

Результаты исследования ферментативного гидролиза в виде зависимостей концентрации РВ в гидролизатах от продолжительности ферментации исходного сырья (мискантуса) и продуктов: ЦСП (образец № 520) и ЛЦМ (образец № 521) представлены на рисунке 2 и в таблице 6.

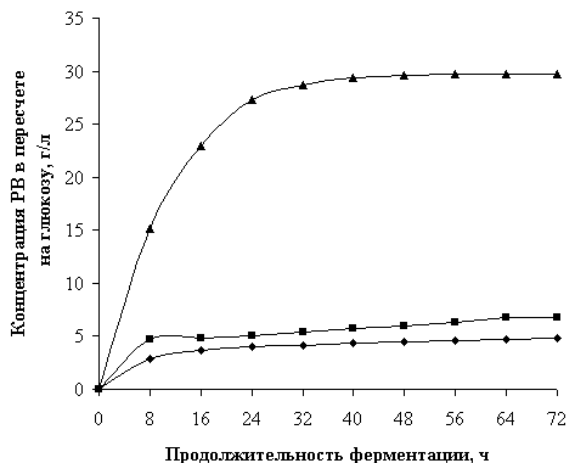


Рисунок 2 – Зависимость концентрации РВ в пересчете на глюкозу от продолжительности ферментации мискантуса и продуктов: ЦСП (образец № 520) и ЛЦМ (образец № 521)

Как следует из представленных результатов, продукты переработки мискантуса ферментируются с большей скоростью, чем необработанное сырье; наибольшей реакционной способностью к ферментации из двух продуктов характеризуется образец ЛЦМ: выход РВ составил 80 %, при этом вклад ксилоразложения составляет всего 3 %.

ВЫВОДЫ

После определения оптимальных условий получения ЛЦМ из плодовых оболочек овса и российского мискантуса (обработка

4 %-ной азотной кислотой) проведена наработка ЛЦМ на опытном производстве в 2012 году. Установлены химические составы ЛЦМ из обоих видов сырья.

Показано, что выше всего реакционная способность к ферментации у образцов ЛЦМ, полученных азотнокислой варкой 4 % азотной кислотой. Выход редуцирующих веществ (РВ) для ЛЦМ ПОО составляет 73 % от массы субстрата (95 % от гидролизующих компонентов), для ЛЦМ мискантуса – 87 % от массы субстрата (92 % от гидролизующих компонентов). ЛЦМ из ПОО и мискантуса являются перспективными субстратами для получения глюкозо-ксилозных гидролизатов с преимущественным содержанием глюкозы (89-93 %).

Данная работа выполнена при поддержке совместного интеграционного проекта № 11 фундаментальных исследований ИПХЭТ СО РАН и ИХ Коми НЦ УрО РАН, государственная регистрация темы проекта № 01201257825. Список литературы

1. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: Изд-во Московского университета, 1995. – 224 с.
2. Торлопов М.А., Тарабукин Д.В., Фролова С.В., Щербакова Т.П. и др. Ферментативный гидролиз порошковых целлюлоз, полученных различными методами // Химия растительного сырья. – 2007. – № 3. – С. 69-76.
3. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков // Ползуновский вестник. – 2008. – № 3. – С. 322-327.
4. Hu F., Ragauskas A. J. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry // Bioenerg. Res. – 2012. – 5. – P. 1043–1066.
5. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонюк А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. – М.: Экология, 1991. – С. 73-74, 106-108, 176-179, 184-187.

УДК 661.728.7:577.152.3

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ГИДРОТРОПНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

Е.И. Макарова, М.Н. Денисова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович

Исследована реакционная способность к ферментации гидротропных целлюлоз, полученных из российского мискантуса и плодовых оболочек овса. Приведены основные характеристики исследуемых субстратов.

Ключевые слова: гидротропная варка, мискантус, плодовые оболочки злаков, целлюлоза, ферментативный гидролиз, «Брюзайм ВГХ», редуцирующие вещества.

ВВЕДЕНИЕ

В ИПХЭТ СО РАН проводятся исследования по переработке недревесного сырья: мискантуса и плодовых оболочек овса (ПОО) различными способами. Одним из направлений таких исследований является получение целлюлоз гидротропной варкой.

