

ского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ipcet@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-14-73.

Люханова Инна Владимировна, инженер кафедры общей физики физико-технического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Петрозаводский государственный университет» (ПетрГУ), luhanova@yandex.ru, пр. Ленина, 33, г. Петрозаводск, 185910, Россия. Тел. (8142) 71-96-54.

Алешина Людмила Александровна, профессор кафедры физики твердого тела физико-технического факультета, кандидат физико-математических наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Петрозаводский государственный университет» (ПетрГУ), aleshina@psu.karelia.ru, пр. Ленина, 33, г. Петрозаводск, 185910, Россия. Тел. (8142) 71-96-54, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-

УДК 661.728.7:66.083.4

ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ СУБСТРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ БЕЗРЕАГЕНТНОГО МЕТОДА ПРЕДОБРАБОТКИ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

И.Н. Павлов¹, Е.И. Макарова¹, Д.А. Чибиряев^{1, 2}

Проведено исследование зависимости реакционной способности к ферментации субстратов на основе продуктов, полученных на универсальной термобарической установке. В качестве субстратов использованы образцы волокнистых продуктов после обработки в условиях термобарического воздействия с декомпрессией и гидротермической обработки, а также техническая целлюлоза после облагораживания волокнистого продукта. Установлено, что волокнистый продукт после обработки в динамичном режиме обладает реакционной способностью к ферментации в 2,5 раза выше по отношению к продукту, полученному обработкой в статичном режиме. Показана целесообразность применения технологии термобарического воздействия при введении динамичного режима прогрева и выдержки продукта.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, реакционная способность, целлюлоза, недревесное целлюлозосодержащее сырье, термобарическое воздействие, гидротермическая обработка.

вых оболочек овса на новом оборудовании – универсальной термобарической установке.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что целлюлозосодержащее сырье (ЦСС) довольно устойчиво к ферментативному гидролизу, что связано с наличием прочной матрицы, образованной лигнином, целлюлозой и гемицеллюлозами. С целью обеспечения доступности полимерных цепей целлюлозы для действия ферментов проводится предварительная обработка лигноцеллюлозного сырья [1, 2]. Особое внимание уделяется безреагентному методу воздействия для получения субстратов, обладающих высокой реакционной способностью к ферментативному гидролизу [3-5].

Целью данной работы являлось изучение реакционной способности к ферментативному гидролизу субстратов, полученных из пло-

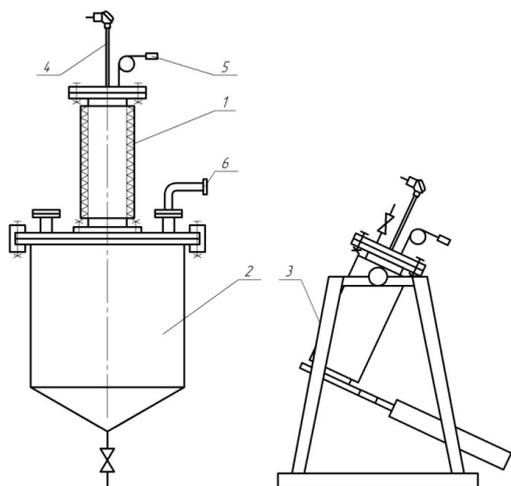
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Универсальная термобарическая установка (УТБ) (рисунок 1) создана для расширения возможностей метода термобарической обработки. На данном виде оборудования апробированы методики: 1) термобарического воздействия (ТБВ) на исходное сырье в водной среде и 2) гидротермической обработки (ГТО). Метод ТБВ, в свою очередь, является модификацией известного метода взрывного автогидролиза, условием реализации которого является декомпрессия системы на конечной фазе проведения процесса.

По методике ТБВ обработка заключается в том, что водная суспензия исходного сырья помещается в реакционную камеру и усредняется посредством перекачивания на платформе. После чего реактор устанавливается на сборник и вся последующая обработка (нагрев до заданных значений температуры и

давления) проводится в статичном положении. После выдержки в камере проводится декомпрессия давления, т.е. ее моментальный сброс при разрыве мембраны, установленной в нижней части реакционной камеры. Это вызывает выброс обработанного продукта в приемный сборник и испарение примерно 1/3 воды.

По методике ГТО исходное сырье, находясь в жидкой фазе в виде суспензии, подвергается экстракции горячей водой при постоянном перекачивании реакционной камеры на платформе. Процесс происходит в динамичных условиях нагрева и последующей выдержки массы при заданных значениях температуры и давления. После завершения процесса осуществляется охлаждение реакционной массы в камере и выгрузка.



