

О ВЛИЯНИИ УСЛОВИЙ СБРАЖИВАНИЯ НА ВЫХОД БИОЭТАНОЛА, ПОЛУЧАЕМОГО ИЗ МИСКАНТУСА ЧЕРЕЗ ХИМИЧЕСКУЮ СТАДИЮ ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ

Е.А. Скиба, О.В. Байбакова

*В статье приведены результаты получения биоэтанола с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693 в зависимости от условий сбраживания ферментативных гидролизатов из мискантуса. В качестве предварительной химической обработки мискантуса для успешного ферментативного гидролиза использован метод щелочной делигнификации, проведенный в одну стадию. Установлено, что ферментативный гидролизат из ВП мискантуса является биологически доброкачественной питательной средой; взвеси гидролизата вызывают замедление процесса брожения и снижают выход биоэтанола, а внесение дрожжевого экстракта в нефилтрованный гидролизат позволяет стимулировать метаболизм дрожжей и получить высокий выход биоэтанола – 86 % от концентрации редуцирующих веществ. Оптимальной является дозировка 1 % дрожжевого экстракта.*

Ключевые слова: биоэтанол, мискантус, щелочная делигнификация, ферментативный гидролиз, спиртовое брожение.

ВВЕДЕНИЕ

При производстве биоэтанола решающей технологической операцией является подготовка субстрата, определяющая экономическую эффективность всего процесса. Способам предобработки сырья посвящено много работ, при этом подчёркивается приоритетность предварительной обработки в одну стадию [1].

Ранее в ИПХЭТ были проведены работы по ферментативному гидролизу технических целлюлоз в ацетатном буфере в колбах Эрленмейера и в водной среде в ферментаторе авторской конструкции Павлова И.Н., а также по получению биоэтанола из полученных гидролизатов [2].

Выделение ТЦ включало две стадии: измельчённое сырьё обрабатывалось разбавленным раствором гидроксида натрия при атмосферном давлении и разбавленным раствором азотной кислоты. Однако получение субстрата в две стадии – это достаточно сложно и дорого, поэтому с целью сокращения стадий химической предобработки целлюлозосодержащего сырья в данной работе предобработку сырья провели в одну стадию разбавленным раствором гидроксида натрия при температуре 90–96 °С, исключив стадию обработки раствором азотной кислоты. Был получен продукт, названный волокнистым продуктом (ВП), так как обработка в одну стадию позволяет провести делигнификацию сырья, но не удаляет гемицеллюлозы, а про-

дукт имеет волокнистую рыхлую структуру. Нарботка ВП проводилась на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН.

Способ предварительной обработки сырья определяет не только химический состав получаемого субстрата, но и его реакционную способность к ферментативному гидролизу, и химический состав получаемого ферментативного гидролизата (также на химической состав гидролизата влияют также селективность действия ферментного комплекса и условия проведения ферментативного гидролиза), а значит и на выход биоэтанола.

Осуществить ферментативный гидролиз волокнистого продукта мискантуса представляется более сложной задачей, чем ферментативный гидролиз целлюлозы, так как одностадийная обработка позволяет лишь частично освободить субстрат от негидролизующих целлюлазами примесей. Если целью ферментативного гидролиза является последующее сбраживание гидролизата в биоэтанол, то задача становится ещё сложнее, так как процесс следует вести в водной среде. Переход к водной среде обязателен, потому что ацетатный буфер является ингибитором спиртового брожения [3], а целью ферментативного гидролиза является получение биологически доброкачественного гидролизата. Для достижения активной кислотности в среде 4,7–4,9 ед. рН и её поддержания на этом уровне была выбрана ортофосфорная кислота. В отличие от уксусной кислоты соли фосфорной кислоты участвуют в метаболизме дрожжей,

О ВЛИЯНИИ УСЛОВИЙ СБРАЖИВАНИЯ НА ВЫХОД БИОЭТАНОЛА, ПОЛУЧАЕМОГО ИЗ МИСКАНТУСА ЧЕРЕЗ ХИМИЧЕСКУЮ СТАДИЮ ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ

интенсифицируя их генеративную и зимазную активность. Но создание благоприятных для развития дрожжей условий сопряжено с повышением риска контаминации ферментативного гидролизата посторонней микрофлорой, так как оптимальные условия жизнедеятельности совпадают для целого ряда микроорганизмов, а процесс получения ферментативного гидролизата достаточно длителен и для разных субстратов может занимать от 20 ч до 72 ч [4–5].

