

Enzymatická hydrolýza bele topoľového dreva predspracovaného zmrazovaním: vplyv trvania enzymatickej hydrolýzy a času zmrazovania

*Štefan Boháček, Vladimír Ihnát, Jozefína Gallová, Andrej Pažitný, Albert Russ

Výskumný ústav papiera a celulózy, Bratislava

bohacek@vupc.sk

Abstrakt

Predmetný článok sa zaoberá vplyvom dĺžky trvania enzymatickej hydrolýzy a času zmrazovania na celkový výťažok monosacharidov z bele topoľového dreva predupravovaného zmrazovaním pri -20°C . Experimentálne porovnanie sa uskutočnilo na frakcii pilín do 0,7 mm nasýtených vodou, nasýtených vodou so 6% zanáškou NaOH a pilín nasýtených vodou so zanáškou 2% Na_2CO_3 a 8% NaOH. Výťažok glukózy a xylózy ako aj množstvo kyseliny octovej boli sledované pri 6, 24, 48, 72 a 96 hod trvania enzymatickej hydrolýzy pri 15% zanáške enzýmu na celkový vstupný obsah celulózy. Vplyv doby trvania zmrazovania bol určený pre štyri zvolené časy (1,5, 3, 24 a 48 hod) pre efektívny čas 48 hod enzymatickej hydrolýzy. Maximálny výťažok glukózy ($45,3 \text{ g.l}^{-1}$) a xylózy ($23,4 \text{ g.l}^{-1}$) bol zistený pri 6% zanáške NaOH s 96 hod enzymatickou hydrolýzou, pričom sa preukázalo, že predlžovanie doby zmrazovania po úplnom vytvorení kryštálov ľadu nemá ďalší vplyv na zvyšovanie výťažku monosacharidov, t.j. nezvyšuje enzymatickú prístupnosť holocelulózy.

Kľúčové slová: Predspracovanie, zmrazovanie, *Populus alba*, monosacharidy, frakcia dreva.

Úvod

Z celosvetovo publikovaných experimentálnych prác je evidentné, že fáza predúpravy pred enzymatickou hydrolýzou pre získavanie II. generácie chemických produktov z lignocelulóзовých zdrojov sa začína segmentovať v dvoch polohách. V prvej polohe sa jedná o výber substrátu, a to buď ľahšie spracovateľného akým je bylinná slama alebo ťažšie spracovateľného a tým je drevná hmota. Druhá poloha je záležitosť účinnosti rôznych metód predspracovania.

Výskumný ústav papiera a celulózy v Bratislave venuje problematike náležitú pozornosť už od roku 2016 výskumom progresívnych metód predspracovania akými sú parná explózia (Russ et al. 2016) alebo parná extrúzia (Gigac et al. 2017a,b) alebo ich vzájomnému porovnávaniu (Pažitný et al. 2019c). Na výskum predspracovania pšeničnej slamy (Brezániová et al. 2016) nadväzuje Pažitný et al. (2019a) svojim výskumom v oblasti spracovania drevnej substancie. V práci Pažitný et al. (2019b) boli hodnotené rozdiely v enzymatickej akcesibilite rozličných druhov lignocelulóзовých materiálov. Práce po roku 2020 sú už venované výlučne drevnému substrátu. V práci Pažitný et al. (2020) sa autori venujú rozdielom v beľovej a jadrovej časti dreveniny *Populus alba* s porovnaním jednoročného výmladku toho istého druhu.

Cieľom tohto článku je predstaviť nepublikované výsledky ďalšej metódy predspracovania dendromasy/biomasy a tou je kryolýza. Malé kryštály ľadu na mikro a nano úrovni sa tvoria v lúmenoch vodou dokonale naimpregnovanej biomasy a zväčšovaním objemu pri zmene skupenstva a ostrými hranami rastúcich kryštálikov zároveň spôsobujú deštrukciu v substráte (Boháček et al. 2020). Ciele súčasného výskumu sú zamerané na vplyv kinetiky procesu zmrazovania na efektívnosť následných procesov hydrolýzy celulózy a hemicelulóz, ale ucelená teória stále chýba. Väčšina publikovaných prác ako použitý substrát uvádza slamu poľnohospodárskych plodín: ryžovú slamu (Chang et al. 2011, Deng et al. 2018), pšeničnú slamu (Wang et al. 2013), jačmennú slamu (Roony et al. 2017) alebo kukuričné kôrovie a stonky (Echeverria et al. 2018, Yuan et al. 2019, Li et al. 2019a). Ďalším substrátom, v podstate v tej istej kategórii, sú trávy, ktoré autori podrobili zmrazovaniu, a to switchgrass (*Panicum virgatum*) (Yang et al. 2009) alebo sitina (*Juncus maritimus*) (Smichi et al. 2016). V aplikačnej časti výskumu VÚPC boli podané dve patentové prihlášky. Boháček et al. (2014) opísal metódu predspracovania opakovaným zmrazovaním a rozmrazovaním a kontrolovaným zmrazovaním kombinovaným s mechanickým predspracovaním Pažitný et al. (2016) za účelom otvorenia kryštalickej štruktúry celulózy a zväčšenia mernej povrchovej plochy vybraných druhov lignocelulózových materiálov pre sprístupnenie hydrolytickými enzýmami. Pre kompaktniejšiu drevnú hmotu mnohí autori kombinujú zmrazovanie s anorganickými rozpúšťadlami. Jeong et al. (2016) študoval efekt zmrazovania na mongolský dub (*Quercus mongolica*), ktorý bol upravený 1% H₂SO₄, Li et al. (2019b) skúmal predúpravu kombinovaného zmrazovania a rozmrazovania (-20°C and 20°C) s prídavkom amoniaku (NH₃) a Su and Fang (2017) použili prídavok NaOH.

