

ЭФФЕКТ АВТОГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ

И.Н. Павлов

Биомасса мискантуса имеет сложную структуру, состоящую из переплетения целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, что препятствует ферментативному гидролизу целлюлозы в технологии производства биоэтанола. Ферментативный гидролиз целлюлозы в необработанном мискантусе выделяет только 15 % редуцирующих веществ. Чтобы увеличить доступность целлюлозы, в этом исследовании измельченный мискантус предварительно подвергали автогидролитической обработке в горячей воде под давлением насыщенного пара. В условиях исследования при изменении температуры от 200 до 220 °С и давлении насыщенного пара от 1,5 до 2,5 МПа, продолжительности обработки от 10 до 25 мин проведена сравнительная обработка горячей водой и объединенной предварительной обработкой горячей водой с резким сбросом давления, приводящим к взрывному эффекту выхода твердого вещества. Проведенная обработка обеспечивает практически полное удаление гемицеллюлоз и не оказывает существенного влияния на лигнин и позволяет достичь максимального накопления целлюлозы 69% при проведении автогидротермической обработки, объединенной с резким сбросом давления. Ферментативный гидролиз твердых остатков в течение 72 ч высвободил 48 % редуцирующих веществ. Было предположено, что псевдолигнин, повторно осажденный на поверхности остаточных твердых веществ, ограничил доступ ферментов и сыграл решающую роль в эффективности ферментативного гидролиза и накоплении сахаров. Для удаления остаточного лигнина и обеспечения доступа фермента к целлюлозе проведена водно-щелочная обработка твердых остатков совместно с отбелкой перекисью водорода. В результате дополнительной обработки достигнута делегнификация твердых осадков с получением технических целлюлоз, после гидролиза которых получен максимальный выход до 63,7 %.

Ключевые слова: лигноцеллюлозная биомасса, мискантус, предварительная обработка, жидкая горячая вода, ферментативный гидролиз.

ВВЕДЕНИЕ

Лигноцеллюлозные материалы имеют сложную структуру, связанную с содержанием основных фракций лигнина, гемицеллюлоз, целлюлозы, кристаллическостью целлюлозы, что определяет природную неподатливость для переработки в технологии производства биоэтанола. Чтобы переработка стала возможной, лигноцеллюлозные материалы необходимо предобработать. Эффективная предварительная обработка может обеспечить получение целлюлозы, доступной для ферментов, и свести к минимуму образование продуктов разложения, которые ингибируют действие ферментативных препаратов. Наиболее широко применяемые технологии предобработки включают химическую предобработку разбавленной кислотой, щелочную предобработку [1-3] и гидротермическую предобработку [4]. Используемые виды предобработки позволяют снизить содержание лигнина, практически полностью удалить ге-

мицеллюлозы и получить целлюлозу, пригодную для получения различных производных простых и сложных эфиров [5], получить качественный субстрат для дальнейшего ферментативного гидролиза в биоэтанол [6] или для биосинтеза бактериальной целлюлозы на ферментативных гидролизатах технической целлюлозы [7]. Предварительная обработка горячей водой выборочно гидролизует гемицеллюлозный компонент и изменяет структуру лигнина, что приводит к увеличению доступности целлюлозных волокон [8].

Одним из ограничений предварительной автогидролитической обработки горячей водой является ограниченное удаление лигнина. Оставшийся лигнин препятствует ферментативному гидролизу. Для удаления лигнина используют различные подходы, связанные с добавлением катализаторов [9], добавлением этапов предварительной обработки [10]. В данной работе проведена предварительная автогидролитическая обработка мискантуса в горячей воде под давлением

ПОЛЗУНОВСКИЙ ВЕСТНИК № 1 2018

ЭФФЕКТ АВТОГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ

насыщенного пара. В условиях исследования при изменении температуры от 200 до 220 °С и давлении насыщенного пара от 1,5 до 2,5 МПа, продолжительности обработки от 10 до 25 мин проведена сравнительная обработка горячей водой и объединенной предварительной обработкой горячей водой с резким сбросом давления, приводящим к взрывному эффекту твердого вещества. Полученные твердые остатки подвергали водно-щелочной обработке и отбелке перекисью водорода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сырьем для получения целлюлозы являлся мискантус сорта Сорановский – *Miscanthus sinensis* – Andersson, Мискантус является быстрорастущим энергетическим растением, наземная часть которого состоит из жесткого стебля с междоузлиями и листовой части [11]. Солому мискантуса предварительно измельчали до размера частиц 10-15 мм. Химический состав мискантуса: 48,7 % целлюлозы, 20,6 % пентозанов, 20,8 % лигнина, 5,0 % золы. Полученную реакционную массу фильтровали с получением волокнистого остатка. Волокнистый остаток промывали до нейтральной реакции и разделяли. Первую часть высушивали, вторую часть облагораживали путем обработки перекисью водорода в 2 % растворе гидроксида натрия.

