

CAMERA SEPARATORIA

Volume 9, Number 2 / December 2017, pp. 92-105

Marta GLINKA, Rafał ŁUKAJTIS, Paulina NOWAK, Marian KAMIŃSKI*

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

*Autor do korespondencji: markamin@pg.edu.pl

Techniki chromatografii cieczowej, stosowane w analityce technicznej procesów hydrolizy biomasy ligno-celulozowej - BMLC. Przegląd

Streszczenie: *Obróbka wstępna biomasy ligno-celulozowej (BMLC) realizowana z zastosowaniem kwasów, zasad oraz enzymów jest ważnym etapem przetwarzania surowca przed procesem fermentacji. Podczas hydrolizy złożone struktury biopolimerów: celulozy, hemicelulozy i ligniny rozpadają się do związków o małej masie cząsteczkowej (cukry, oligosacharydy, związki fenolowe). Jednak nie jest to proces łatwy i wymaga doboru odpowiednich warunków procesu, między innymi rodzaj i stężenie katalizatora, temperatura procesu, czas, ciśnieni). Do określenia składu produktów głównych i ubocznych oraz wydajności produktów w zależności od warunków prowadzonego procesu konieczne jest wykorzystanie pewnych i sprawdzonych metod analitycznych. Odpowiednio dobrana analityka techniczna pozwala również monitorować przebieg procesu hydrolizy w reaktorze. W niniejszej pracy przedstawiono przegląd metod analitycznych wykorzystujących techniki chromatografii cieczowej do analizy technicznej produktów hydrolizy.*

Słowa kluczowe: *biomasa ligno-celulozowa BMLC; hydroliza – chemiczna / enzymatyczna; analityka techniczna / procesowa; chromatografia cieczowa*

Liquid chromatography techniques, used in technical analysis of hydrolysis processes, of lignocellulosic biomass. Review

Abstract: *Pre-treatment of lignocellulosic biomass (BMLC) using acids, bases and enzymes is an important stage of processing the raw material before the fermentation process. During hydrolysis, complex biopolymer structures: cellulose, hemicellulose and lignin break down into low molecular weight compounds (sugars, oligosaccharides, phenolic compounds). However, this is not easy process and requires the selection of appropriate process conditions, including the type and concentration of the catalyst, process temperature, time, pressure. To determine the composition of main products and by-products, but also to product performance depending on the conditions of the process, it is necessary to use reliable and tested analytical methods. Properly selected technical analytics allow also to monitor the course of the hydrolysis process in the reactor. This paper presents an overview of analytical methods using liquid chromatography techniques for technical analysis of hydrolysis products.*

Key words: *lignocellulosic biomass (BMLC); hydrolysis – chemical / enzymatic; technical / process analytics; liquid chromatography*

1. Wstęp (Introduction)

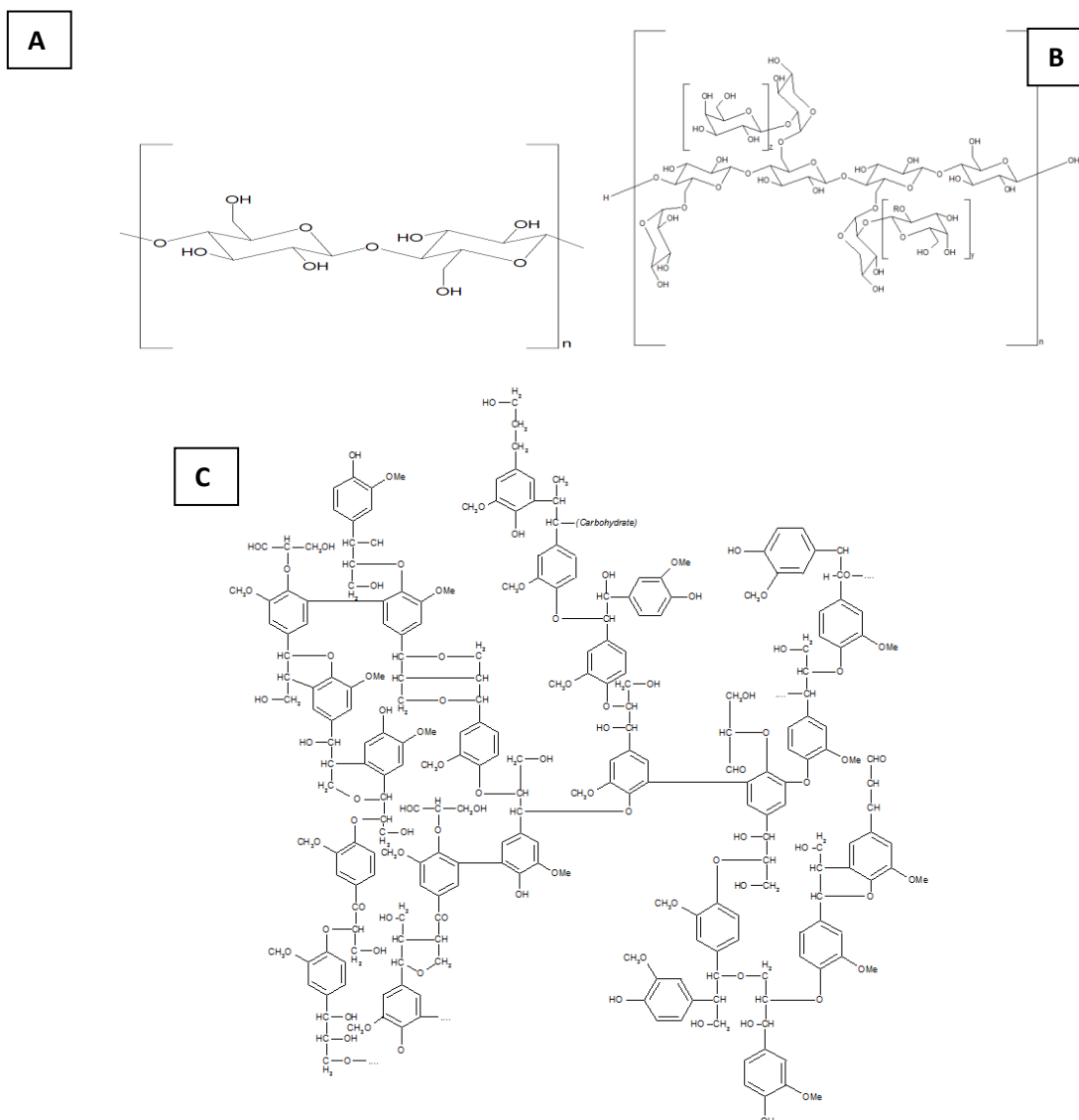
Szybkie wyczerpywanie się paliw kopalnianych oraz ich negatywny wpływ na środowisko (efekt cieplarniany, zanieczyszczenie powietrza związkami siarki i azotu, tworzenie się smogu) sprawia że coraz większy udział w rynku energii mają źródła surowców odnawialnych. Obecnie przede wszystkim wytwarzany jest etanol z materiałów roślinnych bogatych w skrobię (trzcina cukrowa, buraki cukrowe, kukurydza, żyto, pszenżyto, ziemniaki) oraz FAME z roślin oleistych (rzepak). Skrobia to stosunkowo łatwy do przetworzenia na paliwa substrat, jednak może on stanowić również składnik paszy i stąd przeznaczenie jej do wytwarzania biopaliw budzi kontrowersje. Dlatego rośnie zainteresowanie wykorzystaniem materiału lignocelulozowego w procesach biorafinacji, w których lignoceluloza przetwarzana może być zarówno do paliw II-generacji (etanol i metan) jak i do innych organicznych związków chemicznych.

Głównym źródłem materiału lignocelulozowego są odpady rolnicze (słoma, kaczany, łuski, liście, łęty) oraz drewno w tym odpady przemysłu drzewnego i papierniczego a także uprawy roślin energetycznych (wierzba energetyczna, topola energetyczna, miskantus).

