

ANALIZA LIGNOCELULOZNE BIOMASE S FTIR SPEKTROSKOPIJO

QUANTITATIVE ANALYSIS OF LIGNOCELLULOSE BIOMASS BY MEANS OF FTIR SPECTROSCOPY

Maja FRELIH¹, Janja ZULČ¹, Lorna FLAJŠMAN¹

IZVLEČEK

Uporabnost lignocelulozne biomase je odvisna od njene kemične sestave. Standardni analitični postopki za karakterizacijo so zamudni, dragi in operativno zahtevni. Sodobne instrumentalne tehnike, med katere sodi tudi infrardeča spektroskopija (FTIR), omogočajo hitro in enostavno analizo komponent biomase, kot so celuloza, hemiceluloza, različni sladkorji in lignin. V sklopu raziskave smo uporabili tehniko ATR-FTIR za napovedovanje vsebnosti lignina in sladkorjev v vzorcih biomase. Eksperimente smo izvedli s pomočjo umetno pripravljenih zmesi čistih komponent celuloze, lignina, ksiloze in manoze. Z merjenjem višine karakterističnih absorpcijskih vrhov v spektrih v odvisnosti od koncentracije smo izdelali umeritveni krivulji za lignin s koeficientom linearne odvisnosti $R^2 = 0,978$ in za ksilozo z $R^2 = 0,999$. Izračun vsebnosti obeh komponent v referenčni zmesi na osnovi posnetih spektrov je pokazal, da vrednosti odstopajo od teoretičnih za manj kot 15 %, na osnovi česar ugotavljamo, da je spektroskopija ATR-FTIR potencialno zanimiva tehnika za kvantitativno analizo komponent biomase, vendar bo potrebna optimizacija postopka.

Ključne besede: FTIR, infrardeča spektroskopija, kvantitativna analiza, biomasa, celuloza, lignin, ksilozo, manozo

ABSTRACT

The utilization of lignocellulose biomass depends on its chemical structure. Standard analytical procedures for its characterization are time-consuming, expensive and labor-intensive. Modern instrumental techniques, including infrared spectroscopy (FTIR) enable fast and simple analysis of biomass components, e.g. cellulose, hemicellulose, different sugars and lignin. Within our research of biomass composition, we tested the suitability of ATR-FTIR technique for the prediction of lignin and sugar contents. The experiments were carried out by using artificially prepared mixtures of pure cellulose, lignin, xylose and mannose. Calibration curves for lignin and xylose were prepared by measuring the characteristic absorption peak heights as a function of concentration. The obtained linearity coefficient R^2 for lignin was 0.978 and 0.999 for xylose. The calculated content of both components in a reference mixture using spectral data indicated that the values deviated from the theoretical ones by less than 15 %, which made the ATR-FTIR spectroscopy a potentially interesting analytical tool for the quantification of biomass components. However, further optimisation is still needed.

Keywords: FTIR, infrared spectroscopy, quantitative analysis, biomass, cellulose, lignin, xylose, mannose

1 UVOD

V naravi se nahajajo ogromne zaloge lignocelulozne biomase, vendar je tehnološko izkoriščen sorazmerno majhen del. Materiali, kot so npr. invazivne rastline, ostanki kulturnih rastlin po žetvi, ostanki iz kmetijske in lesne predelave ter zeleni odrez, so bogat vir vlaknin, ogljikovih hidratov, lignina, ekstraktivnih spojin in anorganskih snovi. Zato predstavljajo potencialno, alternativno surovino za proizvodnjo celuloze, sladkornih komponent, različnih kemikalij, bioplastike, kompozitnih materialov in biogoriv. Za učinkovito izrabo oz. predelavo razpoložljive biomase je potrebno predhodno okarakterizirati njene morfološke, kemične in fizikalno-mehanske lastnosti, ki narekujejo njeno uporabnost v industriji.

