

похлорит натрия, отбелка гидроперитом занимает промежуточное место.

ВЫВОДЫ

По результатам проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы:

- увеличение продолжительности отбеливания целлюлозы свыше 4 ч не приводит к какому либо заметному снижению остаточного лигнина. Напротив, в результате длительной отбеливания значительно возрастает количество «пыли» из-за механического измельчения волокон;

- наиболее оптимальной температурой отбеливания, нужно считать 40 °С, поскольку повышение температуры приводит к снижению выхода целлюлозы;

- концентрация щелочи в отбелочном растворе влияет на качественные показатели получаемого продукта;

- показана принципиальная возможность использования для отбеливания гидроперита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотухин В.Н., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. // Химия и технология растительных веществ: Материалы VI Всеросс. конф., Санкт-Петербург, 14-18 июня 2010 г. – Санкт-Петербург: ООО Сборка, 2010. – С. 37.
2. Золотухин В.Н., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. // Синтез и разработка технологии компонентов высокоэнергетических составов и химических продуктов гражданского применения: тезисы докладов научно-технической конференции, посвященной 50-летию отдела 20 ФГУП «ФНПЦ «Алтай» (17-18 июня 2010 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2010. – С. 55-57.
3. П. Лендвел Химия и технология целлюлозного производства / Пер. с немецкого. – М., 1978. – С. 544.
4. В.И. Рощин Отбелка целлюлозы / М.: Лесная промышленность. 1977. – 304 с.
5. Н.Н. Непенин Технология целлюлозы. Очистка, сушка и отбелка целлюлозы. Прочие способы получения целлюлозы 2 изд., Т. 3, М.: Экология. – 1994. – 592 с.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИЭНЗИМНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА НЕТРАДИЦИОННОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Е.А. Макарова, В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов

Учреждение Российской академии наук Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН

В статье приведены результаты исследования ферментативного гидролиза российского мискантуса с использованием мультиэнзимных композиций.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, редуцирующие вещества, мискантус, мультиэнзимные композиции.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия наблюдается резкое увеличение мировых объемов производства этанола для технических нужд («топливный этанол» или «биоэтанол») [1].

Тот факт, что для его производства в подавляющем большинстве случаев используется пищевое сырье [2] делает очень актуальной задачу его производства из непищевого сырья, например, из вторичных продуктов сельского хозяйства – соломы и плодовых оболочек злаков, а также из быстрорастущих культур – мискантуса и др. Использование такого сырья имеет как свои достоинства, так

и свои недостатки. Например, такое сырье не требует значительных затрат для производства, однако химический состав такого сырья делает задачу их переработки в сбраживаемые сахара нетривиальной.

Многочисленные работы в этой области [3, 4] доказывают неоднозначный и сложный механизм гидролиза целлюлозы в виду строгой специфичности к субстрату индивидуальных ферментов. В силу этого для гидролиза необходимо применять мультиэнзимные композиции (МЭК). Получение таких МЭК с одинаково высокой активностью для разных ферментов от одного продуцента невозможно, поэтому нами была предпринята попытка приготовить и изучить влияние смесевых МЭК

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИЭНЗИМНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА НЕТРАДИЦИОННОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

на гидролиз нетрадиционного для России целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) – мискантуса.

Наибольшую привлекательность для составления смесевых МЭК на сегодняшний момент имеют коммерчески доступные ферментные препараты, выпуск которых налажен в большом объеме.

Целью работы является исследование ферментативного гидролиза с использованием различных мультиэнзимных композиций необработанного мискантуса и изучение реакционной способности к ферментации химически обработанного мискантуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлся мискантус китайский (веерник китайский) – отдел *Magnoliophyta*, класс *Liliopsida*, порядок *Poales*, семейство *Poaceae*, род *Miscanthus*, вид *sinensis* Andersson, урожай 2008 года, выращенный на плантациях ИЦиГ СО РАН в Новосибирской области (содержание холоцеллюлозы 65%). Высушенный мискантус был измельчен до размера 0,1-1,0 см.

В работе использовались ферментные препараты: «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск), «Рапидаза ЦР», «БРЮЗАЙМ ВГХ», «Целлолюксил» (поставщик компания «Русфермент», Москва).

Перемешивание реакционной массы осуществляли на платформе ПЭ-6410М с частотой колебания 26 мин⁻¹.

