

УДК 577.151:633.13(075.3)

## О ВЛИЯНИИ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МИСКАНТУСА

Е.А. Скиба<sup>1,2</sup>, В.В. Будаева<sup>1</sup>, С.Е. Орлов<sup>1</sup>, В.Н. Золотухин<sup>1</sup>, В.Н. Хмелёв<sup>2</sup>,  
С.Н. Цыганок<sup>2</sup>, Е.В. Удоратина<sup>3</sup>, Т.П. Щербакова<sup>3</sup>

*В статье приведены результаты исследования зависимости кинетики ферментативного гидролиза технической целлюлозы мискантуса от ультразвукового воздействия. Установлено, что ультразвуковое воздействие позволяет повысить начальную скорость ферментативного гидролиза целлюлозы и экономический коэффициент конверсии.*

*Ключевые слова: мискантус, техническая целлюлоза, ультразвуковое воздействие, ультразвуковые колебания, ферментативный гидролиз, экономический коэффициент конверсии.*

### ВВЕДЕНИЕ

Лигноцеллюлозная матрица растительного сырья является очень прочной, поэтому для её успешной ферментативной деструкции требуется предварительная химическая или физико-химическая обработка [1].

Ультразвуковое воздействие на лигноцеллюлозную матрицу, образованную такими полимерами, как целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин, сложно прогнозировать, и интерпретация полученных результатов не может быть однозначной. Поэтому целесообразным является выявление влияния ультразвуковых колебаний высокой интенсивности на каждый из этих полимеров в отдельности. Наиболее прочными и устойчивыми к любым видам воздействий являются целлюлозы. Известно, что в результате ультразвукового воздействия на сыпная площадь целлюлоз повышается на 6-20 %, при этом содержание частиц размером менее 100 мкм повышается на 15-28 %. Предполагается, что ультразвуковое воздействие на целлюлозу приводит к увеличению поверхности её микрокристаллитов, следовательно, можно ожидать увеличения реакционной способности полисахарида к ферментативному гидролизу [2]. Исследованиями Института химии Коми Научного центра УрО РАН показано, что под действием ультразвука происходит аморфизация целлюлозы, снижение степени её кристалличности на 20 % [3].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья выбрана целлюлоза из биомассы энергетического растения Мискантус китайский (М) сорта Сорановский, выведенного в ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. Техническая целлюлоза (ТЦ) мискантуса образец № 403-11 получен щелочной делигнификаци-

ей, проведенной на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН, затем диспергированием в 1 %-ном растворе гидроксида натрия на установке с роторно-пульсационным аппаратом, после отжима и промывки водой до нейтральной реакции промывных вод продукт был высушен. Химический состав ТЦ приведён в таблице 1.

Таблица 1 – Химический состав ТЦ М

Зольность, %	М.д. лигнина, %	М.д. α-целлюлозы, %
6,91	3,52	91,05
Примечание: м.д. – массовая доля		

Воздушно-сухая ТЦ представляла собой плоские пластинки толщиной 1-2 мм и площадью 5x5 и 7x7 см. Перед ультразвуковой обработкой ТЦ была разрезана на пластинки размером 1x1 см. Навеска вносилась в ацетатный буфер с рН 4,7-4,8 в количестве 33,3 г/л (6 г ТЦ на 180 мл ацетатного буфера) в стеклянные ёмкости на 250 мл. Были проведены исследования ультразвукового воздействия на суспензию в ацетатном буфере воздушно-сухой ТЦ (без предварительного замачивания) и на суспензию влажной ТЦ, полученной мацерацией (набуханием) исходной ТЦ в ацетатном буфере в течение 24 ч для разбухания целлюлозных волокон.

Обработку образцов проводили ультразвуковыми колебаниями с частотой 22 кГц в течение 5-20 мин с использованием разных ультразвуковых технологических аппаратов: «Волна» модель УЗТА-0,4/22-О (потребляемая мощность 400 Вт) и «Волна-М» модель УЗТА 01/22-ОМ (потребляемая мощность 1000 Вт) [4, 5]. Контролем служил образец ТЦ, не подверженный ультразвуковому воздействию.

Было проведено три серии экспериментов: серия 1 – ультразвуковое воздействие в ацетатном буфере при потребляемой мощности 400 Вт на воздушно-сухую ТЦ;

серия 2 – ультразвуковое воздействие в ацетатном буфере при потребляемой мощности 400 Вт на ТЦ, подвергнутую мацерации;

серия 3 – ультразвуковое воздействие в ацетатном буфере при потребляемой мощности 1000 Вт на ТЦ, подвергнутую мацерации.

