

Щербакова Татьяна Петровна, научный сотрудник лаборатории химии растительных полимеров, кандидат химических наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИХ Коми НЦ УрО РАН), sher.@tatymail.ru, ул. Первомайская, 48, Сыктывкар, 167982, Россия. Тел. (8212) 21-99-61, факс (8212) 21-84-77.

Удоротина Елена Васильевна, заведующая лабораторией химии растительных полимеров, кандидат химических наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИХ Коми НЦ УрО РАН), udoratina-ev@chemi.komisc.ru, ул. Первомайская, 48, Сыктывкар, 167982, Россия. Тел. (8212) 21-99-61, факс (8212) 21-84-77.

Макарова Екатерина Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), massl@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Будаева Вера Владимировна, заведующая лабораторией биоконверсии, кандидат химических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), budaeva@ipcet.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

УДК 661.728.7:577.152.3

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОЛИЗА ГИДРОТРОПНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

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

Исследован ферментативный гидролиз технических и облагороженных целлюлоз, полученных гидротропным способом из мискантуса и плодовых оболочек овса, с применением промышленных ферментных препаратов. Показано, что выход редуцирующих веществ достигает 55-92 % от массы субстрата. Установлено, что добавление поверхностно активного вещества «Твееп 80» обеспечивает увеличение эффективности ферментолиза технической целлюлозы на 12 %.

Ключевые слова: гидротропная варка, мискантус, плодовые оболочки злаков, целлюлоза, ферментативный гидролиз, «Целлолюкс-А», «Брюзайм ВГХ», Твееп 80, редуцирующие вещества, глюкоза.

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные исследования ферментолиза целлюлозы являются предметом междисциплинарного изучения в связи с наличием закономерностей между реакционной способностью целлюлозы к ферментолиту и физико-химическими свойствами и структурными характеристиками целлюлозного субстрата [1]. Поскольку свойства и характеристики субстрата в первую очередь определяются способом получения целлюлозы и методами подготовки к ферментолиту, и отсутствуют сведения о результатах ферментолиза гидротропных целлюлоз, за исключением работы [2], то необходимо было провести сравнительный анализ результатов ферментолиза гидротропных целлюлоз, полученных из разных видов сырья, а также технических и облагороженных между собой. Кроме того, известны способы активации ферментолиза добавками органи-

ческих веществ [3].

Целью данной работы является исследование реакционной способности технических и облагороженных целлюлоз, полученных гидротропным способом из мискантуса и плодовых оболочек овса, а также влияния поверхностно активного вещества «Твееп 80» на эффективность ферментолиза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гидротропная делигнификация мискантуса и плодовых оболочек овса (ПОО) проведена на качающемся автоклаве [4] и на универсальной термобарической установке (УТБ) [5] в условиях, описанных ниже.

Варка в автоклаве состояла из предварительного гидролиза двух видов сырья при температуре 140 °С без выдержки по времени (модуль 1:8), затем полученную лигноцеллюлозу варили в 30 %-ном растворе бензоата натрия при тем-

пературе 160 °С в течение 3 ч, давлении 0,2-0,3 МПа (модуль 1:8). Часть высушенной технической целлюлозы (ТЦ) использовали в качестве субстрата для ферментативного гидролиза (образцы 1 и 3), другую часть облагораживали по схеме, приведенной в более ранней работе [6]. Образцы облагороженной гидротропной целлюлозы (ОЦ) также использовались для ферментативного гидролиза (образцы 2 и 4).

Варка мискантуса на УТБ проводилась с 35 %-ным раствором бензоата натрия при температуре 180 °С в течение 4 ч, давлении 0,2 МПа (модуль 1:10). Высушенную ТЦ подвергли ферментативному гидролизу (образцы 5 и 6).

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.) в ТЦ и ОЦ определяли по стандартным методикам анализа [7].

Для гидролиза субстратов использовали ферментные препараты (ФП) «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВГХ».

Ферментация осуществлялась в ацетатном буфере (рН=4,7) при температуре (43±2) °С и концентрации субстрата 33 г/л. Проведены 2 эксперимента гидролиза ТЦ мискантуса (5 и 6): в опыте № 6 дополнительно к раствору ферментных препаратов вносили «Твееп 80» в концентрации 0,1 %.

Для контроля концентрации редуцирующих веществ (РВ) каждые 8 ч проводили отбор проб объемом 2 мл. Концентрацию РВ в пересчете на глюкозу определяли на спектрофотометре «UNICO UV-2804» (США) с использованием ди-

нитросалицилового 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики субстратов и условия их получения представлены в таблице 1.