На стадии спиртового брожения можно управлять биотехнологическим процессом, добиваясь стандартизации состава питательных сред, подбирая условия сбраживания, что обеспечивает повышение выхода целевого продукта – биоэтанола.

Используемый продуцент должен обеспечивать максимальную скорость и полноту сбраживания, быть устойчивым к продуктам своего обмена, вредным примесям среды и контаминирующей микрофлоре [3]. В работе использован штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (г. Москва), выделенный из ферментера Котласского ЦБК Архангельской области. Штамм использовался для производства этанола на сульфитных щелоках. Особенностью штамма является его устойчивость к вредным примесям гидролизатов. Для обеспечения максимальной скорости биосинтеза биоэтанола и повышения приспособляемости штамма к новой питательной среде, культура внесена на стадии экспоненциального роста.

Скорость сбраживания определяется биологической доброкачественностью используемой питательной среды, а полнота сбраживания – углеводным составом среды. Так как щелочная делигнификация не обеспечивает удаления пентозанов из сырья, то в результате их гидролиза будут накапливаться как гексозы, так и пентозы. Известно, что пентозы не сбраживаются сахаромикетами [6, 7].

Проблема посторонней микрофлоры при сбраживании гидролизатов из однолетней целлюлозы отражена в классической литературе по технологии гидролизного спирта [7], а поскольку процесс ферментативного гидролиза достаточно длителен, для уменьшения риска контаминации посторонней микрофлорой внесение продуцента биоэтанола должно быть осуществлено как можно быстрее. Эта задача может быть решена путём совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Преимуществом данного пути является также непрерывное выведение из системы глюкозы, начиная с момента

внесения дрожжей в питательную среду с превращением глюкозы в этиловый спирт. Смещение равновесия в реакции гидролиза целлюлозы в сторону образования продукта реакции позволяет интенсифицировать её и повысить выход глюкозы, а, следовательно, и биоэтанола.

Для изучения возможности совмещения технологических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения для субстрата ВП мискантуса в данной работе изучены некоторые условия сбраживания на выход биоэтанола, а именно биологическая доброкачественность среды, наличие в ней твердых взвесей и стимуляторов роста дрожжей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристики ВП из мискантуса представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные характеристики ВП из мискантуса

Характеристика субстрата, % на а.с.с.	Значение
М.д. целлюлозы по Кюршнеру	94,7
М.д. пентозанов	9,4
М.д. лигнина	3,6
Зольность	5,5

Для ферментативного гидролиза использовали ферментные препараты «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск) и «Брюзайм ВGX» (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 ВGX» – как гемицеллюлаза. Мультиэнзимную композицию вносили следующим образом: «Целлолюкс – А» в расчете 0,04 г фермента на 1 г субстрата и «Брюзайм ВGX» в расчете 0,2 г фермента на 1 г субстрата.

Ферментативный гидролиз проводили в ферментёре авторской конструкции объёмом 11 л в водной среде (корректировку осуществляли ортофосфорной кислотой), при активной кислотности 4,7 ед. рН и температуре 40 °С. Концентрация субстрата – 50 г/л. Частота оборотов перемешивающего устройства варьировалась в зависимости от вязкости суспензии в диапазоне от 200 до 750 об/мин.

Концентрацию сахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрически с помощью реактива на основе 3,5-динитро-

салициловой 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.

Гидролизат представлял собой кашеобразную взвесь зеленовато-коричневого цвета, состоящую из жидкой фазы и негидролизованного набухшего в воде волокнистого продукта. Можно предположить, что кашеобразная консистенция и наличие взвешенных примесей будут уменьшать проницаемость клеточных стенок дрожжей и замедлять спиртовое брожение. Фильтрация ферментативных гидролизатов технически затруднено, остающиеся негидролизованными составляющие волокнистого продукта образуют тонкодисперсную взвесь, видимо поэтому, несмотря на другой сырьевой источник (используется зернокартофельное сырьё либо меласса), традиционно в технологии спирта после технологической стадии осахаривания питательная среда (сусло) передается на брожение без фильтрации.

