisks ($p > 0,05$). Pie tās pašas temperatūras un paaugstinātas skābes koncentrācijas (3%), pirmapstrādes reakcijas laiks būtiski ietekmē iegūto rezultātu ($p < 0,05$). Pēc šī var secināt, ka pie zemas temperatūras visnozīmīgākais faktors ir skābes koncentrācija.

Atšķirībā no siena salmu rezultāti uzrāda (7. att.), ka pie zemas temperatūras (121°C) un skābes koncentrācijas (0,5%) skaitļi būtiski atšķiras. Visticamāk, salmu blīvumā dēļ zems skābes daudzums nespēj atbrīvot celulozi no lignīna. Pie zemas temperatūras rezultātiem ar 3% skābes koncentrāciju ir lielāka starpība, nekā ar 0,5%. Var pieņemt, ka tā pat kā siena gadījumā, pie zemas temperatūras visnozīmīgākais faktors ir skābes koncentrācija.



7. attēls. Iegūto cukuru koncentrācija no 1 g siena substrāta, izmantojot skābes pirmapstrādi un enzimatisko hidrolīzi.

Figure 7. The overall concentration of obtained glucose from 1 g of hay substrate after acid pre-treatment and enzymatic hydrolysis.



8. attēls. Iegūto cukuru koncentrācija no 1 g salmi substrāta, izmantojot skābes pirmapstrādi un enzimatisko hidrolīzi.

Figure 8. The overall concentration of obtained glucose from 1 g of straw substrate after acid pre-treatment and enzymatic hydrolysis.

Siena un salmu rezultāti pie augstas temperatūras (170°C) un skābes koncentrācijas (3%) pietuvinājās literatūrā minētam teorētiskajam maksimumam (0,47 g/g salmiem un 0,40 g/g sienam), tāpēc rezultāti, palielinot rekcijas laiku, būtiski neatšķirās ($p > 0.05$). Pie tās pašas temperatūras un zemas skābes koncentrācijas (0,5%) starpība ir būtiska ($p < 0,05$).

Kopumā no siena bija iespējams iegūt vairāk glikozes nekā no salmiem ($p < 0.05$), kas neatbilst literatūrā minētiem teorētiskiem maksimumiem. Visticamāk, tas ir saistīts ar to, ka salmu blīvums ir lielāks, tāpēc skābei un enzīmiem ir grūtāk nokļūt līdz celulozei, kas atrodas substrātu iekšienē.

Palielinot pirmapstrādes koncentrāciju, temperatūru un apstrādes laiku, samazinās starpība starp iegūto glikozes daudzumu no salmiem un siena. Pie 121 °C, 0,5% sērskābes pēc 30 minūtēm starpības ir 0,164 g/g, bet pie 170 °C, 3% sērskābes pēc 60 minūtēm tā ir 0,083.

Izmantojot skābes pirmapstrādi kopā ar hidrolīzi, pēc šiem rezultātiem no 1 g siena substrāta teorētiski ir iespējams iegūt nepieciešamu cukuru daudzumu, lai fermentācijas rezultātā saražotu 0,102-0.121 g/g biobutanola. Tā kā no salmiem sanāca iegūt mazāk cukuru, fermentācijas rezultātā veidosies mazāk biobutanola, (0,084-0.099 g/g no salmu substrāta).

4. SECINĀJUMI

Skābe pirmapstrādes laikā ne tikai degradē lignīnu un hemicelulozi, bet arī palielina substrāta reakcijas laukumu un daļēji sadala celulozi līdz glikozei. Pirmapstrāde pie 121 °C temperatūras un koncentrācijas slikti iedarbojas uz salmiem. Vislabākos rezultātus abiem substrātiem bija iespējams iegūt veicot pirmapstrādi pie 170°C kopa ar 3% skābi 60 minūšu laikā. Veicot tikai pirmapstrādi (bez papildus hidrolīzes), no 1 g siena bija iespējams iegūt 0,32 g/g (79% no literatūrā minētā teorētiskā maksimuma) glikozes, un 0.27 g/g (58% no literatūrā minētā teorētiskā maksimuma) no salmu substrāta.

