

РАЗДЕЛ 4. ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.01.021
УДК 664.768; 663.534

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА БИОЭТАНОЛА ИЗ ПРОДУКТА ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОДПИТКИ

Г.Ф. Миронова, И.Н. Павлов, Е.И. Кашеева

В России актуальной является проблема утилизации отходов агропромышленного комплекса. В частности, на перерабатывающих овёс предприятиях скапливается огромное количество его плодовых оболочек, которые никак рационально не утилизируются, но имеют большой потенциал применения. Ввиду высокого содержания углеводной фракции плодовые оболочки овса являются перспективным сырьем для множества ценных веществ, в том числе биоэтанола.

*Целью данной работы являлось исследование возможности повышения выхода биоэтанола из продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса (субстрата) в совмещенном процессе ферментативного гидролиза и спиртового брожения с применением периодической подпитки. Процесс проводился в ферментере общим объемом 11 л. Концентрация субстрата в опыте увеличивалась от 30 г/л до 120 г/л (подпитка по 30 г/л каждые 12 ч). Вместе с субстратом вносилось соответствующее количество промышленных целлюлазных и гемицеллюлазных ферментных препаратов – «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВGX». В качестве засевных дрожжей для спиртового брожения использовалась адаптированная к ферментативному гидролизату используемого субстрата культура ВКПМ *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693. Выход биоэтанола от массы целлюлозы в субстрате составил 29,2 %.*

*Ключевые слова: отходы АПК, плодовые оболочки овса, утилизация, щелочная делигнификация, ферментативный гидролиз, ферментные препараты, спиртовое брожение, *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, периодическая подпитка, биоэтанол.*

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что на заводах по переработке овса в крупу, толокно, хлопья «Геркулес», муку, кормовые продукты остается огромное количество отходов – плодовых оболочек овса (ПОО), которые имеют большой потенциал применения по различным направлениям промышленности, но по факту сжигаются в котлах-утилизаторах, вывозятся в хозяйства для подстилки животным, мульчирования почвы или просто выбрасываются на свалку [1–2]. ПОО состоят в основном из целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина. Особую ценность представляет углеводная фракция (целлюлоза и гемицеллюлозы), которая может быть деполимеризована в моносахариды – источник широкого спектра ценных продуктов.

Перспективным направлением утилизации ПОО является переработка их в технический этиловый спирт (биоэтанол). Технология биоэтанола из возобновляемого целлюлозо-содержащего сырья (чем и являются ПОО) широко обсуждается сегодня и предполагает биоконверсию микроорганизмами (чаще дрожжами-сахаромицетами) моносахаридов,

образующихся в результате ферментативного гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз субстрата, полученного физико-химической обработкой исходного сырья [3–4].

В настоящее время в России производство биоэтанола по такой схеме ошибочно считается нерентабельным, и, как и в любом производстве, перед учеными ставится цель получения наиболее возможного количества целевого продукта с единицы исходного сырья при минимально возможных затратах. Казалось бы, при увеличении концентрации субстрата для ферментативного гидролиза полученная концентрация моносахаридов и, следовательно, биоэтанола будет выше. Однако существует закономерность: эффективность конверсии целлюлозы при ферментативном гидролизе уменьшается обратно пропорционально увеличению концентрации субстрата. Такой эффект могут вызывать следующие факторы: ингибирование ферментов побочными продуктами, высвобождаемыми при предварительной обработке сырья, непродуктивная адсорбция ферментов на субстрате, ограниченный массоперенос и застойные зоны в реакторе из-за высокой

вязкости при высоких концентрациях субстрата [5–7].

Для преодоления этой проблемы был исследован совмещенный процесс ферментативного гидролиза и спиртового брожения с периодической подпиткой субстрата – продукта щелочной делигнификации ПОО (ПЩД ПОО). В ранее проведенных работах с данным субстратом было показано преимущество совмещения технологических стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения [8] и преимущество метода подпитки субстратом и ферментными препаратами (ФП) при ферментативном гидролизе ПЩД ПОО [9].

В данной работе исследовалась возможность повышения выхода биоэтанола из водной суспензии с повышенной концентрацией ПЩД ПОО путем совмещения ферментативного гидролиза и спиртового брожения, внося субстрат и ФП порциями (периодическая подпитка).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Субстрат (ПЩД ПОО) был получен на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН обработкой ПОО 4%-ным раствором гидроксида натрия (атмосферное давление, температура 90–96 °С, продолжительность 4 ч) [10] и имел следующий химический состав, массовая доля в % на абсолютно сухое состояние: целлюлоза по Кюршнеру – 83,6, лигнин – 6,7, пентозаны – 8,7, зола – 1,0.