Kemična sestava biomase je odvisna od vrste in starosti rastlinskega materiala, vrste tkiva (stebela, veje, listi, cvetovi, sadeži, korenine), pogojev rasti in časa žetve. Zaradi raznolikosti biomase, načina vzorčenja, pogojev predobdelave in skladiščenja je treba vsak material reprezentativno vzorčiti in izvesti večje število analiz, da dobimo čim bolj realne, povprečne podatke o strukturi snovi. Za kemijsko karakterizacijo celulo-

ze, hemiceluloze, lignina, ekstraktivov in pepela se rutinsko uporabljajo večinoma standardne in uporabne kemijske metode preizkušanja (SIST, EN, ISO, TAPPI, SCAN, ASTM), ki bazirajo na selektivnem razklopu snovi z uporabo ustreznih reagentov. V primeru določanja celuloze, hemiceluloze in lignina, slednje izoliramo kot netopni preostanek in jih gravimetrično ovrednotimo. Tako imenovani klasični postopki so sorazmerno dolgi, pri čemer porabimo precejšnje količine kemikalij, vode in energije, hkrati pa nastajajo odpadni produkti, ki jih moramo odstranjevati. Informacija, ki jo dobimo, je zgolj vsebnost posamezne komponente, ne pa tudi njene kemične lastnosti, npr. vsebnost funkcionalnih skupin v ligninu, sestava hemicelulozne frakcije, ekstraktivov in pepela. Zaradi porabljenega časa in materialnih stroškov so analize biomase po standardnih postopkih drage in zato manj primerne za velike serije vzorcev (1).

Alternativa dolgotrajnim standardnim testom so spektroskopske metode, predvsem infrardeča spektroskopija (FTIR), ki je primerna za kvalitativno in kvantitativno karakterizacijo plinskih, tekočih in trdnih vzorcev. FTIR tehnika je hitra in nedestruktivna, obravnavani materiali pa morajo biti

zgolj mehansko obdelani (sušenje, mletje, homogenizacija). Osnovni princip je interakcija IR-elektromagnetnega valovanja s preiskovano snovjo, pri čemer dobimo karakterističen absorpcijski spekter, na osnovi katerega lahko identificiramo komponente vzorca. Vrhovi v spektru predstavljajo nihanja in vibracije molekulskih vezi, do katerih pride pri interakciji snovi z IR-valovanjem. Tehnika je absolutna, kar pomeni, da so spektri čistih snovi pri enakih eksperimentalnih pogojih ponovljivi. Pri večkomponentnih vzorcih se lahko v določenih delih spektra posamezni spektralni vrhovi komponent prekrivajo, vendar je možno s pomočjo računalniškega procesiranja spektrov identificirati tipične spektralne karakteristike posameznih komponent, kar je tudi osnova za kvantitativno delo, saj je višina oz. površina vrha sorazmerna koncentraciji spojine v vzorcu. Potrebna je kalibracija, ki jo izvedemo s pomočjo standardnih zmesi znanih koncentracij. Spektralno območje snemanja FTIR spektrov se razteza med valovnimi dolžinami 25 in 2,5 μm oz. valovnimi števili med (400 in 4000) cm^{-1} . Tipični IR absorpcijski vrhovi celuloze so (895, 1046, 1161, 1253, 1323, 1375, 1417, 1638, 2916 in 3416) cm^{-1} in lignina (780, 850, 945, 1130, 1220, 1270, 1330, 1425, 1500, 1595, 1655, 1710, 3500) cm^{-1} (1,2).

Čeprav je uporaba FTIR še vedno usmerjena predvsem na proučevanje strukturnih lastnosti biomase, pa je bilo precej raziskav posvečenih tudi kvantitativni določitvi vsebnosti posameznih komponent, in sicer celuloze, hemiceluloze, lignina in ekstraktivov v različnih vrstah biomase. V literaturi smo zasledili primere FTIR-analiz z uporabo KBr tablete in PAS tehnike (fotoakustična spektroskopija) za kvantitativno določanje vsebnosti sladkorjev in lignina v ostankih iz predelave iglavcev (3), koncentracijo lignina, ogljikovih hidratov, ekstraktivov in pepela v slami (4,5), polisaharide (arabino-ksilan) v žitnih otrobih (6), koncentracijo celuloze, hemiceluloze in lignina v slami različnih žitaric (7, 8), koncentracijo lignina v lesu evkaliptusa (9).