Kopumā pēc skābes pirmapstrādes un hidrolīzes no siena bija iespējams iegūt būtiski vairāk ($p < 0.05$) glikozes (0,46 g/g, 115% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma) nekā no salmiem (0,38 g/g, 81% no literatūras minēta teorētiskā maksimuma). Tas var būt saistīts ar salmu lielāko blīvumu un sienā sākotnēji esošiem cukuriem.

Izmantojot darbā minētas metodes (vizuālā shēma 1. pielikumā) no 1 g siena substrāta pēc fermentācijas teorētiski ir iespējams iegūt 0,102-0.121 g/g biobutanola. Izmantojot substrātu, ko nav iespējams izmantot liellopu barošanai (salmus), no 1 g substrāta ir iespējams iegūt 0,084-0.099 g/g biobutanola.

5. PATEICĪBA

Vēlos izteikt visdziļāko pateicību savas darba vadītājai - Lindai Mežulei, ka arī Brigitai Daļeckai. Paldies Jums par pieejamību un prasmi vienmēr atrast laiku, lai izrunātu aktuālos jautājumus un atrisinātu svarīgākās problēmas. Paldies par darba kritiku un vērtīgajiem padomiem.

Patiesa pateicība Rīgas Tehniskās Universitātes Būvniecības fakultātes Ūdens Pētniecības laboratorijai par doto iespēju izmantot zinātniski-pētnieciskās iekārtas.

Darbs izstrādāts Valsts pētījumu programmas (VPP) "Energoefektīvi un oglekļa mazietilpīgi risinājumi drošai, ilgtspējīgai un klimata mainību mazinošai energoapgādei" (LATENERGI) projekta Īdeņraža un biodegvielu ieguves inovatīvās tehnoloģijas, to uzglabāšana, kvalitātes kontrole, kvalitātes nodrošināšana un izmantošana Latvijā (4.2. apakšprojekts) ietvaros. Vienošanās Nr. 2014.10-4/VPP-1/27 .