Для изучения влияния вклада таких факторов, как биологическая доброкачественность среды, наличие в ней твердых взвесей и стимуляторов роста дрожжей, проведены следующие варианты брожения, при использовании в качестве питательных сред:

- А) фильтрованного гидролизата;
- Б) нефильтрованного гидролизата;
- В) нефильтрованного гидролизата с добавлением 1 % сухого дрожжевого экстракта;
- Г) нефильтрованного гидролизата с добавлением 3 % сухого дрожжевого экстракта.

Гидролизат пропастеризован при 100 °С без выдержки. Внесено 10 % засевных дрожжей, использована двухсуточная культура со следующими показателями: общее количество – 225,5 млн. КОЕ/мл; из них 17,7 % почкующихся, 20 % упитанных и 0 % мёртвых. Активная кислотность в процессе брожения поддерживалась на уровне 4,5–5,0 ед. рН.

Общую численность дрожжей определяли с использованием камеры Горяева. Морфологические характеристики дрожжей (количество почкующихся, упитанных и мёртвых клеток) определяли согласно методикам, принятым в спиртовой отрасли.

Активную кислотность измеряли потенциометрически. Крепость бражек (объемная доля спирта) определяли ареометром для спирта в дистилляте, полученном после предварительной перегонки спирта из бра-

ки, в соответствии с методикой ГОСТ Р 51135-2003 [8].

По крепости полученных бражек и концентрации РВ в исходной среде рассчитывали выход биоэтанола. Теоретическая концентрация этанола рассчитана от концентрации редуцирующих веществ по стехиометрическому уравнению брожения, выход биоэтанола – как отношение экспериментальной концентрации этанола к теоретической. Полученные образцы биоэтанола концентрировали методом простой перегонки, дополнительной очистки не проводили.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза ВП из мискантуса приведена на рисунке 1.

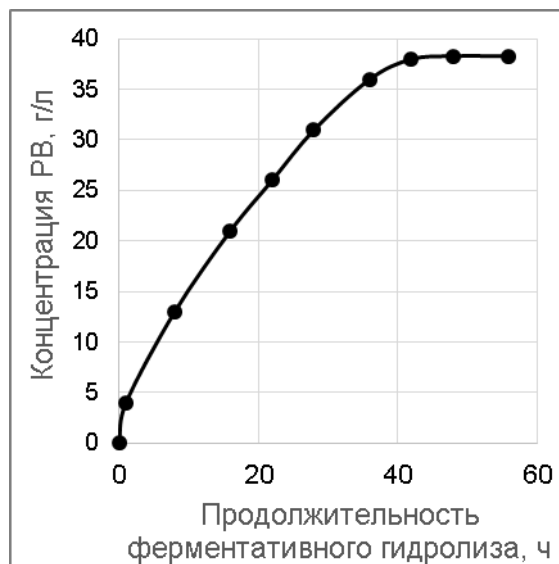


Рисунок 1 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза ВП из мискантуса

Кривая имеет типичный вид и уравнение гидролиза соответствует реакции псевдопервого порядка. Конечная концентрация РВ составляет 38,3 г/л, таким образом, выход РВ составляет 69 % от массы субстрата. Такой относительно невысокий выход может быть связан с проведением процесса в ферментёре объёмом 11 л при ручном регулировании активной кислотности. Активная кислотность снижалась в процессе гидролиза ВП из мискантуса, колебания рН могли привести к временному ингибированию отдельных ферментов мультиэнзимной композиции и, соответственно, к снижению выхода РВ.