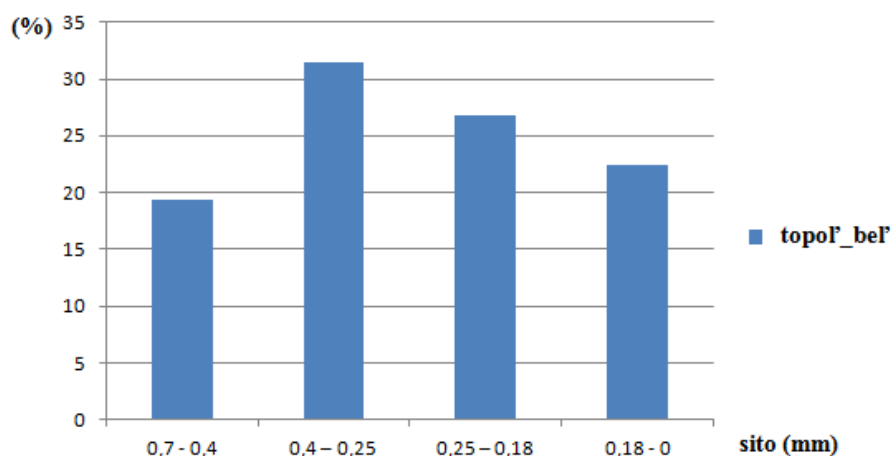
V predkladanom experimente sme jednostupňové zmrazovanie kombinovali so 6% prídavkom NaOH na objem obsiahnutej vody a porovnávali so vzorkou nasýtenou tým istým objemom vody bez hydroxidu. Pri ďalšej vzorke sme významnú časť silného rozpúšťadla nahradili Na₂CO₃, čo je proces šetrnejší k drevnéj hmote (Balberčák et al. 2018).

1. Závislosť výťažkov monosacharidov od času trvania enzymatickej hydrolýzy

Na experimentálne vyšetrenie závislosti výťažkov monosacharidov od času trvania enzymatickej hydrolýzy bola použitá drevina topoľ z lokality Bratislava. Výrez z 12 ročného dreva mal farebne výrazne odlišenú bel' od jadra. Vzorka bola získaná v mesiaci november. Výrez bol spracovaný na hobliny hrúbky do 0,3 mm. Hobliny boli prirodzene sušené pri bežnej laboratórnej teplote 20°C viac ako dva mesiace. Hobliny boli mleté na nožovom mlyne Brabender so spodným sitom 0.7 mm. Celkovo sme získali okolo 250 g svetlej frakcie 0.7 mm bele topoľa (*Populus Alba*). Sitovými testami bola definovaná jej frakcia na vzorke 50 g (Tab.1, Obr. 1).

Tab. 1: Sitové testy topoľového dreva (bel') mletého na nožovom mlyne so spodným sitom 0,7 mm.

sito (mm)	0,7 - 0,4	0,4 - 0,25	0,25 - 0,18	0,18 - 0	spolu
topoľ- bel'	9,7 g	15,7 g	13,4 g	11,2 g	50,0 g



Obr. 1: Frakčné zloženie pilín topoľového dreva (percentuálne zastúpenie).

Na sušinových váhach Denver IR 35 bola stanovená sušina vzorky 94,2%. Na kvantifikáciu jednotlivých zložiek dreva - lignín, celková holocelulóza a celulóza (Tab. 2) boli použité bežné analytické metódy. Klasonov lignín bol stanovený metódou podľa T 222 om-98, lignín rozpustný v kyseline podľa Tappi UM 250. Wiseho metóda sa použila na stanovenie holocelulózy a ISO 692 na stanovenie celulózy. Pritom holocelulóza zahŕňa vo vode nerozpustné vlákna, ktoré sú chemicky tvorené z celulózy hydrolyzovateľnej na glukózu a hemicelulózy hydrolyzovateľných na rôzne hexózy a pentózy.

Tab. 2: Chemické zloženie topoľového dreva (bel').

