

ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВЫХОДА БИОЭТАНОЛА ОТ СТАДИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА

Байбакова О.В.

Установлено, что химическая предобработка мискантуса раствором азотной кислоты в одну стадию позволяет получать субстрат с высокой реакционной способностью к ферментализу. Получен биоэтанол на средах ферментативных гидролизатов лигноцеллюлозного материала и технической целлюлозы мискантуса с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693. Показано, что при сбраживании ферментативного водного гидролизата, полученного из лигноцеллюлозного материала мискантуса, выход биоэтанола в 1,1 раза выше, чем при сбраживании ферментативного водного гидролизата, полученного из технической целлюлозы мискантуса.

Ключевые слова: биоэтанол, мискантус, лигноцеллюлозный материал, техническая целлюлоза, ферментативный гидролизат, биосинтез

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая мировая потребность в энергии, неустойчивые и дорогие нефтяные ресурсы, а также вопросы по изменениям глобального климата побудили к разработке возобновляемых источников энергии, которые могут дополнить ископаемые топлива [1]. В связи с этим лигноцеллюлозная биомасса обладает высоким потенциалом для производства биотоплив и других ценных веществ, основанного на концепции биопереработки.

Преобразование растительной биомассы позволяет получать биоэтанол второго поколения. Этот процесс включает три основных этапа. Первое, это производство растительной биомассы и её предобработка. Выбор биомассы сырья будет зависеть от локальной доступности, определяющей, что будет использоваться: излишки соломы злаковых (кукуруза, пшеница и сорго) или специализированная энергетическая культура (просо, мискантус). Предобработка включает механические, тепловые и химические воздействия, цель которых максимизировать воздействие на химические связи биомассы гликозидными гидролазами или эстеразами, которые ведут их гидролиз. Без предобработки выход моносахаридов из нативной биомассы, составляет порядка 20 %. Это объясняется тем, что структура лигноцеллюлозной матрицы, как древесного, так и недревесного сырья, является очень прочной. Эффективная химическая предобработка может повысить выход до 80 %. 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].

Далее проводится ферментативное осахаривание. На этом этапе требуется несколько ферментов превращения углеводных полимеров в раствор сбраживаемых моносахаридов. Необходимые ферменты должны обладать высокой скоростью гидролиза на натуральных субстратах и быть стабильными. При гидролизе целлюлоза и гемицеллюлоза превращаются в мономеры с образованием смеси гексозно-пентозных редуцирующих веществ (РВ), лигнин при этом не участвует в процессе и является балластом.

Последняя стадия преобразования растительной биомассы в этанол – сбраживание ферментативного гидролизата. Необходимо, чтобы на этой стадии обеспечивалось быстрое и эффективное сбраживание всех имеющихся сахаров [2].

Целью данной работы являлось исследование зависимости выхода биоэтанола от стадий химической предобработки мискантуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья выбрана биомасса энергетического растения мискантус. *Мискантус китайский* (веерник китайский, *Miscanthus sinensis* Anders.) – древовидная трава семейства злаковых, авторская форма которой выведена и адаптирована для Сибири сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Химическая предобработка осуществлялась в одну или две стадии.

Ранее в ИПХЭТ СО РАН были проведены фундаментальные исследования фермен-

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВЫХОДА БИОЭТАНОЛА ОТ СТАДИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА

толиза технической целлюлозы (ТЦ) мискантуса [3], а полученный ферментативный гидролизат превращён в биоэтанол [4].

ТЦ мискантуса была получена азотно-кислым способом в две стадии: измельчённое сырьё обрабатывается разбавленным раствором азотной кислоты при атмосферном давлении, а затем – разбавленным раствором гидроксида натрия [5]. После отжима и промывки до нейтральной реакции полученная ТЦ направлялась на ферментативный гидролиз. Способ выбран в силу доступности, простоты исполнения, дешевизны используемых реактивов, возможности выполнения на стандартном емкостном оборудовании.

Однако получение субстрата в две стадии – это достаточно сложно, поэтому с целью сокращения стадий химической предобработки целлюлозосодержащего сырья, предобработку мискантуса провели в одну стадию разбавленным раствором азотной кислоты при температуре 90-96 °С, исключая стадию обработки гидроксидом натрия. Был получен продукт, названный лигноцеллюлозным материалом (ЛЦМ), так как обработка в одну стадию позволяет удалить из сырья значительную часть гемицеллюлоз, но не удаляет лигнин.

ТЦ и ЛЦМ были получены на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН. Характеристики данных субстратов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики субстратов

Характеристики м.д., %	ЛЦМ	ТЦ
Целлюлоза по Кюршнеру	88,6	-
α-целлюлоза	-	93,6
Зола	4,8	1,0
Пентозаны	7,9	1,7
Лигнин	10,8	1,7

Ферментализация проводилась в водной среде в ферментёре авторской конструкции Павлова И.Н. [6]. В качестве биокатализаторов в работе использовались ферментные препараты: «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», г. Бердск) и «Брюзайм ВГХ» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diadic International Inc.», США). Препарат «Целлолюкс-А» позиционируется на рынке как целлюлоза для расщепления некрахмалистых полисахаридов, «Брюзайм ВГХ» как гемицеллюлаза.

Активная кислотность поддерживалась на уровне 4,6-4,7 ед. рН. Концентрация субстрата – 90 г/л. Мультиэнзимную композицию вносили следующим образом: «Целлолюкс - А» – 0,04 г/г субстрата, «Брюзайм ВГХ» –

0,2 г/г субстрата. Гидролиз проводили при температуре (46±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.

Выход редуцирующих веществ (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.

Концентрацию сахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрически с помощью реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (спектрофотометр «UNICO» UV-2804, США) в пересчете на глюкозу. Активная кислотность измерялась потенциометрически (рН-метр Снесер-1), крепость бражек (объемная доля спирта) определялась ареометром для спирта в дистилляте, полученном после предварительной перегонки спирта из бражки, согласно ГОСТ Р 51135-98-2003 [7]. По крепости полученных бражек и концентрации РВ в исходной среде рассчитывался выход этанола. Теоретическая концентрация этанола рассчитана по стехиометрическому уравнению брожения, а выход этанола – как отношение экспериментальной концентрации этанола к теоретической. Общая численность дрожжей выявлялась с использованием камеры Горяева. Морфологические характеристики дрожжей (количество почкующихся, упитанных и мёртвых клеток) определялись согласно методикам, принятым в спиртовой отрасли.

Гидролизаты ТЦ и ЛЦМ после фильтрации и пастеризации без выдержки при 100 °С охлаждались и направлялись на сбраживание с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (г. Москва). Штамм был выделен из ферментера Котласского целлюлозно-бумажного комбината и использовался для производства этанола. Особенностью штамма является его устойчивость к вредным примесям гидролизатов.

В гидролизаты было внесено по 10 % суспензии дрожжей, находящихся в экспоненциальной фазе развития и имеющих следующие характеристики: общее количество – 141,5 млн КОЕ/мл, из них почкующихся – 27,6 %.

Спиртовое брожение на средах ферментативных водных гидролизатов технической целлюлозы и лигноцеллюлозного материала мискантуса проводилось в анаэробных условиях при 28 °С в течение трех суток.

Отбор проб для определения РВ, объемной доли этанола, микробиологических показателей проводился ежедневно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимости концентрации РВ от стадий химической предобработки субстрата представлены на рисунке 1.

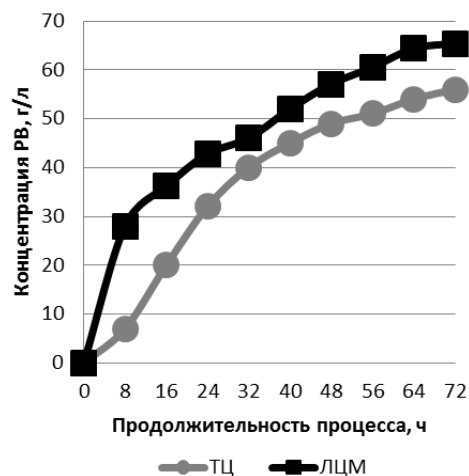


Рисунок 1 – Зависимости концентрации РВ от стадий химической предобработки субстрата.

Полученные результаты показали, что наибольшей реакционной способностью обладает лигноцеллюлозный материал, полученный обработкой азотной кислотой. Гидролиз проходил с большей скоростью и сопровождался большим накоплением РВ в гидролизате (65,4 г/л в сравнении с 56,7 г/л для технической целлюлозы).

Это можно объяснить химическим составом исходного сырья. При химической предобработке мискантуса в одну стадию выше массовая доля пентозанов, чем при химической предобработке в две стадии (7,9 % для ЛЦМ и 1,7 % для ТЦ, см. таблицу 1). Поэтому сумма гидролизуемых компонентов для ЛЦМ несколько больше, чем для ТЦ (96,5 % против 95,3 %). Таким образом, химическая предобработка мискантуса в одну стадию позволяет получать субстрат с высокой реакционной способностью к ферментализу, вторую стадию химической предобработки можно исключить.

Результаты спиртового брожения ферментативного водного гидролизата (ФВГ) ЛЦМ представлены в таблице 2.

Выход этанола рассчитан по стехиометрическому уравнению. Сравнение синтеза этанола, полученного при сбраживании ферментативных водных гидролизатов ЛЦМ и ТЦ,

показывает, что для ЛЦМ выход биоэтанола в 1,1 раза больше, чем для ТЦ. При использовании в качестве субстрата ЛЦМ этанол синтезируется с выходом 70,9 % от теоретического, а для ТЦ выход этанола снижается незначительно и составляет 62,7 % от теоретического.

Таблица 2 – Выход этанола и экономический коэффициент брожения в зависимости от стадий химической предобработки субстрата

Показатель	ЛЦМ	ТЦ
Концентрация субстрата на стадии ферментативного гидролиза, г/л	65,4	56,7
Крепость бражки, об. %	3,0	2,3
Остаточная концентрация РВ в бражке, г/л	14,1	5,5
Выход этанола, % от теоретического	70,9	62,7

При сбраживании ферментативного гидролизата ТЦ остаточная концентрация РВ в бражке в 2,6 раза меньше, чем при сбраживании гидролизата ЛЦМ. Это можно объяснить тем, что в ЛЦМ значительно больше массовая доля пентозанов по сравнению с ТЦ М, которые при ферментализе гидролизуются до пентоз, не сбраживаемых дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693.

Полученные образцы этанола сконцентрированы методом простой перегонки, дополнительной очистке не подвергались. Оценка качества полученных образцов биоэтанола была выполнена методом газожидкостной хроматографии, полученные результаты приведены на рисунке 2. В опытных образцах последовательность выхода обнаруженных веществ соответствует действующей нормативной документации [8]. Присутствие в следовых количествах ацетона, 2-бутанола и кротональдегида идентифицируют этанол как непищевой [8].

Довольно высокая концентрация альдегидов в опытных образцах биоэтанола от 3600 до 6100 мг/дм³ и эфиров (1000 мг/дм³ для ТЦ) связана с природой сырья, поскольку исключено накопление фракции альдегидов (фурфурола и оксиметилфурфурола) в процессе ферментативного гидролиза, так как процесс проводился при температуре (46±2) °С и рН 4,7.

Массовая концентрация сивушного масла в опытных образцах ниже, чем в спиртесырце из пищевого сырья (2500-3500 мг/дм³ против 5000 мг/дм³ [9]), что можно объяснить отсутствием белков и пептидов в опытных гидролизатах ТЦ.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВЫХОДА БИОЭТАНОЛА ОТ СТАДИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА

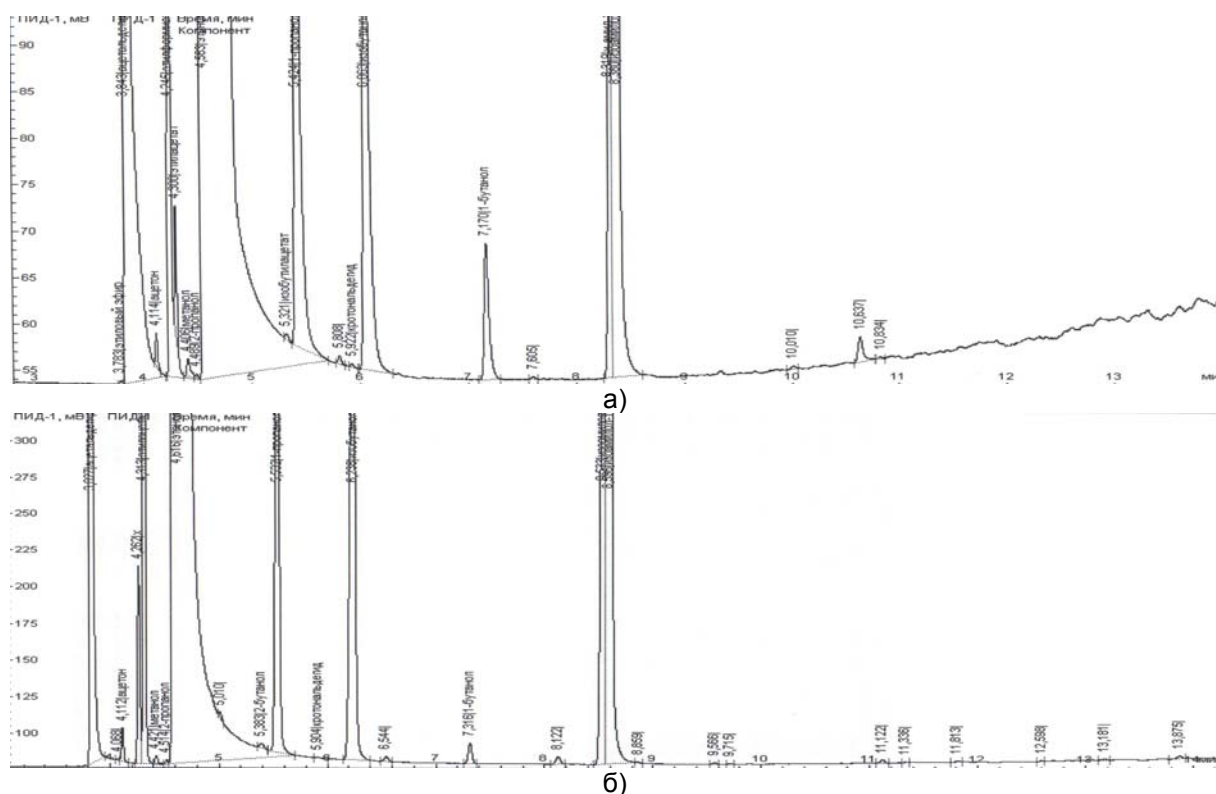


Рисунок 2 – Хроматограммы анализа биоэтанола из гидролизатов: а) ЛЦМ М; б) ТЦ М.

Таблица 3 – Содержание примесей в опытных образцах биоэтанола, полученного из ФВГ ЛЦМ М и ТЦ М

Показатель	ЛЦМ М	ТЦ М
Массовая концентрация альдегидов в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	6100	3600
Массовая концентрация эфиров в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	70	1000
Массовая концентрация свишного масла в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	2500	3500
Массовая доля метанола в пересчёте на безводный спирт, об. %	0,002	0,001

Важно, что в обоих образцах объёмная доля метанола крайне мала 0,001-0,002 об. %, что намного ниже 0,13 об. %, регламентированных для спирта-сырца из всех видов пищевого сырья (за исключением мелассы) [9], и менее 0,1 об. % – для спирта этилового технического [10].

Таким образом, ферментативный гидролиз ЛЦМ и ТЦ позволяет получить доброкачественный гидролизат с низким содержанием вредных примесей и обуславливает низкое содержание побочных и вторичных продуктов спиртового брожения в бражках.

ВЫВОДЫ

Выявлено, что химическая предобработка мискантуса раствором азотной кислоты в одну стадию позволяет получать субстрат с высокой реакционной способностью к ферментализу.

Показано, что при сбраживании ферментативного водного гидролизата ЛЦМ мискантуса выход биоэтанола в 1,1 раза выше, чем для ТЦ мискантуса.

Установлено, что образцы биоэтанола, полученные из ЛЦМ и ТЦ мискантуса, характеризуются низким содержанием метанола.

Работа выполнена при поддержке совместного интеграционного проекта № 11 фундаментальных исследований ИПХЭТ СО РАН и ИХ Коми НЦ УрО РАН «Химическая, механохимическая и ферментативная деструкция целлюлозосодержащего сырья для получения ценных продуктов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry // Bioenerg. Res. – 2012. – № 5. – P. 1043-1066.
- Wagschal K. Plant cell walls to ethanol // Biochem. J. – 2012. – № 442. – P. 241–252.
- Макарова Е.И. Результаты ферментации целлюлозы мискантуса в ацетатном буфере и водной среде // Химия в интересах устойчивого развития.

– 2013. – Т. 21, № 2. – С. 219-225.

4. Скиба Е.А., Будаева В.В., Павлов И.Н., Макарова Е.И., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Получение ферментативных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и их спиртовое брожение // Биотехнология. – 2012. – № 6. – С. 42-53.

5. Гисматулина Ю.А., Будаева В.В. Химический состав российского мискантуса и качество целлюлозы, полученной из него // Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – Т. 21, № 5. – С. 539-544.

6. Павлов И.Н. Установка для исследования биокаталитического превращения продуктов переработки недревесного сырья // Катализ в промышленности. – 2014. – № 1. – С. 66-72.

7. ГОСТ Р 51135-2003. Изделия ликероводочные. Правила приемки и методы анализа. Технические требования. Введ. 1998-03-02. – М.: ИУС, 2003. – 116 с.

8. ГОСТ Р 51786-2001. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – М.: Изд-во стандартов, 2001. – 8 с.

9. ГОСТ Р 52193-2003. Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Технические условия. – М.: Изд-во стандартов, 2005. – 4 с.

10. ГОСТ 17299-78. Спирт этиловый технический. Технические условия. – М.: Изд-во стандартов, 1978. – 4 с.

УДК 547.458.81

ПОЛУЧЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ АЗОТНОКИСЛЫМ СПОСОБОМ НАПРЯМУЮ ИЗ СОЛОМЫ ЛЬНА-МЕЖЕУМКА

Гисматулина Ю.А.

Определен химический состав соломы льна-межеумка. Получена целлюлоза азотнокислым способом напрямую из соломы льна-межеумка. Выделенная целлюлоза характеризуется высоким качеством: α-целлюлоза 84,63 %, нецеллюлозные компоненты: зольность и массовая доля остаточного лигнина 0,07 % и 1,40 % соответственно. Степень полимеризации целлюлозы 500. ИК-спектр целлюлозы из соломы льна-межеумка показал наличие всех характеристических частот, характерных для целлюлозы: 3570-3125 см⁻¹, 2940-2860 см⁻¹, 1631 см⁻¹, 1433 см⁻¹, 1373 см⁻¹, 1338 см⁻¹, 1163 см⁻¹, 1112 см⁻¹, 1059 см⁻¹. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности создания основ технологии переработки отходов масличного льна – соломы льна-межеумка – без разделения на волокно и костру в целлюлозу и продукты ее химической модификации с использованием недорогих и нетоксичных реактивов и стандартного оборудования при атмосферном давлении.

Ключевые слова: солома льна-межеумка, зольность, жировосковая фракция, целлюлоза по Кюршнеру, азотнокислый способ, альфа-целлюлоза, остаточный лигнин, степень полимеризации.

ВВЕДЕНИЕ

Основным видом природного волокнистого сырья для производства целлюлозных материалов многие десятилетия был и остается до сих пор хлопок. Однако для России хлопок является на 100 % импортируемым сырьем. Таким образом, проблема обеспечения широкого промышленного применения волокнистых материалов, способных составить альтернативу хлопку, чрезвычайно важна. В России для промышленного освоения производства целлюлозы из недревесных источников интерес представляет лен-межеумок, посевы которого ежегодно наращиваются в Алтайском крае, в Центральной России, в южных регионах страны и Тверской

области [1, 2]. Семена используются для производства льняного масла, обладающего ценными пищевыми и лечебными свойствами, а отходы переработки (солома и короткое волокно) из-за отсутствия технологии выделения целлюлозы не находят применения. Урожайность такого низкосортного волокнистого сырья в Алтайском крае составляет 1,2 т/га.

Исследования по переработке биомассы, в том числе льна-межеумка, в спектр конкурентоспособных продуктов и энергию в последнее время обладают высокой популярностью [3]. Биорефайнери (англ. «biorefinery») используют ежегодно возобновляемое растительное сырье для выработки биополимеров и их производных, а также индивидуальных