

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЛАКОВ

В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов, В.Н. Золотухин

В статье приведены результаты исследования ферментативного гидролиза отходов переработки злаковых культур. Показана достаточно высокая активность отечественного препарата ЦеллоЛюкс-А в реакции ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья, полученного в процессе предварительной химической обработки соломы и шелухи овса.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире наблюдается рост производства этилового спирта. Это связано с его применением в качестве биотоплива. Использование смесей бензин-этанол в качестве моторного топлива известно давно. В Европе и США широко используется топливо представляющие собой смесь бензина с 10 % и 20 % добавкой этанола. Данный вид топлива позволяет его использовать в двигателях внутреннего сгорания без переделки последних. В Бразилии сотни тысяч машин работают на этаноле. Толчком к этому послужил энергетический кризис семидесятых годов. Для России вопрос производства биотоплива так остро как для Запада не стоит. Однако повышение цен на нефть, а, следовательно, и на нефтепродукты заставляет взглянуть на спирт с другой стороны.

Традиционно для производства этилового спирта используют крахмалосодержащее сырье и сахар (меласса). В качестве крахмалосодержащего сырья преимущественно используются хлебные злаки (пшеница, рожь, ячмень), рис, кукуруза, и особенно картофель. Перечисленное сырье является пищевыми продуктами. Учитывая нарастающий дефицит продуктов питания, получение спир-

та из целлюлозы является перспективным. Преимущество данного вида сырья также заключается в том, что в мире ежегодно возобновляется до 100 млрд. т. целлюлозы, в то время как крахмала только 1 млрд. т., а сахара – 0,1 млрд. т.

Исходя из выше изложенного, актуальными являются исследования получения этилового спирта из целлюлозосодержащего сырья.

Традиционно этиловый спирт получают брожением сахаров, чаще всего глюкозы под влиянием энзимов и дрожжей. Глюкоза или содержится в исходных продуктах, или ее получают гидролизом полисахаридов – крахмала и клетчатки.

Для замены пищевых продуктов в производстве спирта ведутся активные поиски экономически выгодной технологии получения спирта из целлюлозы, содержащейся в больших количествах в отходах лесной, целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности. Эта отрасль промышленности под названием гидролизной получила в СССР широкое развитие [1].

Гидролиз целлюлозы до глюкозы можно осуществить двумя способами: химическим и ферментативным. В основе химического гидролиза лежит реакция:



Данная реакция протекает под действием кислот, поэтому остро стоит проблема, связанная с утилизацией отходов.

Для практического использования процессов ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья необходимы получение высокоактивных ферментных препаратов, активация исходных субстратов, выбор опти-

мальных параметров процесса ферментации.

Последний метод имеет преимущество, заключающееся в использовании экологически чистых технологий, основанных на природных процессах и механизмах конверсии веществ ферментами микробного происхождения [2].

Механизм ферментативного гидролиза

несколько сложнее химического, но позволяет селективно проводить гидролиз и в отличие от химического гидролиза не приводит к образованию целого ряда побочных продуктов и большого количества отходов.

Ферментативная деструкция целлюлозы происходит, как правило, под действием не отдельных ферментов, а полиферментных систем (комплексов). Ферментам, входящим в состав этих систем, присуща определенная специализация: одни из них эффективно гидролизуют «внутренние» гликозидные связи между моносахаридными остатками, удаленными от концов полисахарида (их называют эндоферменты); другие предпочтительно расщепляют «внешние» гликозидные связи, находящиеся на концах полисахаридной молекулы (экзоферменты). Глюкозидазы осуществляют гидролиз гликозидных связей ди- и олигосахаридов.

Целлюлазный комплекс состоит, как правило, из ферментов четырех типов: эндо-1,4-β-глюканазы, экзо-1,4-β-глюканазы (экзо-целлобиогидролазы), экзо-1,4-β-глюкозидазы и целлобиазы (β-глюкозидаза).

Глубокий гидролиз целлюлозы осуществляется в результате согласованного действия полиферментной системы (полиферментного целлюлазного комплекса), состоящей из эндо- и экзодеполимераз и β-глюкозидаз [3].

Методы предобработки целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) по характеру воздействия можно разделить на четыре типа: физические, механические, химические и биологические.

К физическим методам относятся обработка γ-лучами или потоком электронов, обработка микроволновым излучением (от 2400 до 2500 МГц), нагревание на воздухе или в атмосфере CO₂ (100°C), в воде или в керосине, охлаждение, обработка при повышенном или пониженном давлении, действие ультразвука. Облучение высокой энергии приводит к деполимеризации целлюлозы, и накоплению микродефектов в ее трехмерной структуре. Что в конечном счете приводит к увеличению реакционную способность ЦСС от 2 до 5 раз [4, 5].

