

ХИМИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА ДЛЯ СИНТЕЗА БИОЭТАНОЛА

О.В. Байбакова

*При использовании химической предварительной обработки плодовых оболочек овса получен субстрат (волокнистый продукт) с высокой реакционной способностью к ферментативному гидролизу. Исследован процесс осахаривания волокнистого продукта плодовых оболочек овса. С помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 получен биоэтанол на среде волокнистого продукта плодовых оболочек овса. Показано, что при одновременном процессе проведения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения выход этанола увеличивается в 1,1 раза по сравнению с последовательным процессом.*

Ключевые слова: плодовые оболочки овса, волокнистый продукт, ферментативный гидролиз, биоэтанол.

ВВЕДЕНИЕ

Бесконечность объемов целлюлозосодержащего сырья, его доступность во всех регионах мира, и универсальность использования для превращения в различные продукты микробиологической трансформации привлекает все большее внимание исследователей [1–3].

С целью исследований процессов получения биоэтанола из ферментативного гидролизата в качестве сырья для субстратов использовались плодовые оболочки овса (ПОО).

Плодовые оболочки овса, по сути, являются отходами сельскохозяйственного производства, поэтому их выращивание, сбор и транспортировка являются практически бесплатными. ПОО – весьма распространенный и легкодоступный сырьевой источник в сельскохозяйственных регионах РФ, они составляют 28 % от массы зерна, и для перерабатывающих заводов со средней производительностью 1400 т овса в месяц отсутствие схемы их утилизации является нерешенной проблемой. Следует отметить, что ранее ПОО рассматривались как гемицеллюозное сырье и источник получения фурфурола и ксилита [4]. В связи с высоким содержанием целлюлозы (до 35 %) и размещением ПОО непосредственно в промышленных районах, их позиционируют в качестве концентрированного вида отходов – потенциального источника недревесной целлюлозы.

В ИПХЭТ СО РАН ПОО рассматриваются как перспективное сырье для получения растворов сахаров методом ферментативного гидролиза [5] с последующей микробиологической конверсией в ценные продукты (в том

числе в биоэтанол), а также в качестве сырья для выделения целлюлозы с последующей трансформацией её в эфиры [6, 7].

Химическая предобработка сырья необходима для разрушения взаимосвязей между полимерами. Цель предобработки – изменение физических особенностей и химического состава/структуры гидролизующейся части сырья, что делает целлюлозу более доступной для ферментативного гидролиза и превращения её в раствор сахаров. Таким образом, предобработка служит важным этапом устранения прочности сырья и повышения выхода сбраживаемых сахаров на этапе энзиматического разрушения [8].

Целью данной работы являлось исследование химической обработки плодовых оболочек овса для синтеза биоэтанола, а также изучение влияния последовательности технологических стадий осахаривания и сбраживания на процесс биосинтеза этанола.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Субстрат для процесса осахаривания был получен на опытном производстве обработкой плодовых оболочек овса в одну стадию разбавленным раствором щелочи при температуре 90–96 °С. В результате химической обработки сырья был получен субстрат, названный волокнистый продукт (ВП). Плодовые оболочки овса до химической обработки и после нее представлены на рисунке 1. До химической обработки ПОО представляют собой морфологически однородное, сходное по размеру и усредненное по химическому составу сырье, после обработки – волокнистый продукт светлого цвета и рыхлой структуры.



а)



б)

Рисунок 1 – Плодовые оболочки овса до химической обработки (а) и после нее (б)

Характеристики ВП ПОО представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики ВП ПОО

Характеристики субстрата	М.д., % в пересчете на а.с.с.
а-целлюлоза	89,0
Кислотонерастворимый лигнин	5,81
Пентозаны	4,5
Зольность	0,63

Для процесса осахаривания в работе использовали промышленно доступные биокаATALИЗАТОРЫ «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск) и «Брюзайм BGX» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diac International Inc.», США). Препарат «Целлолюкс-А».

Технологические стадии осахаривания и сбраживания проводили последовательно и

одновременно. Для проведения процессов в колбу Эрленмейера емкостью 1000 мл помещали навеску субстрата и дистиллированную воду. Концентрация субстрата составила 60 г/л.