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- Al-Shorgani N. K. N., Kalil M. S., Yusoff W. M. W., Hamid A. A. 2015. Biobutanol production by a new aerotolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* YM1 under aerobic conditions. - *Fuel*, 158: 855–863.
- Allen S. G., Schulman D., Lichwa J., Antal M. J. Jr. 2001. A comparison of aqueous and dilute-acid single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust. - *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40: 2352-2361.
- Bellido C., Pinto M. L., Coca M., González-Benito G., García-Cubero M. T. 2014. Acetone–butanol–ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates. - *Bioresource Technology*, 167: 198-205.
- Berrios M., Skelton R. L. 2008. Comparison of purification methods for biodiesel. - *Chemical Engineering Journal*, 144(3): 459-465.
- Bio-NETT 2007. Biodegvielas izmantošanas iespējas Latvijā. http://www.rms.lv/bionett/Files/BIODEGVIELAS_%28celvedis%29.pdf
- Bora B. J., Saha U. K. 2015. Comparative assessment of a biogas run dual fuel diesel engine with rice bran oil methyl ester, pongamia oil methyl ester and palm oil methyl ester as pilot fuels. - *Renewable Energy*, 81: 490-498.
- Bouza R. J., Gu Z., Evans J. H. 2016. Screening conditions for acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of empty fruit bunches. - *Industrial Crops and Products*, 84: 67–71.
- Brummer V., Jurena T., Hlavacek V., Omelkova J., Bebar L., Gabriel P., Stehlik P. 2014. Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper – Source of raw material for production of liquid biofuels. - *Bioresource Technology*, 152: 543-547.
- Bura R., Richard Chandra R., Saddler J. 2009. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. - *Biotechnology Progress*, 25(2): 315-322.
- Camesasca L., Ramirez B.M., Guigou M., Ferrari M.D., Lareo C. 2015. Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis and fermentation of napiergrass for fuel ethanol production. - *Biomass and bioenergy*, 74: 193-201.
- Carvalho D. L., Avillez R. R., Rodrigues M. T., Borges L.E.P., Appel L.G. 2012. Mg and Al mixed oxides and the synthesis of n-butanol from ethanol. - *Applied Catalysis A: General*, 415-416: 96-100.
- Cheng J., Ding L., Lin R., Liu M., Zhou J., Cen K. 2016. Physicochemical characterization of typical municipal solid wastes for fermentative hydrogen and methane co-production. - *Energy Conversion and Management*, 117: 297–304.
- Chenga C-L., Chea P-Y., Chenb B-Y., Leec W-J., Lind C-Y., Chang J-S. 2012. Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. - *Applied Energy*, 100: 3-9.
- Chung Y. C., Bakalinsky A., Penner M. H. 2005. Enzymatic saccharification and fermentation of xylose-optimized dilute acid-treated lignocellulosics. - *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124: 947-961.
- Dee S., Bell A.T. 2011. Effects of reaction conditions on the acid-catalyzed hydrolysis of miscanthus dissolved in an ionic liquid. - *Green Chemistry*, 13: 1467-1475.
- Du G-Q., Xue C., Zhao Q.-Q., Xub J., Liu T., Chen L.-J., Mu Y., Wu Bai F.-W. 2016. Design of online off-gas analysis system for anaerobic ABE fermentation and the strategy for improving biobutanol production. - *Process Biochemistry*, 51: 555–560.
- Dürre P. 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. - *Biotechnology Journal*, 2: 1525-1534.

- Dürre P. 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. - *Incredible Anaerobes from Physiology to Genomics to Fuels*, 1125: 353-362.
- El-Nasser A. N. H., El-Shafei H. A. 1994. Enzymatic hydrolysis of cellulose and related materials by *Streptomyces* species. - *Microbiological Research*, 149: 151-156.
- Falld M., Eklund M. 2015. Towards a sustainable socio-technical system of biogas for transport: the case of the city of Linköping in Sweden. - *Journal of Cleaner Production*, 98: 17-28.
- García V., Pääkkilä J., Ojamo H., Muurinena E., Keiski R. L. 2011. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? - *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15: 964-980.
- Geng W., Jin Y., Jameel H., Park S. 2015. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. - *Bioresource Technology*, 187: 43-48.
- Givry S., Bliard C., Duchiron F. 2007. Selective ketopentose analysis in concentrate carbohydrate syrups by HPLC. - *Carbohydrate Research*: 342, 859-864.
- Gottumukkala L. D., Parameswaran B., Valappil S. K., Mathiyazhakan K., Pandey A., Sukumaran R. K. 2013. Biobutanol production from rice straw by a non-acetone producing *Clostridium sporogenes* BE01. - *Bioresource Technology*, 145: 182-187.
- Hedriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. - *Bioresource Technology*, 100(1): 10-18.
- Held P. 2012. Enzymatic digestion of polysaccharidespart II: optimization of polymer digestion and glucose production in microplates. Vermont, BioTek, application note, 5 pp.
- Hernández E., García A., López M., Puls J., Parajó J.C., Martín C. 2013. Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* empty pods. - *Industrial Crops and Products*, 44: 227-231.
- Himmel M. E., Ding S. Y., Johnson D. K., Adney W. S., Nimlos M. R., Brady J. W., Foust T. D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. - *Science*, 315: 804-807.
- Hu L., Lin L., Wu Z., Zhou S., Liu S. 2015. Chemocatalytic hydrolysis of cellulose into glucose over solid acid catalysts. - *Applied Catalysis B: Environmental*, 174-175: 225-243.
- Jeong H-S., Jang S-K., Kim H-Y., Yeo H., Choi J. W., Choi I-G. 2016. Effect of freeze storage on hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis by dilute-acid pretreatment of Mongolian oak. - *Fuel*, 165: 145-151.
- Ji W., Shen Z., Wen Y. 2015. Hydrolysis of wheat straw by dilute sulfuric acid in a continuous mode. - *Chemical Engineering Journal*, 260: 20-27.
- Jiang L., Zheng A., Zhao Z., He F., Li H., Liu W. 2015. Obtaining fermentable sugars by dilute acid hydrolysis of hemicellulose and fast pyrolysis of cellulose. - *Bioresource Technology*, 182: 364-367.
- Jones D.T., Woods D. R. 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. - *Microbiological Reviews*, 50: 484-524.
- Jorgensen H., Kristensen J. B. Felby C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. - *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1: 119-134.
- Kalniņš A., Nātre A. 2009. Biobutanols – kā viens no nākotnes alternatīvo degvielu veidiem. http://www.liaa.gov.lv/files/liaa/attachments/22_petijums_biobutanols_-_ka_viens_no_nakotnes_alternativo_degvielu_veidiem.pdf
- Kanno M., Katayama T., Tamaki H., Mitani Y., Meng X-Y., Hori T., Narihiro T., Morita N., Hoshino T., Yumoto I., Kimura N., Hanada S., Kamagata Y. 2013. Isolation of Butanol- and Isobutanol-Tolerant Bacteria and Physiological Characterization of Their Butanol Tolerance.- *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 6998-7005.