Для ферментации в колбу Эрленмейера емкостью 500 мл помещали 5 г измельченного субстрата, 150 мл ацетатного буфера (рН 4,7) (модуль 1:30) и МЭК. Гидролиз проводили при температуре 50±2 °С, в течение 72 ч при постоянном перемешивании. Через каждые 8 ч отбирали пробу суспензии 2 мл для определения концентрации моносахаров в пересчете на глюкозу.

Концентрацию моносахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрически на «UNICO UV-2804», с использованием динитросалицилового реактива [5, 6].

Для этого были построены калибровочные графики для определения глюкозы, ксилозы и смеси глюкозы и ксилозы в соотношении 1:1. Предварительно глюкоза и ксилоза были высушены в сушильном шкафу в течение 3 ч при температуре 100 °С.

Зависимость оптической плотности от концентрации моносахарида в растворе представлена на рисунке 1.

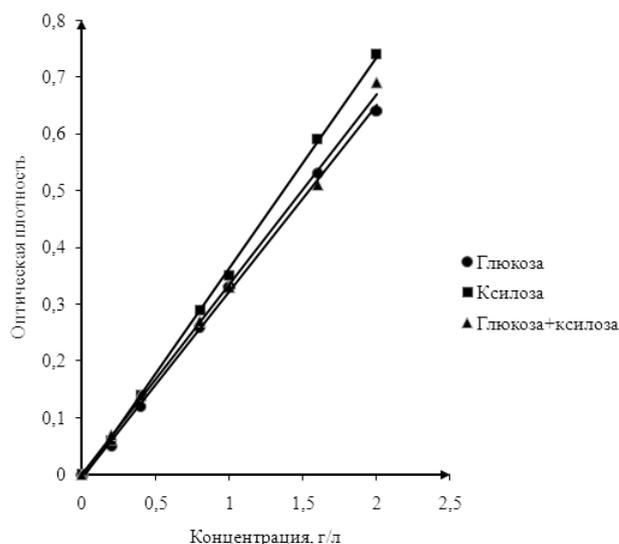


Рисунок 1. Зависимость оптической плотности от концентрации раствора глюкозы, ксилозы и смеси глюкозы и ксилозы

По представленным на рисунке 1 результатам видно, что калибровочные графики на основе глюкозы, ксилозы и смеси глюкозы и ксилозы практически идентичны. Следовательно, при определении редуцирующих сахаров в пересчете на глюкозу в растворе, в котором помимо гексоз могут содержаться и пентозы, отклонение от истинного значения концентрации будет незначительным.

По окончании процесса реакционную смесь фильтровали и в гидролизате определяли концентрацию редуцирующих веществ до инверсии и после инверсии по методу Бертрана [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По определению Клесова А.А. ферментная система (целлюлазный комплекс), катализирующая гидролитическое расщепление целлюлозы и ее производных до глюкозы, состоит из карбогидраз четырех типов:

- 1) эндо-1,4-β-глюканаз (1,4-β-D-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.4);
- 2) экзо-1,4-β-глюканаз (экзо-целлобиогидролаза или 1,4-β-D-глюкан-целлобиогидролаза, КФ 3.2.1.91);
- 3) экзо-1,4-β-глюкозидаз (1,4-β-D-глюкан-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.74);
- 4) целлобиаз (β-глюкозидаза или β-D-глюкозидглюкогидролаза, КФ 3.2.1.21).

Исходя из этого, общую схему ферментативного гидролиза целлюлозы можно представить в следующем виде (рисунок 2):



Рисунок 2. Постадийная схема гидролиза целлюлозсодержащего субстрата: где S – исходный субстрат, G_n – целлоолигосахариды (продукты статистического гидролиза целлюлозы), G₂ – целлобиоза и G – глюкоза

В зависимости от физического состояния исходного субстрата G_n может представлять собой либо частично деструктурированную нерастворимую целлюлозу с относительно низкой степенью полимеризации по сравнению с исходным нерастворимым субстратом, либо набор замещенных целлодекстринов [8].

Ранее было показано авторами [9], что ферментативный гидролиз ЦСС с использованием товарных ферментных препаратов, обладающих целлюлолитической активностью, приводит к значительному накоплению РВ в гидролизате. Однако моносахариды в таком растворе в значительном количестве не накапливаются, так как в составе такого препарата отсутствуют ферменты, расщепляющие олигосахариды до пентоз и гексоз.

