

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 продолжаются 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 Алешиной Л.А. (Петрозаводский государственный университет) рентгенографическим методом на дифрактометре ДРОН-ЗМ (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 BGX» (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», стандартизированного по целлюлазе, составляет целлюлазная – (2000 ± 200) ед./г, ксиланазная – 8000 КС, β -глюканазная – 1500 β -ГлС; препарата «Брюзайм BGX» (продуцент *Trichoderma longibrachiatum*), стандартизированного по гемицеллюлазе: ксиланазная – 6500 ± 5 % ед. КС/см³, β -глюканазная – 1700 ± 5 % ед β -ГлС/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 (pH 4,7), при постоянном перемешивании на платформе «ПЭ-6410 М» (Россия) с частотой колебания 150 мин⁻¹, концентрация субстрата составила 33,3 г/лЗ. На втором этапе гидролиз проводили в ферментаторе авторской конструкции Павлова И.Н. объемом 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 негидролизующихся примесей (зола и лигнина) 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.
М.д. остаточного лигнина, % на а.с.с.	90,50±0,05	88,10±0,05	0,80±0,05
М.д. пентозанов, % на а.с.с.	3,00±0,02	11,30±0,02	0,50±0,05
М.д. золы, % на а.с.с.	5,70±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01
Степень полимеризации	1130±10	1140±10	70±5
Степень кристалличности, %	68±5	68±5	68±5
Удельная площадь поверхности, м ² /г	2,5±0,1	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 гидролизующемостью 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
Концентрация субстрата, г/л		33,3±0,1	55,6±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
Концентрация субстрата, г/л	в водной среде	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
Выход РВ (к массе субстрата), %		48,6±0,5	3,1±0,2
РВ – редуцирующие вещества, АС – азотнокислый способ, КС – комбинированный способ		79,4±0,2	

Следует отметить, что, несмотря на высокие значения СК и УПП субстратов, выход РВ через 72 ч ферментации обеих 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, использующейся как кормовой белок или как источник для выделения ценных минорных компонентов) [17, 18].