Предварительная обработка проводится на универсальной термобарической установке [12]. Измельченная биомасса мискантуса подвергалась обработке в горячей воде в диапазоне 200-220 °С с варьированием времени пребывания от 10 до 25 мин. Обработка мискантуса навеской 100 г проводилась в водной суспензии с гидромодулем 1:10. Суспензию помещали в реакционную камеру, после чего нагревали до рабочей температуры и соответствующего ей давления. Мискантус обрабатывали в течение заданного времени. Рабочую камеру размещали на платформе, где происходило ее маятниковое качание для перемешивания массы.

Работы, выполненные в рамках данного исследования, проводились с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мискантус обработан под действием горячей воды в условиях: гидротермической обработки под давлением насыщенного пара с последующим естественным охлаждением реакционной массы; гидротермобарической

обработки под давлением насыщенного пара с последующим резким сбросом давления и взрывным высвобождением массы. Условия обработки приведены в таблице 1.

Таблица 1. Условия предварительной обработки

Образец, №	Условия обработки			
	Давление, МПа	Время выдержки, мин	Температура, °С	Дополнительные условия
1	1,5	10	200	термическая обработка
2	1,5	10	200	термобарическая обработка со сбросом давления
3	1,5	25	200	термобарическая обработка со сбросом давления
4	2,5	10	220	термобарическая обработка со сбросом давления

Сравнение количественных составов необработанной биомассы и полученных волокнистых фракций в результате обработки представлены на рисунке 1. Расщепление гемицеллюлоз, связанное с разрушением ацетильных и метоксильных групп, приводит к образованию уксусной и муравьиной кислот, что оказывает гидролитическое расщепление на лигноуглеводный комплекс. В результате в образце после термической обработки содержание гемицеллюлоз уменьшено в 2 раза. Удаления большей части гемицеллюлоз вследствие гидролиза и выхода растворимой части в жидкую фазу привело к увеличению концентрации целлюлозы в твердой фазе, т.к. она в меньшей мере подвергается гидролитическому расщеплению. В итоге ее концентрация повысилась до 60,76 %, а доля лигнина увеличилась до 27,27 %.

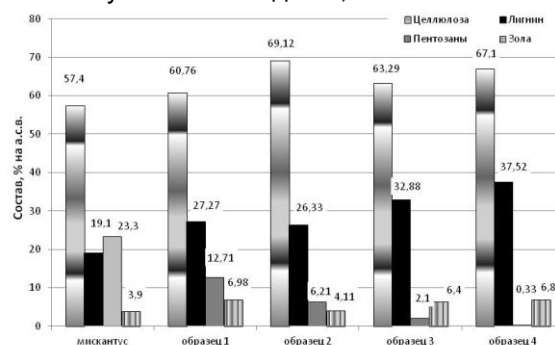


Рисунок 1 - Химический состав мискантуса и твердых остатков после обработки

Термобарическое воздействие на перерабатываемую биомассу при аналогичных условиях процесса (образец № 2) приводит к дополнительному механическому разрушению лигноцеллюлозной матрицы и заметному разрыхлению массы по отношению к первоначальной структуре сырья. Полученная волокнистая фракция более рыхлая в сравнении с образцом после термической обработки. Практический результат проведения взрывной выгрузки после термической обработки проявляется в том, что происходит дополнительное растворение гемицеллюлоз и снижение содержания до 6,21 % по сравнению с 12,71 % в случае предобработки без взрыва. Содержание целлюлозы в твердом остатке увеличилось до 69,12 %, при этом доля кислотонерастворимого лигнина осталась практически не измененной 26,33 %.

Увеличение времени выдержки до 25 мин перед взрывной выгрузкой (образец № 3) дает ужесточение условий обработки, что приводит к усилению гидролиза гемицеллюлоз и снижению их концентрации до минимального содержания 2,1 %. Более жесткие условия обработки влекут разрушение целлюлозной части биомассы, и концентрация целлюлозы снижается до 63,29 %, в тоже время наблюдается рост концентрации кислотонерастворимого лигнина.