Materiał lignocelulozowym to przede wszystkim połączenie trzech polimerów strukturalnych: celulozy (30-60%), hemicelulozy (14-40%) i ligniny (7-25%) [1]. Celuloza to nierozgałęziony polocukier stanowiący materiał budulcowy ścian komórkowych, zbudowany z monomerów glukozy (kilkanaście do kilkaset tysięcy jednostek) połączonych z sobą wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi (rys. 1.A.). Charakteryzuje się mocną i zwartą krystaliczną strukturą, licznie usieciowaną wiązaniami wodorowymi. Hemiceluloza określana jest jako niejednorodna grupa rozgałęzionych polisacharydów, zbudowana głównie z cukrów prostych w tym pentoz: ksylozy, ramnozy, arabinozy oraz heksoz: glukozy, galaktozy i mannozy połączonych wiązaniami β -glikozydowymi. (rys.1.B). Trzeci z biopolimerów to lignina (rys.1.C), jest najbardziej skomplikowanym, pod względem budowy chemicznej biopolimerem. Stanowi składnik ścian komórkowych a jej funkcją jest ochrona roślin przed drobnoustrojami. Lignina jest produktem kondensacji związków fenolowych, takich jak alkohol: trans-*p*-sinapylowy, trans-*p*-kumarylowy i trans-*p*-koniferylowy. Dodatkowo skład biomasy roślinnej uzupełniony jest o związki niestrukturalne w tym minerały i tzw. związki ekstrakcyjne. Ekstrakty stanowią zazwyczaj od 1 do 30% wag. materiałów lignocelulozowych a w ich skład wchodzi przede wszystkim żywice i związki fenolowe (stylobeny, fenole, kwasy tłuszczowe, terpenoidy, terpeny, lignany, flawonoidy, chlorofile, garbniki, taniny hydrolizujące, cukry i inne) oraz pochodne alkoholi i eterów. Zalicza się do nich również rozpuszczalne w wodzie sole nieorganiczne i kwasy organiczne.

Biomasa lignocelulozowa i jej wykorzystanie do otrzymywania biopaliw drugiej generacji oraz innych związków chemicznych jest obecnie przedmiotem licznych badań naukowych [2–10]. Jednak jej przetworzenie do końcowych produktów nie jest łatwe i wymaga trudniejszych warunków obróbki w porównaniu do surowców bogatych w skrobię [11, 12]). Największy udział w biomacie mają polimery cukrowe i to przede wszystkim na nich skupia się wykorzystanie biomasy. Z celulozy i hemicelulozy można zarówno otrzymywać biopaliwa jak i chemikalia, należy jednak wcześniej przeprowadzić polimery cukrowe do cukrów prostych. Zwykle jest to proces wieloetapowy. Najpierw należy rozdrobnić materiał na drodze (siekania, kruszenia, płatkowania, mielenia i innych) [13]. Rozdrobniony materiał podaje się tzw. obróbce materiału z wykorzystaniem albo procesów fizykochemicznych (wybuch pary, wybuch CO₂, wybuch SO₂, wybuch amoniaku) [14, 15] lub chemicznych (kwasy, zasady, utleniacze, ciecz jonowe) [16], innym sposobem jest zastosowanie metod biologicznych (grzyby np. zgnilizna biała, brunatna, miękka lub enzymy : laktaza, peroksydaza) [16]. Obróbka materiału ma za zadanie zwiększyć dostępność enzymów do polimerów cukrowych, dzieje się to dzięki częściowemu usunięciu ligniny, hemicelulozy, związków ekstrakcyjnych. Zwykle po obróbce zwiększeniu ulega powierzchnia właściwa i porowatości materiału dzięki czemu ułatwiony jest kontakt enzymów z celulozą. Po etapie obróbki stałą pozostałość bogatą w polimery cukrowe poddaje się scukrzaniu z wykorzystaniem enzymów cellulolitycznych w tym endoglukanazy, egzoglukanazy, glikozydazy. Ostatnim etapem procesu przetwarzania jest etap fermentacji cukrów prostych w którym w zależności od użytych mikroorganizmów otrzymujemy różne biopaliwa, w tym głównie : etanol, metan i wodór. Etap obróbki najczęściej realizuje się z wykorzystaniem kwasów np. kwasu siarkowego, fosforowego, azotowego, solnego rzadziej mrówkowego i octowego. Badany zakres stężeń kwasów jest szeroki 0,2-72 %, jednak najczęściej są to rozcieńczone roztwory kwasów, o stężeniu rzędu ok. 0,2 – 0,5 % [17-20]. Wadą zastosowania kwasów jest możliwość powstawania tzw. inhibitorów fermentacji oraz enzymów w tym furfuralu, 5-HMF, kwasu lewulinowego [21]. Kwasy dobrze usuwają z biomasy hemicelulozę a słabo ligninę. Obróbka zasadami realizowana jest zwykle dla stężeń z zakresu 1-20% w szerokim zakresie temperatur 25-120°C, z wykorzystaniem relatywnie tanich odczynników jak wodorotlenek sodu, wapnia lub amoniak [17]. Efektem właściwie przeprowadzonej obróbki jest wysoka wydajność produktów końcowych. W tym celu potrzebne jest dobranie optymalnych warunków procesu, tj. rodzaj i stężenie katalizatora, temperatura, pH, czas trwania procesu, stosunek stężenia katalizatora do stężenia suchej masy surowca, sposób doprowadzania energii (ogrzewanie, mikrofałe, ultradźwięki). Jest to istotne ze względu na możliwą degradację materiału a w konsekwencji spadek wydajności.

Dla uzasadnionego ekonomicznie wykorzystania biomasy lignocelulozowej do otrzymywania biopaliw, istotną kwestią jest uzyskanie z materiału roślinnego jak największej gamy produktów do bezpośredniego użycia lub do dalszego przetwarzania. Oprócz przetworzenia najliczniej występujących w biomacie, polimerów cukrowych do biopaliw, możliwe jest równoległe otrzymywanie organicznych związków chemicznych, wykorzystywanych między innymi do syntez w różnych gałęziach przemysłu. Cukry można również przetwarzać do użytecznych związków chemicznych między innymi do kwasów karboksylowych (kw. octowy, kw. mlekowy, kw. cytrynowy, kw. glukonowy) kwasów dikarboksylowych (kw. bursztynowy, kw. fumarowy, kw. jabłkowy), polioli (gliceryna, sorbitol, ksylitol) i innych związków między innymi (butanol, aceton, izopropanol, HMF, furfural, 1,3 -propanodiol) [22]. Inną grupą związków chemicznych stanowią przede wszystkim produkty rozpadu ligniny [23]. Możliwe jest również katalityczne przetwarzanie cukrów prostych zwłaszcza pentoz, które są znacznie gorszym materiałem do fermentacji, często przez wiele mikroorganizmów nie wykorzystywane w ich procesach metabolicznych [24].



Rys. 1. Struktury chemiczne głównych frakcji materiałów lignocelulozowych: celuloza (A), hemiceluloza (B), lignina (C).
 Fig. 1. Chemical structures of main fractions of lignocellulosic materials: cellulose (A), hemicellulose (B), lignin (C).

Bez względu na założony efekt przetworzenia biomasy roślinnej, konieczne jest na każdym etapie stosowanie metod analityki technicznej. Na obecną chwilę otrzymywanie z biomasy lignocelulozowej, biopaliw nie jest realizowane na znaczną skalę w globalnej gospodarce, jednak realizowane są liczne badania pozwalające na rozwój istniejącego stanu techniki. Podczas realizacji badań naukowych konieczne jest stosowanie analityki między innymi w celu monitorowania i kontroli zachodzących mechanizmów przemian. Analityka pozwala również na ocenę wpływu zmian parametrów procesu na wydajność produktów etapów pośrednich i końcowych.

Jak dotychczas, analityka składu hydrolizatów odpadowej biomasy realizowana jest głównie w celu oznaczenia stężeń powstałych cukrów redukujących (tj. glukoza, ksyloza, mannoza, arabinoza, galaktoza) i stężeń inhibitorów fermentacji. Jednakże, matryca hydrolizatu jest mieszaniną związków chemicznych znacznie bardziej złożoną i zależną od rodzaju hydrolizy i warunków procesu [17–19]. Dlatego coraz większe znaczenie ma oznaczenie całkowitego składu produktów obróbki i hydrolizy biomasy roślinnej. W jej skład obok cukrów (oligomery, cukry proste) i produktów ich konwersji (furfural, hydroksymetylofurfural, kwas lewulinowy i mrówkowy), kwasu octowego powstałego podczas hydrolizy grup acetylowych obecnych w hemicelulozie, wchodzi również tzw. związki chemiczne niestrukturalne, które można wyekstrahować (wyługować) z roślin przed obróbką chemiczną polarnymi (np. woda), średnio polarnymi (np. etanol, aceton) i mniej polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi (np. THF, chloroform).

W niniejszej pracy umieszczony został przegląd najważniejszych technik i metod chromatografii cieczowej stosowanych w badaniach naukowych, do analizy składu hydrolizatów, otrzymanych z przeróbki masy lignocelulozowej.