	Holocelulóza	Celulóza	Lignín
		(%)	
topoľ- bel'	75,3	49,9	21,5

Pre experimentálne porovnanie bolo zvolené zmrazovanie pilín nasýtených iba vodou, pilín nasýtených vodou so zanáškou NaOH a pilín nasýtených vodou so zanáškou Na₂CO₃ a NaOH:

- 12,5 g a.s. pilín + 86,7 ml H₂O
- 12,5 g a.s. pilín + 6% zanáška NaOH
- 12,5 g a.s. pilín + 2% zanáška NaOH + 8% zanáška Na₂CO₃

Impregnácia vzorky sa uskutočnila vodou, pričom cieľom bolo dosiahnuť minimálne nasýtený stav buniek pred zmrazovaním. Vzorky boli máčané v neupravenej vode o izbovej teplote v množstve, ktoré sa zistilo tak, že vzorka už nebola schopná postupne pridávanú vodu absorbovať ani v priebehu dostatočne dlhého časového intervalu. Nadbytočná voda zostala do vzorky viditeľne nevsiaknutá. Vzorky boli pripravené v uzavretých PET sáčikoch a vložené do Shaker-inkubátora na **24 hod** pri teplote **60°C**. Následne boli vzorky vybraté a voľne uložené na laboratórnom stole, aby sa teplota ustálila a následne boli vložené na 24 hod do chladničky s teplotou 2°C. Vzorky boli premiestnené do mraziaceho boxu s teplotou -20°C na 48 hod. Vzorky boli vybraté a nechali sa pri bežnej izbovej teplote rozmraziť po dobu 24 hod.

Na **enzymatickú hydrolýzu** sa použil Cellic CTec2 od spoločnosti Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark) priamo určený na degradáciu lignocelulózových materiálov na fermentovateľné monosacharidy. Aktivita enzýmu bola laboratórne stanovená na 1.700 BHU/g. Zanáška enzýmu predstavovala 15%. Vzorky boli uložené v plastových uzavretých bankách a vložené do inkubátora s vyhrievaním na 50°C a otáčkami 150 min⁻¹. Odoberanie vzoriek sa uskutočnilo po 6 hod, 24 hod, 48 hod, 72 hod, 96 hod.

Koncentrácia monosacharidov a inhibítorov bola stanovená pomocou procedúry National Renewable Energy Laboratory (Sluiter et al. 2008). Monosacharidy (glukóza, xylóza) a inhibítor (kyselina octová) boli stanovené použitím metódy HPLC (High performance liquid chromatography) s kolónou Rezex ROA (organic acid) H⁺ column. Mobilná fáza predstavovala 0.005 N, prietok kyseliny sírovej 0.5 ml/min pri teplote do 30°C. Chromatografické dáta boli spracované softvérom Clarity version 5.3.0.180 (DataApex Ltd., Česká republika).

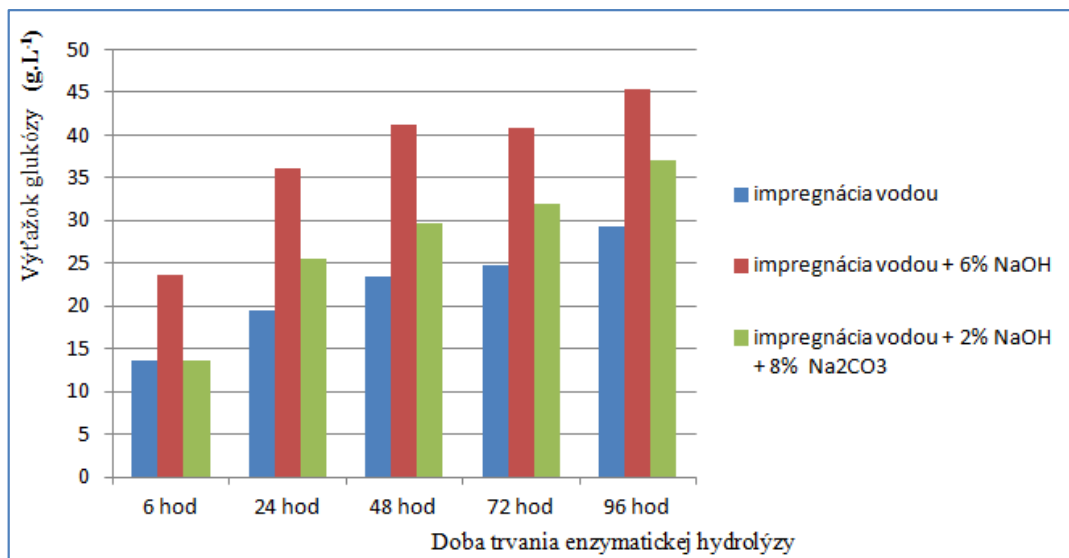
Namerané hodnoty

Výťažky glukózy a xylózy a obsah vznikajúceho inhibítora (kyseliny octovej) zistené metódou HPLC sú uvedené v Tab. 3. V poslednej časti tabuľky sú uvedené hodnoty namerané autormi Pažitný et al. (2020) pri predspracovaní tej istej suroviny parnou explóziou pri 205°C.

