

Е. А. Скиба, В. В. Будаева, Е. И. Макарова,
И. Н. Павлов, В. Н. Золотухин, Г. В. Сакович

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

Ключевые слова: плодовые оболочки овса, техническая целлюлоза, ацетатный буфер, ферментативный гидролиз в водной среде, масштабирование.

В лабораторных условиях исследован ферментативный гидролиз в ацетатном буфере технических целлюлоз, полученных азотнокислым и комбинированным способами из плодовых оболочек овса. Процесс масштабирован по объёму и проведён в ферментаторе объёмом 11 л в водной среде. Определена зависимость эффективности ферментативного гидролиза от способа получения технической целлюлозы плодовых оболочек овса.

Keywords: oat husks, pulp, acetate buffer, enzymatic digestion in aqueous medium, scaling

The enzymatic digestion of pulps derived from oat husks by the nitric acid and combined methods was carried out in acetate buffer under laboratory conditions. The process was scaled up by volume and run in an 11-L fermentor in an aqueous medium. The dependence of the enzymatic hydrolysis efficiency on the oat husk pulping method was determined.

Введение

Целлюлозосодержащее сырьё (ЦСС) привлекает все большее внимание исследователей. Это связано и с бесконечностью ресурсного объёма, и доступностью во всех регионах мира, и с универсальностью использования этого вида сырья для превращения в различные продукты микробиологической трансформации, в том числе в биотоплива [1, 2]. Использование ЦСС недревесного происхождения, включающего в себя как биомассу быстрорастущих, климатически адаптированных культур, так и отходы сельскохозяйственной переработки [2] исключает необходимость разработки технологий получения биотоплив из пищевого (сахаросодержащего и крахмалосодержащего) сырья.

Одним из способов превращения ЦСС в редуцирующие вещества является ферментативный гидролиз, проводимый в мягких условиях, что исключает образование токсичных полупродуктов, а также гарантирует высокий выход сбраживаемых сахаров [3]. Но биокаталитическая трансформация ЦСС является труднореализуемым процессом в связи со сложностью организации матрицы сырья и прочностью, обусловленной химической связью между основными компонентами матрицы: целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина.

В настоящее время нет универсальной технологии превращения ЦСС в редуцирующие вещества, поскольку продолжают подбор экономически целесообразных видов сырья, поиск способов его предварительной подготовки (разрушения матрицы) [2, 4], разработка эффективных ферментативных комплексов [5-7], создание аппаратно-технологических схем проведения процесса [4, 8, 9].

При гидролизе целлюлоза и гемицеллюлоза превращаются в мономеры с образованием смеси гексозно-пентозных редуцирующих веществ (РВ), лигнин при этом не участвует в процессе и является балластом. Поэтому фундаментальные исследования биохимической трансформации целлюлозы важны для понимания закономерностей биокаталитических превращений этого полисахарида в зависимости от его структурных особенностей, обусловленных способом подготовки субстрата. С целью исследований процессов

ферментативного гидролиза целлюлозы нетрадиционного вида ЦСС в качестве субстратов в данной работе использовали технические целлюлозы (ТЦ) плодовых оболочек овса (ПОО).

ПОО (шелуха, лузга) 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 подчеркнуть, что ранее ПОО рассматривались как гемицеллюлозное сырьё и источник получения фурфурола и ксилита [9]. 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 имеется задел по разработке оптимальных схем физико-химических основ технологии получения целлюлозы и лигнина из недревесного ЦСС, исследованию характеристик целевых биополимеров, апробации разработанных способов на опытно-промышленной установке с одновременным получением представительных образцов [10, 11].

Экспериментальная часть

Субстратом являлись ТЦ, полученные азотнокислым (АС) и комбинированным способом (КС) на опытном производстве в ИПХЭТ СО РАН. Оба способа выбраны в силу доступности, простоты исполнения, дешевизны используемых реактивов, возможности реализации на стандартном емкостном оборудовании при атмосферном давлении. Азотнокислый способ заключается в обработке измельченного сырья разбавленной азотной кислотой и затем разбавленным раствором гидроксида натрия [10]. При комбинированном способе сырьё обрабатывается теми же реактивами в обратном порядке [12]. После отжима и промывки до нейтральной реакции промывных вод полученные ТЦ во влажном состоянии направлялись на ферментативный гидролиз.