2. Analityka składu hydrolizatów z biomasy lignocelulozowej (*Analyses of the composition of hydrolysates from lignocellulosic biomass*)

2.1. Techniki chromatografii cieczowej (*Liquid chromatography techniques*)

Spośród znajdujących się w literaturze naukowej opisów metod służących badaniom składu hydrolizatów biomasy lignocelulozowej, najczęściej wykorzystywane są techniki chromatograficzne. Chromatografia cieczowa szczególne zastosowanie znajduje do identyfikacji i oznaczenia zawartości nietlotnych składników/grup składników, tzn. cukry, alkohole polihydroksylowe, kwasy uronowe peptydy, aminokwasy, a także wosków, chlorofilu, soli nieorganicznych, oraz innych wyżej wrzących związków chemicznych. Najbardziej liczną grupą związków powstających z przeróbki lignocelulozy są cukry proste wykorzystywane dalej w procesach fermentacji. Dlatego do oznaczania składu cukrowego w hydrolizatach w tym ich stężenia opracowane są techniki chromatografii cieczowej [28].

Najczęściej stosowaną jest technika wymiany ligandów i wykluczania jonowego, znacznie rzadziej chromatografia anionowymienna oraz oddziaływań hydrofilowych. Wykorzystanie chromatografii gazowej do tego celu wymagałoby przeprowadzenia procesu derywatywacji i przekształcenia cukrów w lotne pochodne, np. trimetylosililowe albo w pochodne fluororganiczne, co jest możliwe ale dość kłopotliwe w praktyce [29].

2.1.1. Warunki wymiany ligandów (*Conditions for exchange of ligands*)

Do identyfikacji i oznaczania stężenia cukrów prostych w hydrolizatach enzymatycznych zdecydowanie najczęściej stosowaną jest chromatografia wymiany ligandów. Technika ta znajduje również zastosowanie w procedurze NREL właściwej do oznaczania zawartości celulozy i hemicelulozy w materiale roślinnym. Jako fazę stacjonarną wykorzystuje się najczęściej kopolimer styren – diwinylobenzen z kowalencyjnie przyłączonymi do powierzchni grupami funkcyjnymi (najczęściej jest to kationit $-SO_3^{2-}$ z przeciw jonem Pb^{2+} lub Ca^{2+}). Ponieważ eluentem wykorzystywanym w tego typu analizach jest zawsze woda demineralizowana jest to technika tania w eksploatacji. W niniejszych warunkach cukry występują w postaci niezdysoncjowanej, a ich retencja rośnie wraz z spadkiem polarności cząsteczki. Rozdzielaniu mogą także ulegać inne obojętne (tzn. nie obdarzone ładunkiem) związki chemiczne. Związki dysocjujące na jony są wymywane wraz z objętością martwą kolumny. Zaleca się także, aby przed przystąpieniem neutralizować pH próbki. Ważne jest, aby przed badaniem próbek hydrolizatów z wykorzystaniem warunków chromatografii wymiany ligandów, usunąć ze składu próbki mniej polarne związki chemiczne. Ich oddziaływanie sorpcyjne mogą być na tyle silne z powierzchnią fazy stacjonarnej że tak słaby eluent jakim jest woda może nie być zdolny do ich wyluowania albo elucja będzie trwała długo. Możliwa jest również trwała sorpcja na powierzchni wypełnienia kolumny chromatograficznej, występowanie takiego zjawiska będzie wiązała się z pogorszeniem sprawności i selektywności kolumny. Ryzykowne jest również wprowadzanie w próbce związków jonowych które mogą stopniowo wymieniać ołów lub wapń z wypełnienia kolumny. Warto stosować kolumny ochronne które zabezpieczają właściwą kolumnę. Bardzo ważna dla sprawności i selektywności rozdzielania jest wysoka temperatura, zwykle stosowana jest temperatura w przedziale 80-90°C. Wybrane przykłady zastosowania chromatografii wymiany ligandów zaprezentowano w tabeli nr 1.

2.1.2. Warunki wykluczania jonowego (*Ion exclusion conditions*)

Technika ta znajduje głównie zastosowanie do monitorowania przebiegu fermentacji oraz od oznaczania składu i stężenia związków powstałych podczas fermentacji. Przede wszystkim oznaczać można, kwasy karboksylowe (kw. mrówkowy, octowy, propionowy, masłowy), hydroksykwasy (np. kwas mlekowy), keto kwasy (np. kwas lewulinowy), poliole (glicerol, ksylitol, mannitol), cukry proste i alkohole. W przypadku hydrolizatów technika ta znajduje zastosowanie głównie w oznaczaniu typowych inhibitorów fermentacji (furfural, 5-HMF, kwas octowy, kw. lewulinowy, kw. felurowy, kw. syryngowy, kw. kumarowy) [30] a także kwas cytrynowy, bursztynowy, propanowy i mrówkowy [31]. Technika wykluczania jonowego wykorzystywana jest również w badaniach dotyczących detosyfikacji hydrolizatów. W jednej z prac badawczych zastosowano ją do określenia zmian stężenia HMF, furfuralu, waniliny i ksylozy w mieszaninie po wprowadzeniu do niej adsorbenta. Łącznie zbadano kilka różnych rodzajów zeolitów [32]. W tabeli nr 1 przedstawiono więcej wybranych przykładów zastosowania. Faza stacjonarna jest analogiczna do tej stosowanej w technice wymiany ligandów, tu jednak przeciw jonem są protony. Stosowanym eluentem jest woda z dodatkiem kwasu, najczęściej siarkowego. Temperatura termostataowania kolumny podczas

rozdzielania mieści się w przedziale 50-65°C. Istotną wadą stosowania tej techniki jest relatywnie długi czas trwania analizy 30-50 min. W jednej z prac zbadany został wpływ warunków na rozdzielanie chromatograficzne, Xie i in. [33], którzy dowiedli jak ważne zagadnienie stanowi m.in. temperatura termostatowania kolumny chromatograficznej z wypełnieniem w postaci silnego kationitu typu H w warunkach wykluczania jonowego. Mianowicie, w większości przykładów aplikacyjnych do separacji cukrów oraz kwasów organicznych, stosowano temperaturę powyżej 50°C. Pociąga to za sobą pewne niedogodności, ponieważ pomimo uzyskania dobrego rozdzielania sacharydów, obserwuje się koelucję kwasów: octowego i lewulinowego, będących inhibitorami fermentacji. Dlatego też, przeprowadzono optymalizację warunków rozdzielania, poprzez zmianę składu eluentu (zastosowano 1, 2,5 oraz 5 mM H₂SO₄) oraz temperatury (60, 50, 40, a także 30°C). Wykazano, że najlepsze efekty osiągane są przy obniżeniu temperatury poniżej 40°C, jednakże z drugiej strony wiąże się to z wydłużeniem czasu analizy o 10 min (w porównaniu do temperatury 60°C) [33]. W tych warunkach elektrolity obecne w badanym materiale ulegają dysocjacji i wykluczaniu jonowemu, dzięki temu uzyskuje się lepsze odseparowanie powyższych od oznaczanych związków organicznych [34]. Znaczącą korzyścią wykorzystywania chromatografii wykluczania jonowego, jest otrzymanie dwóch frakcji eluatu: zawierającej oraz nie zawierającej w swoim składzie elektrolitów.

Tabela 1. Zestawienie przykładowych metodyk chromatograficznych, wykorzystywanych do badania składu hydrolizatów - chromatografia wykluczania jonowego oraz wymiany ligandów (IExclC / LExchC).

Table 1. Summary of exemplary chromatographic methodologies used to study the composition of hydrolysates - ion exclusion chromatography and ligand exchange (IExclC / LExchC).

Lp. (No.)	Nazwa oznaczanych związków chemicznych / parametrów (The name of the chemical compounds / parameters being determined)	Opis metody (Description of the method)	Lit. (Lit.)
1	Cukry	Kolumna: Aminex HPX-87P Eluent: Woda Przepływ: 0,6 mL/min Temperatura: 85°C Detekcja: RID	[35]
2	Cukry (glukoza, ksyloza)	Kolumna: Aminex HPX-87H, Eluent: 5 mM H ₂ SO ₄ , Przepływ: 0,6 mL/min Temperatura: 65°C Detekcja: RID	[36]
3	Alkohole cukrowe	Kolumna: Phenomenex RPM-Monosaccharide Pb ²⁺ (8%), Eluent: woda ultra czysta Przepływ: 0,6 mL/min Temperatura: 40°C Detekcja: RID	[26]
4	Cukry	Kolumna: Sugar Pack Eluent: Woda + 0,05g/dm ³ EDTA-Ca ²⁺ Przepływ: 0,5 mL/min Temperatura: 90°C	[38]
5	Cukry i kwasy organiczne (ksyloza, glukoza, kwas octowy)	Kolumna: Rezex RHM Monosaccharide H ⁺ z kolumną ochronną (Phenomenex, USA) Eluent: woda Przepływ: 0,6 mL/min Temperatura: 80°C Detekcja: RID	[39]
6	Cukry (glukoza, ksyloza i arabinoza)	Kolumna: Aminex HPX-87H, Eluent: 4 m M H ₂ SO ₄ , Przepływ: 0,6 mL/min Temperatura: 63°C Detekcja: RID	[40]
7	Cukry i inhibitory fermentacji (glukoza, ksyloza, arabinoza, mannoza, galaktoza, 5-hydroksymetylofurfural, furfural, kwas octowy)	Kolumna: Aminex HPX-87H z kolumną ochronną: Cation-H Refill Cartridge (Bio-Rad, Hercules, CA) Eluent: 5 mM H ₂ SO ₄ Przepływ: 0,6 mL/min Temperatura: 65°C Detekcja: RID	[41]

8	Kwasy organiczne (kwas lewulinowy, kwas octowy)	Kolumna: Aminex HPX-87H, Eluent: 5 mM H ₂ SO ₄ , Przepływ: 0,7 mL/min, Temp. 40°C Detekcja: DAD	[33]
---	---	---	------

2.1.3. Warunki wymiany jonowej (Ion exchange conditions)

Do analizy mono- jak również oligosacharydów wykorzystywana jest także technika wysokosprawnej chromatografii anionowymiennej często połączona z pulsacyjnym detektorem amperometrycznym – HPAEC-PAD [42,43,44]. Do przeprowadzenia obecnych w hydrolizacie cukrów w formę anionów potrzebne jest wysokie pH. Dlatego eluent zwykle stanowi wodny roztwór wodorotlenku sodu. Rozdzielanie w tym przypadku jest efektem różnic oddziaływania powstałych w silnie alkalicznym eluencie oksyanionów (pH>11) z jonowymiennymi (aminowymi) grupami wypełnienia kolumny. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że w tak silnie alkalicznym środowisku eluentu, może dochodzić do redukcji, niezdegradowanych podczas hydrolizy wielocukrów. Jednak, metoda ta uchodzi za jedną z najbardziej selektywnych metod rozdzielania cukrów, zwłaszcza w połączeniu z detekcją elektrochemiczną. Przykłady metodyk zestawiono w tabeli 2. Technika ta ze względu na swoją specyfikę oddziaływań służy również dobrze porozdzielania kwasów organicznych a także pochodnych fenolowych.

Tabela 2. Zestawienie przykładowych metodyk chromatograficznych, wykorzystywanych do badania składu hydrolizatów - warunki wymiany jonowej (IExchC).

Table 2. List of exemplary chromatographic methodologies used to test the composition of hydrolysates (ion exchange conditions).

Lp. (No.)	Nazwa oznaczanych związków chemicznych / parametrów (The name of the chemical compounds / parameters being determined)	Opis metody (Description of the method)	Lit. (Lit.)
1	Cukry i kwasy organiczne (glukoza, ksyloza, galaktoza, arabinoza, mannoza, ryboza, celobioza, ksylobioza, arabionobioza, mannobioza, celotrioza, ksylotrioza, mannotrioza, ksylotetroza, 3-galaktozo-arabinoza, kwas glukonowy, kwas galakturonowy, kwas glukuronowy, kwas laktobionowy)	Kolumna: Carbo Pac PA1, temp. 35°C Przepływ: 0,215 mL/min Eluent A: 100 mM NaOH Eluent B: 100 mM NaOH + 500 mM NaOAc Gradient: 100% A (t = 0-5 min), od 100% do 74% A (t = 5-78 min), płukanie 100% B (6 min), kondycjonowanie 100% A (10 min) Odsalanie przed detekcją MS. W tym celu przeprowadzano supresję jonów (Na ⁺ -H ⁺) Detekcja: MS (ESI, 275°C, zakres mas: 125-1000 Da)	[43]
2	Cukry (ksyloza, glukoza, galaktoza, mannoza, ramanioza)	Kolumna: Carbo Pac PA1 kolumn Eluent: 16 mM NaOH Temperatura: 30°C Przepływ: 1 mL/min	[44]
3	Cukry	Kolumna: DionexCarboPac PA1 z prekolumną; pH próbki równe 4 Eluent A: woda dejonizowana Eluent B: 150 mM NaOH Eluent C: 600 mM NaAc Eluent D: 500 mM NaOH, Przepływ: 1 mL/min, Gradient: 83% A, 17% B (t = 0 min); 100% A (t = 2-30 min); 30% A, 35% B, 35% C (t = 33-42 min); 100% B (t = 45-50 min) Temperatura: 35°C Detekcja: PAD	[34]
4	Kwasy karboksylowe	Kolumna: Ionpac ICE-AS-6 Eluent: 0,4 mM kwas heptafluorobutanowy Przepływ: 1 mL/min Detekcja: Konduktometryczny i UV (204 nm)	[46]

2.1.4. Warunki układu faz odwróconych (Reversed phase conditions)

W celu oznaczania związków chemicznych pochodzących głównie z depolimeryzacji ligniny obecnej w biomase lignocelulozowej oraz powstających podczas obróbki inhibitorów fermentacji, wykorzystuje się chromatografię w układach faz odwróconych, zarówno w warunkach elucji izokratycznej, jak i gradientowej (tabela 2). Przeważnie, w opublikowanych rezultatach badań opracowywane są metodyki umożliwiające oznaczanie konkretnych związków chemicznych, świadczących o postępach rozkładu biomasy bądź oznaczanie powstałych inhibitorów fermentacji [33, 37]. Rozdzielanie i analiza wykonywana jest zarówno z użyciem wysokosprawnej jak i ultrasprawnej chromatografii cieczowej. W jednym z badań wpływu rodzaju obróbki na obecność związków fenolowych w hydrolizacie, jest zastosowanie UPLC/MS i techniki RP z kolumną C18. Wykryto i oznaczono między innymi kwas felurowy, kwas syryngowy, kwas kumarowy, aldehyd syryngowy, wanilinę, izowanilinę, 4-OH-benzaldehyd, 4-OH-acetofenon. Najwyższe stężenie wymienionych związków było w ciekłej frakcji po obróbce alkalicznej [35]. Przykładowo, Klinke i inni [46] do separacji i analizy furfuralu i 5-HMF, jako najbardziej charakterystycznych związków chemicznych powstałych podczas hydrolizy biomasy lignocelulozowej, zastosowali układ odwróconych faz z kolumną Nucleosil 5C-18 i liniową elucją gradientową podczas której udział metanolu zmieniał się w zakresie od (10-90%). Separowane związki były oznaczane ilościowo poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm, z wykorzystaniem metodyki krzywej kalibracyjnej.

Innym przykładem jest zastosowanie zestawu UPLC/ESI/TOF/MS z kolumną typu C18 do sprawdzenia skuteczności użycia borowodorku sodu w usuwaniu inhibitorów fermentacji (aldehyd koniferylowy kwas felurowy, p-benzochinon, 2,6-dimetoksybenzochinon, furfural) [36]. Technikę RP z kolumną o nazwie handlowej Acclaim® Organic Acid zastosowano do zbadania efektów zastosowania węgla aktywnego w usuwaniu z hydrolizatu inhibitorów fermentacji: kwasu octowego, mrówkowego, HMF i furfuralu. Jako dodatku do eluentu zastosowano kwas metanosulfonowy [17].

Tabela 2 zawiera zestawienie innych przykładów zastosowań techniki RP do rozdzielania, identyfikacji i oznaczania związków chemicznych zawartych w hydrolizatach biomasy lignocelulozowej. Można zauważyć, że kolumny chromatograficzne stosowane do tego rodzaju badań zawierają grupy funkcyjne w postaci łańcuchów oktadecylowych (C-18), zaś eluent stanowi mieszanina w różnych stosunkach objętościowych metanol: woda, bądź acetonitryl woda z dodatkiem kwaśnego modyfikatora (w celu cofnięcia dysocjacji elektrolitycznej i zróżnicowania hydrofobowości składników badanej mieszaniny).

Tabela 3. Zestawienie przykładowych metodyk chromatograficznych, wykorzystywanych do badania składu hydrolizatów - warunki układu faz odwróconych (RP).

Table 3. A comparison of exemplary chromatographic methodologies used to study the composition of hydrolysates (conditions of the reversed phase system).

Lp. (No.)	Nazwa oznaczanych związków chemicznych / parametrów (The name of the chemical compounds / parameters being determined)	Opis metody (Description of the method)	Lit. (Lit.)
1	Inhibitory fermentacji (furfural)	Kolumna: Zorbax XDB-C ₁₈ , Eluent: acetonitryl-woda (1:8) z 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego, Przepływ: 0,8 mL/min Temperatura: 25°C Detekcja: UV-DAD ($\lambda = 276 \text{ nm}$),	[39]
2	4-hydroxybenzaldehyde, vanillin and syringaldehyde	UV/Vis detector SPD-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) set at 270 nm and YMC-Pack ODS-A column (YMC Co., Japan) at 35 °C. The mobile phase was water: acetonitrile (70:30, v/v) at 1.0 ml/min	[30]
3	Inhibitory fermentacji (HMF, furfural)	Kolumna: Nucleosil C18, Eluent: acetonitryl/woda/kwas octowy (84:15:1), Przepływ: 0,8 mL/min Detekcja: DAD (280 nm)	[36]
4	Związki fenolowe (wanilina, aldehyd syryngowy, kwas galusowy)	Kolumna: Nucleosil RP-NH2 Eluent: acetonitryl/woda z kwasem fosforowym (0,1%) (15:85) Detekcja: DAD (313 nm, 280 nm)	[36]
5	Związki fenolowe	Kolumna: Waters Acquity UPLC BEH C18, kolumna ochronna: Waters Van Guard Acquity UPLC BEH C18 Eluent A – wodny roztwór kwasu octowego (C – 2 mL/L wody) lub 50 mM octan amonu, Eluent B: acetonitryl	[34]

		Gradient: 4% B (0-1 min), 56% B (1-17 min), 70% B (17-18 min), 70% B (18-20 min), 100% B (20-21 min), 100% B (21-24 min), 4% (24-25 min), 4% (25-30 min) Przepływ: 0,35 mL/min Temperatura: 40°C Detekcja: DAD (280 nm) oraz MS (HESI: 100°C, temp. kapilary 130°C)	
6	Pochodne ligniny	Kolumna: C-18 Eluent: Metanol:Woda (30:70) + 1,75 mM wodorosiarczan tetrabutylaminy Przepływ: 0,5mL/min Temperatura: 20°C Detektor UV (280 nm)	[37]

2.1.5. Chromatografia wykluczania sterycznego (Steric exclusion chromatography)

Kolejnym narzędziem wykorzystywanym do analityki składu hydrolizatów jest chromatografia wykluczania sterycznego (GPC), realizowana w warunkach hydrofilowych (rozkład masy cząsteczkowej polisacharydów) oraz hydrofobowych (rozkład masy cząsteczkowej frakcji ligniny) [37, 53].

W przypadku wyznaczania rozkładu mas cząsteczkowych polarnych pochodnych hydrolizy (poli- i oligocukry) jako wąsko-dyspersyjne wzorce do kalibracji można wykorzystać polidekstrany o średnich masach cząsteczkowych z zakresu odpowiadającego przewidywanej masie molekularnej analitów (np. 400-4400 Da) [26] lub w szerszym zakresie. Ponadto, ważne jest doprowadzenie analizowanej do pH bliskiego odczynowi obojętnemu, zwłaszcza w przypadku gdy realizowana była hydroliza kwaśna. Wynika to z rodzaju eluentu, który w hydrofilowej chromatografii wykluczania stanowi zazwyczaj kilku milimolowy wodorotlenek sodu. Sugerowane jest, aby w celu usunięcia jonów Na⁺ stosować dializę hydrolizatu wobec wody dejonizowanej [26]. W przypadku zastosowania techniki GPC do oznaczania rozkładu ligniny wyodrębnionej z biomasy, stosowane są warunki hydrofobowe a jako wąsko dyspersyjne wzorce zastosowano polistyreny [39]. W jednym z przykładów zastosowano technikę SEC do oznaczeń ilościowych ligniny, wykorzystując połączone szeregowo trzy kolumny styren - diwinylobenzen o średnich średnicach porów 100, 1000 i 100000 Å. Do detekcji wykorzystano detektor refraktometryczny i lepkościowy [37].

Tabela 4. Zestawienie przykładowych metodyk chromatograficznych, wykorzystywanych do badania składu hydrolizatów (chromatografia wykluczania sterycznego w warunkach hydrofilowych).

Table 4. Summary of exemplary chromatographic methodologies used to investigate the composition of hydrolysates (steric exclusion chromatography under hydrophilic conditions).

Lp. (No.)	Nazwa oznaczanych związków chemicznych / parametrów (The name of the chemical compounds / parameters being determined)	Opis metody (Description of the method)	Lit. (Lit.)
1	Rozkład masy cząsteczkowej hydrolizatów	Kolumna Shimadzu SB-803 HQ (8 × 300 mm, 6 μm) eluent: 0,05 M KNO ₃ przepływ: 0,5 ml/min. Temperatura: 30°C Detekcja: RID, UV	[39]
2	Rozkład masy cząsteczkowej początkowej i resztkowej frakcji ligniny (po acetylowaniu w mieszaninie: bezwodnik octowy – pirydyna)	2 kolumny połączone szeregowo: PLgel Mixed D, 5μ Eluent: tetrahydrofuran Przepływ: 1 ml/min Temperatura: 40°C Detekcja: UV	[38]
3	rozkład masy cząsteczkowej polisacharydów	2 kolumny połączone szeregowo: Waters Ultrahydrogel 250 (MWR: 1 kDa - 80 kDa; 300 mm x 7.8 mm 250A) i 2000 (MWR: 50 kDa - 5000 kDa, 300 mm x 7.8 mm 2000A), eluent: 0,001 M NaOH Przepływ: 0,7 mL/min Temperatura: 70°C Detekcja: RID	[26]
4	Rozkład masy cząsteczkowej ligniny, wyznaczenie indeksu polidispersyjności	2 kolumny połączone szeregowo Agilent PL gel 5 um, 500 Å i Agilent PL gel 5 um, 104 Å Eluent : THF Detekcja : UV 280 nm	[38]

2.1.6. Inne metodyki rozdzielania (Other separation methodologies)

Do analityki hydrolizatów wykorzystywane są także inne techniki separacyjne. Miedzy innymi do wstępnego scharakteryzowania składu próbek i stwierdzenia obecności frakcji cukrowej można wykorzystać także cienkowarstwową chromatografię cieczową (TLC), zarówno w opcji RP (C-18), jak również oddziaływać hydrofilowych – HILIC (SiO₂) [40]. Na przykład Waghmare i inni [41] do oznaczania cukrów oraz związków fenolowych wykorzystali płytki TLC Silicagel 60 W F₂₅₄, aktywowane poprzez impregnację 0,02 M octanem sodu. Jako fazę ruchomą zastosowali mieszaninę aceton : woda 9:1 v/v. W celu detekcji cukrów, po rozwinięciu chromatogramów na powierzchni płytki zastosowano derywatyzację z wykorzystaniem etanolowego roztworu kwasu fosfo-molibdenowego (20% wag.) [41]. Technika TLC jest stosunkowo szybkim oraz łatwym sposobem wstępnego scharakteryzowania składu próbek, jednak kwestia ilościowego oznaczania związków chemicznych jest problematyczna. Co prawda istnieją oprogramowania komputerowe umożliwiające na oszacowanie udziału poszczególnych grup związków/związków chemicznych na podstawie oceny intensywności barwy „plamki”, jednak są to pomiary szacunkowe. Dodatkowo, problematyczna jest sama detekcja. Wywoływanie chromatografów z wykorzystaniem promieniowania UV (254 i 365) nie dostarcza koniecznych informacji o składzie próbki. Ponadto, nie możliwa jest w tych warunkach detekcja cukrów i innych związków chemicznych nie posiadających grup chromoforowych, bądź absorbujących promieniowanie z innego zakresu. Dlatego stosuje się inne metody detekcji polegające na impregnacji płytki przed lub po rozwinięciu chromatogramu. Jednak takie postępowanie sprawia, że podczas takiej „selektywnej detekcji” może być wykryta konkretna grupa związków chemicznych, natomiast w celu wykrycia innej chromatogram musi zostać powtórzony. Dlatego TLC stanowi marginalne zainteresowanie badaczy. W tabeli 5 zestawiono przykładowe indykatory umożliwiające detekcję konkretnych grup związków chemicznych na chromatogramach TLC.