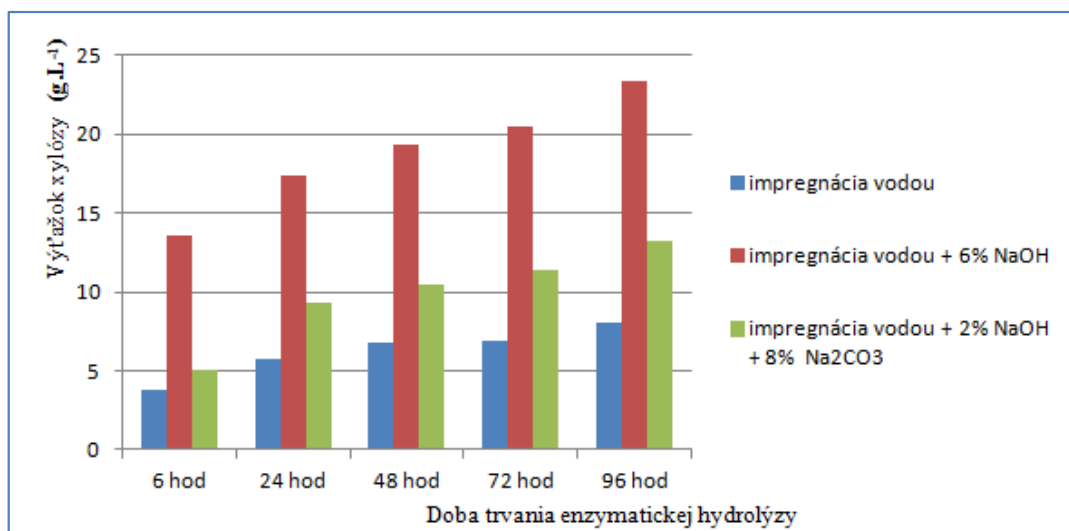
Tab. 3: Výťažky monosacharidov a obsah inhibítora z hydrolyzátov topoľových pilín (beľ frakcie do 0,7 mm) predúpravených kombinovaním zmrazovania pri teplote -20°C po dobu 48 hod a zanášky 6% NaOH alebo 2% NaOH + 8% Na₂CO₃. Porovnanie s parnou explóziou pri 205 °C.

Vzorka	čas hydrolýzy	6 hod	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
	----- výťažok	(g l ⁻¹)	(g l ⁻¹)	(g l ⁻¹)	(g l ⁻¹)	(g l ⁻¹)
Impregnácia vodou	glukóza	13,7	19,5	23,4	24,8	29,2
	xylóza	3,8	5,8	6,7	6,9	8,0
	<i>monosacharidy spolu</i>	17,5	25,3	30,1	31,7	37,2
	kyselina octová	0,4	0,6	0,7	0,8	0,88
Impregnácia vodou + 6% NaOH	glukóza	23,6	36,0	41,1	40,8	45,3
	xylóza	13,6	17,4	19,3	20,5	23,4
	<i>monosacharidy spolu</i>	37,2	53,4	60,4	61,3	68,7
	kyselina octová	6,9	7,2	6,9	8,0	9,9
Impregnácia vodou + 2% NaOH + 8% Na ₂ CO ₃	glukóza	13,7	25,6	29,7	32,0	37,0
	xylóza	5,1	9,3	10,5	11,4	13,2
	<i>monosacharidy spolu</i>	18,8	34,9	40,2	43,4	50,2
	kyselina octová	4,6	6,1	5,9	5,9	6,5
Parná explózia 205°C (Pažitný et al. 2020)	glukóza	-	65,2	65,7	63,9	-
	xylóza	-	17,2	17,6	18,1	-
	ost. monosacharidy		2,2	1,6	1,6	
	<i>monosacharidy spolu</i>	-	84,6	84,9	83,6	-
	kyselina octová	maximálne 1,7 g/l				

Najvyššia koncentrácia monosacharidov (glukóza $45,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, xylóza $23,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) bola dosiahnutá pri použití 6% NaOH pri 96 hod enzymatickej hydrolýze. Výťažok glukózy (Obr. 2), ale hlavne xylózy (Obr. 3), v tomto prípade významne prevyšuje ich ekvivalenty v porovnaní s len vodou impregnovanou vzorkou ($29,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $8,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Substitúcia NaOH za Na_2CO_3 z dôvodu šetrnejšieho prístupu k drevnej hmote (Balberčák et al. 2018) v tomto prípade nebola dostatočne účinná aj keď v porovnaní s len vodou impregnovanou vzorkou sú výťažky podstatne vyššie. V Tab. 3 je zelenou farbou vyznačená enzymatická hydrolýza 48 hod, ako optimálny čas vzhľadom na ďalší zanedbateľný výťažok monosacharidov.