Механические методы предобработки ЦСС заключаются в их измельчении на различных видах мельниц (шаровые, коллоидные или вибромельницы), дезинтеграторах и дробилках, диспергировании на вальцах и т.д. Измельчают ЦСС как в сухом, так и во влажном виде. Использование механических методов приводит к разрушению кристаллической структуры целлюлозы, увеличению по-

верхности, доступной целлюлолитическим ферментам и, как следствие, к значительному возрастанию реакционной способности ЦСС (в 10 и более раз) [6].

Химические методы предобработки основаны на способности тех или иных химических соединений растворять лигнин или целлюлозу, либо приводить к набуханию или разрушению её структуры. Комплексные соединения Cd, Ni, Zn с этилендиамином, со щелочью и биуретом, концентрированные минеральные кислоты (фосфорная, серная, соляная) могут растворять целлюлозу. При разбавлении таких растворов водой, ацетоном или спиртом происходит осаждение (регенерация) целлюлозы. Регенерированная целлюлоза является практически аморфной. Аморфную целлюлозу так же получают обработкой параформом в диметилсульфоксиде. Растворение или набухание целлюлозы происходит в результате воздействия четвертичных аммониевых оснований (тетраметил-, триметилэтил-, триметилбензил-), первичных моно-, ди- и триаминов жирного ряда. Такая обработка с последующим вытеснением химических реагентов органическими растворителями сопровождается значительной аморфизацией целлюлозы [7].

Набухание, растворение и аморфизация целлюлозы происходит также в растворах неорганических солей [7].

Делигнификация ЦСС осуществляется разбавленными растворами щелочи (от 1 % до 2 %), как правило, NaOH или аммиаком (водным или газообразным) при кипячении или автоклавировании. К делигнификации приводит широко применяемый в целлюлозно-бумажной промышленности процесс сульфатной или сульфитной варки [4, 8].

В качестве химических методов предобработки ЦСС используют также методы, основанные на действии окислителей [9].

Следует отметить получившую большое развитие так называемую взрывную дефибриацию ЦСС по декомпрессионному принципу (или паровой взрыв). ЦСС подвергают кратковременному воздействию перегретого пара под давлением, далее давление сбрасывают, что вызывает паровой взрыв ЦСС. При таких условиях лигнин плавится, частично разрушается и выходит из структуры целлюлозы, кроме того, под действием парового взрыва происходит частичная дезинтеграция целлюлозы, а также гидролиз гемицеллюлоз.

Химические методы предобработки, основанные на аморфизации или набухании целлюлозы, приводят от 10 до 15 кратному увеличению ее реакционной способности;

делигнификация, паровой взрыв и другие методы увеличивают реакционную способность от 5 до 10 раз.

Биологические методы предобработки основаны на использовании лигнолитических микроорганизмов, способных избирательно по отношению к целлюлозе утилизировать лигнин в качестве источника углерода. Эти методы требуют достаточно большого времени и относительно эффективны [10].

Каждый из приведенных выше методов предобработки имеет достоинства и недостатки. Основным их плюсом является значительное увеличение реакционной способности целлюлозосодержащего сырья. Основным минусом – достаточно высокая стоимость.

Анализ данных по влиянию совмещения разных методов предобработки на реакционную способность ЦСС показывает, что в случае одновременного применения двух эффективных методов, каждый из которых приводит к существенному увеличению реакционной способности (таких, как делигнификация, измельчение, обработка концентрированными H_3PO_4 или $NaOH$, кадоксеном) не происходит прямого суммирования их индивидуального действия, а наблюдается лишь определенная аддитивность, а в ряде случаев и элиминирование действия друг друга. Напротив, совмещение слабо и сильно действующих методов (например, обработка линта 1% $NaOH$ и его измельчение) приводит к суммированию воздействия. По-видимому, индивидуальное действие каждого эффективного метода предобработки уже приводит к возникновению таких качественных изменений в структуре ЦСС, что исключает возможность существенных дополнительных изменений при применении другого эффективного метода предобработки [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для изучения ферментативного гидролиза соломы и шелухи овса было приготовлено 7 образцов отличающихся методами предобработки. Общая схема изображена на рисунке 1. Образец №5 (с) перед проведением щелочной делигнификации подвергают предварительному гидролизу соляной кислотой. Для этого 100 г соломы в 1,5 л 0,2 М раствора соляной кислоты нагревают от 2 до 4 ч при температуре от 95 °С до 98 °С. По окончании выдержки охлаждают, фильтруют, промывают солому на фильтре водой и далее проводят обработку раствором щелочи.