Для повышения выхода сбраживаемых сахаров (глюкозы) в настоящей работе были составлены МЭК из товарных ферментных препаратов и исследовано их влияние на увеличение степени конверсии одного и того же субстрата.

В таблице 1 представлены ферментативные активности препаратов, которые использовались в данной работе.

Таблица 1

Ферментативные активности индивидуальных ферментных препаратов

| Наименование препарата | Ферментативная активность |
|---|--|
| Целлолюкс-А (препарат стандартизирован по целлюлазе) | Целлюлазная: 2000±200 ед/г; Ксиланазная: 8000 КС; β-Глюканазная: 1500 β-ГлС; |
| Брюзайм ВГХ (препарат стандартизирован по гемицеллюлазе) (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>) | Ксиланазная: 6500 + 5% ед КС/см ³ ; β-Глюканазная: 1700 + 5% ед β-ГлС/см ³ ; Целлюлазная: 1500 ед. + 5% ед КМЦ/см ³ |
| Целлолюксил (препарат стандартизирован по целлюлазе) | Целлюлазная: 7000 ед. КМЦ/мл; Ксиланазная: 1500-2000 ед КС/мл; β-Глюканазная: 390 β-ГлС/мл; |
| Рапидаза ЦР (препарат стандартизирован по пектиназе) (<i>Aspergillus niger</i> .) | Высокая пектолитическая активность |

Таблица 2

Состав МЭК, использованных для ферментативного гидролиза

| Номер композиции | Состав композиции |
|------------------|--|
| 1 | 0,086 г препарата «ЦеллоЛюкс-А» + 0,75 мл препарата «Рапидаза ЦР» |
| 2 | 0,75 мл препарата «Брюзайм ВГХ» + 0,75 мл препарата «Рапидаза ЦР» |
| 3 | 0,086 г препарата «Целлолюкс-А»+ 0,75 мл препарата «Брюзайм ВГХ»+0,75 мл препарата «Рапидаза ЦР» |

Таблица 3

Химический состав необработанного мискантуса

| Компонент | Массовая доля, % |
|-----------|------------------|
| гексозы | 40,2 |
| пентозы | 22,4 |
| лигнина | 24,4 |
| другого | 13,0 |

Гидролиз мискантуса проводился с использованием, как индивидуальных ферментных препаратов, так и МЭК полученных на их основе.

Сравнение внешнего вида необработанного мискантуса и полученной после фермен-

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИЭНЗИМНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА НЕТРАДИЦИОННОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

тативного гидролиза твердой фазы показали, что мискантус до гидролиза представлял жесткие пластинки, а после ферментации они стали мягкими на ощупь и длительное время не высыхали на воздухе. Вероятнее всего это связано с тем, что часть сахаров осталась в субстрате, поскольку промывка твердого остатка, после фильтрования гидролизата не проводилась. По этой же причине результаты определения концентрации сахаров в гидролизате могут быть занижены.

Результаты исследования ферментативного гидролиза представлены на рисунке 3 в виде зависимостей концентрации глюкозы от продолжительности ферментации.

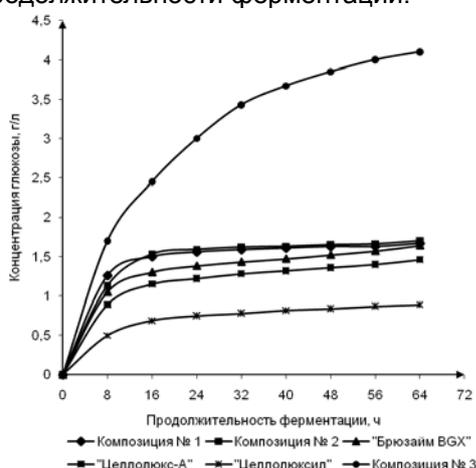


Рисунок 3. Зависимости концентрации глюкозы от продолжительности ферментативного гидролиза мискантуса

При сравнении результатов, полученных с использованием индивидуальных ферментных препаратов видно, что «Целлолюкс А» показал скорость гидролиза выше в два раза, чем «Целлолюксил», несмотря на более низкую целлюлазную активность (2000 ед и 7000 ед.): концентрации глюкозы через 10 ч достигли 1,0 г/л и 0,5 г/л соответственно.