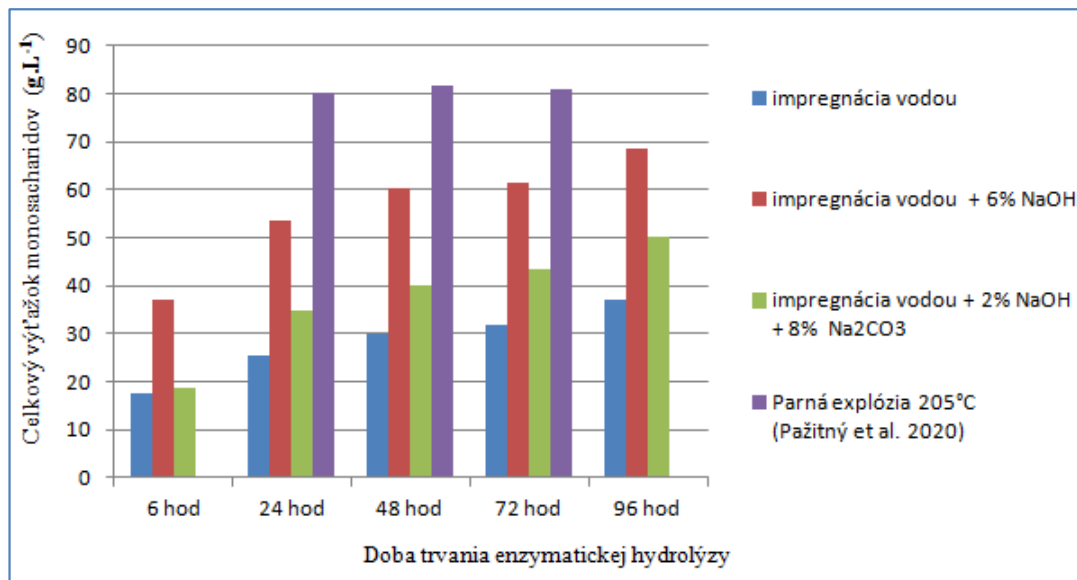


Obr. 2: Vplyv trvania enzymatickej hydrolýzy na výťažok **glukózy** z topoľových pilín (beľ frakcie do 0,7 mm) predúpravených kombinovaním zmrazovania pri teplote -20°C po dobu 48 hod a zanášky 6% NaOH alebo 2% NaOH + 8% Na_2CO_3 .

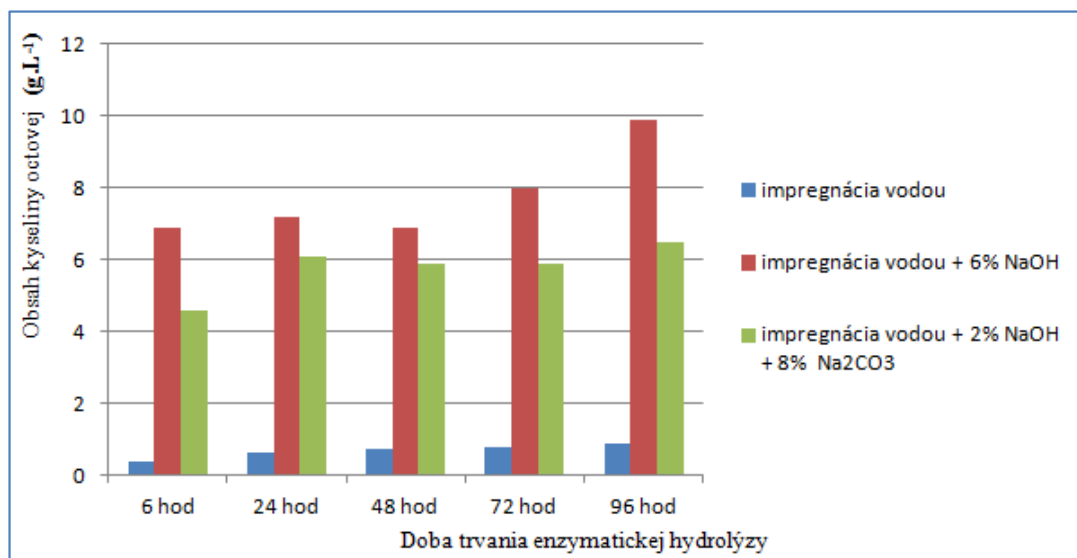


Obr. 3: Vplyv trvania enzymatickej hydrolýzy na výťažok **xylózy** z topoľových pilín (beľ frakcie do 0,7 mm) predúpravených kombinovaním zmrazovania pri teplote -20°C po dobu 48 hod a zanášky 6% NaOH alebo 2% NaOH + 8% Na_2CO_3 .

Porovnanie celkových výťažkov monosacharidov vzhľadom na výsledky dosiahnuté pri parnej explózii (Pažitný et al. 2020) je znázornené na Obr. 4. Dosiahnuté hodnoty pri optimalizovanej 48 hod enzymatickej hydrolyze predstavujú 73% z hodnôt dosiahnutých pri parnej explózii pri 205°C.



Obr. 4: Celkové výťažky monosacharidov v hydrolyzátoch z topoľových pilín (beľ frakcie do 0,7 mm) predúpravených kombinovaním zmrazovania pri teplote -20°C po dobu 48 hod a zanášky 6% NaOH alebo 2% NaOH + 8% Na₂CO₃ v porovnaní s účinnosťou parnej explózie pri 205°C.



Obr. 5: Vplyv trvania enzymatickej hydrolyzy na tvorbu kyseliny octovej v hydrolyzátoch z topoľových pilín (beľ frakcie do 0,7 mm) predúpravených kombinovaním zmrazovania pri teplote -20°C po dobu 48 hod a zanášky 6% NaOH alebo 2% NaOH + 8% Na₂CO₃.