После ультразвукового воздействия образцы охлаждали до 50 °С и вносили в них смесь ферментных препаратов. Гидролиз проводили при температуре (50±1) °С, в течение 72 ч в термостате без перемешивания.

Использовалась смесь ферментных препаратов: «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», 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 целлюлаза для расщепления некрахмалистых полисахаридов, «Брюзайм ВГХ» как гемицеллюлаза. Смесь ферментных препаратов вносили одновременно, «Целлолюкс-А» – в количестве 0,02 г/г субстрата, «Брюзайм ВГХ» – 0,04 г/г субстрата.

Через каждые 8 ч отбирали пробу суспензии 2 мл для определения в гидролизате концентрации моносахаров в пересчете на глюкозу спектрофотометрическим методом с использованием динитросалицилового реактива на «UNICO UV-2804» (США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов при ультразвуковом воздействии целлюлоза начинала перемешиваться под действием ультразвуковых колебаний во всём объёме ёмкости, однако через 1 мин она поднималась вверх и сосредотачивалась вокруг рабочего инструмента. Периодически её вручную стряхивали для интенсификации массообмена. Верхние слои целлюлозных пластинок размягчались в процессе ультразвукового воздействия тем сильнее, чем более длительной было ультразвуковое воздействие. Тем не менее их форма и размер сохранились и через 20 мин обработки, то есть основная часть целлюлозы осталась неизмельчённой и несмоченной. Было сделано предположение, что влажная, разбухшая ТЦ будет более доступна для ультразвукового воздействия.

Во второй серии обрабатывали ультразвуком целлюлозу, подвергнутую мацерации,

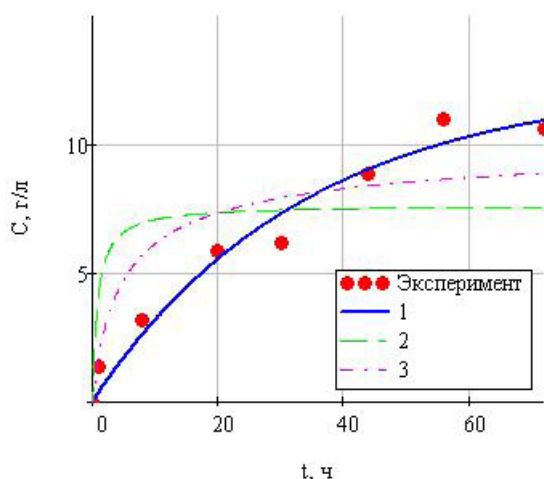
представляющую собой равномерную густую кашеобразную массу. Через 2 мин озвучивания целлюлоза переставала перемешиваться и оседала на дно. Через 5 мин сверху вокруг рабочего инструмента образовывалась ватообразная масса, нижние слои целлюлозы представляли собой кашеобразную массу и не перемешивались. Поэтому при ультразвуковом воздействии образцы дополнительно перемешивались с частотой 30 об/мин. Получение ватообразной массы позволяло предположить высокую реакционную способность к ферментализу.

В третьей серии при ультразвуковом воздействии потребляемая мощность была увеличена до 1000 Вт, дополнительно во время озвучивания образцы перемешивались с частотой 140 об/мин. Во избежание перегрева реакции массы ультразвуковое воздействие проводилось дробно по схеме: 5 мин обработка, охлаждение до 20 °С, обработка 5 мин и т.д. В третьей серии была достигнута наибольшая степень распределения твердой целлюлозы в жидкости: наблюдалась равномерная ватообразная консистенция образцов во всём объёме.

Такие характеристики исходной ТЦ как зольность, м.д. лигнина и м.д. α-целлюлозы не изменялись после УЗ, но несмотря на это, ферментативный гидролиз образцов прошел с разной эффективностью.

На рисунке 1 показана дифференциальная кинетическая кривая ферментативного гидролиза контрольного образца.

Поскольку ферментативный гидролиз целлюлозы является сложным процессом, то подчинение реакции уравнению Вант-Гоффа свидетельствует о реакции псевдопервого, псевдотортого или псевдотретьего порядка [6]. Как видно из графика, уравнение псевдопервого порядка даёт лучшую сходимость с экспериментальными данными. Это подтверждается рассчитанными значениями дисперсий отклонений: 0,544 – для уравнения псевдопервого порядка; 6,935 – для уравнения псевдотортого порядка; 2,897 – для уравнения псевдотретьего порядка.