Процесс ферментативного гидролиза и спиртового брожения с периодической подпиткой был проведен в ферментере авторской конструкции Павлова И.Н. В основу конструкции ферментера заложена модель вертикального аппарата с перемешивающим устройством, оборудованного теплообменным элементом, приспособлением для подачи в процесс необходимых компонентов и пробоотборником; общий объем – 11 л, рабочий объем 7–9 л [11].

Ферментативный гидролиз осуществляли с помощью целлюлазных и гемицеллюлазных ФП из расчета: «Целлолюкс-А» – 0,04 г/г субстрата, «Брюзайм ВGX» – 0,2 мл/г субстрата. Среду выбрали водную, несмотря на то, что ферментативный гидролиз в водной среде технически осуществить сложнее, чем в ацетатном буфере, поскольку в процессе гидролиза в водной среде активная кислотность колеблется, и эти изменения негативно сказываются на биохимической стабильности ферментных препаратов. Ацетатный буфер для ферментативного гидролиза использо-

вать не показано, т.к. он является ингибитором спиртового брожения [12].

Для осуществления спиртового брожения использовали культуру ВКПМ *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 [13], культивируемую с целью адаптации на смешанной питательной среде: 50 % солодового сусла и 50 % ферментативного гидролизата ПЩД ПОО с концентрацией РВ 30 г/л; продолжительность культивирования 24 ч, температура 28 °С.

Условия проведения совмещенного процесса ферментативного гидролиза и спиртового брожения с подпиткой:

- начальная концентрация субстрата в водной среде 30 г/л;
- начальный объем реакционной массы 6 л;
- активная кислотность $4,9 \pm 0,2$ ед. рН;
- перемешивание от 500 до 250 об/мин (варьировалось по мере разжижения реакционной массы);
- температурный режим проведения ферментативного гидролиза 44 °С, спиртового брожения 30 °С.

Подпитку системы свежими порциями субстрата (30 г/л) и ФП осуществляли каждые 12 ч. Для исключения контаминации реакционной массы посторонней микрофлорой вносили антибиотик (бензилпенициллина натрия соль) из расчета 30 тыс. ЕД/л реакционной массы также каждые 12 ч. Через 24 ч реакционную массу охладили до 30 °С и внесли 12 % засевных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693. Через 36 ч от начала ферментативного гидролиза концентрация субстрата в системе составила 120 г/л, далее было принято решение концентрацию субстрата не увеличивать из-за видимых проблем с массообменом. Общая продолжительность процесса составила 96 ч.

В ходе проведения процесса каждые 2 часа потенциометрически измеряли активную кислотность реакционной массы и при необходимости корректировали ее раствором гидроксида аммония или ортофосфорной кислоты. Каждые 4 часа отбирали пробы для определения концентрации редуцирующих веществ (РВ), каждые 8 ч – пробы для определения концентрации сухого вещества (СВ), крепости бражки и микробиологического анализа.

Концентрацию РВ в фильтрате реакционной массы в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) на спектрофотометре UNICO UV-2804 (США). Содержание СВ в суспензии опреде-

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА БИОЭТАНОЛА ИЗ ПРОДУКТА ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОДПИТКИ

ляли как отношение массы пробы реакционной массы после сушки до постоянной массы при температуре 105 ± 2 °С к её массе до высушивания. Общую численность дрожжей и долю почкующихся дрожжей определяли с помощью камеры Горяева. Объёмную долю спирта в бражках определяли ареометром для спирта в дистилляте, полученном перегонкой спирта из бражки по ГОСТ 3639-79.

Работа выполнена при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г.Бийск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

График изменения концентрации СВ показан на рисунке 1.

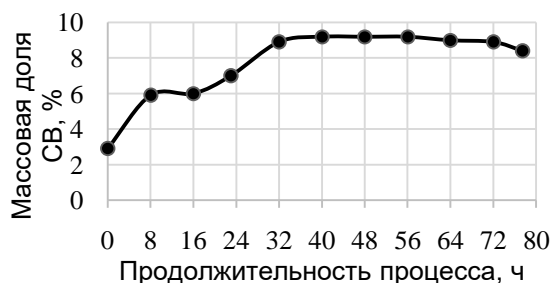


Рисунок 1 – Зависимость концентрации СВ от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Массовая доля СВ возрастала по мере внесения новых порций субстрата (на графике хорошо виден скачок через 12 ч), после прекращения подпитки концентрация СВ продолжительное время находилась практически на одном уровне и лишь через 64 часа начала убывать. Косвенно это свидетельствует о затруднённом массообмене. Более полно о степени гидролиза и сбраживания можно судить по анализам концентрации РВ.