Зависимость убыли редуцирующих ве-

О ВЛИЯНИИ УСЛОВИЙ СБРАЖИВАНИЯ НА ВЫХОД БИОЭТАНОЛА, ПОЛУЧАЕМОГО ИЗ МИСКАНТУСА ЧЕРЕЗ ХИМИЧЕСКУЮ СТАДИЮ ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ

ществ от продолжительности и условий брожения приведена на рисунке 2. Через 12 ч брожения наименьшая убыль РВ наблюдается для нефильтрованного гидролизата (опыт Б). Фильтрация позволяет ускорить утилизацию РВ (опыт А). Внесение дрожжевого экстракта еще больше ускоряет утилизацию РВ, при этом наименьшая концентрация остаточных РВ – 5 г/л наблюдается при добавлении 1 % дрожжевого экстракта (опыт В). Внесение 3 % дрожжевого экстракта (опыт Г) оказывается избыточным: скорость утилизации РВ несколько меньше, чем в опыте В, а концентрация остаточных РВ на уровне гидролизата без добавления стимуляторов роста дрожжей – 10 г/л.

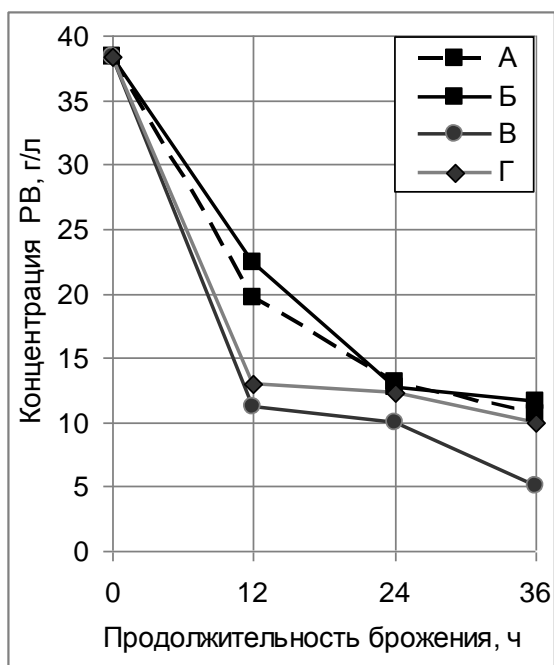


Рисунок 2 – Зависимость убыли редуцирующих веществ (РВ) от продолжительности и условий брожения

Анализ микробиологических показателей брожения (рисунок 3) позволяет сделать вывод о биологической доброкачественности используемой питательной среды: общее количество дрожжей экспоненциально возрастает за первые 12 ч брожения от 22,6 млн. КОЕ/мл до 125–130 млн. КОЕ/мл, при этом мёртвых клеток не было обнаружено во всех вариантах; упитанных в опытах А и Б не зарегистрировано, в опыте В – 30 % и в опыте Г – 5 %. В последующие часы брожения общее количество клеток незначительно увеличилось до 126–135 млн. КОЕ/мл, мёртвых и упитанных клеток не зарегистрировано.

Во всех вариантах количество почкующихся клеток было невелико: 18 % в момент внесения и 3,1–3,4 % во все последующие часы брожения. Для зрелых производственных дрожжей в спиртовой промышленности количество дрожжевых клеток должно быть не менее 80–100 млн. КОЕ/мл; доля упитанных клеток – не менее 70 %; доля почкующихся клеток должна составлять 10–15 %; мёртвых – не более 3–4 % [9].

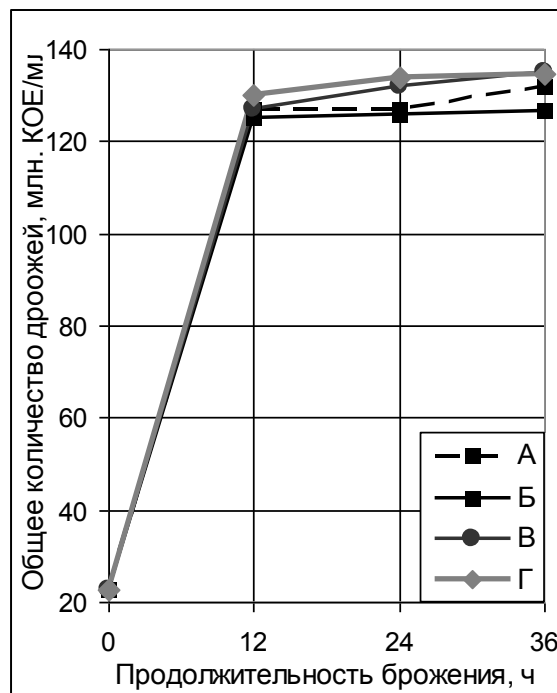


Рисунок 3 – Зависимость общего количества дрожжей от продолжительности и условий брожения