1, 2 и 3 – порядок реакций для соответствующих кривых

Рисунок 1 – Дифференциальная кинетическая кривая ферментативного гидролиза контрольного образца

Для всех экспериментальных образцов получены типичные дифференциальные кинетические

кривые ферментативного гидролиза, по которым можно рассчитать константу скорости реакции и удобный для анализа параметр – начальную скорость реакции ферментативного гидролиза.

Скорость реакции псевдопервого порядка описывается уравнением:

$$v = \frac{dX}{dt} = k \cdot X, \text{ при его решении получим:}$$

$$C(t) = C_m (1 - e^{-kt}), \text{ где}$$

$C(t)$  – концентрация редуцирующих веществ в данный момент времени, г/л;

$C_m$  – равновесная концентрация редуцирующих веществ, г/л;

$k$  – константа скорости реакции ферментативного гидролиза;

$t$  – продолжительность реакции ферментативного гидролиза, ч.

Об эффективности ферментативного гидролиза целлюлозы можно судить по двум параметрам: начальной скорости гидролиза и выходу редуцирующих веществ. В таблице 2 приведены рассчитанные константы скорости реакции и начальные скорости гидролиза.

Таблица 2 – Расчёт кинетических параметров процессов ферментативного гидролиза

Продолжительность УЗ-обработки	Константа скорости реакции	Начальная скорость реакции $V_0$ , г/(л·ч)	Экономический коэффициент конверсии $Y_{P/S}$ , %
Серия 1: ультразвуковая обработка воздушно-сухой ТЦ (потребляемая мощность 400 Вт)			
0	0,029	0,369	28,7
5	0,045	0,703	42,7
10	0,045	0,703	42,7
15	0,045	0,703	42,7
20	0,047	0,750	45,1
Серия 2: ультразвуковая обработка влажной ТЦ (потребляемая мощность 400 Вт)			
5	0,029	0,448	31,1
10	0,042	0,517	31,3
15	0,049	0,573	31,5
20	0,052	0,600	31,9
Серия 3: ультразвуковая обработка влажной ТЦ (потребляемая мощность 1000 Вт)			
5	0,045	0,703	42,7
10	0,046	0,722	44,1
15	0,047	0,750	45,1
20	0,054	0,854	45,4

Выход редуцирующих веществ представлен в виде экономического коэффициента конверсии ( $Y_{P/S}$ ), представляющего отношение концентрации продукта (редуцирующих веществ в пересчёте на глюкозу) к исходной

концентрации субстрата (целлюлозе) и выраженного в процентах. Расчет проведен по конечной концентрации редуцирующих веществ через 72 ч гидролиза с учетом коэффициента, связанного с присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующим

щих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

Анализ показывает, что начальная скорость реакции прямо пропорциональна экономическому коэффициенту конверсии. Во всех сериях экспериментов эффективность ферментативного гидролиза повышается при увеличении длительности ультразвукового воздействия. Наибольшие начальные скорости демонстрируют образцы, полученные в третьей серии экспериментов, при обработке аппаратом с потребляемой мощностью 1000 Вт: озвучивание в течение 20 мин позволяет увеличить начальную скорость гидролиза в 2 раза по сравнению с контролем, при этом экономический коэффициент конверсии повышается в 1,6 раза.

Наименьшее положительное влияние ультразвука на эффективность гидролиза ТЦ получено во второй серии экспериментов: через 20 мин озвучивания начальная скорость увеличивается в 1,5 раза по сравнению с контролем, а экономический коэффициент конверсии – в 1,1 раза. Интересно, что при той же потребляемой мощности (400 Вт) более эффективной было ультразвуковое воздействие на воздушно-сухую целлюлозу, помещённую в ацетатный буфер (серия 1). Уже через 5 мин озвучивания начальная скорость увеличивается в 1,9 раза по сравнению с контролем, а экономический коэффициент конверсии – в 1,5 раза, те же результаты наблюдаются через 10 и 15 мин озвучивания и незначительно улучшаются через 20 мин. Несмотря на визуально более выраженное распределение твердой целлюлозы в жидкости, наблюдаемое при озвучивании ТЦ, подвергнутой мацерации, более эффективным оказалось воздействие на воздушно-сухую целлюлозу. Видимо, это можно объяснить затуханием ультразвуковых колебаний в объёме набухшей, ватообразной целлюлозы.