Предобработанный материал фракционируют. Для работы отбирают фракцию с

размерами частиц от 0,63 мм до 2,5 мм. В подготовленных к ферментации образцах определяют влажность и остаточный лигнин. Результаты сведены в таблицу 1.

Проведение ферментативного гидролиза В коническую колбу емкостью 500 см³ помещают 5 г целлюлозосодержащего сырья, 150 см³ ацетатного буфера (рН = 4,7), в котором растворен ферментный препарат (ЦеллоЛюкс-А). Образец ферментируют в течение 72 ч при 50 ± 2 °С и интенсивном перемешивании. По окончании процесса остаток отфильтровывают под вакуумом, отжимают и высушивают. В гидролизате определяют содержание редуцирующих веществ (РВ) и глюкозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния предобработки на концентрацию глюкозы в гидролизате

В работе было использовано три вида предобработки – это обработка раствором щелочи, обработка пероксидом водорода в щелочной среде и их поочередное воздействие.

Из результатов, представленных в таблице 1 видно, что содержание глюкозы в гидролизате нативных соломы и шелухи овса мало, что связано с высоким содержанием лигнина, который экранирует волокна от действия ферментов. Наибольшая глубина гидролиза получена при ферментации образца №3 (ш), что связано с низким содержанием лигнина и дополнительным разрыхлением структуры целлюлозы под действием химической предобработки.

Исследование зависимости концентрации глюкозы от времени ферментации

Образцы №3 (ш) и №5 (с) были подвергнуты ферментации в течение трех суток. В первые 8 часов пробы на содержание глюкозы отбирались через каждые 2 часа, далее через каждые 8 часов. Полученные результаты графически отображены на рис. 2.

Данные эксперимента показывают, что в первые 8 ч наблюдается максимальная скорость гидролиза. В гидролизате образца №3 (ш) накапливается 3,04 г/л глюкозы за 8 часов проведения процесса.

Скачок в области от 24 до 48 ч можно объяснить присутствием в растворе прочно и слабо адсорбирующихся ферментов. Прочно адсорбирующиеся ферменты относительно

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЛАКОВ

быстро гидролизуют реакционноспособный субстрат в локальной зоне их дислокации, но их транспорт по поверхности затруднен и происходит медленно. Слабо адсорбирующиеся ферменты после акта гидролиза глюкозидной связи на поверхности целлюлозы десорбируются в раствор. Слабо адсорбирующиеся ферменты, как правило, гидролизуют субстрат в зонах дислокации прочно адсорбирующихся ферментов, таким образом,

давая им возможность изменить свое место положение и оказаться на более реакционном участке. Данный факт объясняет представленную графическую зависимость.