Tabela 5. Zestawienie selektywnych sposobów detekcji TLC .

Table 5. List of selective TLC detection methods [42].

Grupa związków chemicznych (A group of chemical compounds)	Odczynnik „wywołujący” / metodyka (Reagent "trigger" / methodology)
Cukry redukujące	FTALAN ANILINY (skład mieszaniny: 0,93 g aniliny, 1,66 g kwasu o-ftalowego w 100 ml butanolu nasyconego wodą. Po spryskaniu, należy suszyć płytkę gorącym powietrzem, a następnie umieścić w suszarce w 105 stopniach Celsjusza przez 10 min. Powstają barwne plamki na prawie bezbarwnym tle, a niektóre wykazują fluorescencję przy 365 nm).
Związki fenolowe, cukry, steroidy, terpeny	p-ALDEHYD 4-METOKSYBENZOESOWY– KWAS SIARKOWY (VI) (płytkę należy spryskać świeżo przygotowanym roztworem 0,5 ml aldehydu 4-metoksybenzoowego w 50 ml lodowatego kwasu octowego i 1 ml 97% kwasu siarkowego (VI). Płytkę następnie ogrzewa się w 105 stopniach Celsjusza. Fenole, terpeny, węglowodany zmieniają zabarwienie na fioletowy, niebieski, czerwony. Do wykrywania jedynie cukrów wykorzystuje się mieszaninę 1 ml aldehydu 4-metoksybenzoowego, 1 ml kwasu siarkowego (VI) 97% w 18 ml etanolu. Po spryskaniu płytkę suszy się w 105 °C . Fenylhydrazony są wizualizowane w postaci zielono-żółtych plamek w ciągu 3 min suszenia, natomiast plamki cukrów charakteryzują się powstawaniem niebieskiego, zielonego bądź fioletowego zabarwienia w przeciągu 10-ciu minut).
Węglowodany/cukry	CHLOROWODOREK p-ANIZYDYN (płytkę należy spryskać roztworem 3% chlorowodoru p-anizydyny w n-butanolu i ogrzewać w temperaturze 100 °C przez 2-10min. Wyniki: aldoheksozy są wizualizowane jako zielono-brązowe plamki, keto heksozy w postaci żółtych, a aldopentozy zielonych plam. Plamki kwasu uronowego mają kolor czerwony).
Kwasy organiczne	ZIELEŃ BROMOKREZOŁOWA (chromatogram zanurza się w roztworze 0,1 g zieleni bromokrezolowej w 500 ml etanolu i 5 ml 0,1M NaOH. Wyniki: Kwasy wizualizowane są jako żółte plamy na niebieskim tle).
Aldehydy i ketony	2,4-DINITROFENYLOHYDRAZYNA (powierzchnię płytki spryskuje się roztworem 0,4 g 2,4-DNPH w 100 ml 2N kwasu solnego i 1 ml etanolu. Wyniki: 2,4 – dinitrofenylhydrazyna - w środowisku kwaśnym związek ten daje specyficzne reakcje, mające na celu wizualizację aldehydów, ketonów oraz węglowodanów. Po użyciu tego odczynnika i wygrzaniu płytki w odpowiedniej temperaturze, powstają żółte (ewentualnie pomarańczowożółte) hydrazony lub osazony (w przypadku węglowodanów)).

Interesującym zastosowaniem chromatografii, możliwym do wykorzystania także w skali procesowej, jest chromatografia wykluczania elektrolitów (EEC) realizowana w układzie multi-kolumnowym z recyrkulacją strumieni [61]. Jest to metoda polegająca na separacji silnych elektrolitów od słabych oraz nieelektrolitów. Fazę ruchomą stanowi woda, natomiast wypełnienie kolumny to zazwyczaj polistyren-diwinilobenzen PS-DVB (8% wag. DVB) ze związanymi grupami sulfonowymi (powierzchnia kationowymienna). Silne elektrolity są wymywane z czołem, ze względu na odpychanie elektrostatyczne z silnymi grupami jonowymi żywic jonowymiennych stanowiących powierzchnię fazy stacjonarnej. Frakcja kwasu siarkowego, wykorzystanego jako „katalizator” homogeniczny w hydrolizie kwaśnej, jest recyrkulowana i wykorzystywana ponownie do hydrolizy, natomiast inne frakcje są poddawane dalszej obróbce. Pozwala to na ograniczenie zużycia eluentu, a także lepszą separację składników, których matrycę w końcowym etapie procesu stanowi woda. Wyeliminowanie kwasu siarkowego z matrycy próbki jest korzystne ze względu na możliwość poddania roztworu lub wydzielonych frakcji dalszym badaniom, gdy jony siarczanowe (VI) mogłyby być, bądź były „interferentami”.

2.2. Detektory stosowane w analityce hydrolizatów (*Detectors used in the analysis of hydrolysates*)

Oprócz wykorzystania właściwych technik chromatografii cieczowej pozwalających na rozdzielanie składników analizowanej mieszaniny konieczne jest również zastosowanie odpowiednio czułego oraz, ze względu na różnorodność chemiczną składników hydrolizatu, także uniwersalnego detektora. Najczęściej stosowanymi w LC są detektory typu UV-VIS DAD zwłaszcza do produktów depolimeryzacji ligniny, RID – tzn. różnicowy detektor refraktometryczny oraz PAD – tzn. detektor woltamperometryczny do analityki cukrów, a także MS – tzn. spektrometr mas, LLSD – tzn. detektor rozproszenia światła laserowego czy C-CAD – tzn. detektor wyładowań koronowych [27, 33, 36-41, 43, 36]. Jednak należy pamiętać o ograniczeniach stosowania poszczególnych rodzajów detekcji. Głównymi wadami najczęściej wykorzystywanego detektora refraktometrycznego jest brak możliwości zastosowania go w przypadku elucji gradientowej, co w przypadku analityki hydrolizatów w większości przypadków jest niezbędne, jak również stosunkowo niska czułość. W przypadku detekcji z użyciem detektora spektrofotometrycznego UV-VIS DAD pomimo znacznie większej czułości niż przy detekcji RID, jego zastosowanie ogranicza się jedynie do związków chemicznych posiadających grupy chromoforowe. W przypadku analityki cukrów jak i alkoholi, nie znajduje więc zastosowania. Wyjściem może być wykorzystanie derywatywacji post-kolumnowej. Detektorami, których praca nie jest zakłócona przy stosowaniu elucji gradientowej są ponadto: MS, LLSD oraz C-CAD. Dodatkową zaletą wspomnianych detektorów jest detekcja związków chemicznych nie posiadających grup chromoforowych. Coulier i in.[43] na podstawie analiz hydrolizatów metodą HPAEC-MS oraz w układzie z dwuwymiarową spektrometrią mas (MS-MS), stwierdzili, że takie rozwiązanie umożliwia na dokonanie „selekcji pików” pod względem stosunku masy do ładunku (m/z). Rozwiązanie to stanowi alternatywę dla C¹³ NMR, jeśli chodzi o identyfikację nieznanymi składników w próbce. Uzyskanie informacji na temat mas molekularnych poszczególnych substancji powoduje, że możliwe jest dokonanie analizy pod kątem stopnia polimeryzacji sacharydów, jak również określenie ilości mono- i dicukrów, a ponadto odróżnienie pentoz od heksoz podczas jednego badania. W przypadku powszechnie wykorzystywanego do analityki cukrów detektora RID, uzyskanie tak szczegółowych informacji jest niemożliwe. Jednakże przed detekcją MS konieczne jest zastosowanie odsalania, dlatego niezbędne jest stosowanie supresji jonów (Na⁺-H⁺) przed dostaniem się eluatu do detektora MS. Eluat nie może zawierać nietlotnych składników. Dodatkowo, w przeprowadzonych badaniach, Coulier i in.[43] wykorzystali różne rodzaje biomasy jako wsad do hydrolizy oraz różne etapy obróbki wstępnej surowca. Na tej podstawie stwierdzili, że opracowana metodyka analityczna HPAEC-MS oraz MS/MS umożliwia określenie składu hydrolizatów, niezależnie od zastosowanych warunków procesu.