Более высокую скорость гидролиза и заметное накопление глюкозы в гидролизате (1,25 г/л через 10 ч) при использовании индивидуального препарата «Брюзайм ВGX», на наш взгляд, можно объяснить природой препарата, который позиционируется как гемичеселлюлаза.

Принимая во внимание содержание гemicеллюлозы в субстрате [11], вполне логично выглядит скорость гидролиза субстрата.

Поскольку гидролиз сырья в присутствии «Целлюксилла» (7000 ед.) происходит с самой низкой скоростью и глюкозы накапливается меньше всего, этот препарат для составления МЭК не был использован. Сравнение результатов гидролиза, полученных с МЭК (компо-

зиция № 1 и композиция № 2) и индивидуальных препаратов, как и ожидалось, показывает преимущество именно композиций: концентрации глюкозы через 10 ч достигают уже 1,5 г/л. Причем при использовании различных препаратов целлюлазы скорости и количества накопленной глюкозы практически одинаковы в течение 72 ч гидролиза.

МЭК 3 (композиция № 3) показала наибольшую начальную скорость гидролиза субстрата и самое высокое содержание глюкозы в гидролизате по сравнению с индивидуальными препаратами и МЭК, составленными из двух препаратов. Концентрация глюкозы через 10 ч гидролиза составляет 2,0 г/л и продолжает дальше возрастать в отличие от композиций 1 и 2 и, тем более, индивидуальных препаратов, действие которых через 16 ч становится минимальным, и накопление глюкозы выходит на плато. Поскольку зависимость концентрации глюкозы от продолжительности гидролиза в случае МЭК 3 имеет совершенно иной характер, то, очевидно, что составленная из трех препаратов ферментативная система (целлюлазный комплекс) наиболее близка к оптимальному для мискантуса.

На рисунке 4 представлены результаты определения концентрации глюкозы, РВ до и после инверсии через 72 ч гидролиза (по окончании процесса) в экспериментах с индивидуальными ферментативными препаратами и МЭК на их основе.

Как следует из рисунка 4, индивидуальный препарат «Брюзайм ВGX» превзошел по активности «Целлолюксил» и обеспечил минимальную разницу между концентрациями редуцирующих веществ до и после инверсии (1,65 и 1,65 г/л) в отличие от «Целлолюкс-А» (1,63 и 1,80 г/л).

Использование мультиэнзимных композиций № 1 и 2 привели к увеличению концентрации РВ после инверсии (2,64 и 2,67 г/л) в сравнении с индивидуальными препаратами.

Но наибольшая концентрация как моносахаров, так и РВ, наблюдается при использовании МЭК № 3: 4,1 г/л и 7,0 г/л, что соответствует выходу РВ после инверсии 21 % (от массы субстрата) или 33 % (от суммы гексоз и пентоз мискантуса). Полученные результаты позволяют предположить, что использование МЭК № 3 для ферментации предобработанного мискантуса позволит получить высокий выход сбраживаемых сахаров.

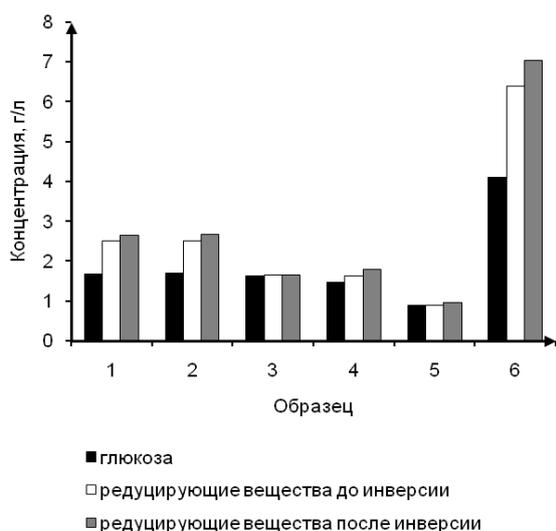


Рисунок 4. Концентрация глюкозы, РВ до и после инверсии в гидролизатах мискантуса через 72 ч ферментации: 1 – композиция № 1; 2 – композиция № 2; 3 – «Брюзайм ВГХ»; 4 – «Целлолюкс-А»; 5 – «Целлолюксил»; 6 – композиция № 3

Еще одним этапом работы было исследование ферментации индивидуальным препаратом «Брюзайм ВГХ» химически обработанного мискантуса в продолжение ранее проведенных работ по изучению ферментации продуктов химической переработки мискантуса с использованием «Целлолюкс-А» [9].

Технические целлюлозы были получены на опытно-промышленной установке с вертикальным перемешивающим устройством и с использованием роторно-пульсационного аппарата (РПА), обработкой лигноцеллюлозного материала раствором гидроксида натрия [12]. В качестве субстратов в ферментативном гидролизе использованы четыре образца: исходный лигноцеллюлозный материал, полученные из него технические целлюлозы: без РПА при температуре 60 °С, с РПА при температуре 30°С, с РПА при температуре 60 °С.

Зависимость концентрации глюкозы от продолжительности гидролиза этих образцов представлены на рисунках 5. Наименьшей скоростью гидролиза характеризуется исходный лигноцеллюлозный материал, который через 10 ч ферментации имеет концентрацию глюкозы 2,3 г/л и в интервале 20-72 ч увеличивает накопление моносахаров всего с 4,0 г/л до 6,0 г/л.

Технические целлюлозы гидролизуются с гораздо более высокой скоростью, концентрация моносахаров в гидролизатах 4 г/л достигается уже через 8 ч процесса и продолжает расти до 13,9-14,7 г/л. Поскольку массовая доля лигнина в лигноцеллюлозном материале

составляет 8,6 % (в пересчете на абсолютно сухое вещество), в технических целлюлозах находится в пределах 2,5-4,0 %, то установленное в эксперименте различие по скорости гидролиза можно объяснить экранирующим эффектом лигнина.

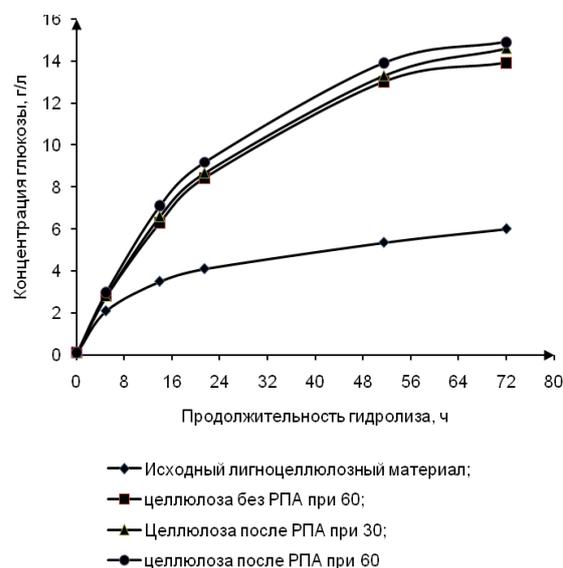


Рисунок 5. Зависимость концентрации глюкозы от продолжительности ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала и технических целлюлоз, полученных из него без РПА и с помощью РПА

Кроме того, содержание целлюлозы в субстратах, определенное по Кюршнеру, составляет для исходного лигноцеллюлозного материала 92 %, для технических целлюлоз – 96-97 %, следовательно, можно утверждать, что моносахара в гидролизатах представлены в основном, глюкозой.

Сравнение результатов гидролиза технических целлюлоз между собой позволяют сделать вывод о более высоких концентрациях глюкозы в гидролизатах целлюлоз, полученных после РПА (14,7 г/л), чем без РПА (13,9 г/л), так как погрешность определения глюкозы в гидролизатах спектрофотометрическим методом не превышает 0,02 г/л.

Скорее всего, высокая реакционная способность целлюлоз после РПА к ферментативному гидролизу с образованием именно моносахаров связана с измельчением субстрата [12], но не исключается вероятность снижения степени полимеризации целлюлозы в момент обработки в РПА, облегчающей ферментативный гидролиз.

Результаты гидролиза (концентрация глюкозы, РВ до и после инверсии) через 72 ч представлены на рисунке 6.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИЭНЗИМНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА НЕТРАДИЦИОННОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

