

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ВОЛОКНИСТОГО ПРОДУКТА ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ СУБСТРАТА

Е.И. Макарова, В.В. Будаева

Впервые исследован ферментативный гидролиз нового вида целлюлозосодержащего субстрата – образца волокнистого продукта плодовых оболочек овса – при различных начальных концентрациях субстрата в буферной и водной средах. Установлено, что при увеличении начальной концентрации субстрата от 60 г/л до 90 г/л конечная концентрация редуцирующих веществ в гидролизате увеличивается от 53 г/л до 73 г/л в ацетатном буфере и от 52 г/л до 71 г/л в водной среде, при этом выход редуцирующих веществ уменьшается от 80 % до 73 % в ацетатном буфере и от 78 % до 71 % в водной среде. Показано отличие результатов гидролиза волокнистого продукта от ферментации целлюлозы. Рекомендована начальная концентрация субстрата 60-75 г/л при масштабировании по объему ферментативного гидролиза волокнистого продукта плодовых оболочек овса для получения высококонцентрированных водных растворов редуцирующих веществ, преимущественно глюкозы – питательных сред для микробиологического синтеза.

Ключевые слова: плодовые оболочки овса, предварительная обработка, волокнистый продукт, ферментативный гидролиз, концентрация субстрата, выход редуцирующих веществ.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что исследование ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего субстрата в буферных средах (в частности, ацетатном растворе) [1] позволяет определить сравнительную реакционную способность к ферментации различных субстратов, которая, как правило, закладывается при выборе вида сырья и способа его предварительной обработки. Полученные в таком случае гидролизаты не могут быть использованы для последующего микробиологического синтеза в связи с высоким содержанием в них ингибиторов ферментации – ацетата натрия и уксусной кислоты. Но при переходе к водным средам исследователи сталкиваются с проблемой удержания кислотности среды в процессе ферментации в диапазоне 4,5-5,5, необходимом для работы ферментных комплексов. Поэтому, сравнительные исследования ферментации экспериментальных субстратов в буферной и водной среде являются востребованными. Особое значение эти исследования приобретают при прогнозе масштабирования по объему биотехнологических процессов, в данном случае увеличения концентрации субстрата. Так, например, обсуждаются возникающие трудности обеспечения высокого выхода редуцирующих веществ при ферментации предварительно обработанных брикетов просо с увеличением концентрации субстрата от 50 г/л до 200 г/л в

ПОЛЗУНОВСКИЙ ВЕСТНИК № 3 2015

связи с ограниченной подвижностью целлюлаз в системе, а также ингибированием ферментов продуктами реакции, в основном глюкозой [2].

Известно, что концентрация субстрата является одним из главных факторов, оказывающих влияние на начальную скорость ферментативного гидролиза и выход редуцирующих веществ [3]. Проведение ферментации в водной среде при повышенной начальной концентрации субстрата является важным этапом для масштабирования этого процесса до промышленного производства. Проведение процесса при повышенных начальных концентрациях субстрата позволяет не только получить высокую концентрацию редуцирующих веществ и биопродуктов, но и исключает проведение дополнительных операций для концентрирования гидролизатов [4].

Плодовые оболочки овса являются уникальным видом широко распространенного в мире сырья, массовая доля плодовых оболочек овса от зерна составляет 28 %. Отличительной чертой данного вида сырья является калиброванный размер частиц (не более 15 мм) и наличие тонких стенок растительного материала, не требующих измельчения сырья перед переработкой. В химическом составе присутствуют гидролизующие компоненты – целлюлоза и пентозаны – в количестве 45 % и 31 %, соответственно.

В настоящее время проведены исследования реакционной способности к фермента-

тивному гидролизу продуктов предварительной обработки перспективных видов целлюлозосодержащего сырья (энергетических растений и отходов АПК), в том числе и плодовых оболочек овса. Результаты исследования гидролиза при начальной концентрации субстрата 30 г/л позволили рекомендовать обработку сырья разбавленным раствором гидроксида натрия в качестве предварительной химической обработки [5]. При этом происходит упрощение процесса получения субстрата – так называемого волокнистого продукта, обладающего высокой реакционной способностью. Выход редуцирующих веществ от массового содержания гидролизующих компонентов при ферментации волокнистого продукта плодовых оболочек овса с начальной концентрацией субстрата 30 г/л достигает 95–100 %.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование ферментативного гидролиза образца волокнистого продукта плодовых оболочек овса при различных начальных концентрациях субстрата в ацетатном буфере и водной среде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве субстрата в работе исследовался образец волокнистого продукта плодовых оболочек овса (ВП ПОО), полученный на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН одностадийной обработкой сырья разбавленным раствором гидроксида натрия [6].