W przypadku detektora LLSD użytecznym sygnałem analitycznym jest stopień rozproszenia światła lasera, zależny od masy cząsteczkowej analitu [45]. Niestety lotne związki obecne w analizowanej próbce zostaną odparowane razem z eluentem w komorze detektora a tym samym na chromatogramie nie zaobserwujemy pochodzącego od nich sygnału. Ciekawym rozwiązaniem jest także użycie detektora C-CAD, pozwalającego na wykrywanie związków chemicznych, których prężność par jest niższa od 10⁻⁵ hPa (np. do oznaczania związków z grupy oligosacharydów) [61].

Do analityki cukrów wykorzystywany jest także powszechnie pulsacyjny detektor woltamperometryczny, pozwalający na selektywne oznaczanie związków chemicznych o danym, konkretnym potencjale elektrochemicznym (np. cukrów redukujących). Tego typu detektor wykorzystywany jest głównie z chromatografią anionowymienną [43].

3. Podsumowanie

Pozyskiwanie biopaliw z odpadowej biomasy lignocelulozowej wymaga przeprowadzenia wstępnej obróbki wsadu przed procesem fermentacji. Wykorzystanie do obróbki wstępnej metod chemicznych, takich jak hydroliza kwaśna bądź zasadowa, wiąże się z przemianą chemiczną struktury surowca. Przebieg procesu hydrolizy chemicznej zależy od zastosowanego katalizatora (odczynnika kwaśnego/zasadowego), temperatury, ciśnienia oraz czasu prowadzenia procesu. Zastosowanie różnorodnych warunków konwersji biomasy lignocelulozowej wpływa na wydajność procesu, a także na rodzaj powstających produktów ubocznych. Tak więc podczas optymalizacji warunków hydrolizy istotnym zagadnieniem jest kontrola techniczna składu powstających hydrolizatów, pozwalająca na monitorowanie najważniejszych parametrów a tym samym poznanie zachodzących mechanizmów reakcji, jak również samej biomasy lignocelulozowej.

Analityka hydrolizatów wykonywana jest głównie z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i gazowej. Wynika to z możliwości jednoczesnego oznaczania co najmniej kilku składników hydrolizatów, zarówno w sposób ilościowy jak i jakościowy. Ponadto, dzięki zastosowaniu chromatografii możliwe jest wstępne rozdzielenie hydrolizatów, zawierających w swoim składzie substancje o zróżnicowanych właściwościach chemicznych, na konkretne frakcje i poddanie ich dalszej, bardziej szczegółowej analizie z wykorzystaniem innych technik analitycznych, takich jak np. MS, FTIR, NMR itp. Rozwiązanie to jest szczególnie istotne ze względu na skomplikowaną matrycę próbki hydrolizatów. Przewagą technik chromatograficznych w zastosowaniu do analityki hydrolizatów, jest także możliwość rozdzielania składników mieszanin, nie tylko w skali analitycznej, ale także preparatywnej, jak również procesowej. Stwarza to możliwość wykorzystania tego typu technik do pozyskiwania cennych składników chemicznych (z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego, spożywczego) powstających jako produkty uboczne podczas hydrolizy odpadowej biomasy lignocelulozowej. Dzięki temu, zwiększa się także stopień możliwości przetworzenia materiałów lignocelulozowych, co wpływa korzystnie na ekonomikę procesu oraz ograniczenie, a nawet praktycznie całkowite zagospodarowanie odpadów powstających przy produkcji biopaliw. Jednakże często zastosowanie jedynie chromatografii nie daje pełnej informacji o składzie próbki, dlatego istotne jest, by badania uzupełnić o dodatkowe wiadomości uzupełniające, uzyskane dzięki zastosowaniu innych metodyk analitycznych. W przypadku analityki hydrolizatów, niezbędne wydaje się być stosowanie także technik takich jak ASA, ICP, jak również klasycznych metod spektrofotometrycznych (UV-VIS) stosowanych m.in. do oznaczania całkowitej ilości cukrów redukujących oraz zawartości związków fenolowych.

Podsumowując, należy zwrócić szczególną uwagę na odpowiednie dobranie technik analitycznych stosowanych w badaniach, by w możliwie prosty, szybki sposób uzyskać niezbędne informacji na temat składu hydrolizatów, jak również biomasy lignocelulozowej, w celu dokonania optymalizacji procesu, jak również możliwości pozyskiwania użytecznych produktów ubocznych w skali preparatywnej bądź procesowej.

Summary

Acquiring biofuels from waste lignocellulosic biomass requires pre-treatment of the batch prior to the fermentation process. The use of chemical methods for pretreatment, such as acid or alkaline hydrolysis, is associated with the chemical transformation of the raw material structure. The course of the chemical hydrolysis process depends on the catalyst used (acid / alkaline reagent), temperature, pressure and process time. The use of various conditions for the conversion of lignocellulosic biomass affects the efficiency of the process, as well as the type of by-products produced. Thus, during the optimization of the hydrolysis conditions, an important issue is the technical control of the composition of the resulting hydrolysates, allowing the monitoring of the most important parameters and thus the recognition of the reaction mechanisms underway, as well as the lignocellulosic biomass itself.

The analysis of hydrolysates is carried out mainly using liquid and gas chromatography. This is due to the possibility of simultaneous determination of at least several components of hydrolysates, both quantitatively and qualitatively. In addition, thanks to the use of chromatography, it is possible to pre-separate hydrolysates, containing in their composition substances of different chemical properties, into specific fractions and subject them to further, more detailed analysis using other analytical techniques, such as MS, FTIR, NMR, etc. this is particularly important due to the complicated matrix of the hydrolyzate sample. The advantage of chromatographic techniques in application to the hydrolyzate analysis is also the possibility of separating the constituents of mixtures, not only on the analytical scale, but also on the preparative as well as on the analytical scale. This creates the possibility of using this type of techniques to acquire valuable chemical components (from the point of view of the pharmaceutical, cosmetic, food industry) arising as by-products during the hydrolysis of waste lignocellulosic biomass. Thanks to this, the degree of the possibility of processing of lignocellulosic materials is also increased, which has a positive effect on the economics of the process as well as limitation, or even virtually complete management of waste generated in the production of biofuels. However, often using only chromatography does not give full

information about the composition of the sample, therefore it is important to supplement the study with additional supplementary information obtained through the use of other analytical methodologies. In the case of hydrolyzate analysis, it seems necessary to use also techniques such as ASA, ICP as well as classical spectrophotometric methods (UV-VIS) used, among others, for determining the total amount of reducing sugars and the content of phenolic compounds.

In summary, special attention should be paid to the appropriate selection of analytical techniques used in the research to obtain the necessary information on the composition of hydrolysates as well as lignocellulosic biomass in order to optimize the process as well as the possibility of obtaining useful by-products on a scale. preparative or process.

Podziękowania (Acknowledgements)

Praca finansowana z grantu NCN, pt. „Badania zasadowej hydrolizy biomasy ligno-celulozowej oraz warunków konwersji produktów do biogazów” [na podstawie umowy nr UMO-2014/13/B/ST8/04258].

This work was supported by the National Science Centre, „Research of alcalic hydrolysis of lignocellulosic biomass and conversion of hydrolysis products to fuel-bio- gases” Poland [grant number 2014/13/B/ST8/04258].