Namen preliminarne raziskave je bil ugotavljanje primerčnosti spektroskopije ATR-FTIR za določanje oz. napovedovanje vsebnosti celuloze, hemiceluloze in lignina na osnovi identifikacije karakterističnih absorpcijskih vrhov in kalibracije instrumenta z uporabo zmesi standardnih spojin, saj se tehnika ATR uporablja predvsem za identifikacijo neznanih spojin. Bistveno manj je podatkov o njeni uporabi za kvantitativne namene.

2 MATERIALI IN METODE

Potencial tehnike FTIR z ATR (attenuated total reflection) snemanjem spektra za kvantitativno delo smo testirali na umetno pripravljenih mešanicah celuloze, lignina, manoze in ksiloze z znano vsebnostjo posameznih komponent. Za pripravo mešanic smo uporabili komercialno dostopne kemikalije analizne čistosti.

2.1 Priprava vzorcev

Natančno smo zatehtali določene mase čistih kemikalij, in sicer mikrokristalinične celuloze (MCC), manoze (D+ manozo) in ksiloze (D+ ksilozo) od proizvajalca Fluke ter lignina, pridobljenega po Milox tehnološkem postopku. Pripravili smo mešanice, v katerih se je vsebnost navedenih komponent gibala v območju med 0 % in 100 % (Preglednica 1). Ker velikost delcev vzorca in kontaktna površina s kristalom ATR pri snemanju bistveno vplivata na kakovost spektrov in intenziteto vrhov, smo vse čiste kemikalije in zmesi pred snemanjem spektrov 2 minuti homogenizirali na vibracijskem krogljčnem homogenizatorju Perkin Elmer.

Vzorci umetno pripravljenih zmesi (1–6) smo uporabili za kalibracijo, vzorec 7 pa za preverjanje natančnosti oz. primerčnosti tehnike ATR-FTIR za kvantitativno vrednotenje.

2.2 Snemanje spektrov

Spektre čistih substanc in pripravljenih mešanic smo posneli v tehniki ATR na instrumentu Perkin Elmer Frontier MIR v območju valovnih števil med 4000 cm^{-1} in 400 cm^{-1} . Uporabljen sila na nastavku ATR in kontaktna površina z vzorcem vplivata na

Preglednica 1: Sestava zmesi, uporabljenih za analizo ATR-FTIR
Table 1: Composition of mixtures used for ATR-FTIR analysis

Vzorec	MCC %	Lignin %	D+ manozo %	D+ ksilozo %
1	24,83	25,84	24,70	24,63
2	50,98	0,00	24,49	24,54
3	52,90	22,62	0,00	24,49
4	52,30	24,09	23,61	0,00
5	25,33	0,00	24,89	49,78
6	0,00	51,18	24,07	24,75
7	33,33	33,10	0,00	33,56