При последовательном процессе осахаривания-сбраживания (ППОС) ферментализацию проводили в водной среде при pH 4,7 (корректировку осуществляли ортофосфорной кислотой и гидроксидом аммония) и при непрерывном перемешивании с частотой 150 мин⁻¹. Температура гидролиза составила 45 °С, продолжительность – 72 ч. Мультиэнзимную композицию вносили следующим образом: «Целлолюкс – А» в расчете 0,04 г фермента на 1 г субстрата и «Брюзайм BGX» в расчете 0,1 г фермента на 1 г субстрата. В результате процесса осахаривания был получен ферментативный гидролизат, который стерилизовали методом автоклавирования при 0,5 атм в течение 40 мин.

При одновременном процессе осахаривания-сбраживания (ОПОС) процесс осахаривания проводился в приведенных выше условиях, но его продолжительность составила 24 ч, после чего ферментативный гидролизат охлаждали до 28 °С, вносили засевные дрожжи и в течение трех последующих суток проводили сбраживание, совмещенное с осахариванием.

В обоих случаях сбраживание проводили с использованием штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика г. Москва). Штамм был выделен из ферментера Котласского целлюлозно-бумажного комбината и использовался для производства этанола на сульфитных щелоках. Особенностью штамма является его устойчивость к вредным примесям гидролизатов [9]. В качестве среды для приготовления инокулята использовался стерильный солодовый экстракт. В колбу Эрленмейера (250 мл), со 100 мл среды вносили посевную петлю из клеток, выращенных на скошенном агаре с солодовым экстрактом дрожжей, далее штамм культивировали в течение 2 суток в термостате при температуре 28 °С.

Доза инокулята составила 10 %. Инокулят имел следующие характеристики для последовательного процесса: общее количество – 72,8 млн. КОЕ/мл, из них почкующихся – 29,2 %; для одновременного процесса: общее количество – 85,3 млн. КОЕ/мл, из них почкующихся – 24,2 %. Сбраживание проводили в анаэробных условиях при 28 °С в течение трех суток.

Концентрацию сахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрическим методом с помощью реактива на основе

3,5-динитросалициловой кислоты (спектрофотометр «UNICO» UV-2804, США) в пересчёте на глюкозу. Выход редуцирующих веществ (РВ) рассчитан как отношение массы РВ к массе субстрата, с учетом коэффициента, связанного с присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

Активную кислотность измеряли потенциометрически (рН-метр Cheser-1). Крепость бражек (объемная доля спирта) определяли ареометром для спирта в дистилляте, полученном после предварительной перегонки спирта из бражки, в соответствии с методикой ГОСТ Р 51135-2003 [10].

По крепости полученных бражек и концентрации РВ в исходной среде рассчитывали выход биоэтанола. Теоретическая концентрация этанола рассчитана по стехиометрическому уравнению брожения, выход биоэтанола – как отношение экспериментальной концентрации этанола к теоретической. Полученные образцы биоэтанола концентрировали методом простой перегонки, дополнительной очистки не проводили. Анализ этанола выполнен методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) по ГОСТ Р 51786-2001 [11] на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором «Кристалл 2000М» фирмы «СКБ Хроматэк».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимости концентрации РВ от продолжительности процессов осахаривания-спиртового брожения, проводимых последовательно и одновременно, представлены на рисунке 2.

Полученные результаты показали, что при ППОС максимальное накопление РВ происходит через 72 ч ферментации и составляет 56,7 г/л, а при ОПОС – через 32 ч и составляет 34,5 г/л. Это можно объяснить тем, что при добавлении дрожжей в ОПОС через 24 ч от начала процесса РВ начинают расходоваться на синтез этанола, то есть они отводятся из системы и таким образом равновесие суммарной ферментативной реакции гидролиза целлюлозы постоянно смещается в сторону образования продуктов реакции.

Результаты спиртового брожения ферментативного водного гидролизата волокнистого продукта плодовых оболочек овса представлены в таблице 2.



Рисунок 2 – Зависимости концентрации РВ от продолжительности процесса при одновременном и последовательном осахаривании-сбраживании

При ППОС этанол синтезируется с выходом 41,7 % от РВ, выход этанола из 1 т ПОО составляет 10,6 дал. При ОПОС этанол синтезируется с выходом 46,3 % от РВ, выход этанола из 1 т ПОО составляет 11,8 дал. Сравнение синтеза этанола, полученного при проведении процесса осахаривания-спиртового брожения последовательно и одновременно, показывает, что при одновременном процессе выход этанола увеличивается в 1,1 раза по сравнению с последовательным процессом.

