

ОПЫТ МАСШТАБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ТЕХНИЧЕСКИХ ЦЕЛЛЮЛОЗ ИЗ МИСКАНТУСА И ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

Г.В. Сакович, В.В. Будаева, Е.А. Скиба, Е.И. Макарова,
И.Н. Павлов, А.Н. Кортусов, В.Н. Золотухин

В статье приведены результаты ферментативного гидролиза технических целлюлоз, полученных из биомассы мискантуса и плодовых оболочек овса методом щелочной делигнификации гидроксидом натрия с последующей дополнительной обработкой азотной кислотой. Ферментативный гидролиз проведен в ацетатном буфере и водной среде в лабораторных условиях. Масштабирование процесса в ферментаторе авторской конструкции позволило обнаружить общие тенденции ферментации целлюлоз из различных сырьевых источников.

Ключевые слова: технические целлюлозы, мискантус, плодовые оболочки овса, ферментация, масштабирование процесса

ВВЕДЕНИЕ

В ИПХЭТ СО РАН накоплен некоторый опыт ферментативного гидролиза нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья и его продуктов переработки различными способами [1-3]. Главными объектами исследований являются два сырьевых источника: плодовые оболочки овса и биомасса растения Мискантуса китайского, выращенного в ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск) [4-8]. Исследован ферментативный гидролиз исходного сырья, лигноцеллюлозных материалов и технических целлюлоз, полученных различными способами: азотнокислой и гидротропной варкой, методом термобарического взрыва, щелочной делигнификацией [9-11].

В перечисленных работах оценивали не только скорость и глубину ферментативного гидролиза, но и биологическую доброкачественность получаемых гидролизатов. Другими словами, экспериментальным путем была определена пригодность полученных гидролизатов в нативном виде, или после внесения дополнительных источников минеральных веществ, или после технологической доработки использования в качестве питательной среды для получения биотоплив и других продуктов микробиологической трансформации [12].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной работе в качестве субстратов ферментативного гидролиза использованы технические целлюлозы, полученные из плодовых оболочек овса и биомассы мискан-

туса методом щелочной делигнификации гидроксидом натрия и последующей дополнительной обработкой азотной кислотой [13]. Данный способ получения технической целлюлозы отличается простота исполнения, использование доступных дешёвых химических реактивов и чистота получаемого продукта, в том числе низкое содержание негидролизующих примесей.

Таблица 1 – Характеристика технических целлюлоз биомассы мискантуса и плодовых оболочек овса, используемых для ферментативного гидролиза

Сырьё	Характеристика, % на а.с.с.				
	зо-ла	лиг-нин	α-целлю-лоза	степень полиме-ризации	пен-тозаны
Биомасса мискантуса	0,6	1,4	90,3	628	5,5
Плодовые оболочки овса	0,1	0,5	93,0	1139	11,3

Характеристики технических целлюлоз приведены в таблице 1.

Степени кристалличности данных целлюлоз были определены рентгенографическим способом, описанным в работе [14], и составили 73 ± 5 % и 68 ± 5 % соответственно. На первом этапе ферментативный гидролиз данных технических целлюлоз проводился в лабораторных условиях: в колбах в ацетатном буфере, в колбах в водной среде. Затем процесс был масштабирован в ферментёре общим объёмом 11 л в водной среде.

Для ферментации в лабораторных усло-

виях в колбу Эрленмейера емкостью 500 мл помещали навеску субстрата (5 г), 150 мл ацетатного буфера (pH 4,7) и смесь ферментных препаратов, вносимых в избытке, в количестве 0,04 г фермента /г субстрата. Были использованы отечественный ферментный препарат «Целлолюкс-А» и препарат датской компании «Novozymes» «Брюзайм ВGX». Концентрация технической целлюлозы в смеси составила 33,3 г/л.

Гидролиз проводили при температуре 50 ± 2 °С, в течение 72 ч при постоянном орбитальном перемешивании. Перемешивание реакционной массы осуществляли на платформе «ПЭ-6410М» с частотой колебания 26 мин-1.