1 – реакционная камера; 2 – сборник; 3 – платформа; 4 – датчик температуры; 5 – датчик давления; 6 – патрубок отвода неконденсируемых газов

Рисунок 1 – Схема универсальной термобарической установки

В обоих случаях полученный продукт первоначально отжимали, промывали дистиллированной водой с температурой 20-30 °С для удаления водорастворимых веществ, повторно фильтровали и затем высушивали при комнатной температуре, после чего анализировали на содержание основных компонентов согласно общепринятым методикам [6]. В жидкой фракции определяли концентрацию редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу спектрофотометрическим методом с

использованием динитросалицилового реактива.

Ферментативный гидролиз субстратов проведен в ацетатном буфере с использованием ферментного комплекса, состоящего из ферментных препаратов «Целлолюкс-А» (производитель ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск) и «Брюзайм ВГХ» (поставщик – компания «Русфермент», г. Москва) по методике, подробно представленной в [7, 8]. Для контроля концентрации РВ каждые 8 ч проводили отбор проб объемом 2 см³. Концентрацию пентоз в пересчете на ксилозу в готовых гидролизатах определяли спектрофотометрическим методом с использованием орсина [9].

Выход РВ на навеску субстрата (5 г) без вычета нецеллюлозных примесей (зола и лигнина), а также выход пентоз от массового содержания пентозанов в субстрате рассчитан с учетом коэффициента 0,9, связанного с присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным и ангидроксилосным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По представленным методикам проведена наработка образцов [10], в качестве исходного сырья для которых взяты отходы зернового производства – плодовые оболочки овса (ПОО). Массовая доля кислотонерастворимого лигнина в исходном сырье составляет 18,0 % (в пересчете на абсолютно сухое сырье – а.с.с.), массовая доля целлюлозы, определенная методом Кюршнера (а.с.с.) – 36,0 %, массовая доля золы (а.с.с.) – 5,0 %, пентозанов – 33,0 %. Далее проведено исследование зависимости реакционной способности к ферментации субстратов от способа их получения на УТБ. В качестве субстратов использованы образцы волокнистых продуктов (ВП) непосредственно после обработки по методикам ТБВ и ГТО, а также техническая целлюлоза (ТЦ), полученные из ВП при облагораживании (обработка перекисью водорода в щелочной среде) по методике [11]. Для сравнения эффективности используемых методик предобработки проведен также ферментативный гидролиз нативных ПОО. Массовые доли (м.д.) основных компонентов ВП и ТЦ – субстратов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики волокнистых продуктов и технических целлюлоз – субстратов

Субстрат	Метод обработки	Выход, % на а.с.в.	М.д. компонента, %				РВ в фильтрате, г/л
			Целлюлоза*	Лигнин	Зола	Пентозаны	
ПОО	Без обработки	–	36,0	18,0	5,0	33,0	–
ВП	ТБВ	71,9	43,8	18,1	4,6	19,6	1,2
ВП	ГТО	43,9	69,9	25,5	4,7	3,9	7,0
ТЦ	ТБВ, облагораживание	–	71,3	6,8	5,9	28,3	–

Примечание: * – в волокнистых материалах определена массовая доля целлюлозы по Кюршнеру, в полученных из них целлюлозах – массовая доля α-целлюлозы.

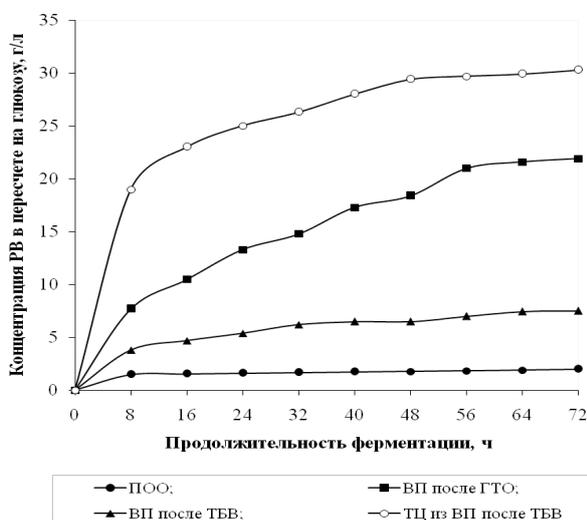


Рисунок 2 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации

Все образцы были обработаны в одинаковых условиях на УТБ: температура 197 °С, давление в реакционной камере 1,5 МПа, время выдержки 400 с. Исследования проводились при гидромодуле системы 1:30.