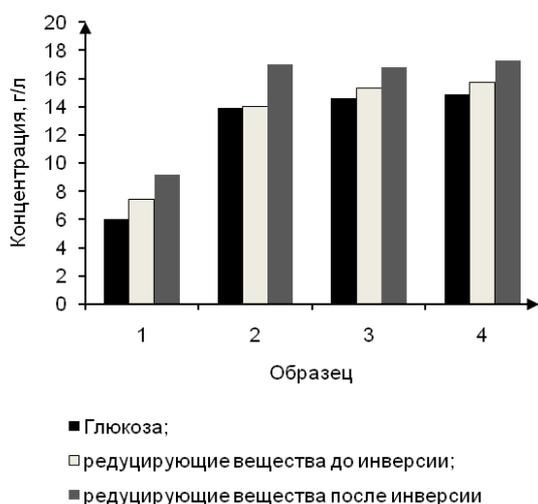


Рисунок 6. Концентрация глюкозы, РВ до и после инверсии через 72 ч в гидролизатах лигноцеллюлозного сырья и технических целлюлоз: 1- исходный лигноцеллюлозный материал; 2 - целлюлоза без РПА при 60 °С; 3 – целлюлоза после РПА при 30 °С; 4 – целлюлоза после РПА при 60 °С

Как следует из представленных данных, несмотря на близкие значения содержания целлюлозы в лигноцеллюлозном материале и технических целлюлозах, по концентрации РВ исходный значительно уступает технической целлюлозы (9,0 г/л и 16,8 г/л соответственно). Кроме того обнаружено, что в конце процесса гидролиза концентрации РВ после инверсии для всех технических целлюлоз имеют близкие значения (16,8 и 17,3 г/л). Установленный факт, что для всех субстратов, включая лигноцеллюлозный материал, имеет место примерно один и тот же интервал 2,9-3,2 г/л между концентрацией глюкозы (методом СФ) и концентрацией РВ после инверсии (методом Бертрана), что можно объяснить только природой индивидуального ферментного препарата «Брюзайм ВГХ».

Сравнение технических целлюлоз между собой по концентрации РВ после инверсии не позволяет подчеркнуть более высокую реакционную способность к ферментации технических целлюлоз после РПА, как это обнаружено выше.

ВЫВОДЫ

Исследован ферментативный гидролиз необработанного мискантуса и установлено, что индивидуальные ферментные препараты

содержат не полный комплекс ферментов для высокого накопления сбраживаемых моносахаров и наиболее активно показал себя препарат «Брюзайм ВГХ». Добавление к целлюлазным препаратам пектиназы «Рапидаза ЦР» и гемицеллюлазы «Брюзайм ВГХ» приводит к значительному увеличению начальной скорости гидролиза субстрата и большему накоплению глюкозы в гидролизате по сравнению с индивидуальными препаратами.

Исследован ферментативный гидролиз с использованием индивидуального препарата «Брюзайм ВГХ» химически обработанного мискантуса на примере лигноцеллюлозного материала и полученных из него технических целлюлоз. Показано, что при гидролизе целлюлозы, полученной после РПА, выход моносахаров, но не РВ, увеличивается в сравнении с целлюлозой, полученной без РПА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гельфанд Е.Д. Основы технологии биозтонала: Учеб. пособие/ Архангельск, Изд-во Арханг. гос. техн. ун-та, 2005. – 56 с.
2. Яровенко В.Л., Маринченко В.А. Технология спирта М.: Колос – Пресс, 2002. – 465 с.
3. Гутьеррес Б., Сеницын А.П. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1998. – Т. 34. – № 6. – С. 622-627.
4. Гусаков А.В., Сеницын А.П. // Биохимия. – 1982. – Т. 47, № 8. – С. 1322-1333.
5. Коренман, И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений М.: Химия, 1970. – 334 с.
6. Макарова Е.И., Будаева В.В. // Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 3-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (28-30 апреля 2010 г., г. Бийск). – В 2-х ч. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-т, 2010. – Ч. 1. – С. 215-218.
7. ГОСТ 13192 – 73. Вина, виноматериалы и коньяки. Метод определения сахаров. Введ. 1975-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1973. – 14 с.
8. Клесов А.А., Рабинович М.Л. // Биоорг. химия. – 1980. – Т. 6, № 8. – С. 1225-1242.
9. В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов, В.Н. Золотухин, Г.В. Сакович // Ползуновский вестник. – 2009. – № 3 – С. 328-335.
10. Makoto Yoshida, Yuan Liu and et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2008. – 72. – P. 805-810.
11. Miscanthus: For Energy and Fibre. By Michael B. Jones, Mary Walsh. Published by Earthscan, 2001. – 192 p.
12. С. Е. Орлов, В. В. Будаева, А. А. Кухленко и др. // Ползуновский вестник, 2011. – в печати.