Сравнение физико-химических свойств ТЦ (образец 1 и 3), полученных после варки на автоклаве показало, что при данных условиях были получены продукты схожие по своим характеристикам, независимо от вида используемого сырья. Дальнейшее облагораживание ТЦ привело к концентрированию в ОЦ (образцы 2 и 4) целлюлозной части (до 85-88 %) и снижению м.д. лигнина (до 5-6 %), и золы (до 2-4 %). Образец ОЦ из мискантуса характеризуется меньшим содержанием примесей нецеллюлозного характера. Проведение гидротропной варки без предгидролиза (на УТБ) при более высокой температуре (180 °С) и продолжительности (4 ч) дает более качественную ТЦ. М.д. основных компонентов (α-целлюлозы, лигнина и золы) в образцах ТЦ 5 и 6 сопоставимы с м.д. компонентов в ОЦ (образцы 2 и 4).

Оценка реакционной способности к ферментации субстратов проводилась по концентрации образующихся РВ в гидролизате и скорости их накопления. Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза представлена на рисунке 1.

Таблица 1 – Характеристики и условия получения субстратов

Сырье	№	Обозначение и условия получения субстратов		Характеристики, %			
				α-целлюлоза	лигнин	зола	
Мискантус	1	ТЦ	Автоклав, модуль 1:8	ПР 140 °С без выдержки, ГВ 160 °С, 3 ч	84,0	13,8	2,9
	2	ОЦ		ПР 140 °С без выдержки, ГВ 160 °С, 3 ч, облагораживание	85,3	4,8	1,6
ПОО	3	ТЦ		ПР 140 °С без выдержки, ГВ 160 °С, 3 ч	83,8	14,4	5,0
	4	ОЦ		ПР 140 °С без выдержки, ГВ 160 °С, 3 ч, облагораживание	88,1	6,0	3,5
Мискантус	5	ТЦ	УТБ, модуль 1:10	ГВ 180 °С, 4 ч	87,1	7,3	3,6
	6			ГВ 180 °С, 4 ч			

Как следует из представленных на рисунке 1 данных, самой высокой реакционной

способностью к ферментализу на протяжении всего процесса характеризуется образец № 4

ОЦ ПОО с м.д. лигнина 6 %: всего за 8 первых ч концентрация РВ достигает 17,5 г/л (выход 50 % от массы субстрата), и далее, медленно нарастает последующие 40 ч, приближаясь к максимально возможной концентрации РВ 34,0 г/л, что соответствует выходу 91,8 % от массы субстрата.

Образец № 2 ОЦ мискантуса уступает по скорости гидролиза образцу из ПОО: в первые 8 ч в 2,3 раза, и достигает значения 17,5 г/л только через 48 ч. Следует подчеркнуть, что м.д. лигнина в данном образце того же порядка 4,8 %, следовательно, данный факт можно объяснить только структурными особенностями целлюлозы. Преимущество ОЦ из ПОО, именно для гидротропных целлюлоз, наблюдалось ранее [2].

Сравнение между собой реакционной способности образцов ТЦ и ОЦ из одного и того же сырья мискантуса демонстрирует отсутствие зависимости данной способности от свойств субстрата, что выражается в практическом совпадении кривых зависимостей концентрации РВ от продолжительности ферментализации.

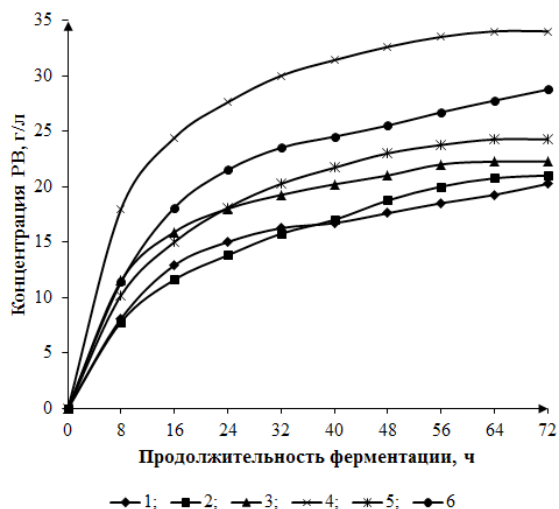


Рисунок 1 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментализации ТЦ и ОЦ мискантуса и ПОО

Наоборот, в случае ТЦ и ОЦ ПОО наблюдается большой разрыв между текущими концентрациями РВ в один и тот же промежуток времени, например, концентрация РВ через 16 ч – 16 г/л для образца № 3 и 24 г/л для образца № 4, через 56 ч – 22 г/л и 34 г/л соответственно.