Через каждые 8 ч отбирали пробу суспензии 2 мл для определения концентрации редуцирующих веществ (РВ) в пересчёте на глюкозу спектрофотометрическим методом на «UNICO UV-2804» с использованием динитросалицилового реактива. Преимуществами данного метода является простота выполнения анализа и малый расход реагентов. Относительная погрешность данного метода составляет 3,45 % [6].

Далее проводили гидролиз не в ацетатном буфере, а в водной среде, так как гидролизат направлялся на спиртовое брожение и известно, что уксусная кислота является его ингибитором. Для достижения активной кислотности в среде 4,7 ед. pH и её поддержания на этом уровне была использована ортофосфорная кислота. Эксперимент был проведён в водной среде в круглодонной колбе с вертикальным перемешивающим устройством и в ферментаторе на технической целлюлозе мискантуса. С целью повышения концентрации РВ в гидролизате, предназначенном для конверсии в биоспирты, исходная концентрация субстрата была увеличена до 83,3 г/л. Данная концентрация или данный гидромодуль – 1:12 – был выбран исходя из реологических свойств суспензии целлюлозы мискантуса и конструктивных особенностей ферментатора [11].

Ферментатор представляет собой вертикальную ёмкость цилиндрической формы, снабжённую мешалкой с регулируемой частотой оборотов, трубчатым змеевиковым нагревателем с контролируемой подачей теплоагента и датчиком температуры для поддержания заданного температурного режима.

Ферментативному гидролизу в ферментаторе также была подвергнута ТЦ плодовых оболочек овса. Вязкость суспензии данной целлюлозы значительно выше, чем ТЦ мис-

кантуса, поэтому был установлен гидромодуль 1:18 (концентрация субстрата 55,6 г/л).

При ферментации в водной среде для гидролиза была использована мультиэнзимная композиция ферментных препаратов «Брюзайм ВGX», «Целлолюкс А», и «Рапидаза ЦР» (производитель «Novozymes»), вносимых в избытке, в количестве 0,04 г фермента /г субстрата. Гидролиз проводили при температуре 50 ± 2 °С, в течение 72 ч при постоянном перемешивании.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ферментативного гидролиза в колбах Эрленмейера в ацетатном буфере при орбитальном перемешивании отражены на рисунке 1.

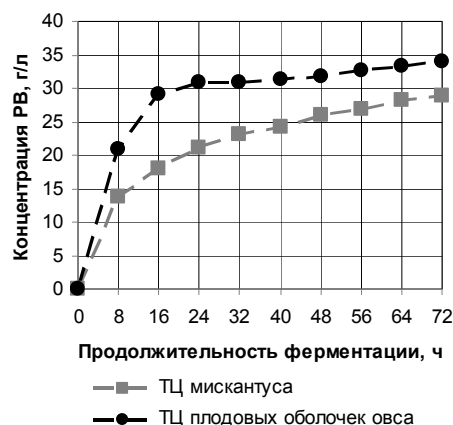


Рисунок 1 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации в ацетатном буфере технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса

Техническая целлюлоза плодовых оболочек овса ферментируется полнее и с большей скоростью, чем ТЦ мискантуса. Так как целлюлозы получены в идентичных условиях, то данные различия объясняются исключительно природой данных целлюлоз. Можно предположить, что этот факт можно объяснить различной морфологической структурой целлюлоз, полученных из разных источников [15]. Целлюлоза из плодовых оболочек овса более однородна и представлены одним типом волокон – тонкие плоские и короткие. Возможно, что они более доступны в процессе ферментативного гидролиза, несмотря на высокую степень полимеризации. Другая ситуация с целлюлозой из мискантуса, которая характеризуется двумя типами волокон, гораздо большей длиной и прочностью единичного волокна.

ОПЫТ МАСШТАБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ТЕХНИЧЕСКИХ ЦЕЛЛЮЛОЗ ИЗ МИСКАНТУСА И ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

Выход редуцирующих веществ от массы субстрата составляет 90 % для ТЦ плодовых оболочек овса и 78 % для ТЦ мискантуса.