Степень кристалличности (СК) целлюлозы в субстратах определены Люхановой И.В. и Алеши-

ной Л.А. (Петрозаводский государственный университет) рентгенографическим методом на дифрактометре ДРОН-3М (НПО Буревестник, Россия) [13]. Удельная площадь поверхности (УПП) субстратов определены методом термопрограммируемой десорбции газов (азота) на установке «Термосорб ТРД 400» (Институт физики полупроводников СО РАН, Россия).

В качестве биокатализаторов были использованы препараты «Брюзайм ВГХ» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diadic International Inc.», США) и «ЦеллоЛюкс-А» (производитель ООО ПО «Сиббиофарм», Россия, г. Бердск), вносимые каждый в количестве 0,04 г фермента/г субстрата. Ферментативная активность препарата грибного происхождения «ЦеллоЛюкс-А», стандартизованного по целлюлазе, составляет целлюлазная – (2000±200) ед./г, ксиланазная – 8000 КС, β-глюканазная – 1500 β-ГлС; препарата «Брюзайм ВГХ» (продуцент *Trichoderma longibrachiatum*), стандартизованного по гемицеллюлазе: ксиланазная – 6500 + 5 % ед. КС/см³, β-глюканазная – 1700 + 5 % ед β-ГкС/см³, целлюлазная – 1500 ед. + 5 % ед. КМЦ/см³ (паспортные данные).

Гидролиз проводили при температуре (50±2) °С в течение 72 ч. Через каждые 8 ч отбирали пробу суспензии для определения концентрации РВ в пересчёте на глюкозу спектрофотометрическим методом на «UNICO UV-2804» (США) с использованием динитросалицилового реактива. Относительная погрешность данного метода составляет 3,45 %. Выход РВ (отношение массы РВ к массе субстрата) рассчитан с учетом коэффициента, обусловленного присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате гидролиза.

Концентрацию пентоз в пересчёте на ксилозу в конечных гидролизатах определяли по модифицированной методике [14] спектрофотометрическим методом с использованием реактива орсина (Acros organics, Бельгия).

Исследования проводились в два этапа. На первом этапе ферментативный гидролиз проводился в колбах Эрленмейера емкостью 0,5 л в ацетатном буфере (рН 4,7), при постоянном перемешивании на платформе «ПЭ-6410 М» (Россия) с частотой колебания 150 мин⁻¹, концентрация субстрата составила 33,3 г/л³. На втором этапе гидролиз проводили в ферментаторе авторской конструкции Павлова И.Н. объёмом 11 л, в водной среде с концентрацией субстрата 55,6 г/л. Ферментатор представляет собой вертикальную ёмкость цилиндрической формы, снабжённую мешалкой с регулируемой частотой оборотов, трубчатым змеевиковым нагревателем с контролируемой подачей теплоагента и датчиком температуры для поддержания заданного температурного режима. Частота оборотов мешалки варьировалась в зависимости от вязкости суспензии и составляла от 800 до 400 об/мин.

Результаты и их обсуждение

Характеристики субстратов, используемых для гидролиза, приведены в таблице 1. Комбинированный способ позволяет получать ТЦ с более низкими концентрациями негидролизующих примесей (зола и лиг-

нина) по сравнению с азотнокислым способом: 0,50 % и 0,10 % против 0,80 % и 5,70 % соответственно. Низкая концентрация пентозанов 3,00 % в ТЦ, полученной азотнокислой варкой, объясняется окислительным действием раствора азотной кислоты. Массовая доля (м.д.) α-целлюлозы для обоих субстратов (АС – 90,50 % и КС – 88,10 %), а также степени полимеризации целлюлоз (АС – 1130 и КС – 1140) приблизительно одинаковы.

