

Введение Комплексная переработка лигноцеллюлозной биомассы химическими и/или биотехнологическими методами в спектр конкурентно-способных продуктов и энергию (biorefinery) [1] является современным и фундаментальным направлением промышленной биотехнологии, использующей ежегодно возобновляемое растительное сырье для выработки индивидуальных веществ: моносахаридов, спиртов, кислот и мономеров биоразлагаемых полимеров для химической промышленности, энергетики и медицины. Приоритетным направлением данной области знаний является разработка способов получения биоэтанола второго поколения [2, 3]. Данная работа является продолжением опубликованной ранее статьи «Ферментативный гидролиз целлюлоз плодовых оболочек овса», в которой были отражены способы получения технических целлюлоз (ТЦ) на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН, методология получения ферментативных гидролизатов, первичное масштабирование этого процесса в ферментаторе объёмом 11 л в водной среде. Поскольку гидролизат предназначен для последующей биоконверсии редуцирующих веществ (РВ) в этанол, ацетатный буфер, являющийся ингибитором спиртового брожения [4], был заменен на фосфатный. Целью работы являлось получение биоэтанола, а также обоснование биологической доброкачественности ферментативных гидролизатов из ТЦ плодовых оболочек овса, обуславливающей хороший выход и высокие качественные показатели биоэтанола. Экспериментальная часть В работе использованы ферментативные гидролизаты из технических целлюлоз плодовых оболочек овса, полученных азотнокислым и комбинированным способами. Гидролизаты после фильтрации и пастеризации без выдержки при 100 °С охлаждались и направлялись на сбраживание с помощью дрожжей ВКПМ *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 (ФГУП «ГосНИИГенетика», г. Москва). Штамм был выделен из ферментера Котласского ЦБК Архангельской области и использовался для производства этанола на гидролизатах древесины. Особенностью штамма является его устойчивость к вредным примесям гидролизатов. Брожение осуществлялось в анаэробных условиях при температуре 28 °С, активной кислотности 4,5 ед. рН, в течение 3 сут. В среды дополнительно был внесён сухой дрожжевой экстракт для азотного питания дрожжей. Объёмную долю спирта в бражках определяли ареометром в дистилляте, полученном перегонкой спирта из бражки согласно ГОСТ Р 51135-2003 [5]. Этанол из бражки сконцентрирован методом простой перегонки и дополнительной очистке не подвергался. Теоретическая концентрация этанола рассчитана по стехиометрическому уравнению брожения, а выход этанола – как отношение экспериментальной концентрации этанола к теоретической. Экономический коэффициент брожения $Y_{P/S}$ (РВ) представляет собой отношение концентрации продукта (этанола) к концентрации РВ; экономический коэффициент превращения субстрата в этанол $Y_{P/S}$ (ТЦ) – отношение концентрации продукта (этанола) к концентрации субстрата ферментативного

гидролиза (ТЦ). Анализ этанола выполнен методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) по ГОСТ Р 51786-2001 [6] на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором «Кристалл 2000М», фирмы «СКБ Хроматэк», г. Йошкар-Ола, Россия; условия эксперимента: колонка газохроматографическая капиллярная ZB-FFAP (США) 50 м×0,32 мм×0,52 мкм, температура детектора 220 оС, температура испарителя 190 оС, выдержка пробы при температуре 77 оС длительностью 6 мин 30 с, затем нагрев со скоростью 10 оС/мин, до температуры 210 оС, выдержка 15 мин, коэффициент деления потока 40:1, газ-носитель азот сжатый, давление газа-носителя (азота) 77 кПа, соотношение воздух: водород равно 250:25; построение калибровочного графика по градуировочным смесям – государственным стандартным образцам; расход газа (сброс) – 30 мл/мин, расход газа (поддув в ПИД) 30 мл/мин, расход газа (водород в ПИД) 20 мл/мин, расход газа (воздух ПИД) 200 мл/мин, объем пробы 1 мкл. Результаты и их обсуждение