Визуально отмечено, что в результате проведенных обработок (ТБВ и ГТО) на установке УТБ частицы ПОО сохраняли свою первоначальную форму. Отмечено изменение окраски полученных образцов от темно-бежевого после ТБВ до темно-коричневого цвета для продукта прошедшего ГТО. Темная окраска образцов ГТО свидетельствует о более глубоком протекании окислительных процессов. В нагретом и взорванном ВП ТБВ м.д. пентозанов снизилась до 19,5 %, т.е. потеря составила менее половины от начальной концентрации. Лигнин и зола остались на уровне исходного сырья.

В отличие от него ВП ГТО подвергся большему гидролитическому расщеплению, в результате сопровождающего автогидролиза. Потеря сухих веществ составила 56,1 % и обусловлена удалением большей части пентозанов вследствие гидролиза, их доля в ВП составила 3,9 %. Выход растворимой части веществ в жидкую фазу способствует концентрированию целлюлозы в твердой фазе, что приводит к повышению ее м.д. в ВП до 69,9 %.

При облагораживании образец ВП ТБВ частично превращался в волокнистую массу с потерей формы частиц. При этом м.д. лигнина уменьшилась в 2 раза и составила 6,8 % в образце ТЦ. Результаты исследования ферментативного гидролиза в виде зависимостей концентрации РВ в гидролизате от продолжительности ферментации представлены на рисунке 2. В таблице 2 показаны характеристики полученных гидролизатов по концентрации РВ и пентозанов в гидролизате после 72 ч ферментативного гидролиза. Наименьшую реакционную способность по выходам РВ и пентозанов показал субстрат нативных ПОО, около 5,4 % и 0,8 % соответственно, что указывает на наличие прочной лигноцеллюлозной структуры, придающей ей устойчивость к ферментативному гидролизу.

В сравнении с ПОО субстрат ВП ТБВ становится более доступным к ферментативному воздействию, о чем свидетельствует повышение реакционной способности и достижение выходов РВ до 20,3 % и пентоз до 11,1 % (от содержания пентозанов в субстрате), не смотря на отсутствие видимых изменений в структуре.

Таблица 2 – Характеристики гидролизатов после 72 ч ферментативного гидролиза

Субстрат	ПОО	ВП ТБВ	ВП ГТО	ТЦ ВП ТБВ
Концентрация РВ в гидролизате, г/л	2,0	7,5	21,9	30,3
Выход РВ в пересчете на глюкозу, %	5,4	20,3	59,1	81,8
Концентрация пентоз в гидролизате, г/л	0,1	0,8	1,4	6,4
Выход пентоз от содержания пентозанов в субстрате, %	0,8	11,1	96,9	61,1

ТЦ, полученная после облагораживания ВП ТБВ, обладает высокой реакционной способностью, и выход РВ после 72 ч гидролиза достигает 81,8 %, что превышает выход РВ образца ВП ТБВ в 4 раза, и в 15 раз – нативных ПОО. Выход пентоз при гидролизе образца ТЦ ВП ТБВ в 5,5 раз выше выхода ВП ТБВ и составляет 61,1 % и в 76 раз выше соответствующего показателя нативных ПОО. Это подтверждает доступность целлюлозы и гемицеллюлоз после удаления лигнина облагораживанием образца ВП ТБВ, что сопровождается изменением химического состава субстрата с накоплением гидролизуемых компонентов.

Ферментативный гидролиз образца ВП ГТО обеспечивает выход РВ 59 %. Это связано с тем, что водная горячая обработка приводит к структурным изменениям продукта и образованию микропор, которые увеличивают восприимчивую площадь поверхности и делают целлюлозу более доступной для гидролитических ферментов, несмотря на высокое значение м.д. лигнина в субстрате 25,5 %. Высокий уровень лигнина в данном субстрате свидетельствует о том, что в ходе гидротермической обработки происходил обратный процесс реполимеризации растворенного лигнина при его взаимодействии с продуктами деструкции гемицеллюлоз.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показывают, что ТЦ из ВП, прошедшего обработку в условиях ТБВ, обладает высокой реакционной способностью к ферментации. В то же время ВП ТБВ не претерпевает видимых изменений после обработки и содержит нерастворимый лигнин, что препятствует действию ферментов и затрудняет гидролиз.