Есть мнение, что характеристики СК и УПП субстратов являются важными факторами, определяющими реакцию способность субстратов к ферментации [3]. Оказалось, что значения СК и УПП обеих целлюлоз одинаковы, что предполагало одинаковое поведение субстратов при гидролизе.

Таблица 1 – Характеристики субстратов, используемых для ферментативного гидролиза

Характеристика субстрата	Способ получения субстрата	
	АС	КС
М.д. α-целлюлозы, % на а.с.с.	90,50±0,05	88,10±0,05
М.д. остаточного лигнина, % на а.с.с.	0,80±0,05	0,50±0,05
М.д. пентозанов, % на а.с.с.	3,00±0,02	11,30±0,02
М.д. зола, % на а.с.с.	5,70±0,01	0,10±0,01
Степень полимеризации	1130±10	1140±10
Степень кристалличности, %	70±5	68±5
Удельная площадь поверхности, м ² /г	2,5±0,1	2,5±0,1
М.д. – массовая доля, АС – азотнокислый способ, КС – комбинированный способ		

Результаты исследования ферментативного гидролиза субстратов ТЦ АС и ТЦ КС в ацетатном буфере представлены на рисунке 1 и в таблице 2.

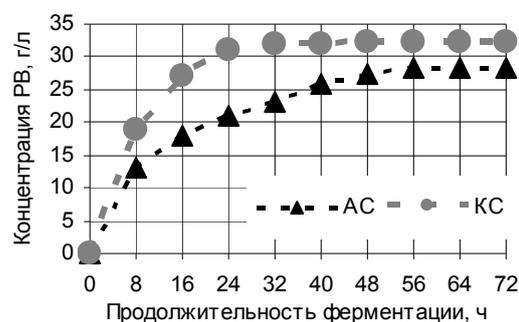


Рис. 1 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации ТЦ АС и ТЦ КС в ацетатном буфере

Полученные результаты показали, что наибольшей реакционной способностью обладает целлюлоза, полученная комбинированным способом ТЦ КС: гидролиз проходил с большей скоростью (выход на плато наблюдался через 24 ч в сравнении

с 56 ч в ферментации субстрата ТЦ АС) и сопровождался большим накоплением РВ в гидролизате (32,4 в сравнении с 28,4 г/л), что соответствует выходам 87,6 % и 76,8 %.

Это явление можно объяснить более высокой гидролизуемостью гемицеллюлоз, присутствующих в качестве примесей в ТЦ КС, а также большей доступностью данной целлюлозы каталитическому воздействию ферментов.

Таблица 2 – Результаты исследования ферментативного гидролиза в ацетатном буфере (33,3 г/л) в колбах и в водной среде (55,6 г/л) в ферментаторе

Характеристика субстрата	Способ получения субстрата	
	АС	КС
в ацетатном буфере		
Концентрация субстрата, г/л	33,3±0,1	33,3±0,1
Конечная концентрация РВ, г/л	28,4±0,5	32,4±0,5
Выход РВ (к массе субстрата), %	76,8±0,1	87,6±0,1
в водной среде		
Концентрация субстрата, г/л	55,6±0,1	55,6±0,1
Конечная концентрация РВ в гидролизате, г/л,		
в т.ч. пентоз	41,7±0,5 1,6±0,2	48,6±0,5 3,1±0,2
Выход РВ (к массе субстрата), %	68,1±0,2	79,4±0,2
РВ – редуцирующие вещества, АС – азотнокислый способ, КС – комбинированный способ		

Следует отметить, что, несмотря на высокие значения СК и УПП субстратов, выход РВ через 72 ч ферментации обоих целлюлоз близок к количественному 77-87 %.