Массовые доли (м.д.) основных компонентов в субстрате определялись по стандартным методикам анализа продуктов переработки растительного сырья [7].

Ферментативный гидролиз осуществлялся с использованием мультиэнзимной композиции из ферментных препаратов «Целлюлюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) и «Брюзайм ВГХ» («Polfa Tarchomin Pharmaceutical», Польша) при фермент-субстратном соотношении 1:50. «Целлюлюкс-А» стандартизирован по целлюлазе, «Брюзайм ВГХ» – по гемицеллюлазе и обладает высокой целлюлазной активностью.

Ферментативный гидролиз субстрата проводился при температуре $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$ и pH $(4,6 \pm 0,3)$ при постоянном перемешивании на горизонтальном перемешивающем устройстве «ПЭ 6410» (Россия) в ацетатном буфере и водной среде. Каждые 4 ч в водном гидролизате определялось значение pH.

В случае его отклонения от оптимального производилась регулировка добавлением разбавленного раствора ортофосфорной кислоты или аммиака. Начальная концентрация субстрата составляла 60 г/л, 75 г/л и 90 г/л.

Для контроля концентрации редуцирующих веществ (РВ) в гидролизатах через определенные промежутки времени проводился отбор проб объемом 2 мл. Концентрация РВ определялась на спектрофотометре UNICO UV-2804 (США) с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты [8].

По окончании процесса (72 ч) рассчитывался выход РВ на массу субстрата по формуле:

$$\eta_{РВ} = \frac{C_k \cdot V_r}{m_c} \cdot 0,9 \cdot 100,$$

где $\eta_{РВ}$ – выход РВ от массы субстрата, %;

C_k – конечная концентрация РВ в гидролизате, г/л;

V_r – объем ацетатного буфера, л;

0,9 – коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза;

m_c – масса субстрата для ферментации, г.

Концентрация пентоз в пересчете на ксилозу в гидролизатах определялась на спектрофотометре UNICO UV-2804 (США) с использованием железоорсинового реактива [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам анализа химического состава, субстрат ВП ПОО представлен по большей части гидролизующими компонентами – целлюлозой (88,0 %) и пентозанами (4,5 %). Меньшая доля относится к негидролизующим примесям – кислотонерастворимому лигнину (6,7 %) и золе (0,6 %).

Следует отметить, что при проведении гидролиза в водной среде на протяжении всего процесса гидролиза требовалась регулировка pH: через 4 ч pH сместился в щелочную область (6,1–6,3), в течение последующей продолжительности 4–72 ч – в кислую область (3,3–4,0).

Результаты эксперимента представлены на рисунке 1 в виде зависимостей концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза ВП ПОО в ацетатном буфере (а) и водной среде (б) при различных начальных концентрациях субстрата.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ВОЛОКНИСТОГО ПРОДУКТА ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ СУБСТРАТА