Na obr. 5 je znázornený vývoj kyseliny octovej ako hlavného inhibítora enzymatickej hydrolýzy. Jednoduché zmrazovanie vzorky impregnovanej iba vodou nemá výraznejší vplyv na tvorbu kyseliny octovej (0,4 – 0,88 g.l⁻¹). Jej tvorbu ovplyvňuje veľkosť prídavku NaOH. Substitúcia NaOH za Na₂CO₃ túto skutočnosť mierne zjemňuje.

2. Vplyv doby zmrazovania na celkový výťažok monosacharidov

V ďalšom kroku bol sledovaný vplyv doby zmrazovania na celkový výťažok monosacharidov pri 48 hod enzymatickej hydrolýze, ktorá bola vyhodnotená ako časovo efektívne výhodná doba vzhľadom na ďalší málo významný prírastok vo výťažku spojený s jej predlžovaním. Experiment sa uskutočnil za totožných podmienok pre zanášky:

- 12,5 g a.s. pilín + 6% zanáška NaOH
- 12,5 g a.s. pilín + 2% zanáška NaOH + 8% zanáška Na₂CO₃

Nezmenené zostali 24 hod impregnácia vzoriek, 24 hod chladenie, pričom sa menila iba doba zmrazovania: 1.5 hod, 3 hod, 24 hod. Enzymatická hydrolýza trvala spomínaných 48 hod.

Namerané hodnoty

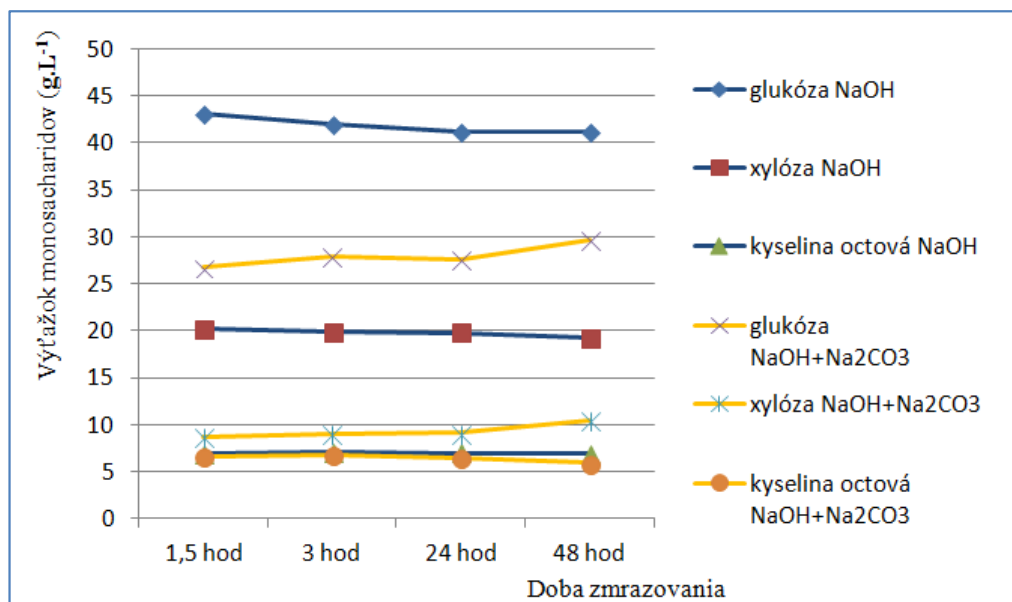
Výťažky glukózy a xylózy ako aj obsah vznikajúcej kyseliny octovej pri kombinovanom zmrazovaní v závislosti od dĺžky zmrazovania je znázornený v Tab. 4.

Tab. 4: Výťažky monosacharidov a obsah inhibítora z hydrolyzátov topoľových pilín (beľ frakcie do 0,7 mm) predúpravených kombinovaním zmrazovania pri teplote -20°C po dobu 48 hod a zanášky 6% NaOH alebo 2% NaOH + 8% Na₂CO₃ počas rôznych dôb trvania zmrazovania.

Vzorka	do <u>ba</u> zmrazovania	1,5 hod	3 hod	24 hod	48 hod
	----- výťažok	(g.l ⁻¹)	(g.l ⁻¹)	(g.l ⁻¹)	(g.l ⁻¹)
Impregnácia vodou + 6% NaOH	glukóza	43,1	42,0	41,2	41,1
	xylóza	20,2	19,9	19,8	19,3
	monosacharidy spolu	63,3	61,9	61,0	60,4
	kyselina octová	6,9	7,0	6,9	6,9
Impregnácia vodou + 2% NaOH + 8% Na ₂ CO ₃	glukóza	26,7	27,9	27,6	29,7
	xylóza	8,7	9,0	9,1	10,5
	monosacharidy spolu	35,4	36,9	36,7	40,2
	kyselina octová	6,6	6,8	6,4	5,9

