

СБРАЖИВАНИЕ НЕЦЕЛЕВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ С ПОМОЩЬЮ SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ШТАММ Y-1693)

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

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

В статье приведены результаты сбраживания с помощью дрожжей Saccharomyces cerevisiae (штамм Y-1693) синтетической глюкозо-аммонийной среды и нецелевых гидролизатов мискантуса.

Ключевые слова: биоэтанол, дрожжи, брожение, питательная среда, гидролизат.

ВВЕДЕНИЕ

Для производства биоэтанола из гидролизатов растительного сырья в промышленности применяют дрожжи родов *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pachysolen*, *Candida*, *Pichia* и ряд других.

Многие производственные штаммы дрожжей относятся к *Saccharomyces cerevisiae*. Они непатогенны, адаптированы к производству, дают высокий выход этанола, образование побочных продуктов – низкое, не требуют аэрации. Ряд штаммов способны сбраживать целлобиозу [1-4].

Шизосахаромицеты обладают высокой бродильной активностью и обеспечивают повышенный выход спирта из редуцирующих веществ субстрата по сравнению с сахаромицетами. Способны развиваться при повышенной температуре (до 36 °С). Хуже переносят остановки цехов на планово-предупредительный и капитальный ремонты, а также нарушения параметров технологического процесса спиртового брожения.

Ни сахаромицеты, ни шизосахаромицеты не сбраживают ксилозу. Известно несколько видов дрожжей, сбраживающих ксилозу в этанол. Это *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *S. tropicalis*, *Pichia stipitis* и некоторые другие.

Однако, *Pichia stipitis*, во-первых, образуют побочные продукты (ксилит), во-вторых, ингибируются фурфуролом и другими примесями, в-третьих, по одним источникам требуют аэрации [4], по другим – нет [3].

Candida shehatae культивируют в полуживых условиях, кроме того, эти дрожжи не способны сбраживать целлобиозу.

Pachysolen tannophilus накапливают в среде кроме этанола эквивалентное количество ксилита. Выход спирта достигает 0,3 г/г ксилозы [3].

Таким образом, целесообразным представляется использование штаммов *Sac-*

charomyces cerevisiae российской селекции. Для сбраживания были выбраны дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693), полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) во ФГУП ГОСНИИ Генетики в г. Москве. В соответствии с паспортом штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 выделен из ферментера Котласского ЦБК Архангельской области, где использовался для производства этилового спирта на гидролизатах древесины.

Целью данной работы является исследование сбраживания с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) синтетической глюкозо-аммонийной среды и нецелевых гидролизатов мискантуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 после получения из ВКПМ был регенерирован на неохмеленном солодовом сусле.

Бродильная активность штамма проверялась на рекомендованной синтетической глюкозо-аммонийной среде с дозировкой глюкозы 20 г/л [5-6]. Состав среды приведен в таблице 1.

Раствор солей с дрожжевым автолизатом стерилизовался 30 минут при 1 атм, раствор глюкозы отдельно – 30 мин при 0,5 атм. Растворы смешивались в боксе стерильно.

Был проведен ряд опытов по сбраживанию нецелевых гидролизатов мискантуса, полученных в результате предобработки в процессе комплексной переработки сырья. Предгидролиз мискантуса проводился в автоклаве, в водной среде, при температуре 140-160 °С и давлении 2 атм.

В синтетическую среду и в гидролизаты вносилось 5 % засевных дрожжей, полученных субкультивированием *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) на неохмеленом пивном сусле. Сбраживание проводилось при 28 °С, в анаэробных условиях, продолжи-

СБРАЖИВАНИЕ НЕЦЕЛЕВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ С ПОМОЩЬЮ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (ШТАММ Y-1693)

тельность составляла 2-3 суток. Массовая доля редуцирующих сахаров (МД РС) определялась спектрофотометрически с реактивом 3,5-динитросалициловой кислоты (спектрофотометр «UNICO» UV-2804), активная кислотность – анионометрически (рН-метр Cheser-1), объемная доля этанола – по стандартной методике [7] с помощью ареометра АСП-1. Подсчет клеток дрожжей проводился с помощью камеры Горяева [8]. Изменения физико-химических и микробиологических показателей среды регистрировались ежедневно.

Таблица 1

Состав синтетической глюкозо-аммонийной среды

Компонент среды	Дозировка, г/ л среды
Глюкоза	20,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
KH ₂ PO ₄	0,8
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5
NH ₄ Cl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,15
Дрожжевой автолизат	10,0

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сбраживание с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) синтетической глюкозо-аммонийной среды (концентрация глюкозы – 20 г/л)

Микробиологические и физико-химические и показатели глюкозо-аммонийной среды в процессе брожения отражены в таблицах 2 и 3. Брожение шло активно, на поверхности среды образовалась шапка из пены, при перемешивании наблюдалось интенсивное вспенивание. При микроскопировании наблюдались клетки дрожжей овальной формы, по размеру – средние и мелкие. В процессе брожения клетки становились более мелкими, упитанных клеток мало, на третьи сутки клетки были вынуждены использовать внутренние запасы гликогена, поэтому упитанных клеток остается всего 2 %.