- Kiyoshi K., Furukawa M., Seyama T., Kadokura T., Nakazato A., Nakayama S. 2015. Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. - *Bioresource Technology*, 186: 325–328.
- Kondo T. 1997. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. - *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 35: 717–723.
- Krause D. O., Denman S. E., Mackie R. I., Morrison M., Rae A. L., Attwood G. T., McSweeney C. S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. - *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 663-693.
- Kumar D., Murthy G.S. 2011. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. - *Biotechnology for Biofuels*, 4:27: 1-19.
- Kumar M., Gayen K. 2011. Developments in biobutanol production: New insights. - *Applied Energy*, 88(6): 1999-2012.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. - *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8): 3713-3729.
- Lee S., Posarac D., Ellis N. 2011. Process simulation and economic analysis of biodiesel production processes using fresh and waste vegetable oil and supercritical methanol. - *Chemical Engineering Research and Design*, 89: 2626-2642.
- Liang G., Wu C., He L., Ming J., Cheng H., Zhuo L., Zhao F. 2011. Selective conversion of concentrated microcrystalline cellulose to isosorbide over Ru/C catalyst. - *Green Chemistry*, 13: 520-540.
- Li K., Wan J., Wang X., Wang J., Zhang J. 2016. Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of Tween 80. - *Industrial Crops and Products*, 83: 414-422.
- Li P., Cai D., Luo Z., Qin P., Chen C., Wang Y., Zhang C., Wang Z., Tan T. 2016. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. - *Bioresource Technology*, 206: 86-92.
- Lynd LR., Wyman CE., Gerngross TU. 1999. Biocommodity engineering. - *Biotechnology Progress*, 15: 777-793.
- Mabee W. E., Gregg D. J., Arato C., Berlin A., Bur, R., Gilkes N. 2006. Updates on softwood-to-ethanol process development. - *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132: 55-70.
- Martín C., García A., Schreiber A., Puls J., Saake B. 2015. Combination of water extraction with dilute-sulphuric acid pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* shells. - *Industrial Crops and Products*, 64: 233-241.
- McGinty D., CS L., AM A. 2010. Fragrance material review on 2-ethyl-1-butanol. - *Food and Chemical Toxicology*, 48(4): 85-88.
- McIntosh S., Vancov, T. 2010. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. - *Bioresource Technology*, 101: 6718-6727.
- Mechmech F., Chadjaa H., Rahni M., Marinova M., Akacha N. B., Gargouri M. 2015. Improvement of butanol production from a hardwood hemicelluloses hydrolysate by combined sugar concentration and phenols removal. - *Bioresource Technology*, 192: 287-295.
- Mendu V., Shearin T., Campbell J. E., Stork J., Jae J., Crocker M., Huber G., DeBolta S. 2012. Global bioenergy potential from high-lignin agricultural residue. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10): 4014-4019.
- Mezule.L., Strods M., Dalecka B. 2016. Influence of mechanical pre-treatment on fermentable sugar production from lignocellulosic biomass. - *Agronomy research*, 14.