На рисунке 2 представлены результаты гидролиза технической целлюлозы мискантуса в водной среде. Гидролиз проводился в круглодонной колбе с вертикальным перемешивающим устройством и в ферментаторе при концентрации субстрата 83,3 г/л.

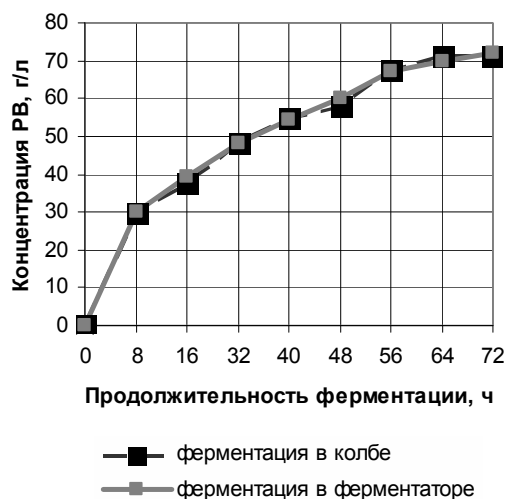


Рисунок 2 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации ТЦ мискантуса в водной среде в колбе и в ферментаторе

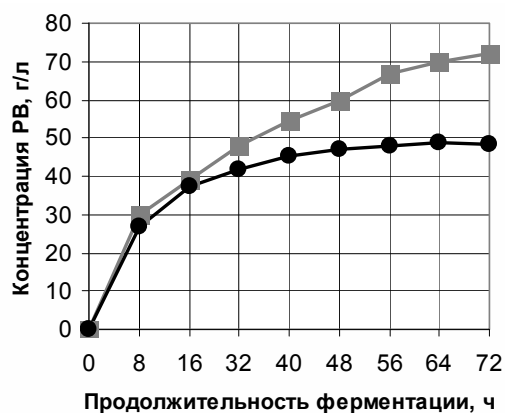
Как видно из рисунка 2, кривые полностью совпадают, таким образом, при соблюдении режимов проведения ферментации, лабораторные эксперименты воспроизводятся количественно. Выход редуцирующих веществ от массы субстрата составил 76 %.

На рисунке 3 представлены результаты ферментативного гидролиза технических целлюлоз, полученные из биомассы мискантуса и плодовых оболочек овса в ферментаторе. Так как технические целлюлозы мискантуса и плодовых оболочек овса имеют разную природу, то были использованы различные гидромодули ферментации (1:12 и 1:18 соответственно).

Поскольку концентрация субстрата была выше для ТЦ мискантуса, то, соответственно выше и концентрация РВ в гидролизате мискантуса. Более объективно сравнить полученные выходы: для ТЦ мискантуса получен выход РВ 76 % от массы субстрата, для ТЦ плодовых оболочек овса – 78 %.

Данный результат был прогнозируем в связи с выполненными предварительными исследованиями зависимости конечной кон-

центрации РВ в гидролизате от концентрации субстрата [16].



—■— ТЦ мискантуса, гидромодуль 1:12
—●— ТЦ плодовых оболочек овса, гидромодуль 1:18

Рисунок 3 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации в водной среде, в ферментаторе технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса

ВЫВОДЫ

Исследован ферментативный гидролиз технических целлюлоз, полученных из биомассы мискантуса и плодовых оболочек овса методом щелочной делигнификации.

Масштабирование данного процесса показало воспроизводимость лабораторных результатов и позволило получить доброкачественные гидролизаты, пригодные для эффективного спиртового брожения. Например, нами получен этанол из ТЦ плодовых оболочек овса с выходом 0,43 г/г целлюлозы или 0,18 г/г сырья [12]. Выход этанола того же порядка был получен зарубежными учёными из багассы с выходом 0,15 г этанола/г сырья [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков // Ползуновский вестник. – 2008. – № 3. – С. 322-327.
2. Бурцева Е.А., Гора А.А., Будаева В.В. Ферментативный и химический гидролиз недревесного целлюлозосодержащего сырья / Новые достижения в химии и химической

технологии растительного сырья: материалы IV Всерос. конф., Барнаул, 21-23 апреля 2009 г.: в 2 кн. /Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2009. – Кн. 1. – С. 148–151.

3. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Переработка Мискантуса китайского // Ползуновский вестник, 2009. – № 3. – С. 328–335.

4. Будаева В.В., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Архипова О.С. Обогащение отходов переработки злаков для ферментации / Сотрудничество для решения проблемы отходов: Материалы VII Междунар. конф., Харьков, Украина, 7-8 апреля 2010 года – Х.: Независимое агентство экологической информации, 2010. – С. 112–114.

5. Будаева В.В., Бычин Н.В., Сакович Г.В. Свойства мискантуса после обработки в реакторе высокого давления–2009 // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 144–149.

6. Макарова Е.И., Будаева В.В. Определение глюкозы на спектрофотометре UNICO UV-2804 / Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 3-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – В 2-х ч. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2010. – Ч. 1. – С. 215–218.

7. Макарова Е.И., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Использование мультиэнзимных композиций для гидролиза нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья // Ползуновский вестник, 2010. – № 4-1. – С. 192–198.

8. Будаева В.В., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю. Зависимость роста редуцирующих веществ от продолжительности ферментации обогащенных отходов переработки злаков / Сотрудничество для решения проблемы отходов: материалы VIII Междунар. конф., Харьков, Украина, 23-24 февраля 2011 года – Х.: Независимое агентство экологической информации, 2011. – С. 57–59.

9. Макарова Е.И., Будаева В.В. Исследование ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса / Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 4-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (27-29 апреля 2011 г., г. Бийск). – В 2-х ч. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2011. – Ч. 1. – С. 142–146.

10. Будаева В.В. Ферментация продуктов переработки мискантуса и отходов злаков / Альтернативные источники сырья и топлива: тезисы докладов III Международной научно-технической конференции «АИСТ – 2011», Минск, 24-26 мая 2011 г. / Под ред. В.Е. Агабекова, И.И. Лиштван. – Минск: Изд-во института химии новых материалов НАН Беларуси, 2011. – С. 22.

11. Скиба Е.А. Масштабирование ферментативного гидролиза технической целлюлозы мискантуса / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. /Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 384–385.

12. Скиба Е.А., Будаева В.В., Сакович Г.В., Золотухин В.Н., Макарова Е.И., Павлов И.Н. Биэтанол из мискантуса и отходов злаков / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. /Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 386–387.

13. Золотухин В.Н., Будаева В.В. Сравнительная характеристика целлюлоз, полученных щелочной делигнификацией из нетрадиционного сырья / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. /Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 75–77.

14. Алешина Л.А., Люханова И.В., Будаева В.В., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Сакович Г.В. Результаты рентгеноструктурного анализа недревесных целлюлоз // Ученые записки Петрозаводского государственного университета, 2011. – № 8 (121). – С. 114–117.

15. Будаева В.В., Сакович Г.В. Морфологические особенности нетрадиционных целлюлоз и получение эфиров / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. /Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 37–40.

16. Макарова Е.И. Исследование ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всерос. конф., Барнаул, 24-26 апреля 2012 г. /Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 55–58.

ОПЫТ МАСШТАБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ТЕХНИЧЕСКИХ ЦЕЛЛЮЛОЗ
ИЗ МИСКАНТУСА И ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

17. Run-Cang Sun Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels – Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose. – Elsevier, 2010. – P. 154.

Сакович Геннадий Викторович¹, академик РАН, научный руководитель ИПХЭТ

Будаева Вера Владимировна¹, к.х.н., зав. лабораторией, e-mail: bydaeva@mail.ru

Скиба Екатерина Анатольевна¹, к.т.н., научный сотрудник

Макарова Екатерина Ивановна¹, мл.

научный сотрудник

Павлов Игорь Николаевич¹, к.т.н., научный сотрудник

Кортусов Алексей Николаевич², студент-дипломник

Золотухин Владимир Николаевич¹, ст. научный сотрудник

¹ ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, Бийск

² Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул