

М. В. Харина, В. М. Емельянов

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

Ключевые слова: свекловичный жом, ферментативный гидролиз, предварительная обработка, сернистая кислота, степень конверсии.

Изучено влияние длительности предварительной обработки, а также концентрации сернистой кислоты на степень конверсии свекловичного жома ферментным комплексом CellicCTec2.

Key words: sugar beet pulp, enzymatic hydrolysis, pretreatment, sulfurous acid, degree of conversion.

The effect of the duration of the pre-treatment and concentration of sulfuric acid on the conversion of sugar beet pulp with enzyme complex CellicCTec2 was investigated.

Введение

Свекловичный жом является побочной продукцией переработки сахарной свеклы и представляет собой микростружку толщиной не более 2 мм влажностью около 90%, из которой диффузионным способом горячей водой (70-80°C) извлечено основное количество сахарозы и некоторая часть минеральных и органических веществ [1].

В свекловичной стружке после извлечения сахарозы остается от 18 до 23% сухих веществ [3]. В свежем свекловичном жоме содержится (% от массы сухих веществ): пектиновых веществ – 24-32, целлюлозы – 22-30, связующих гликанов – 22-30, белков – 1,5-3,0, золы – 3,0-8,2, лигнина – 1,5-3,0, сахарозы – 0,2-0,3 [2].

Свекловичный жом является источником моносахаридов, имеющих большую коммерческую ценность и различные направления применения. Благодаря высокому содержанию углеводов, возможно использование гидролизатов свекловичного жома в производстве биоэтанола, кормовых дрожжей, лизина и других продуктов микробиологического синтеза. Растительная клеточная стенка обладает высокой устойчивостью к деградации. Как известно, условия гидролиза лигноцеллюлозного сырья разбавленными кислотами практически не влияют на химическую устойчивость целлюлозы.

При проведении ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов в их нативном виде выход сахаров достигает менее 20% от теоретически возможного [3]. Это связано с наличием ряда факторов, влияющих на эффективность ферментативного гидролиза, таких как лигнин, связующие гликаны, ацетильные группы, кристалличность и степень полимеризации целлюлозы, размер частиц и пор, доступная площадь поверхности [4-6].

Для повышения степени конверсии полисахаридов нами проведено исследование двухстадийной обработки свекловичного жома, включающей в себя гидролиз связующих гликанов сернистой кислотой и последующая ферментативная деградация целлюлозы.

Экспериментальная часть

В работе использовался жом сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), выработанный на ООО «Буин-

ский сахарный завод» (г. Буинск, февраль 2013 г). Выделение легко- и трудногидролизуемых полисахаридов из свекловичного жома проводилось по стандартным методикам [7].

Предварительная обработка свекловичного жома сернистой кислотой проводилась на лабораторной установке высокотемпературного гидролиза растительного сырья оригинальной конструкции [8, 9] позволяющей проводить процессы химического гидролиза в рабочем диапазоне температур 100-200°C при избыточном давлении 0-1,2 МПа. Свекловичный жом обрабатывался 1% сернистой кислотой при температуре 190°C и варьировании времени обработки свекловичного жома от 5 до 50 минут. Содержание редуцирующих веществ определяли методом Макэна-Шоорля [10]. После гидролиза жом промывался дистиллированной для удаления кислоты, которая в дальнейшем может снижать эффективность ферментативного гидролиза непрогидролизированных остатков жома.

В качестве биокатализатора при ферментативном гидролизе в работе использовался ферментный препарат CellicCTec2 компании Novozymes (активностью 115,6 FPU/мл). Основные компоненты ферментного комплекса: целлюлаза CAS 9012-54-8, ксиланаза CAS 37278-89-0. Плотность препарата 1,15 г/мл. Оптимальные условия применения: температура 45-50 °C, pH 5,0-5,5.

Количество ферментного комплекса, вносимого при ферментализации варьировалось от 0,01 до 0,25 г/г АСВ субстрата.

Исследования проводили в колбах Эрленмейера в натрий-цитратном буфере (pH 5,0) при варьировании гидромодуля 1:(10-30) при температуре 50±2°C в течение 120 ч. при постоянном перемешивании на качалке с частотой вращения 150 об/мин. С целью предотвращения роста микроорганизмов в процессе ферментативного гидролиза в каждую колбу добавляли по 40 мкл 1% раствора тетрациклина в 70% этаноле.

Каждые 4-12 ч. отбирали пробу суспензии для определения содержания глюкозы, которое рассчитывали с учетом присоединения воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев при ферментативном гидролизе субстрата. Содержание глюкозы в ферментализатах определяли глюкозооксидазным методом.

Эксперименты проводили в 3 кратной аналитической повторности. Погрешность реализации экспериментов при определении содержания глюкозы и редуцирующих веществ не превышала $\pm 0,25\%$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе выбора оптимальных условий предварительной обработки с целью оценки влияния длительности предварительной обработки свекловичного жома сернистой кислотой проведен ферментативный гидролиз свекловичного жома, обработанного 1% сернистой кислотой в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 минут при 190°C. Также, в качестве контрольного эксперимента проводился ферментативный гидролиз свежего свекловичного жома, не подвергавшегося какой-либо обработке. Ферментативный гидролиз проводился при соотношении массы абсолютно сухого вещества 1:20 и загрузке фермента 0,1 г/г АСВ субстрата.

Динамика конверсии свекловичного жома, предварительно обработанного 1% сернистой кислотой в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 минут при 190°C представлена на рисунке 1.

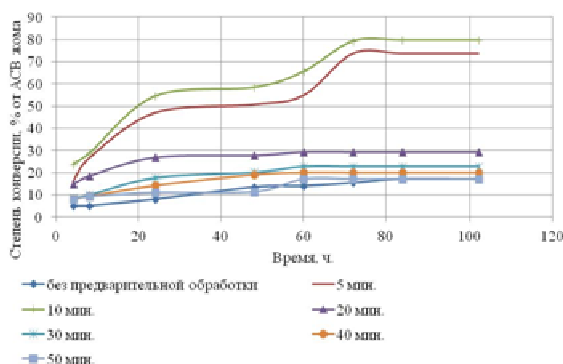


Рис. 1 – Динамика конверсии свекловичного жома, предварительно обработанного 1% сернистой кислотой в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 минут при 190°C

Как показано на рис. 1, предварительная обработка свекловичного жома 1% сернистой кислотой оказывает значительное влияние на степень его конверсии ферментным препаратом. Наибольшая степень ферментативной конверсии наблюдается при предварительной обработке свекловичного жома 1% сернистой кислотой в течение 10 мин. С увеличением продолжительности обработки свекловичного жома 1% сернистой кислотой с 10 до 50 мин. наблюдается снижение степени его конверсии. Это может быть связано с тем, что при более длительном пребывании в аппарате происходит обугливание свекловичного жома при контакте со стенками капсул, нагретых до 190°C. Таким образом, обработка жома более 10 мин. не желательна. Предварительная обработка свекловичного жома 1% сернистой кислотой значительно увеличивает выход глюкозы по сравнению с жомом, не подвергавшимся обработке, с 17,3% до 79,6% от АСВ жома. Данный факт объясняется тем, что при воздействии сернистой кислоты происходит удаление связующих гли-

канов и пектиновых веществ и увеличение площади доступной поверхности целлюлозы.

С целью определения оптимальной нормы расхода фермента проведен ферментативный гидролиз свекловичного жома обработанного в течение 10 мин. 1% сернистой кислотой при 190°C при варьировании загрузки ферментного комплекса от 0,01 до 0,25 г/г АСВ субстрата при гидромодуле 1:20 (рис. 2).

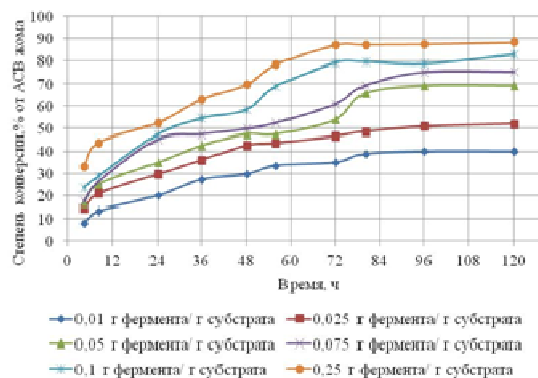


Рис. 2 – Влияние загрузки ферментного комплекса на степень конверсии свекловичного жома, предварительно обработанного 1% сернистой кислотой при 190°C в течение 10 мин.

Как видно из рисунка 2, максимальная степень конверсии достигается к 96 ч. ферментативного гидролиза и достигает 82,76 и 88,3% от АСВ жома при загрузке фермента 0,10 и 0,25 г/г АСВ субстрата соответственно.

Известно, что такие компоненты целлюлолитических ферментных комплексов как целлобиогидролазы и эндоглиюканазы ингибируются продуктами их гидролиза - целлобиозой и глюкозой [11]. Существует предположение, что в процессе ингибирования нормальный комплекс субстрат-фермент преобразуется в неэффективный. Следовательно, при накоплении в гидролизате высокой концентрации глюкозы и целлобиозы, процессы ферментативной конверсии лигноцеллюлозы замедляются.

Увеличение гидромодуля в процессе ферментативного гидролиза может способствовать повышению степени конверсии свекловичного жома. Поэтому, для изучения влияния гидромодуля на степень конверсии при ферментативном гидролизе свекловичного жома проведен ферментализ при варьировании гидромодуля 1:(15-30) (рис. 3).

Исследование влияния гидромодуля на степень конверсии при ферментативном гидролизе свекловичного жома показало, что увеличение гидромодуля от 1:20 до 1:30 обеспечивает повышение степени конверсии на 15,7% от АСВ жома. При этом максимальная степень конверсии достигается при более низкой загрузке фермента (0,05 вместо 0,1 и 0,25 г/г АСВ субстрата) и составляет 84,96% от АСВ жома.

Важным аспектом, который необходимо учитывать при подготовке сырья, подлежащего дальнейшему ферментативному гидролизу, является его хранение после проведения предварительной

обработки. Свекловичный жом, предварительно обработанный при выбранных оптимальных условиях (1% сернистой кислотой в течение 10 мин. при 190°C) был высушен в сушильном шкафу при температуре 50°C до постоянной массы, а затем подвергнут ферментативному гидролизу. Влияние высушивания предварительно обработанного свекловичного жома на эффективность его дальнейшего гидролиза ферментным комплексом ферментным комплексом при гидромоделе 1:20 и варьировании загрузки фермента от 0,01 до 0,1 г фермента/г АСВ субстрата показано на рисунке 4.

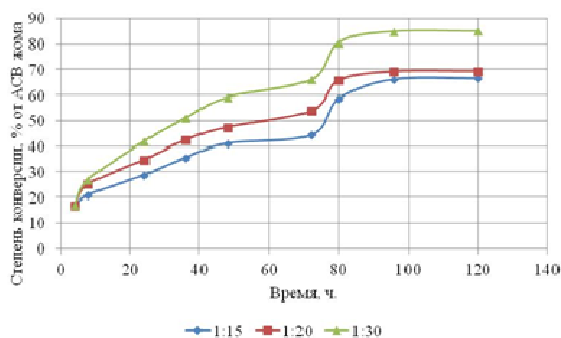


Рис. 3 – Влияние гидромодела на степень конверсии при ферментативном гидролизе свекловичного жома с загрузкой фермента 0,05 г/г АСВ субстрата, предварительно обработанного 1% сернистой кислотой при 190°C в течение 10 мин. при варьировании гидромодела 1:(15-30)

Как показано на рисунке 4, высушивание предварительно обработанного свекловичного жома приводит к снижению степени его конверсии более чем в 4 раза. Это может быть связано с необратимым закупориванием пор целлюлозы, затрудняющим доступ ферментов к субстрату [11].

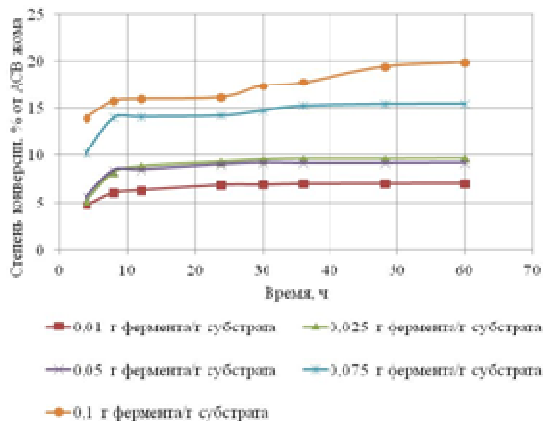


Рис. 4 - Влияние высушивания предварительно обработанного свекловичного жома на эффективность его дальнейшего гидролиза

Выводы

1. Наибольшая степень ферментативной конверсии наблюдается при предварительной обработке свекловичного жома 1% сернистой кислотой в течение 10 мин.
2. Увеличение гидромодела от 1:20 до 1:30 обеспечивает повышение степени ферментативной конверсии свекловичного жома на 15,7% от АСВ жома. При этом максимальная степень конверсии достигается при более низкой загрузке фермента (0,05 вместо 0,1 и 0,25 г/г АСВ субстрата) и составляет 84,96% от АСВ жома.
3. Высушивание предварительно обработанного свекловичного жома нежелательно, так как приводит к снижению степени его конверсии более чем в 4 раза.

Литература

1. Л. В. Донченко, Н. В. Демина, С. Е. Ковалева. Возможность Науч. журн. КубГАУ, 21, 44-48 (2006)
2. Стахеев И.А., Коломиец Э.И., Здор Н.А., Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина. Наука ітэхшка, Киев, 1991. 264 с.
3. A.P. Dadi, C.A. Schall, S. Varanasi, Chin. Sci. Bull, 51, 2432-2436 (2007)
4. С.Е. Wyman, Annu Rev Energy Environ, 24,189–226 (1999)
5. М.В. Харина, О.Н. Григорьева, Вестник Казан. технол. ун-та, 16, 158-166 (2001)
6. Р.М. Нуртдинов, Р.Т. Валеева, С.Г. Мухачев, М.В. Харина Вестник Казан. технол. ун-та, 6, 143-147 (2001)
7. Stephen S. Fry, The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Springer, New York, 1988. 121 p.
8. С.Г. Мухачев, В.М. Емельянов, М.Ф. Шавалиев, Р.Т. Елчуев, Р.Т. Валеева, Р.М. Нуртдинов, А.М. Буйлин Вестник Казан. технол. ун-та, 5, 21-26 (2009)
9. Р.М. Нуртдинов, С.Г. Мухачев, Р.Т. Валеева, В.М. Емельянов, М.Ф. Шавалиев, И.В. Шагивалеев, И.А. Якушев, Вестник Казан. технол. ун-та, 2, 143-147 (2011)
10. Ю.А. Жданов, Г.Н. Дорофеев, Практикум по химии углеводов. Высшая школа, Москва, 1973. 204 с.
11. Scheper T., Tsao G. T. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1999. 280 p.