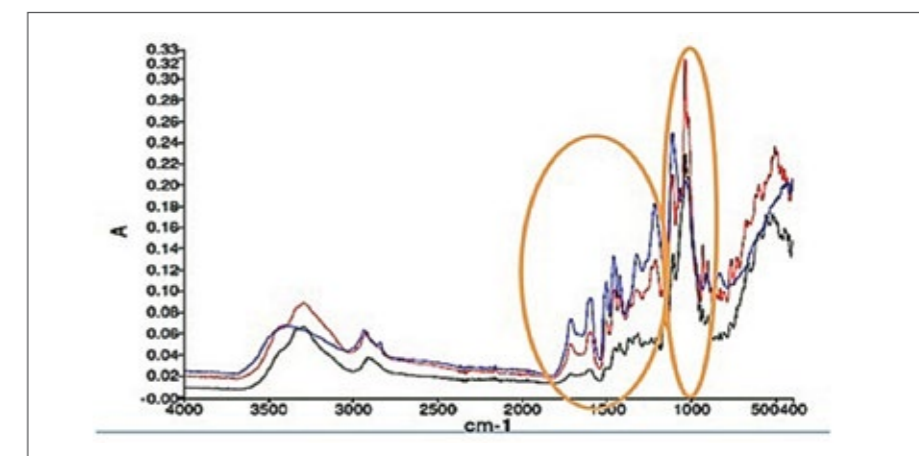
kakovost spektra, zato je treba pri kvantitativnih določitvah zagotoviti enakomerno intenziteto spektralnega signala. V ta namen smo najprej definirali optimalni pritisk, pri katerem je bila intenziteta karakterističnih vrhov v posnetih spektrih najboljša, nakar smo uporabili enak pritisk pri snemanju spektrov mešanic.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

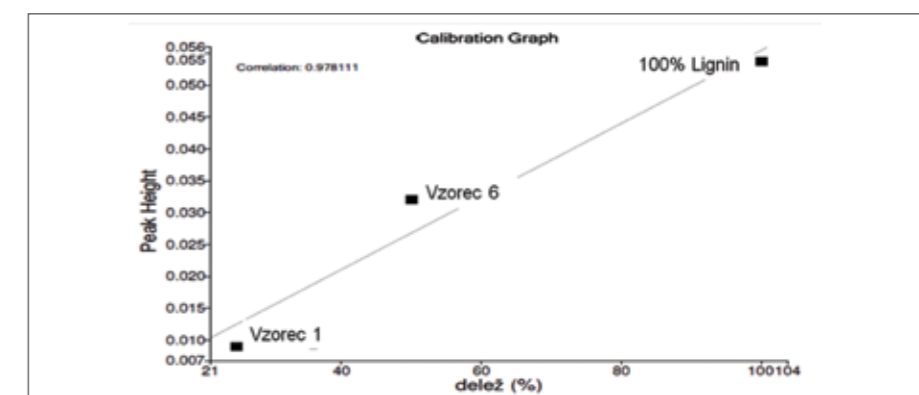
3.1 Umeritvene krivulje za določanje koncentracije lignina

Za pripravo umeritvene krivulje smo posneli spektre dveh različnih mešanic, ki sta vsebovali približno 25 % in 50 % lignina ter

spekter čistega lignina (100 %). Spremljali smo odvisnost višine karakterističnih vrhov lignina od valovne dolžine oz. valovnega števila v spektralnih območjih 1090–1100 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} in 1500–1600 cm^{-1} . Na spektrih je bila vidna razlika v višini karakterističnih vrhov merjenih vzorcev. Višina je linearno sorazmerna koncentraciji komponente v zmesi. Za pripravo umeritvene krivulje smo posneli tri spektre čistega lignina in obeh zmesi. Po korekciji bazne linije smo za statistično obdelavo uporabili povprečne vrednosti izmerjenih višin pri posameznih znanih koncentracijah lignina. FTIR spektri lignina in zmesi (vzorec 1 in 6) so prikazani na sliki 1, umeritvena krivulja pa na sliki 2.