### ВЫВОДЫ

Исследовано влияние ультразвукового воздействия на кинетику ферментативного гидролиза технической целлюлозы мискантуса. Найдены условия, в которых ультразвуковое воздействие позволяет повысить начальную скорость ферментативного гидролиза целлюлоза в 2 раза, а экономический коэффициент конверсии – в 1,6 раза.

Показано, что ультразвуковое воздействие на воздушно-сухую целлюлозу более эффективно, чем обработка целлюлозы после мацерации.

*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

1. Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry // Bioenerg. Res. – 2012. – № 5. – P. 1043-1066.
2. Щербакова Т.П., Удоратина Е.В., Кучин А.В., Будаева В.В., Скиба Е.А., Сакович Г.В. Исследование ультразвукового воздействия на лигноцеллюлозную матрицу / 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. 100-101.
3. Кожевина О.Е., Токарева Н.В., Щербакова Т.П. Изучение ультразвукового воздействия на физико-химические характеристики порошковой целлюлозы / Химия и технология новых веществ и материалов: материалы конференции II Всерос. молодежной научной конф., г. Сыктывкар, 14-16 мая 2012 г. – С. 74.
4. Хмелев, В.Н. Ультразвуковые многофункциональные специализированные аппараты для интенсификации технологических процессов в промышленности, сельском и домашнем хозяйстве [Текст] / В.Н. Хмелев, Г.В. Леонов, Р.В. Барсуков, С.Н. Цыганок, А.В. Шалунов // Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2007. – 400 с.
5. Khmelev, V.N. Effectiveness Increase of Ultrasonic Cavitation Processing of Viscous Liquid Media [Текст] / V.N. Khmelev [и др.] // 10<sup>th</sup> International Workshops and Tutorials on Electron Devices and Materials EDM'2009: Workshop Proceedings. – Novosibirsk: NSTU, 2009.
6. Варфаломеев, С.Д. Биокинетика: практический курс / С.Д. Варфаломеев, К.Г. Гуревич. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.: ил.

**Скиба Екатерина Анатольевна**, старший 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), eas08988@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Бийский технологический институт (филиал) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», доцент кафедры Биотехнология, ул. Трофимова, 27, Бийск, 659305, Россия. Тел. (3854) 43-53-01.



**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.

**Орлов Сергей Евгеньевич**, младший научный сотрудник лаборатории процессов и аппаратов химических технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), serpp@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-18-69, факс (3854) 30-17-25.

**Золотухин Владимир Николаевич**, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-15-28.

**Хмелев Владимир Николаевич**, заместитель директора по научной работе, доктор технических наук, профессор, научный руководитель лаборатории акустических процессов и аппаратов Бийского технологического института (филиала) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессиональ-

ного образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», vnh@bti.secna.ru, ул. Трофимова, 27, Бийск, 659305, Россия. Тел. (3854) 43-25-81

**Цыганок Сергей Николаевич**, к.т.н., доцент, доцент каф. МСИА, заведующий лабораторией акустических процессов и аппаратов Бийского технологического института (филиала) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», gray@bti.secna.ru, ул. Трофимова, 27, Бийск, 659305, Россия. Тел. (3854) 43-25-81

**Удоратина 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.

**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.taty@mail.ru, ул. Первомайская, 48, Сыктывкар, 167982, Россия. Тел. (8212) 21-99-61, факс (8212) 21-84-77.

УДК 66.061.3; 66.098

## ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

А.А. Кухленко, М.С. Василишин, С.Е. Орлов, Д.Б. Иванова,  
В.Н. Золотухин, Е.И. Макарова, В.В. Будаева

*Исследовано влияние различных способов предварительной обработки плодовых оболочек овса в роторно-пульсационном аппарате и емкостной аппаратуре на эффективность проведения последующей стадии ферментативного гидролиза субстратов целлюлозы. Показано, что применение роторно-пульсационного аппарата в сочетании с определенными режимными параметрами процесса предобработки способствует удалению нецеллюлозных примесей из субстратов, что во многом определяет скорость и длительность следующего за предобработкой процесса ферментативного гидролиза.*

*Ключевые слова:* плодовые оболочки овса, роторно-пульсационный аппарат, целлюлоза, лигнин, пентозаны, ферментативный гидролиз, редуцирующие вещества, эффективность гидролиза.

### ВВЕДЕНИЕ

Характерной тенденцией индустриального развития на современном этапе является

все возрастающее применение моторных топлив из возобновляемых источников сырья, в том числе биомассы. Так в качестве одного