Изменения концентрации РВ и крепости бражки в ходе эксперимента отражены на рисунке 2.

В первые 24 ч процесса накопление РВ при ферментативном гидролизе субстрата шло достаточно быстро. На момент внесения засеваемых дрожжей степень гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз (от массы субстрата 60 г/л) составила 39 %. После внесения дрожжей концентрация РВ резко убывала и около 50 ч поддерживалась практически на одном уровне. Это свидетельствует о том, что одновременно шел ферментативный гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз ПЩД ПОО и ассимиляция моносахаридов дрожжами.

Через 92 ч концентрация РВ установилась на уровне 9,5 г/л и далее не изменялась, к тому же времени перестала изменяться крепость бражки (2,1 % об.).

Так как выход РВ от массы субстрата посчитать нельзя при совмещенном процессе ферментативного гидролиза и сбраживания, о полноте гидролиза можно судить по остаточной концентрации РВ. Предполагается, что остаточные РВ в ферментативном гидролизате из ПЩД ПОО представлены целлобиозой, ксилозой, арабинозой, т.е. редуцирующими сахарами, не сбраживаемыми штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693. Сравнивая данные остаточной концентрации РВ в данной работе (9,5 г/л при концентрации ПЩД ПОО 120 г/л) с данными работы [8] (8,6 г/л при концентрации ПЩД ПОО 60 г/л), можно сделать вывод о том, что при концентрации субстрата 120 г/л остаточная концентрация РВ должна быть больше примерно в 2 раза. Эти данные, наряду с данными, представленными на рисунке 1, свидетельствуют о прекращении процесса ферментативного гидролиза при повышении концентрации выше 60 г/л и одновременном снижении температуры до 30 °С. Малая степень гидролиза, которая может быть вызвана трудностью массопереноса в высоковязкой реакционной смеси, субстратным ингибированием ферментов, адсорбцией ферментов и дрожжей на субстрате, нарушением температурного оптимума работы ферментных препаратов.

Выход биоэтанола от массы целлюлозы в субстрате (отношение экспериментальной концентрации этанола к теоретической) составил 29,2 %.

Подсчитанные в камере Горяева значения количества клеток дрожжей в пробах реакционной массы внесены в таблицу 1.

Таблица 1 – Количество клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693

Продолжительность процесса, ч	Общая численность дрожжей, млн. КОЕ/мл	Доля почкующихся клеток, %
24	8,0	30
48	27,5	24
72	40,0	20
92	36,0	19

Максимальное количество клеток дрожжей было накоплено на вторые сутки сбраживания (72 ч), доля почкующихся клеток с момента внесения дрожжей постепенно уменьшалась.

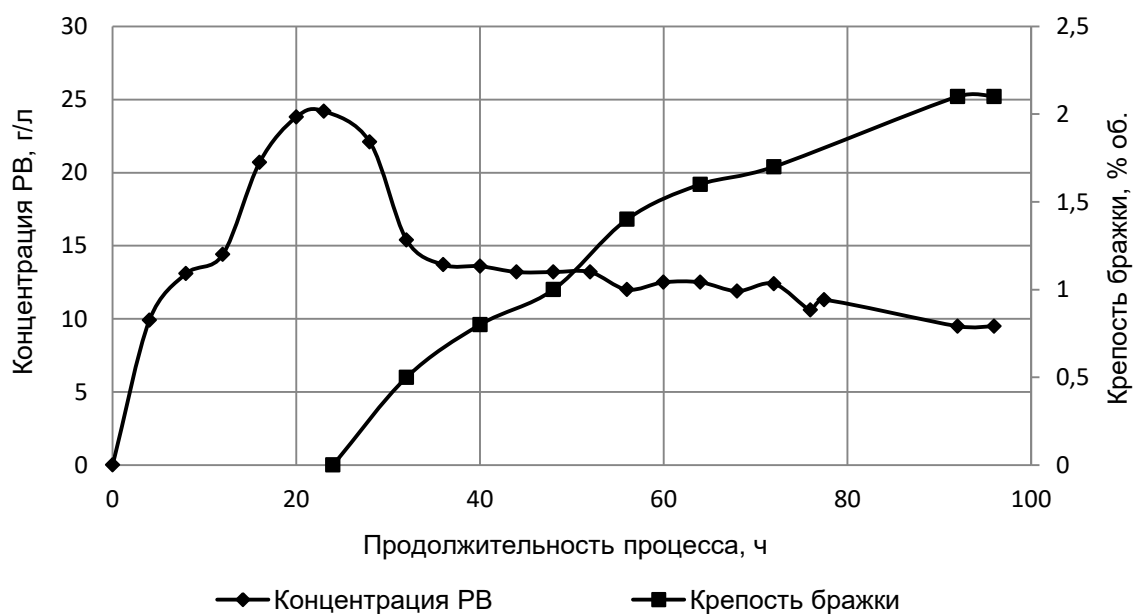


Рисунок 2 – Зависимость концентрации РВ и крепости бражки от продолжительности ферментативного гидролиза и спиртового брожения

