

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 «Буинский сахарный завод» (г. Буинск, февраль 2013 г). Выделение легко- и трудногидролизующих 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 °С, 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 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 ферментолізатах 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 гликанов 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 эндоглюканазы 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 при гидромодуле 1:20 и варьировании загрузки фермента от 0,01 до 0,1 г фермента/г АСВ субстрата показано на рисунке 4. Рис. 3 – Влияние гидромодуля 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 гидромодуля 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, затрудняющем 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 гидромодуля 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.