4. Literatura (References)

- [1] Y. Sun, J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, *Bioresource Technology*, 83 (2002) 1-11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- [2] P. Kumar, DM. Barrett, MJ. Delwiche, P. Stroeve, *Methods for pre-treatment of lignocellulosic Biomass for efficient hydrolysis and biofuel production*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (2009) 3713–3729. doi: 10.1021/ie801542g.
- [3] J. Wang, W. Wan, *Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production*, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 8864-8. doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.052.
- [4] N. Azbar, Ft. Çetinkaya Dokgöz, T. Keskin, KS. Korkomaz, HM. Syed, *Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (2009) 7441-7447. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.04.032.
- [5] R. Kothari, DP. Singh, VV. Tyagi, SK. Tyagi, *Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16 (2012) 2337-2346. doi: 10.1016/j.rser.2012.01.002.
- [6] JY. Zhu, X. Pan, RS. Zalesny, *Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (2010), 847-857. doi: 10.1007/s00253-010-2654-8.
- [7] J. Zhu, Y. Li, X. Wu, C. Miller, P. Chen, R. Ruan, *Swine manure fermentation for hydrogen production*, *Bioresource Technology*, 100 (2009) 5472-5477. doi: 10.1016/j.biortech.2008.11.045.
- [8] K. Karimi, G. Emtiazi, MJ. Taherzadeh, *Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae**, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2006) 138-144. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.046.
- [9] R. Lee, PJ. Weimer, WH. Zyl, *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (2002) 506-577.
- [10] DF. Correa, HL. Beyer, HP. Possingham, SR. Hall, PM. Schenk, *Biodiversity impacts of bioenergy production: Microalgae vs. first generation biofuels*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74 (2017) 1131-1146. doi: doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.068.
- [11] F. Saladini, N. Patrizi, FM. Pulselli, N. Marchettini, S. Bastianoni, *Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels*, *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 66 (2016) 221-227. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.073.
- [12] DP. Singh, RK. Trvedi, *Acid and alkaline pretreatment of lignocellulosic biomass to produce ethanol as biofuel*, *International Journal of ChemTech Research*, 5 (2013) 727-734.
- [13] F. Carvalheiro, LC. Duarte, FM. Girio, *Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments*, *Journal of Scientific & Industrial Research (India)*, 67 (2008) 849-864.
- [14] MJ. Taherzadeh, K. Karimi, *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*, *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (2008) 1621–1651. doi: 10.3390/ijms9091621.

- [15] R. Kumar, CE. Wyman, *Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies*, *Biotechnology Progress*, 25 (2002) 302-14. doi: 10.1002/btpr.102.
- [16] X-Z. Zhang, N. Sathitsuksanoh, Y-HP. Zhang, *Glycoside hydrolase family 9 processive endoglucanase from Clostridium phytofermentans: Heterologous expression, characterization, and synergy with family 48 cellobiohydrolase*, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 5534-5535. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.152.
- [17] RN. Gurram, S. Datta, YJ. Lin, SW. Snyder, TJ. Menkhaus, *Removal of enzymatic and fermentation inhibitory compounds from biomass slurries for enhanced biorefinery process efficiencies*, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 7850-7859. doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.043.
- [18] Q. Qing, B. Yang, CE. Wyman, *Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes*, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 9624-9630. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.137.
- [19] Sl. Mhlongo, R. Den Haan, M. Viljoen-Bloom, Van Zyl WH., *Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance*, *Enzyme and Microbial Technology*, 81 (2015) 16-22 .doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.07.005.
- [20] K. Chen, S. Hao, H. Lyu, G. Luo, S. Zhang, J. Chen, *Ion exchange separation for recovery of monosaccharides, organic acids and phenolic compounds from hydrolysates of lignocellulosic biomass*, *Separation and Purification Technology*, 172 (2017) 100-106. doi: 10.1016/j.seppur.2016.08.004.
- [21] Z. Fuzfai, I. Boldizsar, I. Molnar-Perl, *Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl-oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A.*, 1177 (2008) 183-189. doi: 10.1016/j.chroma.2007.11.023.
- [22] R. Xie, M. Tu, Y. Wu, S. Adhikari, *Improvement in HPLC separation of acetic acid and levulinic acid in the profiling of biomass hydrolysate*, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 4938-4942. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.050.
- [23] G. Lodi, LA. Pellegrini, A. Aliverti, B. Rivas Torres, M. Morbidelli, *Recovery of monosaccharides from lignocellulosic hydrolysates by ion exclusion chromatography*, *Journal of Chromatography A*, (2017) 25-36. doi: 10.1016/j.chroma.2017.03.016.
- [24] R. Datar, J. Huang, PC. Maness, A. Mohagheghi, S. Czernik, E. Chornet, *Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32 (2007) 14245-14251. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.06.102.
- [25] Y. Su, R. Du, H. Guo, M. Cao, Q. Wu, R. Su, *Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components*, *Food Bioproduction Processing*, 94 (2015) 322-330. doi: 10.1016/j.fbp.2014.04.001.
- [26] B. Kaya, S. Irmak, A. Hasanoglu, O. Erbatur, *Evaluation of various carbon materials supported Pt catalysts for aqueous-phase reforming of lignocellulosic biomass hydrolysate*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (2014) 10135–10140. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.04.180.
- [27] A. Wei, X. Zhang, D. Wei, G. Chen, Q. Wu, ST. Yang, *Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae Chlorella protothecoides*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (2009) 1383-1389. doi: 10.1007/s10295-009-0624-x.
- [28] ISM. Rafiqul, AM. Mimi Sakinah, *Kinetic studies on acid hydrolysis of Meranti wood sawdust for xylose production*, *Chemical Engineering Science*, 71 (2012) 431–437. doi: 10.1016/j.ces.2011.11.007.
- [29] HB. Klinke, BK. Ahring, AS. Schmidt, AB. Thomsen, *Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw*, *Bioresource Technology*, 82 (2002) 15-26.
- [30] A. Gautam, TJ. Menkhaus, *Performance evaluation and fouling analysis for reverse osmosis and nanofiltration membranes during processing of lignocellulosic biomass hydrolysate*, *Journal of Membrane Science*, 451 (2014) 93 – 107. doi: 10.1590/0104-6632.20170341s20150082.
- [31] K. Ziemiński, I. Romanowska, M. Kowalska, *Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production*, *Waste Management*, 32 (2012) 1131-7. doi: 10.1016/j.wasman.2012.01.016.
- [32] L. Coulier, Y. Zha, R. Bas, PJ. Punt, *Analysis of oligosaccharides in lignocellulosic biomass hydrolysates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with mass spectrometry (HPAEC-MS)*, *Bioresource Technology*, 133 (2013) 221-231. doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.085.
- [33] CF. Crespo, M. Badshah, MT. Alvarez, B. Mattiasson, *Ethanol production by continuous fermentation of d-(+)-cellobiose, d-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe Caloramator boliviensis*, *Bioresource Technology*, 103 (2012) 186-191. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.020.
- [34] R. Bakker, A. Zeelend, D. Sanchez-Garcia, A. Punt, G. Eggink, *Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: Differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment*, *Bioresource Technology*, 181 (2015) 114-123. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.033.
- [35] MKD. Rambo, FI. Schmidt, MMC, Ferreira, *Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities*, *Talanta*, 144 (2015) 696-703. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.045

- [36] F. Mechmech, H. Chadjaa, M. Rahni, M. Marinova, N. Ben Akacha, F. Gargouri, *Improvement of butanol production from a hardwood hemicelluloses hydrolysate by combined sugar concentration and phenols removal*, *Bioresource Technology*, 192 (2015) 287-295. doi: 10.1016/j.biortech.2015.05.012.
- [37] A. Boussaid, Y. Cai, J. Robinson, DJ. Gregg, Q. Nguyen, JN. Saddler, *Sugar recovery and fermentability of hemicellulose hydrolysates from steam-exploded softwoods containing bark*, *Biotechnology Progress*, 887 (2017) 887-892. doi: 10.1021/bp010092b.
- [38] A. Barakat, F. Monlau, JP. Steyer, H. Carrere, *Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production*, *Bioresource Technology*, 104 (2012) 90-9. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.060.
- [39] Z. Wang, J. Zhuang, X. Wang, Z. Li, Y. Fu, M. Qin, *Limited adsorption selectivity of active carbon toward non-saccharide compounds in lignocellulose hydrolysate*, *Bioresource Technology*, 208 (2016) 195-199. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.072.
- [40] B. Wang, YH. Rezenom, K-C. Cho, JL. Tran, DG. Lee, DH. Russell, *Cultivation of lipid-producing bacteria with lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory compounds of lignocellulosic hydrolysates*, *Bioresource Technology*, 161 (2014) 162-170. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.133.
- [41] PR. Waghmare, AA. Kadam, GD. Saratale, SP. Govindwar, *Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation*, *Bioresource Technology*, 168 (2014) 136-41. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.099.
- [42] TLC Visualization Reagents., EMD Chem (2014)
- [43] J. Heinonen, T. Sainio, *Electrolyte exclusion chromatography using a multi-column recycling process: Fractionation of concentrated acid lignocellulosic hydrolysate*, *Separation and Purification Technology*, 129 (2014) 137-149. doi: 10.1016/j.seppur.2014.03.031.
- [44] B. Rafał, *Corona CAD - nowa jakość w detekcji HPLC*, Lab., (2010) 7-8.
- [45] L-P. Yu., JE. Rollings, *Quantitative branching of linear and branched polysaccharide mixtures by size exclusion chromatography and on-line low-angle laser light scattering detection*, *Journal of Applied Polymer Science*, 35 (1988) doi: 10.1002/app.1988.070350420.