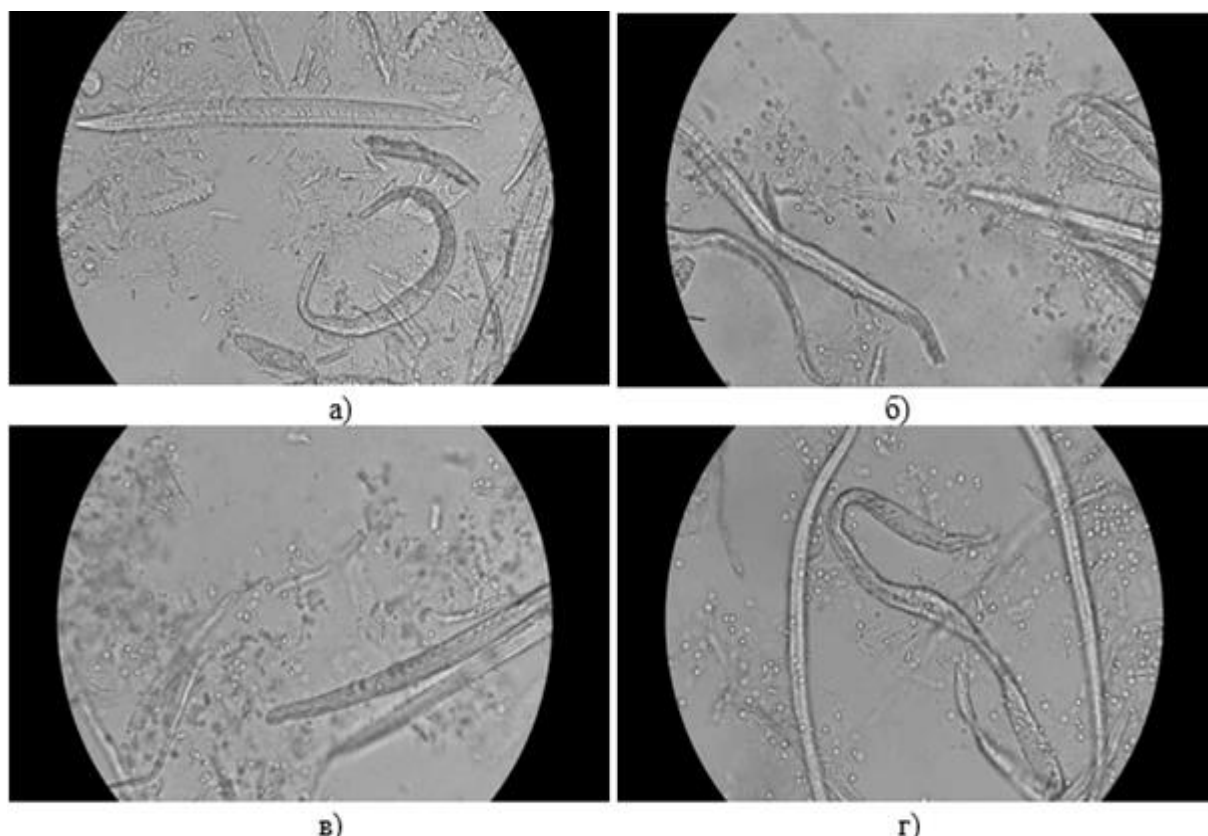


Рисунок 3 – Микрофотографии реакционной массы, $\times 400$
 а) через 24,5 ч от начала гидролиза, б) через 51 ч, в) через 71 ч, г) через 92 ч

На рисунке 3 показаны микрофотографии реакционной массы. Видно, что клетки

дрожжей круглой и овальной формы, мелкие по размеру, образуют скопления и находятся

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА БИОЭТАНОЛА ИЗ ПРОДУКТА ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПОДПИТКИ

в основном близко у частиц субстрата, частично адсорбируясь на нём.

Небольшая численность дрожжей (27,5 – 40 млн КОЕ/мл) и их морфологическое состояние говорит о том, что высокая концентрация субстрата неблагоприятна для метаболизма дрожжей.