Z grafického znázornenia vyplýva, že predlžovanie doby zmrazovania pri tej istej teplote (-20°C) neprináša žiadany efekt. Z vedeckého hľadiska zaujímavý je fakt, že krivka vývoja výťažkov pre zanášku s NaOH má mierne degresívny a pre zanášku s Na₂CO₃ mierne progresívny charakter. Deštruktívny účinok je preto možné predpokladať iba pri tvorbe kryštálikov ľadu, čo nastáva pri 0°C až -5°C. Po následnom znížení teploty by sa mali vytvárať kryštálky ľadu v lúmenoch buniek biomasy smerom dovnútra častíc pričom súčasne

dochádza ku zväčšeniu objemu pri fázovej premene vody na ľad v lúmenoch buniek, čo spôsobuje narušenie kryštalickej štruktúry celulózy a zvyšuje jej prístupnosť v následných procesoch hydrolýzy. Tvorba kyseliny octovej pri zanáške NaOH je v podstate konštantná ($6,9 - 7,0 \text{ g l}^{-1}$), rozsah pri zanáške Na_2CO_3 je minimálny ($6,6 - 5,9 \text{ g l}^{-1}$) (Obr. 6).



Obr. 6: Vplyv dĺžky zmrazovania (-20°C) na výťažok monosacharidov v hydrolyzátoch z topoľových pilín (beľ frakcie do $0,7 \text{ mm}$) pri kombinovanej predúprave.

Počas procesu mrazenia je nižšia povrchová teplota v porovnaní s vnútornou časťou lignocelulózy (Chang et al. 2011). Keď teplota pri zmrazovaní klesá, objem voľnej vody v póroch sa rozširuje a molekula vody musí prekonať viskóznú odolnosť a výsledné tlakové gradienty vody majú výrazne poškodiť lignocelulóзовú štruktúru (Chang et al. 2011). K adsorpcii molekuly vody dochádza iba v amorfnej oblasti celulózy, kde viazaná voda vytvára vodíkové väzby s hydroxylovými skupinami. Vnútorný objem lignocelulóзовej štruktúry sa zvýši v dôsledku zníženia súdržnosti, tuhé látky zmäknú a dôjde k napučaniu. Deštrukcia lignocelulóзовej štruktúry nastáva v dôsledku expanzie objemu vody počas zmrazovania (Boháček et al. 2020).

Záver

Podľa súčasných poznatkov kryolýza dendromasy/biomasy predstavuje metódu predspracovania, ktorá pre praktické uplatnenie potrebuje, aby substrát bol okrem vody impregnovaný aj malým prídavkom chemikálií, aby sa prejavil účinok expanzie kryštálikov ľadu. Alkalické rozpúšťadlá v kombinácii s teplotou nízkou pod bodom mrazu predstavujú vhodnú voľbu. Experimentálne vyšetrenie preukázalo celkové výťažky monosacharidov v rozsahu $60,4$ až $68,70 \text{ g l}^{-1}$ pri použití 6% zanášky NaOH a v rozsahu $40,2$ až $50,2 \text{ g l}^{-1}$ pri čiastočnej substitúcii NaOH za Na_2CO_3 . Pre lepšiu predstavu výťažky iba vodou predimpregnovaného substrátu (prekročený bod nasýtenia vlákien, 60°C , 24 hod) sa pohybujú v rozsahu $30,1$ až $37,2 \text{ g l}^{-1}$ a momentálne najprogresívnejšia metóda predúpravy – parná

explózia poskytuje výťažky cez 80 g·l⁻¹. Experimentom bolo potvrdené, že výťažky monosacharidov nie sú ovplyvnené narastajúcou dĺžkou zmrazovania, dôležité je prekročiť časový interval, kedy už dôjde k úplnej tvorbe kryštálov ľadu, ktoré substrát sprístupňujú enzýmom.