В литературе отсутствуют данные по ферментации целлюлоз, полученных гидротропным способом, поэтому целью данной работы является исследование реакционной способности к ферментации гидротропных целлюлоз из мискантуса и плодовых оболочек овса (ПОО).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение гидротропных целлюлоз (ГЦ) из мискантуса и ПОО проводили при одинаковых условиях [1-3].

На первом этапе провели предгидролиз без выдержки по времени при температурах 140 °С, модуль 1:8. Второй этап работы заключался в проведении гидротропной варки полученной лигно-целлюлозы с 30 %-ным раствором бензоата натрия при 160 °С в течение 1 ч. Техническая целлюлоза была промыта сначала порцией гидротропного раствора, затем дистиллированной водой, отжата и высушена. Заключительный этап работы состоял в облагораживании технической целлюлозы в три стадии: отбелка H_2O_2 в растворе NaOH, обработка раствором HCl, промывка C_2H_5OH . Полученную таким образом гидротропную целлюлозу (ГЦ) высушили.

Массовую долю (м.д.) золы (в пересчете на абсолютно сухое сырье – а.с.с.), м.д. кислотонерастворимого лигнина (а.с.с.), м.д. α -целлюлозы (а.с.с.), м.д. пентозанов определяли в ГЦ по стандартным методикам анализа [4].

Степень полимеризации (СП) гидротропных целлюлоз определяли по вязкости растворов в кадоксене на вискозиметре типа ВПЖ-3 [5].

Рентгеноструктурный анализ проведен на дифрактометре «Bruker D8 Advance». Порошковые дифрактограммы записывались в режиме 2 θ сканирования в диапазоне углов 5...40°, с шагом измерения 0,02°. Каждая дифрактограмма накапливалась в течение 15 мин. Условия подготовки всех образцов и записи рентгенограмм были идентичны. Обработку данных осуществляли в программе ORIGIN 6.0. Степень кристалличности (СК) рассчитана по отношению интенсивностей

рефлекса при углах 22° и 19° методом Сегала [6].

Для гидролиза субстратов использовали ферментный препарат (ФП) «Брюзайм ВГХ» (поставщик компания «Русфермент», г. Москва), который обладал следующими активностями: целлюлазной 1500 ед.+5 % ед. КМЦ/см³, ксиланазной 6500+5 % ед. КС/см³, β -глюканазной 1700+5 % ед. β -ГКС/см³. В соответствии с рекомендациями поставщика расходы ФП «Брюзайм ВГХ» на 1 г субстрата составили 0,02 см³.

Для ферментативного гидролиза целлюлоз в колбу Эрленмейера емкостью 500 мл помещали 5 г субстрата в пересчете на а.с.с., 150 см³ ацетатного буфера (рН 4,7) и ФП. Температура ферментации составляла (50±2) °С, продолжительность – 72 ч. Перемешивание реакционной массы осуществляли на горизонтальной платформе ПЭ-6410М (Россия) с частотой колебания 150 мин⁻¹ [7]. Для контроля концентрации редуцирующих веществ (РВ) каждые 8 ч проводили отбор проб объемом 2 см³. Концентрацию РВ в пересчете на глюкозу определяли на спектрофотометре «UNICO UV-2804» (США) с использованием динитросалицилового реактива. Выход РВ (отношение массы РВ к массе субстрата) рассчитан с учетом коэффициента, связанного с присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза. По окончании ферментации реакционную массу фильтровали с получением готового гидролизата и твердого осадка остатков субстрата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Целлюлозы-субстраты, полученные при одинаковых условиях гидротропной варки из мискантуса и ПОО, характеризуются близкими значениями м.д. α -целлюлозы 82- 83 % (таблица 1). В ГЦ ПОО большее содержание негидролизующих компонентов – остаточного лигнина и золы – 9,4 % против 6,1 % ГЦ М.

ГЦ характеризуются высокими значениями степени полимеризации: 950 ед. для образца ГЦ М и 890 ед. для образца ГЦ ПОО. Объясняется это тем, что при варке с гидротропными (нейтральными) реагентами растительные материалы не испытывают сильного деструктирующего воздействия на целлюлозные волокна, в результате получается целлюлоза с упорядоченной упаковкой молекулярных цепочек.