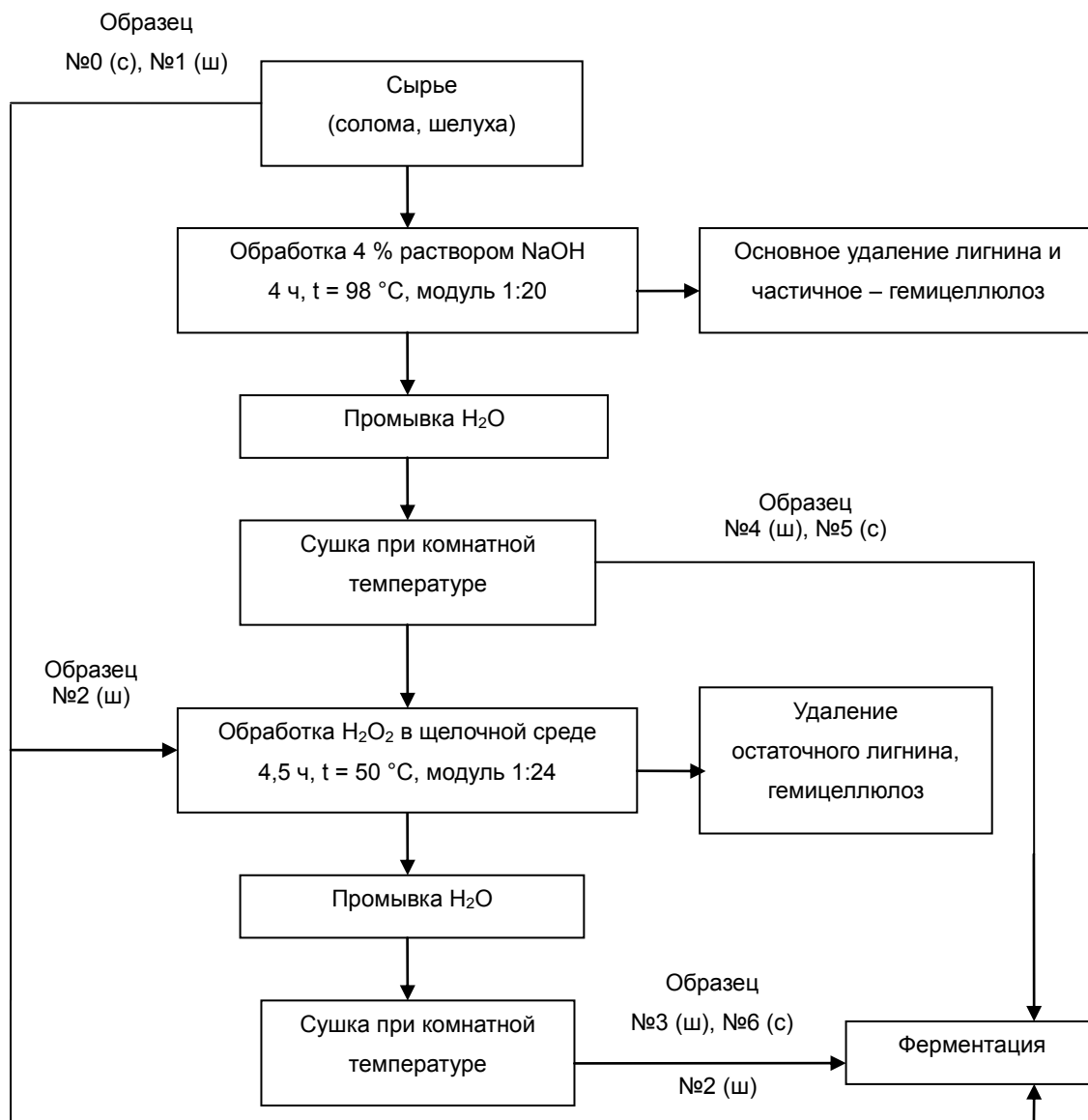


Рисунок 1. Общая блок-схема предварительной обработки образцов

Таблица 1

№ и характеристика образца	Масса навески, г	Массовая доля лигнина, %	Потеря в массе при ферментации, г	Масса глюкозы в гидролизате, мг/мл	Масса РВ в гидролизате, мг/мл
0. Солома исходная	5	18,20	0,30	0,60	0,61
1. Шелуха исходная	5	17,41	0,02	0,32	0,33
2. Шелуха исходная после обработки H ₂ O ₂ в щелочной среде	5	7,77	0,40	1,91	4,64
3. Шелуха после щелочной делигнификации, обработанная H ₂ O ₂ в щелочной среде	5	4,29	0,80	3,31	5,50
4. Шелуха после щелочной делигнификации	5	5,07	0,45	2,89	5,22
5. Солома после щелочной делигнификации	5	5,74	0,30	1,84	2,80
6. Солома после щелочной делигнификации, обработанная H ₂ O ₂ в щелочной среде	5	4,65	0,40	1,64	2,50