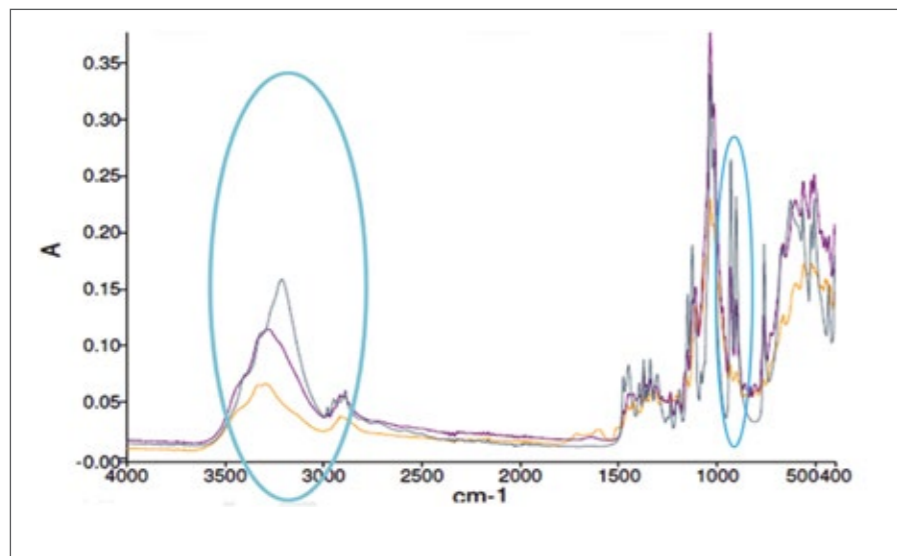
Slika 1: Spektri zmesi 1 (25,84 % lignina) in 6 (51,18 % lignina) in spekter čistega lignina (100%), uporabljeni za kalibracijo
Figure 1: Spectra of mixtures 1 (25.84% of lignin) and 6 (51.18% of lignin,) and spectrum of pure lignin (100%) used for calibration



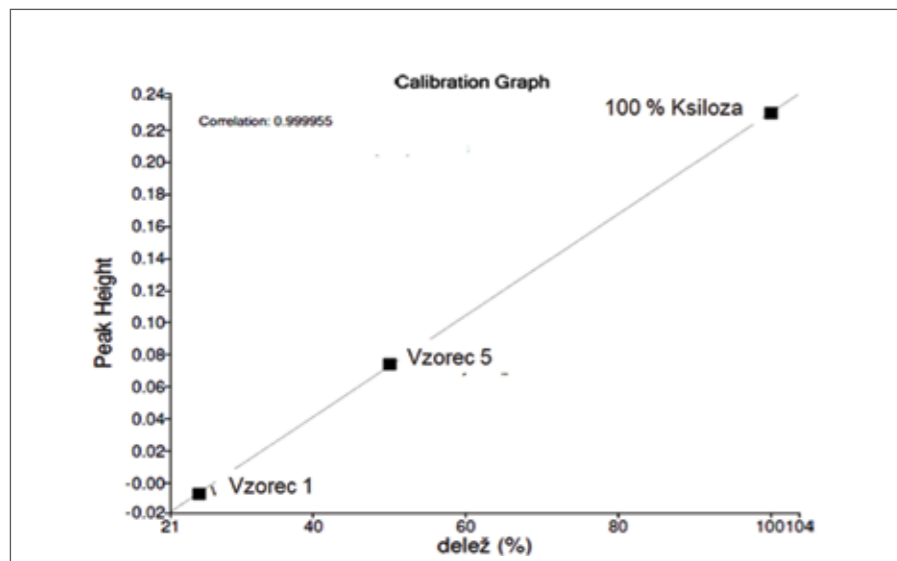
Slika 2: Umeritvena krivulja za kvantitativno napovedovanje vsebnosti lignina
Figure 2: Calibration curve for the quantitative prediction of lignin content