Повышение температуры до 220 °С и действующего давления насыщенного водяного пара повышает жесткость обработки мискантуса. Происходит практически полное растворение гемицеллюлоз и снижение концентрации до 0,33 %. Вместе с тем, в биомассе общее содержание целлюлозы остается практически без изменения - около 67,1 % при равной продолжительности обработки с образцом № 2. Протекание побочных реакций реполимеризации растворенного лигнина при взаимодействии с продуктами деструкции гемицеллюлоз приводит к увеличению содержания лигнина до 37,52 %.

Волокнистые продукты испытывали на ферментативную усвояемость для оценки эффективности предварительной обработки, где параметром оценки является выход редуцирующих веществ (РВ). 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, представленной в [13]. Испытания проводили при 45 °С в течение 72 ч в ацетатном буфере при рН 4,8 и плотности

субстрата 33,3 г/л. Каждые 8 ч проводили отбор проб. Выход РВ на навеску субстрата без вычета нецеллюлозных примесей рассчитан с учетом коэффициента 0,9, связанного с присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным и ангидроксилосным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

На рисунке 2 представлены результаты ферментативного гидролиза волокнистых продуктов. После предобработки при воздействии горячей воды выход редуцирующих веществ повышается почти в 3-3,5 раза по сравнению с необработанной биомассой.

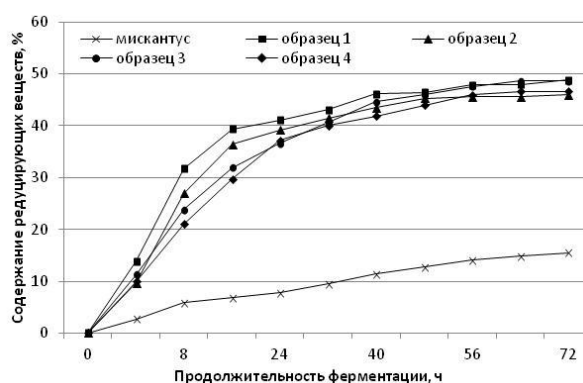


Рисунок 2 - Ферментативный гидролиз твердого остатка

В результате при обработке в горячей воде при 200 °С удаление большей части гемицеллюлоз освобождает поры на поверхности целлюлозы и делает ее более доступной для ферментов. Выход редуцирующих веществ для образца, обработанного в этих условиях, достигает наибольшего значения - около 50 % (образец №1). Ужесточение условий обработки, связанное с резким сбросом давления, приводит к дополнительному разрушению лигноцеллюлозной матрицы и изменению структуры целлюлозы. Очевидно, лигнин-углеводные связи разрушаются, а лигнин частично деполимеризуется [14]. Лигнин в исследуемых условиях, по-видимому, подвергается сначала дегградации при проведении резкого сброса давления (образец №2), а затем реакции реполимеризации, которая усиливается с ужесточением условий обработки. Практически полное удаление гемицеллюлоз при жестких условиях обработки для образцов № 3 и 4 не дает эффекта при ферментативном гидролизе, т.к. происходит очевидное увеличение выделения лигнина. Действие ферментов в таких условиях приводит к накоплению от 46,0 до 48,6 %% редуцирующих веществ. Вероятной причиной

ЭФФЕКТ АВТОГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ

снижения выхода является выделение лигнина и конденсации его на поверхности целлюлозы, что подавляет действие ферментов. Повышение жесткости обработки с увеличением температуры до 220 °С приводит к накоплению в твердом остатке нерастворимого псевдолигнина [15], что ограничивает протекание ферментативного гидролиза.

Гидротермическая обработка горячей водой не оказывает существенного влияния на лигнин, и степень удаления лигнина зависит от вида сырья и условий обработки [16]. В то же время присутствие лигнина препятствует действию ферментов и снижает ферментативную усвояемость целлюлозы [17]. На практике используют различные способы для усиления делигнификации на стадии обработки и снижения его уровня в твердом остатке [9], а также для предотвращения дезактивации ферментов в ходе ферментативного гидролиза [17, 18]. В настоящей работе для снижения доли лигнина в субстрате проведена водно-щелочная обработка твердых остатков совместно с отбелкой перекисью водорода. В таблице 2 приведен состав технических целлюлоз после проведенной отбелки.