- Morales-de la Rosa S., Campos-Martin J. M., Fierro J. L. G. 2014. Optimization of the process of chemical hydrolysis of cellulose to glucose. – *Cellulose*, 4: 2397-2407.
- Motte J-C., Sambusiti C., Dumas C., Barakat A. 2015. Combination of dry dark fermentation and mechanical pretreatment for lignocellulosic deconstruction: An innovative strategy for biofuels and volatile fatty acids recovery. - *Applied Energy*, 147: 67–73.
- Ni Y., Sun Z. 2009. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. - *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 415–423.
- Niemi P., Faulds C. B., Sibakov J., Holopainen U., Poutanen K., Buchert J. 2012. Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. - *Bioresource Technology*, 116: 155–160.
- Nieves D. C., Ruiz H. A., Cárdenas L. Z., Alvarez G. M., Aguilar C. N., Ilyina A., J. L. M. 2016. Enzymatic hydrolysis of chemically pretreated mango stem bark residues at high solid loading. - *Industrial Crops and Products*, 83: 500–508.
- Palme A., Theliander H., Brelid H. 2016. Acid hydrolysis of cellulosic fibres: Comparison of bleached kraft pulp, dissolving pulps and cotton textile cellulose. - *Carbohydrate Polymers*, 136: 1281–1287.
- Qin L., Liu Z. H., Li B. Z., Dale B. E., Yuan Y. J. 2012. Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids. - *Bioresource Technology*, 112: 319-326.
- Ranjan A., Khanna S., Moholkar V. S. 2013. Feasibility of rice straw as alternate substrate for biobutanol production. - *Applied Energy*, 103: 32–38.
- Saha B. C., Qureshi N., Kennedy G. J., Cotta M. A. 2016. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. - *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109: 29-35.
- Saqib A. A. N., Whitney P. J. 2011. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. - *Biomass and bioenergy*, 35: 4748-4750.
- Sasaki K., Tsuge Y., Sasaki D, Teramura H., Inokuma K., Hasunuma T., Ogino C., Kondo A. 2015. Mechanical milling and membrane separation for increased ethanol production during simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. - *Bioresource Technology*, 185: 263–268.
- Singh J., Suhag M., Dhaka A. 2015. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. - *Carbohydrate Polymers*, 117: 624-631.
- Stoeberl M., Werkmeister R., Faulstich M., Russa W. 2011. Biobutanol from food wastes – fermentative production, use as biofuel and the influence on the emissions. *Procedia Food Science*, 1: 1867-1874.
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. - *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- Sun Z-Y., Tang Y-Q., Iwanaga T., Sho T., Kida K. 2011. Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. - *Bioresource Technology*, 102: 10929-10935.
- Taherzadeh M. J., Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: A review. - *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 1621-1651.
- Talebnia F., Karakashev D., Angelidaki I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. - *Bioresource Technology*, 101: 4744-4753.
- Tippkötter N., Duwe A-M., Wiesen S., Sieker T., Ulber R. 2014. Enzymatic hydrolysis of beech wood lignocellulose at high solid contents and its utilization as substrate for the