3.2 Umeritvene krivulje za določanje koncentracije ksiloze

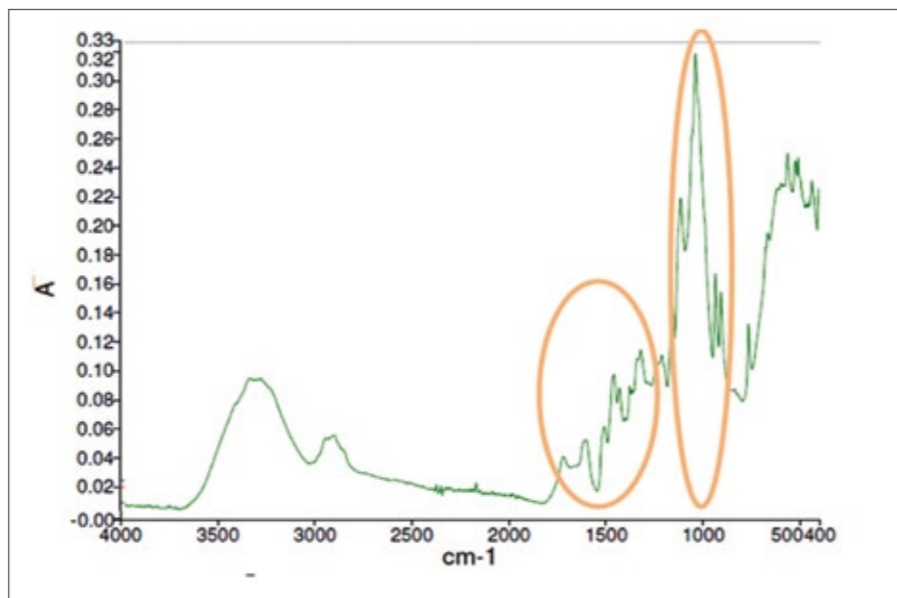
Umeritveno krivuljo za napovedovanje koncentracije ksiloze smo pripravili na enak način kot v primeru lignina. Posneli smo spektre dveh različnih mešanic, ki vsebujeta približno 25 % in 50 % ksiloze in spekter čiste ksiloze (100 %). Spremljali smo odvisnost višine karakterističnih absorpcijskih vrhov ksiloze od valovne dolžine oz. valovnega števila v območjih 3250–3340 cm⁻¹ in 910–940 cm⁻¹. Na spektrih je bila tudi v tem primeru opazna razlika v višini vrhov ksiloze, in sicer v odvisnosti od koncentracije. Posneli smo po tri spektre čiste spojine in obeh zmesi. Po korekciji bazne linije smo tudi tu za statistično obdelavo uporabili povprečne vrednosti višin vrhov. FTIR spektri ksiloze in zmesi (vzorec 1 in 5) so prikazani na sliki 3, umeritvena krivulja za kvantitativno napovedovanje vsebnosti ksiloze pa na sliki 4.



Slika 3: Spektri zmesi 1 (24,63 % ksiloze) in 5 (49,78 % ksiloze) in čiste D+ ksiloze, uporabljeni za kalibracijo
Figure 3: Spectra of mixtures 1 (24.63 % of xylose) and 5 (49.78 % of xylose), and pure D+ xylose used for calibration



Slika 4: Umeritvena krivulja za kvantitativno napovedovanje vsebnosti ksiloze
Figure 4: Calibration curve for the quantitative prediction of xylose content



Slika 5: Spekter zmesi 7 (33,10 % lignina) uporabljen za napovedovanje koncentracije lignina in testiranje postopka
Figure 5: Spectrum of mixture 7 (33.10 % of lignin) used for the prediction of lignin content and procedure testing calibration

Vzorec 7 z vsebnostjo 33,33 % celuloze, 33,10 % lignina in 33,56 % ksiloze smo uporabili za preverjanje ustreznosti kalibracije. Obravnavali smo ga kot neznan vzorec, ki je služil kot referenca pri oceni pravilnosti postopka za napovedovanje sestave vzorcev biomase s pomočjo priprave umeritvenih krivulj, upoštevajoč višine karakterističnih vrhov v FTIR spektru (slika 2 in 4). Postopali smo na enak način kot v primeru priprave umeritvenih krivulj, posneli smo tri spektre in po korekciji bazne linije spektrov izračunali povprečne vrednosti višin odgovarjajočih, karakterističnih vrhov. Iz umeritvenih krivulj, ki so premice in podajajo zvezo med koncentracijo komponente v zmesi in višino spektralnega vrha, smo s pomočjo računalniškega programa izračunali vsebnost lignina in ksiloze v pripravljene zmesi.