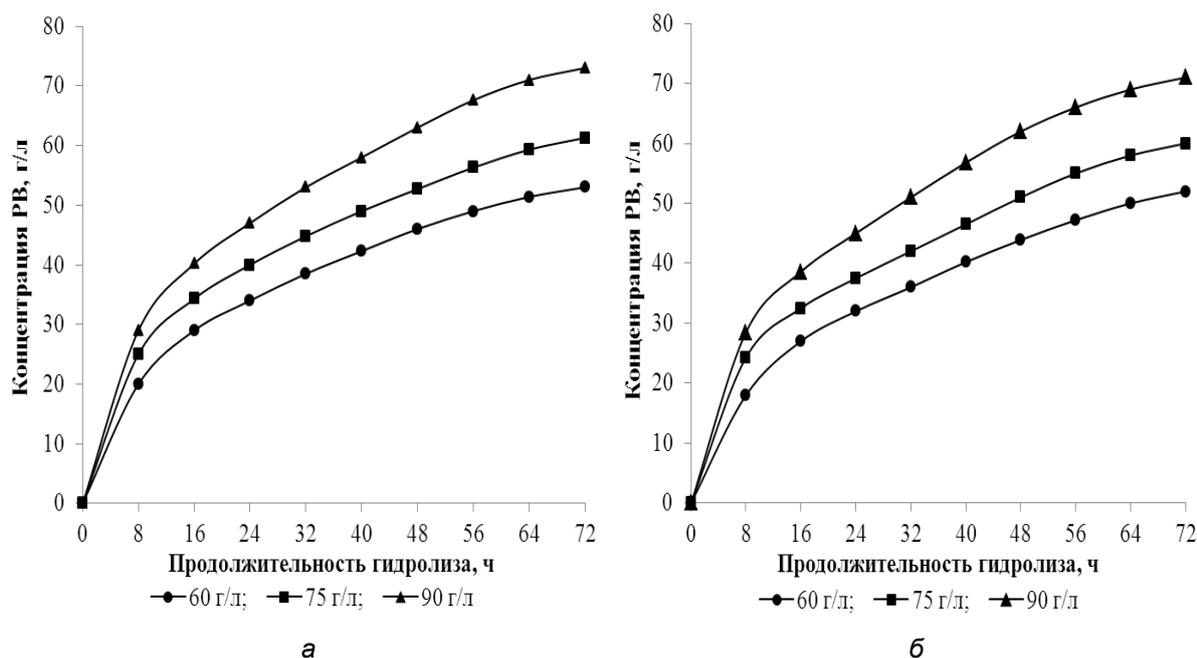


Рисунок 1 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза ВП ПОО с различными начальными концентрациями субстрата в ацетатном буфере (а) и водной среде (б)

Сравнение кинетических зависимостей, полученных при ферментативном гидролизе ВП ПОО с различными начальными концентрациями субстрата в диапазоне от 60 г/л до 90 г/л в буферной и водной средах, демонстрирует увеличение конечной концентрации РВ от 53 г/л до 73 г/л в ацетатном буфере и от 52 г/л до 71 г/л в водной среде. Зависимости концентрации РВ от продолжительности гидролиза в ацетатном буфере и водной среде при одном значении начальной концентрации субстрата практически идентичны: на протяжении всего процесса гидролиза разрыв в концентрациях РВ не превышает 3 г/л. Следовательно, несмотря на колебания рН в процессе гидролиза в водной среде удалось обеспечить требуемый диапазон рН, что в свою очередь, не оказало негативного влияния на активность ферментных препаратов.

Кинетические зависимости в исследуемом диапазоне начальных концентраций субстрата демонстрируют резкий рост концентрации РВ в первые 8 ч гидролиза (2,5–3,6 г/л/ч) и дальнейший медленный прирост концентрации РВ в течение 72 ч. Полученные данные отличаются от результатов ферментализации образцов целлюлозы плодовых оболочек овса при различных концентрациях субстрата, где наблюдался выход концентрации РВ на плато уже через 16–32 ч гидролиза [10]. Такой характер гидролиза субстрата ВП ПОО обусловлен более сложным химическим составом субстрата и постепенным увеличением центров субстрата, доступных ферментам.

Для сравнительного анализа полученных результатов на рисунке 2 представлены зависимости выхода РВ от начальной концентрации ВП ПОО при гидролизе в ацетатном буфере и водной среде. Полученные зависимости демонстрируют уменьшение выхода РВ от 80 % до 73 % в ацетатном буфере и от 78 % до 71 % в водной среде при увеличении концентрации субстрата от 60 г/л до 90 г/л. Снижение выхода РВ, в первую очередь, вызвано трудностями при перемешивании системы, и, как следствие, ограниченной подвижностью ферментов из-за адсорбции на пористой структуре субстрата, а также частичным ингибированием фермента избытком субстрата. Переход от буферной к водной среде приводит к снижению выхода РВ на 1,5–2,0 %, что подтверждает возможность использования ВП ПОО для получения высококонцентрированных водных растворов РВ. По результатам эксперимента рекомендуется дальнейшее масштабирование гидролиза по объему ВП ПОО в водной среде при начальных концентрациях субстрата 60–75 г/л.

Анализ концентрации пентоз в пересчете на ксилозу в водных гидролизатах (1,6–2,4 г/л) показал, что гидролизаты являются преимущественно глюкозными, что ожидаемо исходя из химического состава субстрата (соотношение м.д. целлюлозы к м.д. пентозанов = 20:1).