С целью получения биологически доброкачественного гидролизата [15] отказ от ацетатного буфера (источника ингибитора брожения – уксусной кислоты) и переход к ферментации в водной среде представляется важным этапом. Для достижения активной кислотности в среде 4,7 ед. рН и её поддержания на этом уровне была выбрана ортофосфорная кислота. В отличие от уксусной кислоты соли фосфорной кислоты участвуют в метаболизме дрожжей, интенсифицируя их генеративную и зимазную активность [15, 16].

Для увеличения концентрации РВ в гидролизате исходная концентрация субстрата была изменена от 33,3 г/л до 55,6 г/л. Данная концентрация или данный гидромодуль (1:18) был выбран исходя из реологических свойств суспензии ТЦ и конструктивных особенностей ферментатора. Следует отметить, что применение большего гидромодуля сокращает время диспергирования ТЦ, но приводит к более низкой концентрации РВ в конечном гидролизате. Возможность применения меньшего гидромодуля ограничена высокой вязкостью суспензии.

Зависимость концентрации РВ от продолжительности гидролиза субстратов ТЦ АС и ТЦ КС в водной среде приведена на рисунке 2.

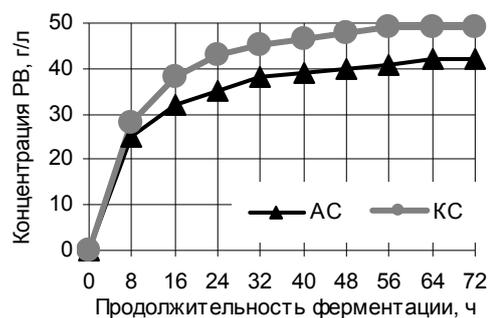


Рис. 2 – Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментации ТЦ АС и ТЦ КС в водной среде

Аналогично результатам ферментации в ацетатном буфере (рис. 1) скорость и глубина ферментации в водной среде выше для ТЦ КС: разрыв в концентрациях РВ в гидролизатах субстратов через 8 ч составляет 5 г/л, затем увеличивается до 7 г/л через 16 ч, и сохраняет это значение до окончания процесса. Конечные концентрация и выход РВ в гидролизатах через 72 ч приведены в таблице 2. Выход РВ субстрата ТЦ КС на 11 % выше соответствующего значения для субстрата ТЦ АС: 79,4 % против 68,1 %. Это еще раз подтверждает, что комбинированный способ позволяет получать целлюлозу, более доступную ферментам для каталитического воздействия.

Сравнение результатов ферментативного гидролиза в ацетатном буфере в колбах при концентрации субстрата 33,3 г/л и в водной среде в ферментаторе при концентрации субстрата 55,6 г/л (таблица 2) позволяет сделать вывод об успешном масштабировании процесса. При гидролизе с более высокой концентрацией субстрата (55,6 %) в водной среде выход РВ снижается по сравнению с гидролизом в ацетатном буфере: для ТЦ КС – на 8,2 % (79,4 % и 87,6 % соответственно), для ТЦ АС – на 8,7 % (68,1 % и 76,8 %). Снижение степени конверсии с повышением концентрации субстрата описано в литературе для ферментации в реакторах периодического действия [3]. Достигая цель – получение высококонцентрированного доброкачественного гидролизата, эти потери можно считать обоснованными. При отводе РВ из системы с помощью мембранных методов [1, 3] снижения выхода РВ при повышении концентрации субстрата можно избежать.

По результатам проделанных работ можно сделать следующие выводы.

В лабораторных условиях (в колбах Эрленмейера в ацетатном буфере) исследован ферментативный гидролиз ТЦ, полученных азотнокислым и комбинированным способами из ПОО. Установлено, что ТЦ, полученная комбинированным способом, обеспечивает более высокий выход РВ от массы субстрата, чем целлюлоза, полученная азотнокислым способом.

Сравнением результатов процессов, проведенных в объемах 0,150 и 11 л (в водной среде), продемонстрирован первичный этап масштабирования по объему ферментации технической целлюлозы, который будет продолжен с применением ферментатора объемом 60 л (коэффициент масштабирования составит 400).