При проведении процессов осахаривания-сбраживания одновременно исключается стадия фильтрования ферментативного гидролизата и сокращается продолжительность технологических стадий в 1,5 раза. Остаточная концентрация редуцирующих веществ в бражке ниже при ОПОС в 6,3 раза, чем при ППОС, что также указывает на повышение эффективности процесса.

Полученные образцы биоэтанола сконцентрированы простой перегонкой, без дополнительной очистки. Анализ качества полученных образцов биоэтанола выполнен методом газожидкостной хроматографии по ГОСТ [12] на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором «Кристалл - 2000М» фирмы «СКБ Хроматэк». Установлено, что спирты, полученные из волокнистого продукта плодовых оболочек овса, характеризуются низким содержанием эфирной фракции и метанола.

Таблица 2 – Показатели сбраживания при проведении технологических стадий одновременно и последовательно

Показатель	ППОС	ОПОС
Концентрация субстрата (ЛЦМ ПОО), г/л	60,0	60,0
Максимальная концентрация РВ на стадии ферментативного гидролиза, г/л	56,7	34,5
Крепость бражки, об. %	1,8	2,0
Остаточная концентрация РВ в бражке, г/л	8,8	3,4
Выход этанола, % от теоретического	41,7	46,3
Выход этанола из 1 т сырья (ПОО), дал	10,6	11,8

ВЫВОДЫ

С помощью химической предварительной обработки плодовых оболочек овса получен субстрат (волоконистый продукт) с высокой реакционной способностью к ферментативному гидролизу. Исследован процесс осахаривания волокнистого продукта плодовых оболочек овса, установлено, что выход РВ составил 85,1 % от массы субстрата.

Получен биоэтанол из ВП ПОО. Показано, что при одновременном процессе проведения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения выход этанола увеличивается в 1,1 раза по сравнению с последовательным процессом. Кроме того, при одновременном процессе исключается стадия фильтрования ферментативного гидролизата и в 1,5 раза сокращается общая продолжительность технологических стадий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jordan, D. B. Plant cell walls to ethanol / D. B. Jordan, M. J. Bowman, J. D. Braker, B. S. Di-en, R. E. Hector, C. C. Lee, J. A. Mertens, K. Wagschal // Biochem. J. – 2012. – 442. – P. 241–252.

2. Chaud LCS, da Silva DDV, de Mattos RT, Felipe MGA. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipites*. Braz Arch Biol Technol. – 2012. – 55. P. 771–777.

3. Sun, Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review / Y. Sun, J. Chehg // Bioresource Technology. – 2002. – № 83. – P. 1–11.

4. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. II. – Спб. : АНО НПО «Профессионал», 2006. – 1142 с

5. Будаева, В. В. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков / В. В. Будаева, Р. Ю. Митрофанов, В. Н. Золотухин // Ползуновский вестник. – 2008. – № 3. – С. 322–327.

6. Будаева, В. В. Карбоксиметилирование плодовых оболочек овса / В. В. Будаева, М. В. Обрезкова, Н. А. Томильцева, Г. В. Сакович // Строительство нефтяных и газовых скважин на суше и на море. – 2011. – № 9. – С. 41–45.

7. Якушева, А. А. Свойства нитроцеллюлоз из хлопка и плодовых оболочек овса / А. А. Якушева // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 202–206.

8. F. Hu, A. Ragauskas Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. // Bioenerg. Res. – 2012. – № 5. – P. 1043–1066.

9. Скиба, Е. А. Изучение устойчивости штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-169 к ферментативным гидролизным средам / Е. А. Скиба, О. В. Байбакова // Ползуновский вестник. – 2013 – № 3. – С. 214–219.

10. ГОСТ Р 51135-2003. Изделия ликероводочные. Правила приемки и методы анализа. Технические требования. – Введ. 1998-03-02. – М. : ИУС, 2003. – 116 с.

11. ГОСТ Р 51786-2001. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – М. : Изд-во стандартов, 2001. – 8 с.

12. ГОСТ Р 51786-2001. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – М. : Изд-во стандартов, 2001. – 8 с.

Байбакова О.В., аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), *olka_baibakova@mail.ru*, тел. (3854) 30-59-85.