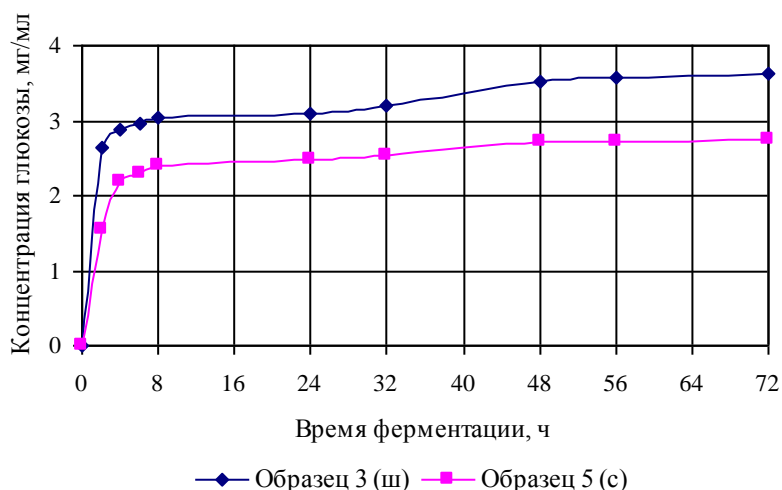


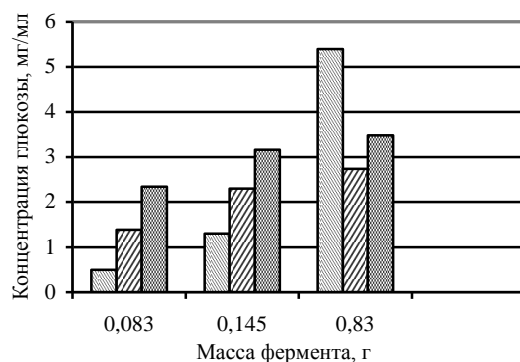
Рисунок 2. Изменение концентрации глюкозы от времени ферментации

Исследование зависимости выхода глюкозы от массы ферментного препарата ЦеллоЛюкс-А

В качестве субстрата были взяты три образца. Два из них являются модельными

– это хлопковый линт и фильтровальная бумага. Ферментацию проводили в вышеописанных условиях в течение 8 ч. Полученные результаты графически отображены на рис. 3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЛАКОВ



■ Хлопковый линт ■ Образец №2 (ш) ■ Бумага фильтровальная

Рисунок 3. Зависимость выхода глюкозы от массы ферментного препарата ЦеллоЛюкс-А

Из диаграммы видно, что увеличение массы ферментного препарата в 10 раз приводит к соответствующему увеличению концентрации глюкозы в гидролизате хлопкового линта. В гидролизатах образца №2 (ш) и фильтровальной бумаги увеличение концентрации ферментного препарата в 10 раз не способствует значительному увеличению концентрации глюкозы. По-видимому, это объясняется тем, что хлопковый линт представляет собой чистую целлюлозу, в то время как фильтровальная бумага и образец №2 (ш) являются композиционными материалами. В состав фильтровальной бумаги кроме волокнистой целлюлозы входят склеивающие вещества, а образец №2 (ш) представляет собой лигноцеллюлозу. Входящие в бумагу и лигноцеллюлозу (клей и лигнин) оказывают экранирующее действие на атаку ферментов волокна целлюлозы. Исходя из этого, можно сделать вывод, что предобработка должна максимально освободить ЦСС от лигнина и максимально разрыхлить волокна.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований и полученных данных можно сделать следующие выводы:

- последовательная обработка раствором щелочи и пероксидом водорода в щелочной среде является наиболее эффективной из химических методов предобработки для ферментативного гидролиза соломы и шелухи овса.

- показана возможность использования отходов растениеводства Алтайского края, а именно соломы и шелухи овса для получения биоэтанола.

- показана достаточно высокая активность препарата ЦеллоЛюкс-А (г. Бердск) в реакции ферментативного гидролиза соло-

мы и шелухи овса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров А.А. Органическая химия: учебник для вузов / А.А. Петров, Х.В. Бальян, А.Т. Трощенко; под ред. М.Д. Стадничука. – СПб.: «Иван Федоров», 2002. – 624 с.
2. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств / Ю.И. Холькин. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.
3. Клесов А.А. Ферментативное превращение целлюлозы // Итоги науки и техники. – 1983. – №1. – С. 63-150.
4. Синицин А.П. Сравнительное изучение влияния различных видов предобработки на скорость ферментативного гидролиза природных целлюлозосодержащих материалов / А.П. Синицин, Г.В. Ковалев, С.Р. Меса-Манреса // Химия древесины. – 1984. – №5. – С. 60-71.
5. Синицин А.П. Влияние предобработки на эффективность ферментативного превращения хлопкового линта / А.П. Синицин, А.А. Клесов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1981. – Т.17. – №5. – С. 682-695.
6. Клесов А.А. Ферментативный гидролиз целлюлозы. Влияние физико-химических и структурных факторов субстрата на эффективность ферментативного гидролиза / А.А. Клесов, А.П. Синицин // Биоорганическая химия. – 1981. – Т.7. – №12. – С. 1801-1812.
7. Целлюлоза и ее производные / под. ред. Н. Байкласа, Л. Сегала. – М.: Мир, 1974. – Т.1. – 500 с.
8. Химия древесины / под. ред. Б.Л. Браунинга. – М.: Мир. – 1967. – 400 с.
9. Puri V.P. Ozone pretreatment to increase digestibility of lignocellulose // Biotechnology. – 1983. – Vol.5. – P. 773-776.
10. Головлева Л.А. Микробная деградация лигнина / Л.А. Головлева, Х.Г. Ганбаров // Успехи микробиологии. – 1982. – №17. – С. 136-158.