Максимальное накопление этилового спирта наблюдалось через двое суток культивирования, что связано с низкой концентрацией глюкозы в питательной среде.

Согласно стехиометрическому уравнению, теоретический выход спирта из 100 кг глюкозы составляет 51,14 кг, или 64,79 л (при относительной плотности спирта 0,78927). Тогда максимальный экономический коэффициент процесса может составлять:

$$Y_{P/S}(\text{теор}) = 64,79 \text{ мл} / 100,0 \text{ г} = 0,65 \text{ мл/г} = 64,79 \%$$

Таблица 2

Микробиологические показатели глюкозо-аммонийной среды в процессе брожения

Продолжительность брожения, сутки	Количество дрожжей			
	всего, млн. КОЕ /мл	почкующихся, %	упитанных, %	мертвых, %
0	3,48	12	50	–
1	4,89	20	4	–
2	37,07	15	4	1
3	41,95	5	2	1

Таблица 3

Физико-химические показатели глюкозо-аммонийной среды в процессе брожения

Продолжительность брожения, сутки	МД РС, г/л	Этанол, об. %
0	20,0	–
1	2,6	1,2
2	0,18	1,3
3	0,02	1,2

При МД глюкозы 20 г/л теоретический выход этанола 1,2958 %, то есть выход 100 % от теоретического, или

$$Y_{P/S}(\text{практ}) = 1,3 \text{ мл} / 2,0 \text{ г} = 0,65 \text{ мл/г} = 65 \%$$

Таким образом, показано, что штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 работает, выход по этанолу высокий. На практике выход спирта не может быть выше 95 % (в соответствии с классическими опытами Пастера), поэтому несколько завышенный результат можно объяснить погрешностью измерений этанола, связанной с его низкой концентрацией в бражке.

Сбраживание с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) нецелевых гидролизатов мискантуса китайского

Гидролизат представлял собой непрозрачную жидкость темно-коричневого цвета. При фильтрации была удалена часть коллоидных частиц темно-коричневого цвета. Массовая доля редуцирующих сахаров в гидролизатах составляла от 6,5 до 9,4 г/л, активная кислотность – 4,2 ед. рН.

Брожение шло слабо, на поверхности гидролизата мало пузырьков углекислого газа, при перемешивании пена выделялась умеренно. Клетки дрожжей были мелкие и в процессе культивирования становились все мельче, окрашены в желтый цвет (поэтому определить упитанность было нельзя). В целом, чем старше клетка, тем интенсивнее ее окраска. В поле зрения кроме клеток отчетливо видны взвеси в виде коротких ниток коричневого цвета. Численность дрожжей плано-

мерно снижалась в течение трех суток культивирования, одновременно возрастала доля мертвых клеток (до 50 %).

Этанола в образцах не было обнаружено, содержание редуцирующих сахаров не изменялось в течение 3 суток.

Было сделано предположение, что в полученном гидролизате нет гексоз, а штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 не способен утилизировать пентозы. Поэтому в следующем опыте дополнительно была внесена глюкоза в количестве 20 г/л, а также в качестве источника витаминов внесен дрожжевой автолизат.

После внесения глюкозы изменения содержания редуцирующих сахаров не зарегистрировано в течение всех трех суток культивирования. Этанол в среде не обнаружен. При микроскопировании сделаны наблюдения, аналогичные предыдущему опыту с той разницей, что доля мертвых клеток дрожжей через двое суток культивирования составила 20 %.

Очевидно, что компоненты среды (гидролизата) действуют на клетки и на синтез этанола как ингибитор. Для удаления ингибиторов 1/3 часть полученного гидролизата, а именно: фракция, содержащая фурфурол и летучие кислоты, была отогнана на роторном испарителе.

После удаления фракции фурфурола и летучих кислот активная кислотность гидролизата повысилась до 5,1 ед. рН. В процессе культивирования наблюдались видимые признаки брожения: на поверхности бражки – пузырьки углекислого газа, при перемешивании интенсивно выделялась пена. При микроскопировании обнаружены клетки среднего размера и, на вторые сутки, крупные, правильной овальной формы, прозрачные. Упитанных и мертвых клеток не обнаружено. Таким образом, после удаления ингибиторов, физиологическое состояние клеток дрожжей улучшилось.

Через двое суток обнаружено 0,15 % (об.) этанола. Сахара утилизировались в процессе брожения незначительно (с 6,55 до 6,35 г/л). Таким образом, вероятно, в гидролизатах сахара представлены пентозами, которые *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 не утилизируют.

Следующий опыт заключался в проведении сбраживания после отгонки фурфурола с добавлением в среду глюкозы в количестве 20 г/л. В таблицах 4 и 5 приведены микробиологические и физико-химические показатели среды в процессе брожения.