Таблица 2. Химический состав технических целлюлоз

Образец	М.д. α-целлюлозы, %	М.д. лигнина, %	М.д. гемицеллюлоз, %	М.д. золы, %	Удаления лигнина, %	Удаления гемицеллюлоз, %
1	83,51	9,72	7,97	5,54	64,3	37,3
2	88,67	7,32	4,97	2,82	72,2	20,0
3	88,40	9,20	1,60	5,10	72,0	23,8
4	94,92	6,63	0,28	5,95	82,3	15,2

Проведенная отбелка обеспечивает значительную делигнификацию целлюлоз со снижением концентрации лигнина в отбеленных образцах в 3-5 раз, в результате коэффициент удаления лигнина в сравнении с исходными образцами достигает 64,3-82,3 %%. При обработке также происходит разрушение части гемицеллюлоз, коэффициент удаления составляет 15,2-37,3 %%. Повреждение целлюлозы является незначительным, поэтому при удалении составляющих компонентов в технической целлюлозе значительно повышается содержание α-целлюлозы до 94,92 %. Полученные после отбелки технические цел-

люлозы подвергнуты ферментативному гидролизу (рисунок 3).

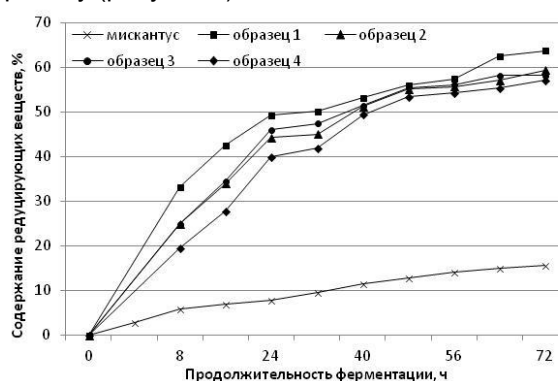


Рисунок 3 - Ферментативный гидролиз технических целлюлоз

Накопление редуцирующих веществ увеличилось через 72 часа ферментативной обработки и составило 57,1-63,7 %%. При отбелке происходит повреждение целлюлозы, которое приводит к изменению морфологической структуры и степени полимеризации, что качественно влияет на ферментативную усвояемость в результате увеличения доступной поверхности. Использование перекиси водорода при отбелке создает делигнифицирующий эффект [19], в результате чего снижается ингибирующее действие на фермент. Кроме того, происходит удаление лигнина из целлюлозных макромолекул, что делает их более доступными для ферментов.

Недостатком метода обработки горячей водой является повышенные затраты энергии по сравнению с методами кислотной и щелочной обработок. После проведенной отбелки максимальный выход редуцирующих веществ по отношению к твердым остаткам, полученным после гидротермической обработки, увеличился на 30,5 %. Такое повышение выхода вероятно неоправданно, так как требует дополнительного потребления энергии на проведение стадии отбелки и последующей промывки технических целлюлоз перед ферментативным гидролизом.

ВЫВОДЫ

Проведенная предварительная обработка мискантуса в горячей воде под давлением насыщенного пара и с объединенным воздействием резкого сброса давления приводит практически к полному удалению гемицеллюлоз и не оказывает существенного влияния на лигнин. В результате протекания процесса повторного осаждения псевдолигнина ограни-