PodĎakovanie

„Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV–18–0533.“

Použitá literatúra

1. Balbercak, J., Bohacek, S., Pazitny, A., Ihnat, V., Lubke, H., 2018: Chemical processing of waste wood based agglomerates part II: Evaluation of properties of fluting liners made of semichemical pulp obtained by an alkaline cooking process. *Wood Research* 63(1): 35-44.
2. Boháček, Š., Balberčák, J., Schwartz, J., Pažitný, A., Bombilajová, K., Kuňa, V., 2020: Predspracovanie biomasy kryolýzou. In: Zborník výskumných prác. Január 2020. Centrum pre rozvoj drevárskeho, nábytkárskeho a celulózo-papierenského priemyslu. Bratislava. Str. 15-21. Dostupné online: www.centrumdp.sk.
3. Boháček, S., Fišerová, M., Gigac, J., Pažitný, A., Russ, A., Letko, M., Mikulášik, R., Ihnat, V., 2014: "Metóda zvýšenia prístupnosti lignocelulózových materiálov voči hydrolytickým enzýmom počas výroby biopalív ". Výskumný ústav papiera a celulózy a.s., Bratislava. PA 50076-2014 (IPO SR, 12.12.2014).
4. Brezániová, Z., Fišerová, M., Stankovská, M., Gigac, J., Opálená, E., Puškelová, J., 2016: Effect of prehydrolysis on enzymatic hydrolysis of two-stage pretreated wheat straw. *Wood Research* 61(5): 697-708.
5. Deng, Y., Qiu, L., Yao, Y., Qin, M., 2018: A technology for strongly improving methane production from rice straw: freeze–thaw pretreatment. *RSC Adv.* (8): 22643-22651.
6. Echeverria, C., Bazan, G., Gonzalez, J.S., Lescano, L., Pagador, S., Linares, G., 2018: Pre-treatment by Acidification and Freezing on Corn cob Polymers and its Enzymatic Hydrolysis. *Asian Journal of Scientific* 11 (2): 222-231.
7. Gigac, J., Fišerová, M., Stankovská, M., Pažitný, A., 2017a: Enzymatic hydrolysis of extruded wheat straw with addition of sodium hydroxide and calcium hydroxide. *Wood Research* 62(6): 919-930.
8. Gigac, J., Fišerová, M., Stankovská, M., Pažitný, A., 2017b: Effect of alkaline extrusion pretreatment of wheat straw on filtrate composition and enzymatic hydrolysis. *Wood Research* 62(6): 919-930.
9. Chang, K.L., Thitikorn-amorn, J., Hsieh, J.F., Ou, B.M., Chen, S.H., Ratanakhanokchai, K., Huang, P.J., Chen, S.T., 2011: Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and Bioenergy* 35(1): 90-95.
10. 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* Volume 165: 145-151.

11. Li, J., Wachemo, A.Ch., Yuan, H., Zuo, X., Li, X., 2019a: Natural freezing-thawing pretreatment of corn stalk for enhancing anaerobic digestion performance. *Bioresource Technology* 288: 121518.
12. Li, J., Wachemo, A.Ch. Yu, G., Li, X., 2019b: Enhanced anaerobic digestion performance of corn stalk pretreated with freezing-thawing and ammonia: An experimental and theoretical study. *Journal of Cleaner Production*, Available online 2 November 2019, 119112.
13. Pažitný, A., 2019a: Steam explosion of wood particles from fibreboard and particle board with indirect control by enzymatic hydrolysis. *Acta Chimica Slovaca* 12(2): 185-191.
14. Pažitný, A., Russ, A., Kuňa, V., Balberčák, J., Ihnát, V., Stankovská, M., Boháček, S., Gigac, J., Medo, P., Schwartz, J., 2016: "Metóda zvýšenia výťažku monosacharidov počas výroby biopalív z lignocelulóзовých materiálov", Výskumný ústav papiera a celulózy, a.s., Bratislava. PP 50083 – 2016 (ÚPV SR, 06.12.2016).
15. Pažitný, A., Russ, A., Boháček, Š., Stankovská, M., Ihnát, V., Šutý, Š., 2019b: Various lignocellulosic raw materials pretreatment processes utilizable for increasing holocellulose accessibility for hydrolytic enzymes. Part II. Effect of steam explosion temperature on beech enzymatic hydrolysis. *Wood Research* 64(3): 437-448.
16. Pažitný, A., Russ, A., Boháček, Š., Stankovská, M., Šutý, Š., 2019c: Various lignocellulosic raw materials pretreatment processes utilizable for increasing holocellulose accessibility for hydrolytic enzymes. Part I. Evaluation of wheat straw pretreatment processes. *Wood Research* 64(1): 13-24.
17. Pažitný, A., Russ, A., Boháček, Š., Stankovská, M., Ihnát, V., Šutý, Š., 2020: Effect of steam explosion on enzymatic hydrolysis of various parts of poplar tree. *Wood research* 65(4): 579-590.
18. Rooni, V., Raud, M., Kikas, T., 2017: The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries. *Energy* 139: 1-7.
19. Russ, A., Fišerová, M., Letko, M., Opálená, E., 2016: Effect of steam explosion temperature on wheat straw enzymatic hydrolysis. *Wood Research* 61(1): 65-74.
20. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008: Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO, USA.
21. Smichi, N., Messaoudi, Y., Moujahed, N., Gargouri, M., 2016: Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. *Renewable Energy* 85: 1357-1361.
22. Su, T.CH., Fang, Z., 2017: One-pot microwave-assisted hydrolysis of cellulose and hemicellulose in selected tropical plant wastes by NaOH-freeze pretreatment. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2017, 5, 6: 5166-5174.
23. Wang, X.M., Wang, L.J., Yu, M., Chen, H., 2013: Freeze-thaw and sulfuric acid pretreatment of wheat straw for fermentable sugar release. *Advanced Materials Research* (724-725) : 257-260.
24. Yang, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., Cheng, J., 2009: Saccharification and fermentation of dilute-acid-pretreated freeze-dried switchgrass. *Energy Fuels* 23, 11: 5626-5635.

25. Yuan, H., Lan, Y., Zhu, J., Wachemo, A.Ch., Li, X., Yu, L., 2019: Effect on anaerobic digestion performance of corn stover by freezing–thawing with ammonia pretreatment. Chinese Journal of Chemical Engineering 27(1): 200-207.