Исследованием в водной среде ферментативного гидролиза ТЦ ПОО, полученных разными способами подтверждена зависимость выхода РВ от способа получения ТЦ с преимуществом комбинированного способа.

Следует подчеркнуть, что биокатализ ТЦ позволил получить преимущественно гексозные гидролизаты (концентрация пентоз 1,6-3,1 г/л или 3,8-6,4 % к РВ). Такие гидролизаты могут быть потенциальным сырьем для получения не только биотоплив (биоэтанола и биобутанола), но и широкой группы других ценных соединений: как продуктов микробиологического синтеза (органических кислот, аминокислот, бактериальной целлюлозы и др.), так и непосредственно биомассы (дрожжевой или микробиальной, используемой как кормовой белок или как источник для выделения ценных минорных компонентов) [17, 18].

Литература

1. С.Д. Варфаломеев, *Катализ в промышленности*, **5**, 8-11 (2012).
2. Р.М. Нуртдинов, Р.Т. Валеева, С.Г. Мухачёв, М.В. Харина, *Вестник Казан. технол. ун-та*, **9**, 264-267 (2011).
3. А.П. Сеницын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов *Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов*. Изд-во Московского университета, Москва, 1995. 224 с.
4. Xue-Dan Hou, *Biotechnology and Bioengineering*. 2012. DOI: 10.1002/bit.24522; <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.24522/abstract>.
5. М.Е. Зиновьева, В.С. Гамаюрова, М.А. Бурмасова, *Вестник Казан. технол. ун-та*, **6**, 130-134 (2009).
6. В.М. Харина, Р.Т. Валеева, С.Е. Орлова, *Вестник Казан. технол. ун-та*, **15**, 18, 220-222 (2012).
7. Е.И. Макарова, В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов, *Ползуновский вестник*, 4-1, 192-198 (2010).
8. Zhiying Yu, *Biotechnology and Bioengineering*, **109**, 5, 1131-1139 (2012).
9. *Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ*. НПО «Профессионал», СПб., 2006. 1142 с.
10. Пат. РФ № 2448118 (2012).
11. Пат. РФ № 2456394 (2012).
12. В.Н. Золотухин, В.В. Будаева *Материалы V Всерос. конф. Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья*, (Барнаул, апрель 2012). Изд-во Алт. ун-та, 2012. С. 75-77.
13. Л.А. Алешина, И.В. Люханова, В.В. Будаева, В.Н. Золотухин, Р.Ю. Митрофанов, Г.В. Сакович *Ученые записки Петрозаводского государственного университета*, **8** (121), 114-117 (2011).
14. ГОСТ 10820-75 Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. М.: Изд-во стандартов, 1991. 8 с.
15. В.И. Шарков, С.А. Сапотницкий, О.А. Дмитриева *Технология гидролизных производств*. Лесная промышленность, Москва, 1973. 408 с.
16. В.А. Маринченко, Б.Д. Метюшев, В.Н. Швец *Технология спирта из мелассы: учебное пособие для студентов высших учебных заведений*. Издательское объединение «Вища школа», Киев, 1975. 284 с.
17. А.Г. Лобанок, В.Г. Бабицкая, Ж.Н. Богдановская *Микробный синтез на основе целлюлозы. Белок и другие ценные продукты*. Наука и техника, Минск, 1988. 216 с.
18. A.J. Ragauskas, C.K. Williams, V.H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C.A. Eckert, *Science*, **311**, 484-489 (2006).

© **Е. А. Скиба** – канд. техн. наук, с.н.с. лаб. биоконверсии ИПХЭТ СО РАН, eas08988@mail.ru; **В. В. Будаева** – канд. хим. наук, зав. лаб. биоконверсии ИПХЭТ СО РАН; **Е. И. Макарова** – асп. той же лаборатории; **И. Н. Павлов** – канд. техн. наук, н.с. той же лаборатории; **В. Н. Золотухин** – канд. хим. наук, с.н.с. той же лаборатории; **Г. В. Сакович** – академик РАН, научный руководитель ИПХЭТ СО РАН.