3.3 Izračun vsebnosti lignina v umetno pripravljene zmesi

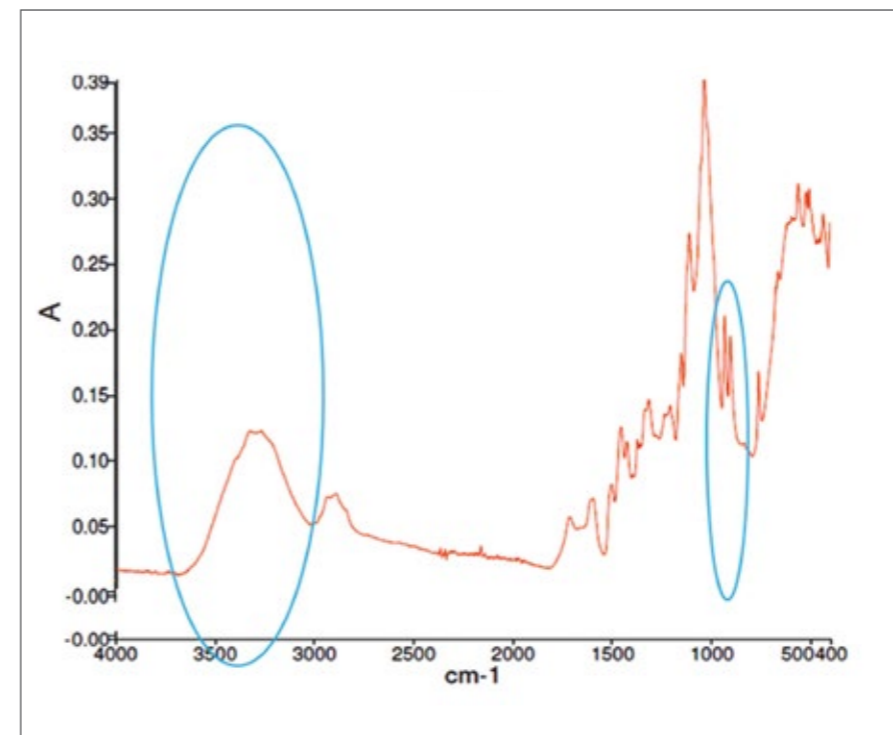
Na sliki 5 je prikazan spekter vzorca 7 (preglednica 1). Iz umeritvene krivulje za napovedovanje vsebnosti lignina (slika 2) smo izračunali vsebnost lignina, in sicer je ta znašala 38 %, medtem ko je njegova dejanska koncentracija v zmesi 33,10 %. Razlika med realno in napovedano vrednostjo je 12,8 %. Vrednost koeficienta linearnosti umeritvene krivulje za lignin je 0,978.

3.4 Izračun vsebnosti ksiloze v umetno pripravljene zmesi

Na sliki 6 je spekter zmesi 7 (preglednica 1). Iz umeritvene krivulje za napovedovanje koncentracije ksiloze (slika 4) smo izračunali, da znaša vsebnost ksiloze v zmesi 37,7 %, medtem ko je njena dejanska koncentracija, ki smo

jo pripravili, 33,56 %. Na osnovi obeh regresijskih enačb oz. umeritvenih premic s koeficientom linearnosti za lignin 0,978 in ksiloze 0,999 ugotavljamo, da lahko s tehniko ATR-FTIR dobimo absorpcijske spektre zmesi spojin z ustrezno kakovostjo karakterističnih signalov, ki omogoča razvoj kvantitativnih metod za hitro in nedestruktivno analizo lignocelulozne biomase. Odstopanje

je tehniko možno uporabljati tudi za napovedovanje sestave lignocelulozne biomase. Postopek bo treba še naprej razvijati in ugotoviti vpliv vlage in velikosti delcev ter določiti optimalno število posnetih spektrov in spektralno ločljivost. FTIR spektroskopska analiza predstavlja velik potencial kot nadomestilo za časovno zamudne in drage molekularne metode.