Субстрат ВП ГТО, показал удовлетворительную реакционную способность. Анализ продукта после обработки показывает, что в условиях динамичного режима перекачивания

сырье претерпевает качественные изменения, что повышает его реакционную способность в 2,5 раза по отношению к обработке в статичном режиме, даже при проведении декомпрессии. Таким образом, обработка ПОО при постоянном перекачивании приводит к наиболее выраженному проявлению автогидролиза, что влечет изменение химического состава и нарушение прочности структуры исходного сырья. Поэтому целесообразным является разработка технологии термобарического воздействия в динамичных условиях прогрева и выдержки продукта.

Работа выполнена в рамках проекта фундаментальных исследований № 5 «Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья в различных средах в реакторах под давлением» Программы 3 Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taherzaden M.J., Karimi K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review // BioResources, 2007. – 2 (4). – P. 707-738.
2. Разумовский С.Д., Подмастерьев В.В., Зеленецкий А.Н. Механо-химические методы активации процессов предобработки биомассы // Катализ в промышленности. – 2010. – № 5. – С. 53-57.
3. Будаева, В. В. Свойства мискантуса после обработки в реакторе высокого давления – 2009 / В.В. Будаева, Н.В. Бычин, Г.В. Сакович // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 144-149.
4. Будаева, В.В. Ферментативный гидролиз продуктов гидротермобарической обработки мискантуса и плодовых оболочек овса / В.В. Будаева, Е.И. Макарова, Е.А. Скиба, Г.В. Сакович // Катализ в промышленности. – 2013. – № 3. – С. 60-66.
5. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Гидротермобарический способ получения целлюлозы из отходов злаков // Ползуновский вестник. – 2011. – № 4-1. С. 236-239.
6. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. – М.: Экология, 1991. – 320 с.
7. Макарова Е.И., Будаева В.В., Митрофанов

Р.Ю. Использование мультиэнзимных композиций для гидролиза нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 192-198.

8. Макарова, Е. И. Результаты ферментации целлюлозы мискантуса в ацетатном буфере и водной среде / Е.И. Макарова // Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – Т.21. – № 2. – С. 219-225.

9. ГОСТ 10820-75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. – М.: Изд-во стандартов, 1991. – 8 с.

10. Павлов И.Н., Будаева В.В., Сакович Г.В. Термобарическая обработка плодовых оболочек овса в водной среде / Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н.Фрумкина РАН, 2012 г. – Т. 2 – С. 135-137.

11. Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья [Текст]: отчет о НИР (заключительный): Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН; рук. Сакович Г.В.; исполн.: Будаева В.В., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Обрезкова М.В., Скиба Е.А. и др. – Бийск, 2011. – 78 с. – Библиогр.: с. 77. – № Государственной регистрации 02201250091. Инв. № О-315.

Павлов Игорь Николаевич, научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), rawlow-in@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. 8903 958 4140.

Макарова Екатерина Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), assl@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Чибиряев Дмитрий Андреевич, студент группы БТ-73 Бийского технологического института АлтГТУ им. И.И. Ползунова, практикант-дипломник 2013 года в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), chidim@ngs.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

УДК 577.151:633.13(075.3)

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ИХ ПОДГОТОВКИ

Е.А. Скиба, Т.О. Момот, Н.В. Бычин, В.Н. Золотухин

В статье приведены результаты исследования зависимости ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов плодовых оболочек овса и мискантуса от способа их подготовки. Показано, что удаление из субстратов продуктов деструкции лигнина (ингибитора) способствует повышению эффективности ферментативного гидролиза.

Ключевые слова: мискантус, плодовые оболочки овса, лигноцеллюлозный материал, ферментативный гидролиз, ингибитор, продукты деструкции лигнина.

ВВЕДЕНИЕ

Структура лигноцеллюлозной матрицы как древесного, так и недревесного сырья, является очень прочной, поэтому для её успешной ферментативной деструкции требуется предварительная химическая или физико-химическая обработка. В литературе описана предварительная химическая обработка при нормальном давлении раствором серной или соляной кислоты, позволяющая повысить скорость ферментализации не менее, чем в два раза по сравнению с исходным сырьём [1].

В данной работе лигноцеллюлозный материал получен из недревесного целлюлозосодержащего сырья обработкой раствором азотной кислоты.

Азотнокислый способ выбран в силу доступности реагента для нашей промышленной зоны, накопленного опыта использования реагента (включая регенерацию при необходимости), а также возможности получения азотных удобрений на основе отработанного варочного раствора в рамках создания комплексной переработки целлюлозосодержащего сырья.

Из литературы известно, что химиче-