ВЫВОДЫ

Таким образом, показано, что в силу реологических свойств высококонцентрированной суспензии ПЩД ПОО при выбранной технологической схеме проведения процесса концентрация субстрата 120 г/л является избыточной. Кроме того, на выход редуцирующих веществ и, следовательно, биоэтанола оказало влияние снижение температуры реакционной массы до температуры, необходимой для спиртового брожения дрожжей.

Несмотря на отрицательные результаты эксперимента, в результате данной работы выявлены недостатки, с учетом которых будут спланированы следующие опыты с применением периодической подпитки в процессах ферментативного гидролиза и спиртового брожения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов, Б.Н. Разработка способа получения пищевых волокон из соломы пшеницы и шелухи овса / Б.Н. Кузнецов, В.Г. Данилов, О.В. Яценкова, Е.Ф. Ибрагимов, Н.М. Иванченко // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2009. – № 2. – С. 156–164.

2. Способ приготовления корма: пат. 2267958 Рос. Федерация: МПК А23К 1/00 / Прищенко Ю.Е., Верещагин А.Л., Барабошкин К.С., Марьин В.А., Ильющин А.П., Федотов Е.А.; заявители и патентообладатели Прищенко Ю.Е., Верещагин А.Л., Барабошкин К.С., Марьин В.А., Ильющин А.П., Федотов Е.А. – № 2004121274/13; заявл. 12.07.2004; опубл. 20.01.2006, Бюл. № 02. – 5 с.

3. Макарова, Е.И. Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья. Часть 1 / Е.И. Макарова, В.В. Будаева // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6,

№ 2. – С. 43–50. doi: 10.21285/2227-2925-2016-6-2-43-50.

4. Макарова, Е.И. Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья. Часть 2 / Е.И. Макарова, В.В. Будаева // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 26–35. doi: 10.21285/2227-2925-2016-6-3-26–35.

5. Du, J. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations / Jian Du, Yuan Cao, Guodong Liu, Jian Zhao,

Xuezhi Li, Yinbo Qu // *Bioresource Technology*. – 2017. – № 229. – P. 88–95.

6. Fan, Z. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor / Z. Fan, C. South, K. Lyford, J. Munsie, P. van Walsum, L.R. Lynd // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2003. – № 26. – P. 93–101.

7. Humbird, D. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover / D. Humbird, A. Mohagheghi, N. Dowe, D.J. Schell // *Biotechnol. Prog.* – 2010. – № 26. – P. 1245–1251.

8. Скиба, Е.А. Преимущества совмещения биокаталитических стадий в синтезе биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья / Е.А. Скиба, Г.Ф. Миронова // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 53–60. doi: 10.21285/2227-2925-2016-6-4-53-60.

9. Макарова, Е.И. Оценка эффективности ферментативного гидролиза плодовых оболочек овса с подпиткой при высоких начальных концентрациях субстрата / Е.И. Макарова, В.В. Будаева // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 24–30.

10. Байбакова, О.В. Щелочная делигнификация недревесного целлюлозосодержащего сырья в условиях опытного производства / О.В. Байбакова, Е.А. Скиба, В.В. Будаева, В.Н. Золотухин // *Ползуновский вестник*. – 2016. – № 4, Т. 1. – С. 147–151.

11. Pavlov, I.N. A setup for studying the biocatalytic conversion of products from the processing of Nonwood Raw Materials / I.N. Pavlov // *Catalysis Industry*. – 2014. – № 6(4). – P. 350–360. doi: 10.1134/S207005041404014X.

12. Skiba, E.A. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials in aqueous media and the subsequent microbiological synthesis of bioethanol / E.A. Skiba, V.V. Budaeva, O.V. Baibakova, G.V. Sakovich, E.V. Udoratina, E.G. Shakhmatov, T.P. Shcherbakova, A.V. Kuchin // *Catalysis in Industry*. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 168–175. doi: 10.1134/S2070050416020100.

13. Скиба, Е.А. Изучение устойчивости штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 к ферментативным гидролизным средам / Е.А. Скиба, О.В. Байбакова // *Ползуновский вестник*. – 2013. – № 3. – С. 214–219.

Миронова Галина Федоровна, инженер лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: yur_galina@mail.ru, тел. (3854) 30-59-85.

Павлов Игорь Николаевич, кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук

(ИПХЭТ СО РАН), e-mail: pawlow-in@mail.ru, тел. (3854) 30-59-85.

Кащеева Екатерина Ивановна, кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение

науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: massl@mail.ru, тел. (3854) 30-59-85