В гидролизной промышленности важным критерием качества гидролизата является его доброкачественность. Под биологической доброкачественностью понимают показатель, отражающий степень влияния вредных примесей среды на процесс биосинтеза этанола. Доброкачественной считают среду, на которой функция размножения дрожжевых клеток не подавляется, а субстрат расходуется на биосинтез целевого продукта. Доброкачественность сред определяют биологическим методом, например, по выходу биомассы или продукта метаболизма либо по физиологической активности дрожжей [4, 7]. В опытных бражках дрожжи находились в хорошем морфофизиологическом состоянии на всех стадиях брожения, от момента внесения инокулята в среду до окончания процесса. По общему количеству клеток в бродящем сусле (от 80 млн. КОЕ/мл до 124 млн. КОЕ/мл) и долям почкующихся (от 10 % до 20 %) и мёртвых клеток (от 0 % до 4 %) они соответствовали требованиям, предъявляемым к дрожжам в спиртовой отрасли [8], при использовании пищевого сырья. По количеству клеток, содержащих гликоген, опытные образцы не превышали 55 %, что объясняется недостатком азотного (в том числе азота аминокислот) питания. Корректировка питательной среды по азоту позволит повысить этот показатель до нормы (не менее 70 %). Размеры клеток дрожжей варьировали от 10,0×7,5 мкм до 5,0×5,0 мкм, что соответствует их размерам при культивировании на паспортной эталонной среде неохмелённого солодового сусла. Хорошее морфофизиологическое состояние дрожжей косвенно указывает на отсутствие в средах вредных примесей (фурфурола, оксиметилфурфурола, летучих кислот, формальдегида, лигногуминовых и других веществ, характерных для химических гидролизатов). Таким образом, опытные гидролизаты являются биологически доброкачественными и не нуждаются в дополнительной технологической обработке для освобождения их от вредных примесей, что выгодно отличает ферментативные гидролизаты от химических. Поскольку

опытные гидролизаты являются полноценной питательной средой для развития микроорганизмов, то они могут быть конверсированы не только в этанол, но и в другие продукты микробиологической трансформации, такие как бактериальная целлюлоза, биомасса дрожжей, молочная кислота и др. [9]. С учётом вышеизложенного исследование процесса спиртового брожения ферментативных гидролизатов технических целлюлоз представляется научно и практически значимым [10], тем более известно, что не все гидролизаты соответствуют таким высоким требованиям [11].

Результаты получения биоэтанола на средах гидролизатов технических целлюлоз плодовых оболочек овса, полученных азотнокислым (АС) и комбинированным (КС) способами, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Получение биоэтанола на средах гидролизатов технических целлюлоз плодовых оболочек овса, полученных азотнокислым и комбинированным способами

Характеристика	Способ получения ТЦ АС	КС
Концентрация субстрата на стадии ферментативного гидролиза, г/л	55,6±0,5	55,6±0,5
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	
Крепость бражки, об. %	2,4±0,1	2,4±0,1
Остаточная концентрация РВ в бражке, г/л	10,0±0,2	14,8±0,2
Теоретическая концентрация этанола, об. %	2,70	3,15
Выход этанола, % от теоретического	88,9	76,2
Экономический коэффициент брожения, YP/S (РВ), об.%/масс.%	0,576	0,494
Экономический коэффициент превращения субстрата в этанол, YP/S (ТЦ), об.%/масс.%	0,432	0,432

Крепости опытных бражек составили по 2,4 об. %, что превышает крепости бражек в гидролизном производстве (1,0-1,5 %) [4, 7]. Это объясняется более высокой концентрацией РВ в ферментативных гидролизатах, по сравнению с химическими гидролизатами. Полученные выходы спирта – 88,9 % для азотнокислого и 76,2 % для комбинированного способа получения ТЦ – соответствуют выходу этанола на гидролизных заводах и превышают его: практический выход спирта на гидролизных заводах составляет 55-79 % от теоретического [4].

При спиртовом брожении гидролизата ТЦ, полученной комбинированным способом, остаточная концентрация РВ в бражке в 1,5 раза выше, чем в бражке из гидролизата ТЦ, полученной азотнокислым способом. Это объясняется большей массовой долей пентозанов в целлюлозе, полученной комбинированным способом, при гидролизе которых образуются пентозы, не сбраживаемые сахаромикетами.

Несмотря на то, что гидролизаты и бражки из них были получены в одинаковых условиях, экономические коэффициенты брожения для них различаются, а именно: 0,576 – для азотнокислого способа и 0,494 – для комбинированного. Несомненно, оптимизация стадии брожения позволит ещё увеличить выход этанола. Однако экономические коэффициенты превращения исходных субстратов (ТЦ) в биоэтанол тождественны для азотнокислого и комбинированного способов получения технических целлюлоз и составляют 0,432 об.%/масс.%. Полученные образцы этанола, сконцентрированные методом простой перегонки, дополнительной очистке не

подвергались. Хроматограммы биоэтанола приведены на рисунке 1. а б Рис. 1 – Хроматограммы образцов биоэтанола, конверсированных спиртовым брожением ферментативных гидролизатов ТЦ, полученных: а) азотнокислым, б) комбинированным способом В опытных образцах последовательность выхода обнаруженных веществ соответствует действующей нормативной документации [6]: этиловый эфир, уксусный альдегид, ацетон, метилацетат, этилацетат, метанол, 2-пропанол, этанол, 2-бутанол, 1-пропанол, кротоноальдегид, изобутиловый спирт, 1-бутанол, изоамиловый спирт, 1-пентанол, 1-гексанол. Присутствие в следовых количествах ацетона, 2-бутанола и кротоноальдегида идентифицируют этанол как непищевой [6]. Близость качественных составов опытных образцов обусловлена единым сырьевым источником – плодовыми оболочками овса. Результаты анализа опытных образцов этанола, выполненного методом ГЖХ, представлены в таблице 2 в сравнении с нормативами на этиловый спирт-сырец из пищевого сырья [12] и спирт этиловый технический [13]. Довольно высокая концентрация альдегидов в опытных образцах от 200 до 3600 мг/дм³ связана с природой сырья, поскольку исключено накопление фурфурола и оксиметилфурфурола в процессе ферментативного гидролиза, так как процесс проводился при температуре 47 °С и рН 4,7. Таблица 2 –

Содержание примесей в этиловом спирте из пищевого и непищевого сырья и опытных образцах

Показатель	Этиловый спирт-сырец из пищевого сырья [12]	Спирт этиловый технический [13]	Опытные образцы спирт-сырец из всех видов сырья (за исключением мелассы) или их смеси спирт-сырец из мелассы марки А	ОКП 91 8213 1100 марки Б ОКП 91 8213 1200 этанол из ТЦ АС этанол из ТЦ КС
Массовая концентрация альдегидов, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	300	500	200	350 200-1000 1200-3600
Массовая концентрация сивушного масла, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	5000	5000	500	1000 1600-2600 1600-4300
Массовая концентрация эфиров, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³	500	700	80	180 100-1100 100-750
Содержание метанола в пересчёте на безводный спирт, об. %	0,13 – 0,1	0,1	0,002-0,07	0,002-0,06

Массовая концентрация сивушного масла в опытных образцах значительно ниже, чем в спирте-сырце из пищевого сырья (1600-2600 мг/дм³ против 5000 мг/дм³), что можно объяснить отсутствием белков и пептидов в опытных гидролизатах ТЦ. Отметим, что более высокая концентрация сивушных масел (2600 мг/дм³ и более) получена при биосинтезе этанола в присутствии дрожжевого экстракта, являющегося источником витаминов группы В, факторов роста и аминного азота для дрожжей. Наличие дрожжевого экстракта интенсифицирует спиртовое брожение, тем самым создаёт селективные условия для работы дрожжей и препятствует контаминации гидролизата посторонней микрофлорой. Проведение брожения без добавки дрожжевого экстракта несколько снижает выход этанола (можно предположить, что часть РВ расходуется на автосинтез витаминов группы В, являющихся кофакторами в зимазном комплексе дрожжей),

а также снижает примесь сивушного масла (до 1600 мг/дм³). Концентрация эфиров в опытных образцах достаточна низка от 100 до 1100 мг/дм³, что соответствует требованиям спирта-сырца из мелассы, при этом очистка опытных образцов не производилась, косвенно это может указывать на чистоту культуры дрожжей при брожении и благоприятные условия для биосинтеза этанола. Особо важно, что в обоих образцах объёмная доля метанола крайне мала: менее 0,13 об. %, регламентированная для спирта-сырца из всех видов пищевого сырья (за исключением мелассы), и менее 0,1 об. % – для спирта этилового технического. Таким образом, ферментативный гидролиз ТЦ позволяет получить доброкачественный гидролизат с низким содержанием вредных примесей и обуславливает низкое содержание побочных и вторичных продуктов спиртового брожения в бражке. Поскольку представленные образцы спирта не подвергались никакой очистке, приведенные в таблице 2 результаты анализа примесей опытных образцов биоэтанола дают основания предположить, что после ректификации будет получен спирт высокого качества. По результатам проделанных работ можно сделать следующие выводы. Установлено, что полученные в водной среде ферментативные гидролизаты являются биологически доброкачественными. Показано, что достигнутые выходы спирта (88,9 % для азотнокислого и 76,2 % для комбинированного способа получения ТЦ) соответствуют выходу этанола на гидролизных заводах и превышают его, а концентрация этанола в бражке – 2,4 об. % – в два раза превышает его концентрацию на гидролизных заводах. Рассчитано, что экономические коэффициенты превращения ТЦ (исходных субстратов) в биоэтанол тождественны для азотнокислого и комбинированного способов получения технических целлюлоз и составляют 0,432 об.%/масс.%. Выявлено, что содержание побочных и вторичных продуктов брожения в спиртах из ТЦ плодовых оболочек овса незначительно, что обусловлено глубокой подготовкой субстратов и получением гидролизатов ферментативным путём в мягких условиях.