Таблица 1 - Характеристики субстратов

Показатель	ГЦ М	ГЦ ПОО
М.д. α-целлюлозы, %	82,1	82,8
М.д. остаточного лигнина, %	4,5	6,1
М.д. золы, %	1,6	3,3
Степень полимеризации, ед.	950	890
Степень кристалличности, %	89	79

На рисунке 1 представлены результаты рентгеноструктурного анализа образцов ГЦ. Для исследуемых целлюлоз характерно наличие на дифрактограммах интерференционных пиков, соответствующих аморфно-кристаллической форме природной целлюлозы. Аморфные области характеризуются легкогидролизруемыми полисахаридами, лигнином и частично трудногидролизруемыми полисахаридами, а кристаллическая область – целлюлозой.

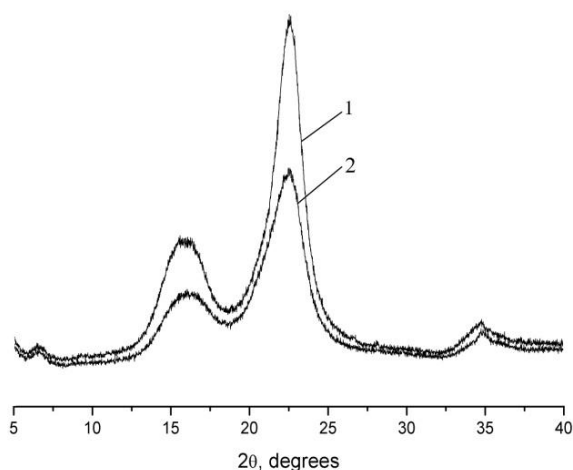


Рисунок 1 - Рентгенограммы:
1 - ГЦ М, 2 - ГЦ ПОО

В обоих образцах доля кристаллической части преобладает над аморфной. Ширина сигнала на рентгенограммах при $2\theta=22^\circ$ характеризует СК целлюлозы. Более узкий пик дает целлюлоза из мискантуса, СК этого образца составляет около 89 %, СК образца целлюлозы из ПОО около 79 %. Разница в значении СК между целлюлозой из мискантуса и ПОО связана с тем, что СК мискантуса (около 67 %) изначально превышает СК ПОО (около 49 %).

Химический состав субстратов позволяет предположить меньшую реакцию способность к ферментации ГЦ ПОО.

Влияние кристалличности целлюлозы остается вопросом для активных исследований. В последних работах [8-10] предложено, что степень и скорость ферментативного гидролиза целлюлозы снижается с увеличением кристалличности целлюлозы, а в работах [11, 12] не наблюдали этой сильной корреляции.

Реакционная способность ГЦ при ферментативном гидролизе оценивалась по накоплению РВ. Зависимость концентрации РВ в реакционной смеси в процессе ферментативного гидролиза представлена на рисунке 2.

Как следует из представленных на рисунке результатов, для образца ГЦ ПОО отмечена более значительная скорость накопления РВ, чем для ГЦ М, как в начальный период реакции (6,32 г/л и 4,27 г/л за первые 8 ч ферментации соответственно), так и в течение всего процесса (31,0 г/л и 17,4 г/л после 72 ч).

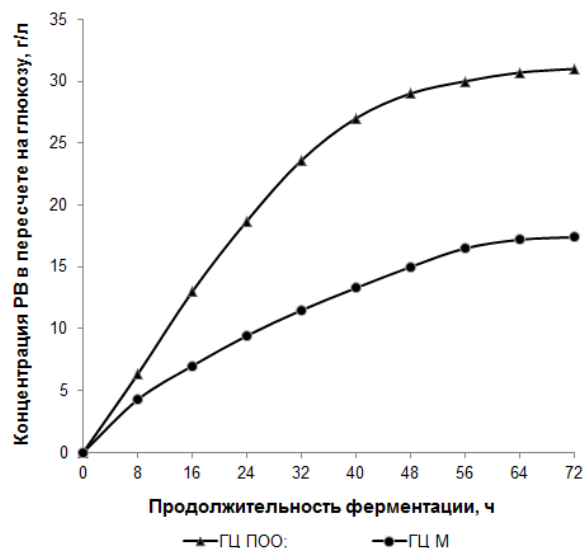


Рисунок 2 - Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации ГЦ

Данный факт свидетельствует о том, что химический состав субстратов не является определяющим фактором при оценке реакционной способности к ферментации исследуемых целлюлоз. Остаточный лигнин в данном случае не выступает в качестве физического барьера, препятствующего действию ферментов на фибриллы целлюлозы.