Таблица 4

Микробиологические показатели гидролизата мискантуса в процессе брожения

Продолжительность брожения, сутки	Количество дрожжей			
	всего, млн. КОЕ /мл	почкующихся, %	упитанных, %	мертвых, %
0	5,18	7	40	–
1	27,3	36	4	1
2	61,3	21	–	1
3	33,5	29	–	2

Через сутки культивирования на поверхности 0,5 см пены, при перемешивании наблюдается хорошее выделение пены. Дрожжи прозрачные, средние или крупные, овальной формы или слегка вытянутые. Через сутки брожения обнаружено упитанных дрожжей – 4 %, мертвых – 1 %.

Через двое суток немного пены оставалось по краям сосуда со средой, при перемешивании выделялось немного пены. Через трое суток нет видимых признаков брожения, клетки дрожжей стали мельче. Упитанных дрожжей не обнаружено, мертвых – 2 %.

В процессе культивирования несколько снижается активная кислотность среды. В первые сутки брожения расходуется основная часть сахаров и образуется максимальное количество этанола. Таким образом, подтверждается предположение о том, что сахара в гидролизатах мискантуса представлены преимущественно пентозами. Из 9,2 г/л редуцирующих сахаров 5,1 г/л составляют пентозы и 4,1 г/л гексозы, которые в процессе брожения были утилизированы.

Таблица 5

Физико-химические показатели гидролизата мискантуса в процессе брожения

Продолжительность брожения, сутки	рН среды	МД РС, г/л	Этанол, об. %
0	5,17	29,2	–
1	4,99	5,8	1,4
2	4,92	5,4	1,3
3	4,94	5,1	1,3

Глюкоза утилизируется дрожжами с неплохим выходом этилового спирта. При содержании глюкозы 24,1 г/л (29,2-5,1) теоретический выход этанола 1,56 %, то есть выход составляет 89,5 % от теоретического, или экономический коэффициент составляет: $Y_{P/S}(\text{практ}) = 1,4 \text{ мл} / 2,41 \text{ г} = 0,58 \text{ мл/г} = 58 \text{ \%}$.

СБРАЖИВАНИЕ НЕЦЕЛЕВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ С ПОМОЩЬЮ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (ШТАММ Y-1693)

ВЫВОДЫ

Штамм Y-1693 *Saccharomyces cerevisiae*, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ФГУП ГОСНИИ Генетики, г. Москва), показал высокую бродильную активность при сбраживании синтетической глюкозо-аммонийной среды.

Нецелевые гидролизаты мискантуса плохо сбраживаются *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693), так как в качестве редуцирующих сахаров содержат преимущественно пентозы. Наряду с редуцирующими веществами нецелевые гидролизаты содержат фурфурол и другие летучие примеси, ингибирующие размножение дрожжей и синтез биоэтанола. Отметим, что нецелевые гидролизаты являются побочными продуктами, поэтому концентрация редуцирующих сахаров в них низкая, а содержание побочных веществ достаточно высоко.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.А. Кухаренко, А.Ю. Винаров, Т.Е. Сидоренко, А.И. Бояринов. // Бюллетень «Новые технологии». – М.: Издательско-полиграфическая фирма «Ключ Оракул» – 1999. – 93 с.
2. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. Учебник для вузов. – М.: Лесн. Пром-сть, 1989. – 496 с.
3. Борисова С.В. Использование дрожжей в промышленности – СПб.: ГИОРД, 2008. – 216 с.
4. Бродильные производства / Под. ред. Л.А. Андеркофлера, т.1. М.: Пищепромиздат, 1959. – 453 с.
5. Нетрусов А.И., Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
6. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / М.: ДеЛи принт, 2001. – 131 с.
7. ГОСТ Р 51135-98. Изделия ликероводочные. Правила приемки и методы анализа. – М.: Изд-во стандартов, 1998. – 27 с.
8. Римарева, Л.В. Микробиологический контроль спиртового и ферментного производств М.: Россельхозакадемия, 2005. – 200 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РОТОРНО-ПУЛЬСАЦИОННОГО АППАРАТА В ПРОЦЕССЕ ЭКСТРАКЦИИ ЛИГНИНА ИЗ НЕДРЕВЕСНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

С.Е. Орлов, В.В. Будаева, А.А. Кухленко, А.Г. Карпов, М.С. Василишин, В.Н. Золотухин

Учреждение Российской академии наук Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН (ИПХЭТ СО РАН)

Разработана математическая модель для расчета кинетики процесса экстракции веществ из пористых частиц. Приведены результаты экспериментов по экстракции лигнина из лигноцеллюлозного материала, полученного из мискантуса, в емкостном аппарате с мешалкой и с использованием роторно-пульсационного аппарата. Проведено сравнение модели с экспериментальными данными.

Ключевые слова: экстракция, роторно-пульсационный аппарат, лигноцеллюлозный материал, техническая целлюлоза, мискантус.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время к дешевому возобновляемому растительному сырью, как источнику волокнистых целлюлозосодержащих материалов, проявляется нарастающий интерес. Существующие промышленные способы получения целлюлозы из древесины, как

правило, не могут быть адаптированы к нетрадиционным источникам в связи с нерешенными экологическими проблемами. Наиболее распространенные сульфатный и сульфитный способы переработки сырья обладают рядом недостатков. В частности, промышленная реализация этих способов ограничена рядом проблем, связанных с