Сравнение ферментализации двух образцов ТЦ мискантуса № 1 и № 5(6), полученных при разных условиях и характеризующихся различными значениями м.д. лигнина (13,8 % и 7,3 % соответственно) свидетельствует о более высокой реакционной способности образца ТЦ, полученного при более высоких температуре (180 °С против 160 °С) и продолжительности (4 ч против 3 ч), что привело к снижению м.д. лигнина с 13,8 % до 7,3 %. Первые 8 ч ферментализации образца № 5 обеспечил концентрацию 10,0 г/л против 7,5 г/л, затем разрыв в концентрациях увеличивается до 5,0 г/л (48 ч).

Добавление «Tween 80» к раствору ФП заметно меняет характер зависимости накопления РВ в гидролизате, а именно: не выходит на плато, как концентрация РВ 22,5 г/л при гидролизе образца № 5 через 56 ч, а продолжает медленно увеличиваться со скоростью 0,14 г/л в час.

Результаты ферментализации, а именно, конечная концентрация РВ, выходы РВ на массу навески и с вычетом негидролизующихся компонентов (зола и лигнин) приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты ферментализации

№	Конечная концентрация РВ, г/л	Выход РВ на массу навески, %	Выход РВ с вычетом негидролизующихся компонентов, %
1	20,25	54,7	65,7
2	21,00	56,7	60,6
3	22,25	60,1	74,6
4	34,00	91,8	101,4
5	24,25	65,5	73,5
6	28,75	77,6	87,1

Сравнение пяти образцов по выходу РВ от массы субстрата позволяет построить ряд реакционной способности следующим образом: ОЦ ПОО > ТЦ М (УТБ) > ТЦ ПОО > ОЦ М > ТЦ М. Сравнение данных образцов по выходу РВ с вычетом негидролизующих компонентов подтверждает последовательность расположения субстратов в полученном ряду.

Добавление к раствору ФП органического вещества «Твееп 80» (образец 6) в концентрации 0,1 % приводит к росту выхода РВ на массу навески на 12 %, а выхода РВ с вычетом негидролизующих компонентов на 14 %, что свидетельствует об увеличении целлюлазной активности используемых ферментных препаратов в присутствии «Твееп 80».

ВЫВОДЫ

Исследован ферментативный гидролиз технических и облагороженных целлюлоз, полученных гидротропным способом из мискантуса и плодовых оболочек овса, с применением промышленных ФП. Показано, что выход РВ достигает 55-92 % от массы навески.

Определена реакционная способность к ферментализации пяти субстратов: ОЦ ПОО > ТЦ М (УТБ) > ТЦ ПОО > ОЦ М > ТЦ М.

Показано, что добавление поверхностно активного вещества «Твееп 80» обеспечивает увеличение эффективности ферментализации ТЦ с 65,5 % до 77,6 % (к массе навески).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 13-03-98001 «р_сибирь_а».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yu Z., Jameel H. and et al. Evaluation of the factors affecting avicel reactivity using multi-stage enzymatic hydrolysis // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2012. – Vol. 5. – P. 1449-1463.
2. Макарова Е.И., Денисова М.Н., Будаева В.В., Сакович Г.В. Ферментативный гидролиз гидротропных целлюлоз // *Ползуновский вестник*. – 2013. – № 1. – С. 219-222.
3. Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С., Бурмасова М.А. Интенсификация процесса гидролиза целлюлоза ферментным препаратом DENYCEL 100 CG при добавлении некоторых органических соединений // *Вестник Казан. технол. ун-та*. – 2009. – № 6. – С. 130-134.
4. Полезная модель № 2518 (РФ). Качающийся автоклав с электрообогревом для проведения гетерогенных процессов / В.А. Куничан, Г.И. Севодина, В.П. Севодин, Ю.Н. Денисов, В.М. Буров / 16.08.1996.
5. Пат. 2472808 Россия, С 1. Способ получения целлюлозы (варианты) и устройство для его

осуществления. / Будаева В.В., Цуканов С.Н., Сакович Г.В. – № 2011134207/05, заявлено 15.08.2011; опубл. 20.01.2013, Бюл. № 2. – 10 с.

6. 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.

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

Будаева Вера Владимировна, кандидат химических наук, доцент, заведующая лабораторией биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), budaevadogipcet.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Макарова Екатерина Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), massldogmail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Денисова Марина Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), anigam-1988dogmail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Павлов Игорь Николаевич, научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), rawlow-indogmail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Сакович Геннадий Викторович, научный руководитель ИПХЭТ СО РАН, советник РАН, академик РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ipcetdogmail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-55, факс (3854) 31-70-70.