чивается протекание ферментативного гидролиза целлюлозы и накопление редуцирующих веществ достигает 48 %. Проведенное облагораживание с отбелкой обеспечивает значительную делигнификацию целлюлоз, в результате коэффициент удаления лигнина в сравнении с исходными образцами достигает 64,3-82,3 %%. Накопление редуцирующих веществ для всех образцов технической целлюлозы увеличилось через 72 часа ферментативной обработки до 57,1-63,7 %%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shi, J. Sugar yields from dilute sulfuric acid and sulfur dioxide pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis of switchgrass [Текст] / J. Shi, M.A. Ebrik, C.E. Wyman // *Bioresource Technology*. – 2011. – V. 102. – P. 8930–8938.
- Wu, L. Efficient conversion of sugarcane stalks into ethanol employing low temperature alkali pretreatment method [Текст] / L. Wu, Y. Li, M. Arakane, M. Ike, M. Wada, Y. Terajima, S. Ishikawa, K. Tokuyasu // *Bioresource Technology*. – 2011. – V. 102. – P. 11183–11188.
- Байбакова, О.В. Химическая обработка плодовых оболочек овса для синтеза биоэтанола [Текст] / О.В. Байбакова // *Ползуновский вестник*. – 2015. – № 4-2. – С. 71-74.
- Zeng, M. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: enzymatic hydrolysis (part 1) [Текст] / M. Zeng, E. Ximenes, M.R. Ladisch, N.S. Mosier, W. Vermerris, C.-P. Huang, D.M. Sherman // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 109. – P. 390–397.
- Гисматулина, Ю.А. Разработка рациональных условий азотнокислого способа получения целлюлозы из мискантуса [Текст] / Ю.А. Гисматулина // *Фундаментальные исследования*. – 2017. – № 10-2. – С. 189-193.
- Скиба, Е.А. Биоэтанол из плодовых оболочек овса, предварительно обработанных методом щелочной делигнификации. I. Химическая и ферментативная трансформация сырья [Текст] / Е.А. Скиба, В.В. Будаева, Е.И. Макарова, О.В. Байбакова, В.Н. Золотухин, Г.В. Сакович // *Биотехнология*. – 2017. – Т. 33. – № 2. – С. 68-75.
- Гладышева, Е.К. Биосинтез бактериальной целлюлозы на ферментативном гидролизате технической целлюлозы из плодовых оболочек овса [Текст] / Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2017. – Т. 7. – № 1 (20). – С. 140-146.
- Yu, Q. Hydrolysis of sweet sorghum bagasse and eucalyptus wood chips with liquid hot water [Текст] / Q. Yu, X. Zhuang, Q. Wang, W. Qi, X. Tan, Z. Yuan // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 116. – P. 220–225.
- Imman, S. Influence of alkaline catalyst addition on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw [Текст] / S. Imman, J. Arnthong, V. Burapatana, V. Champreda, N. Laosiripojana // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – V. 278. – P. 85–91.
- Kumar, L. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility [Текст] / L. Kumar, V. Arantes, R. Chandra, J. Saddler // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 103 (1). – P. 201-208.
- Гисматулина, Ю.А. Химический состав разных морфологических частей мискантуса урожая 2014 года [Текст] / Ю.А. Гисматулина // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 2. – С. 4897-4900.
- Павлов, И.Н. Изучение реакционной способности к ферментативному гидролизу субстратов на основе продуктов безреагентного метода предобработки плодовых оболочек овса [Текст] / И.Н. Павлов, Е.И. Макарова, Д.А. Чибиряев // *Ползуновский вестник*. – 2013. – №3. – С. 193-197.
- Макарова, Е.И. Использование мультиэнзимных композиций для гидролиза нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья [Текст] / Е.И. Макарова, В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов // *Ползуновский вестник*. – 2010. – № 4-1. – С. 192-198.
- Bobleter, O. Degradation of poplar lignin by hydrothermal treatment [Текст] / O. Bobleter, R. Concin // *Cellulose Chemistry and Technology*. – 1979. – V. 13. – P. 583-593.
- Pan, X. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content [Текст] / X. Pan, D. Xie, N. Gilkes, D.J. Gregg, J.N. Saddler // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2005. – V. 121-124. – P. 1069-1079.
- Garrote G. Hydrothermal and pulp processing of Eucalyptus [Текст] / G. Garrote, M.E. Eugenio, M.J. Diaz, J. Ariza, F. Lopez // *Bioresource Technology*. – 2003. – V. 88 (1). – P. 61-68.
- Yu, Q. Liquid hot water pretreatment of energy grasses and its influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility [Текст] / Q. Yu, J. Liu, X. Zhuang, Z. Yuan, W. Wang, W. Qi, Q. Wang, X. Tan, X. Kong // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 199. – P. 265–270.
- Макарова, Е.И. Глюкозный гидролизат из гидротропной целлюлозы мискантуса (влияние «Tween 80») [Текст] / Е.И. Макарова, М.Н. Денисова, И.Н. Павлов, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2014. – № 9. – С. 2156.
- Пен, Р.З. Технология целлюлозы. Т.2 Сульфитные способы получения, очистка, отбелка, сушка целлюлозы. – Красноярск: СибГТУ, – 2001. – 358 с.

Павлов Игорь Николаевич, кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: pawlow-in@mail.ru, тел. 8 (903) 958-41-40.