Slika 5: Spekter zmesi 7 (33,10 % lignina) uporabljen za napovedovanje koncentracije lignina in testiranje postopka
Figure 5: Spectrum of mixture 7 (33.10 % of lignin) used for the prediction of lignin content and procedure testing calibration

napovedanih oz. izračunanih vrednosti od teoretičnih, in sicer 12,8 % v primeru lignina in 12,3 % v primeru ksiloze, je sprejemljivo, zato je metoda primerna tudi za kvantitativno napovedovanje vsebnosti strukturnih komponent biomase. Te vrednosti bo možno še bolj približati teoretičnim z optimiranjem pogojev snemanja in ustrezno matematično obdelavo podatkov, dobljenih na osnovi ATR-FTIR spektrov.

4 SKLEPI

ATR-FTIR infrardeča spektroskopija v srednjem območju valovnih dolžin je najhitrejša tehnika določanja sestave vzorcev organskih in anorganskih snovi. Je preprosta za rokovanje in primerna za direktno karakterizacijo vzorcev, in sicer brez uporabe zahtevnejših postopkov predpriprave, kot so npr. ekstrakcija, derivatizacija in raztapljanje. FTIR spektri so ponovljivi, zato obstajajo obsežne podatkovne baze, na osnovi katerih lahko s primerjavo s spektri čistih spojin identificiramo sestavo vzorcev. Prvi preliminarni poskusi kvantifikacije komponent biomase so pokazali, da

ZAHVALA

Delo je bilo opravljeno znotraj razvojno-raziskovalnega programa CELKROG »Izkoriščanje potenciala biomase za razvoj naprednih materialov in bio-osnovanih produktov«, ki je sofinanciran s strani Republike Slovenije, Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport in Evropske unije, Evropski sklad za regionalni razvoj 2016–2020.

5 LITERATURA

- ZULE, J., FRELIH, M., FLAJSMAN, L. Rastlinska biomasa – možni alternativni vir papirnih vlaken. *Papir* 2017, vol. 45, št. 2, str. 34–37
- XU, F., YU, J., TESSO, T., DOWELL, F., WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, 2013, vol. 104, str. 801–809
- HAMES, B.R., THOMAS, S.R., SLUITER, A.D., ROTH, C.J.. Rapid biomass analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, vol. 105, str. 5–16
- TUCKER, M.P., NGUYEN, Q.A., EDDY, E.P., KADAM, K.L., GEDVILAS, L.M., WEBB, J.D. Fourier transform infrared quantitative analysis of sugars and lignin in pretreated softwood solid

residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 91, str. 51–614.

5. TAMAKI, J., MAZZA, G. Rapid determination of carbohydrates, ash and extractives contents of straw using attenuated total reflectance Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, št. 12, str. 6346–6352

6. TAMAKI, J., MAZZA, G. Rapid determination of lignin content of straw using Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, št. 2, str. 504–512

7. ROBERT, P., MARQUIS, M., BARRON, C., GUILLON, F., SAULNIER, L. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, št. 2, str. 7014–7018

8. ADAPA, P.K., TABIL, L.G., SCHOENAU, G.J., CANAM, T., DUMONCEAUX, T. Quantitative analysis of lignocellulosic components of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 2011, vol. 1, št. 1, str. 177–188

9. RODRIGUES, J., FAIX, O., PEREIRA, H. Determination of lignin content of Eucalyptus globulus wood using FTIR spectroscopy. *Holzfor-schung*, 1998, vol. 52, št. 1, str. 46–50

Maja Frelih, dr. Janja Zule, Lorna Flajšman
Inštitut za celulozo in papir Ljubljana

Paper
precious
natural
renewable
innovative
essential
Paper is
precious natural
innovative essential
natural renewable precious
essential innovative
natural essential
innovative precious
renewable
The Values of Paper