- production of biobutanol and dicarboxylic acids. - *Bioresource Technology*, 167: 447–455.
- Verardi A., De Bari I., Ricca E., Calabrò V. 2012. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. - <http://cdn.intechweb.org/pdfs/27352.pdf>
- Verma S. K., Shastri Y. 2016. Optimal control and stochastic modelling of acid pre-treatment of bagasse. - *IFAC-PapersOnLine*, 49-1: 498-503.
- Wang G. S., Lee J. W., Zhu J. Y., Jeffries, T. W. 2011. Dilute acid pretreatment of corncob for efficient sugar production. - *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163: 658-668.
- Weil J. R., Sarikaya, A., Rau S. L., Goebz J., Lasisch C. M., Brwer M., Hendrickson R., Ladisch M. R., 1998. Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. - *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73: 1-17.
- Wijaya Y.P., Putra R.D.D., Widayaya V.T., Ha J-M., Suh D.J., Kim C.S. 2014. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. - *Bioresource Technology*, 164: 221-231.
- Xia M-L., Wang L., Yangc Z-X., Chen H-Z. 2015. A novel digital color analysis method for rapid glucose detection. - *Analytical Methods*, 7: 6654-6663.
- Yang M., Kuittinen S., Keinänen M., Vepsäläinen J., Romar H., Tynjälä P., Lassi U., Pappinen A. 2014. The use of (green field) biomass pretreatment liquor for fermentative butanol production and the catalytic oxidation of biobutanol. - *Chemical Engineering Research and Design*, 92(8): 1531-1538.
- Yin Y., Wang J. 2016. Enhancement of enzymatic hydrolysis of wheat straw by gamma irradiation–alkaline pretreatment. - *Radiation Physics and Chemistry*, 123: 63-67.
- Yuana X., Cheng G. 2015. From cellulose fibrils to single chains: understanding cellulose dissolution in ionic liquids. - *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17: 31592-31607.
- Zhang B., Wang L., Shahbazi A., Diallo O., Whitmore A. 2011. Dilute-sulfuric acid pretreatment of cattails for cellulose conversion. - *Bioresource Technology*, 102: 9308-9312.
- Zhang L., Zhou T., Wu Y., Xu F. 2016. The dual effects of lignin content on enzymatic hydrolysis using film composed of cellulose and lignin as a structure model. - *Bioresource Technology*, 200: 761-769.
- Zheng Y., Pan Z., Zhang R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. - *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2: 51-68.
- Zoulikha M-R., Thierry M., Qiuyu Z. J-M., Nouviaire A., Sid-Ahmed R. 2015. Combined steam-explosion toward vacuum and dilute-acid spraying of wheat straw. Impact of severity factor on enzymatic hydrolysis. – *Renewable Energy*, 78: 516-526.

PIELIKUMI

1. Pielikums



Gatavie reaģenti**3,5- dinitrosalisila skābes (DNS) reaģents**

Sterils destilēts ūdens	142 ml
3,5- dinitrosalicila skābe	1,06 g
Nātrija hlorīds	1,98 g
Rošela sāls	36 g
Fenols (kušanas temperatūra 50°C)	760 µl
Nātrija metabisulfīts	0,83 g

0,5 M Citrāta buferšķidrums

Citronskābes monohidrāts	5,35 g
Sterils destilēts ūdens	50 ml

0,05 M Citrāta buferšķidrums

Citrāta buferšķidrums M0,5	20 ml
Sterils destilēts ūdens	180 ml



Siena substrāta vizuālas pārmaiņas pēc 60 minūšu ilgas sērskābes pirmapstrādes 121 °C.

Bakalaura darbs „Fermentējamo cukuru iegūšana no lignocelulozes atkritumiem biodegvielas ražošanai” izstrādāts Rīgas Tehniskās Universitātes Būvniecības fakultātes Ūdens Pētniecības laboratorijā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Anastasija Tolmačeva

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.sc.ing. Linda Mežule

Recenzents: Dr.biol. Uldis Kalnenieks

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē

Metodiķe: _____

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

13.06.2016. prot. Nr. _____.

Komisijas sekretārs: _____