ГЦ М обладает почти в 2 раза меньшей реакционной способностью к ферментации, чем ГЦ ПОО.

Таблица 2 - Результаты ферментации ГЦ

Показатель	ГЦ М	ГЦ ПОО
Конечная концентрация РВ, г/л	17,4	31,0
Выход РВ от начальной массы субстрата, %	47,0	83,7
Выход РВ: -от м.д. α-целлюлозы, % -от начальной массы субстрата с вычетом негидролизуемых примесей, %	57,4 50,1	101,1 92,4

ВЫВОДЫ

Исследована реакционная способность к ферментации целлюлоз, полученных в одинаковых условиях гидротропной варки из мискантуса и ПОО. Показано, что при ферментативном гидролизе ГЦ ПОО достигается степень конверсии в 2 раза выше, чем при гидролизе ГЦ М. Данный факт можно объяснить только природой субстрата, поскольку СК и СП обоих субстратов одного порядка: оба значения образца ГЦ М в 1,1 раза больше соответствующих значений ГЦ ПОО. Кроме того, нами ранее было обнаружено, что обогащенные целлюлозой продукты из ПОО всегда легче подвергаются гидролизу, чем продукты из мискантуса на серии субстратов [13].

Данная работа выполнена при поддержке проекта РФФИ «р_сибирь_а» № 13-03-98001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Денисова М.Н., Митрофанов Р.Ю., Будаева В.В., Архипова О.С. Целлюлоза и лигнин, полученные гидротропным способом из мискантуса // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4. – С. 198-206.
2. Денисова М.Н. Нейтральный способ получения целлюлозы из плодовых оболочек злаков // Ползуновский вестник. – 2011. – № 4-1. – С. 236-239.
3. Митрофанов Р.Ю., Будаева В.В., Денисова М.Н., Сакович Г.В. Гидротропный способ получения

целлюлозы из мискантуса // Химия растительного сырья. – 2011. – № 1. – С. 25-32.

4. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. – М.: Экология, 1991. – 320 с.

5. ГОСТ 25438-82. Целлюлоза для химической переработки. Методы определения характеристической вязкости. Издание официальное. – М.: Издательство стандартов, 1982. – 20 с.

6. L. Segal, J.J. Creely. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer // Textile Research Journal. – 1959. – № 29. – P. 789.

7. Макарова Е.И., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Использование мультиэнзимных композиций для гидролиза нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья / Е.И. Макарова, В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4. – С. 192-198.

8. Makoto Yoshida, Yuan Liu and et al. Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the Enzymatic Hydrolysis of Miscanthus sinensis to Monosaccharides // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2008. – Vol. 72. – P. 805-810.

9. Zhu L, O'Dwyer JP, Chang VS, Granda CB, Holtzapple MT. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility // Bioresour Technol. – 2008. – № 99. – P. 3817-3828.

10. Iovelovich M, Morag E. Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis // Bioresources. – 2011. – № 6. – P. 2818-2835.

11. Puri VP. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification // Biotechnol Bioeng. – 1984. – № 26. – P. 1219-1222.

12. Thompson DN, Chen HC, Grethlein HE. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface-area // Bioresour Technol. – 1992. – № 39. – P. 155-163.

13. Макарова Е.И. Реакционная способность к ферментации технических целлюлоз / Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 5-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (24-26 мая 2012 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-т, 2012. – С 287-291.

АЦИЛИРОВАНИЕ СУЛЬФАТНОГО ЛИГНИНА О-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТОЙ

А.В. Протопопов, Я.В. Фролова, О.В. Радкина

Исследован процесс ацилирования лигнина о-аминобензойной кислотой в присутствии трифторуксусной кислоты и тионилхлорида.

Ключевые слова: лигнин, ароматическая кислота, ацилирование.