Полученные гидролизаты в водной среде были предоставлены для биосинтеза бактериальной целлюлозы [11].

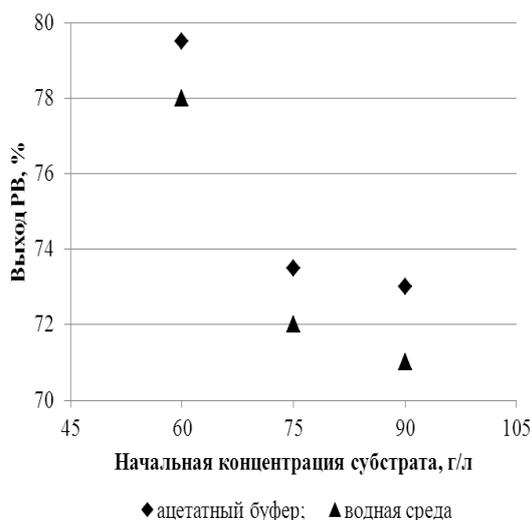


Рисунок 2 – Зависимость выхода РВ от начальной концентрации ВП ПОО через 72 ч гидролиза в буферной и водной средах

ВЫВОДЫ

Впервые исследован ферментативный гидролиз образца ВП ПОО при различных начальных концентрациях субстрата в ацетатном буфере и водной среде. Установлено, что при увеличении начальной концентрации субстрата от 60 г/л до 90 г/л конечная концентрация РВ увеличивается от 53 г/л до 73 г/л в ацетатном буфере и от 52 г/л до 71 г/л в водной среде, при этом выход РВ уменьшается от 80 % до 73 % в ацетатном буфере и от 78 % до 71 % в водной среде. Показано, что в отличие от ферментации целлюлозы из плодовых оболочек овса зависимости концентрации РВ от продолжительности гидролиза ВП ПОО не выходят на плато через 16 ч гидролиза, а наблюдается медленный прирост концентрации РВ на протяжении всего процесса (72 ч).

Полученные результаты позволили рекомендовать масштабирование по объему ферментативного гидролиза ВП ПОО в водной среде при начальной концентрации 60–75 г/л с целью получения питательных сред для микробиологического синтеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сеницын, А. П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А. П. Сеницын, А. В. Гусаков, В. М. Черноглазов. – М. : Издательство МГУ, 1995. – 224 с.
2. Ioelovich, M. Study of enzymatic hydrolysis of pretreated biomass at increased solids loading / M. Ioelovich, E. Morag // BioResources. – 2012. – V. 7, № 4. – P. 4672–4682.

3. Di Risio, S. Large-scale, high-solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded poplar / S. Di Risio, C. S. Hu, B. A. Saville, D. Liao, J. Lortie // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2011. – V. 5, № 6. – P. 609–620.

4. Modenbach, A. A. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment – A review / A. A. Modenbach, S. E. Nokes // Biotechnology and Bioengineering. – 2012. – № 109. – P. 1–13.

5. Макарова Е. И. Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья: энергетических растений и отходов АПК: дис. ... канд. техн. наук: 03.01.06 / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. Бийск, 2015.

6. Технологическая пропись получения технической целлюлозы из плодовых оболочек овса комбинированным способом ТП 10018691.01101.00072. Утверждена директором ИПХЭТ СО РАН 12.05.2015 г.

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

8. Gusakov, A. V. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities / A. V. Gusakov, E. G. Kondratyeva, A. P. Sinitsyn // International Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – V. 2011. – P. 1–4.

9. ГОСТ 10820-75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. – М., 1975. – 7 с.

10. Makarova, E. I. Enzymatic Hydrolysis of cellulose from oat husks at different substrate concentrations / E. I. Makarova, V. V. Budaeva, E. A. Skiba // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2014. – V. 40, № 7. – P. 726–732.

11. Гладышева, Е. К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* J. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-1. – С. 13–17.

Макарова Е.И. – кандидат технических наук, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), *massl@mail.ru*, тел. (3854) 30-59-85.

Будаева В.В. – кандидат химических наук, доцент, заведующая лабораторией биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), *budaeva@ipcet.ru*, тел. (3854) 30-59-85.