Опытные образцы по общему количеству клеток и доле мёртвых соответствуют требованиям, принятым в отрасли, что свидетельствует о доброкачественности ферментативного гидролизата из ВП мискантуса и отсутствию в нём технологически вредных примесей, характерных для гидролизатов, полученных химическим путём, либо для сульфитных щелоков [6, 7]. Можно сделать вывод, что химическая предварительная обработка мискантуса в одну стадию гидроксидом натрия и последующий ферментативный гидролиз позволяют получить биологически доброкачественную питательную среду.

Однако, среда не является полноценной: доля почкующихся клеток и доля упитанных клеток в разы меньше требуемых показателей, что свидетельствует о недостатке азотного и фосфорного питания, даже не смотря

на добавление в отдельных вариантах экспериментов дрожжевого экстракта.

Теоретический выход этанола при концентрации РВ 38,3 г/л составляет 2,5 об. %. Наименьший практический выход этанола получен для опыта Б – нефильтрованного гидролизата – 64 %. Это можно объяснить наличием в гидролизате взвесей, оседающих на клетках дрожжей и снижающих их биосинтетическую способность: несмотря на глубокую утилизацию РВ, выход этанола снижается. Эту гипотезу подтверждает повышение выхода этанола до 84 % при сбраживании фильтрованного гидролизата. Добавление дрожжевого экстракта в нефильтрованный гидролизат также позволяет получить выход этанола 84 %, что, видимо, связано с наличием в экстракте аминного азота и витаминов группы В, стимулирующих метаболизм дрожжей. Равноценный выход (84 %) получен при сбраживании фильтрованного гидролизата.

Таким образом, успешное совмещение стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения возможно для ВП из мискантуса при добавлении в ферментативный гидролизат 1 % дрожжевого экстракта.

ВЫВОДЫ

– показано, что ферментативный гидролизат из ВП мискантуса является биологически доброкачественной питательной средой;

– установлено, что взвеси гидролизата вызывают замедление процесса брожения и снижают выход биоэтанола;

– выявлено, что внесение дрожжевого экстракта в нефильтрованный гидролизат позволяет стимулировать метаболизм дрожжей и получить высокий выход биоэтанола – 86 % от концентрации редуцирующих веществ. Оптимальной является дозировка 1 % дрожжевого экстракта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

2. Скиба, Е. А. Получение ферментативных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и их спиртовое брожение / Е. А. Скиба, В. В. Будаева, И. Н. Павлов, Е. И. Макарова, В. Н. Золотухин, Г. В. Сакович // Биотехнология. – 2012. – № 6. – С. 42–52.

3. Яровенко, В. Л. Технология спирта / В. Л. Яровенко, В. А. Маринченко, В. А. Смирнов [и др.]; под ред. проф. В. Л. Яровенко. – М.: Колос, 1999. – 464 с.

4. Макарова, Е. И. Ферментативный гидролиз гидротропных целлюлоз / Е. И. Макарова, М. Н. Денисова, В. В. Будаева, Г. В. Сакович // Ползуновский вестник. – 2013. – № 1. – С. 219–222.

5. Кухленко, А. А. 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 // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 238–243.

6. Агеев, Л. М. Химико-технический контроль и учёт гидролизного и сульфитно-спиртового производства / Л. М. Агеев, С. И. Корольков. – М., Л.: Гослесбумиздат, 1953. – 403 с.

7. Шарков, В. И. Технология гидролизных производств / В. И. Шарков, С. А. Сапотницкий, О. А. Дмитриева. – М.: Лесная промышленность, 1973. – 408 с.

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

9. Римарева, Л. В. Микробиологический контроль спиртового и ферментного производств / Л. В. Римарева, Н. Н. Воронцова. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 200 с.

Скиба Е.А. – кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки *Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН)*, eas08988@mail.ru, тел. (3854) 30-59-85.

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.