

УДК 612.015.161

СБРАЖИВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МИСКАНТУСА С ПОМОЩЬЮ *PACHYSOLEN TANNOPHILUS* Y-1532 И *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y-1693

Байбакова О.В.

ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, e-mail: olka_baibakova@mail.ru

Исследована кинетика прироста биомассы дрожжей и утилизации субстрата для штаммов *Pachysolen tannophilus* ВКПМ Y-1532 и *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 на синтетических глюкозных и ксилозных средах. Установлены преимущества *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 по скорости прироста биомассы и скорости утилизации субстрата по сравнению с *Pachysolen tannophilus* ВКПМ Y-1532. При повышении концентрации субстрата до 30 г/л для *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 наблюдается субстратное ингибирование. Установлено, что *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 не утилизирует ксилозу, а для *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 выход этанола крайне низок и составляет 23% от теоретического. Получен биоэтанол на среде ферментативного водного гидролизата технической целлюлозы мискантуса с помощью обоих видов дрожжей. Показано, что *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 синтезирует этанол с выходом 62,5%.

Ключевые слова: биоэтанол, спиртовое брожение, дрожжи, кинетика прироста биомассы дрожжей, кинетика потребления субстрата

FERMENTATION OF ENZYMATIC HYDROLYZATE OF MISCANTHUS CELLULOSE BY *PACHYSOLEN TANNOPHILUS* Y-1532 AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y-1693

Baybakova O.V.

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Biysk, e-mail: olka_baibakova@mail.ru

The kinetics of cell growth and of substrate utilization for Y-1532 *Pachysolen tannophilus* and Y-1693 *Saccharomyces cerevisiae* yeasts was studied on synthetic carbohydrate media. At a substrate concentration of 20 g/L, the specific growth rate of *Saccharomyces* was shown to be 1,8 times higher than that of *Pachysolen* and the glucose fermentation rate to be 1,4 times higher. With increasing substrate concentration as high as 30 g/L for Y-1693 *Saccharomyces cerevisiae*, the growth rate and glucose fermentation rate increase as well by a factor of 1.4 and 1.2, respectively; for Y-1532 *Pachysolen tannophilus*, the substrate was observed to be inhibited. Bioethanol was produced on a medium of aqueous *Miscanthus* hydrolyzate using both yeasts. The joint use of the strains was shown to be unreasonable, so far as it does not increase the ethanol yield. Y-1693 *Saccharomyces cerevisiae* on the aqueous enzymatic *Miscanthus* hydrolyzate medium was found to synthesize ethanol in 62,5% yield.

Keywords: bioethanol, alcohol fermentation, yeast, cell growth kinetics, substrate consumption

Проблеме переработки биомассы с целью получения биотоплива в мире уделяется значительное внимание [3]. Основным продуцентом биоэтанола в России являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, применяемые в производстве этилового спирта как на пищевом сырье, так и на гидролизных средах. Однако сахаромикеты не сбраживают в этанол пентозы, которых в гидролизатах может быть значительное количество (это зависит от вида сырья и способа получения гидролизата). Известно несколько видов дрожжей, сбраживающих ксилозу в этанол: *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Pichia stipitis* и другие [1, 5].

Для выбора продуцента биоэтанола необходимо предварительное определение удельной скорости прироста биомассы дрожжей и скорости утилизации субстрата на синтетических средах. Целью данной работы было получение биоэтанола на

среде ферментативного гидролизата целлюлозы мискантуса с помощью продуцентов *Pachysolen tannophilus* и *Saccharomyces cerevisiae* и обоснование выбора продуцента.

Материалы и методы исследования

Штамм *Pachysolen tannophilus* ВКПМ Y-1532 был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, г. Москва) и предназначен для производства спирта на гидролизатах древесины. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 был выделен из ферментера Котласского целлюлозно-бумажного комбината Архангельской области и использовался для производства этанола на сульфитных щелоках.

На первом этапе изучалась биосинтетическая активность штаммов на синтетических средах. Использовалась полная дрожжевая среда, рекомендованная ВКПМ для дрожжей рода *Pachysolen* (ПДС-1) и её модификации (табл. 1).

В стерильные среды вносился инокулят сахаромикетов или пахизолона в количестве 5%. Культивирование проводилось в анаэробных условиях при температуре 28 °С и pH 4,5.

Таблица 1

Состав синтетических сред

Компонент среды	Дозировка компонентов, г / 1000 мл		
	ПДС-1	ПДС-2	ПДС-3
Глюкоза	20	30	–
Ксилоза	–	–	20
Пептон	10	14	10
Дрожжевой экстракт	5	7	5

На втором этапе в качестве питательной среды был использован ферментативный водный гидролизат технической целлюлозы энергетического растения Мискантус китайский, полученной азотнокислым способом на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН [2]. Гидролизат представлял собой янтарно-жёлтую мутноватую жидкость с характерным кисловатым запахом мискантуса. Редуцирующие вещества (РВ) гидролизата представлены преимущественно глюкозой: всего РВ – $51,2 \pm 0,5$ г/л, в том числе ксилозы $1,7 \pm 0,2$ г/л; рН 4,5. Гидролизат не является полноценной средой для дрожжей, ранее было установлено, что в него дополнительно следует вносить азот в количестве, пропорциональном концентрации РВ в полученном гидролизате [4]. Поэтому в гидролизат был внесён сульфат аммония в количестве 10 г/л. Гидролизат был пастеризован при 100°C без выдержки, охлаждён до 30°C и направлен на спиртовое брожение. Было проведено 4 варианта биосинтеза этанола с использованием следующих продуцентов, вносимых в питательную среду в количестве 5%:

А – *P. tannophilus* ВКПМ У-1532;

Б – *S. cerevisiae* ВКПМ У-1693, продолжительность культивирования 3 суток; после этого внесён *P. tannophilus* ВКПМ У-1532;

В – одновременно внесены *P. tannophilus* ВКПМ У-1532 и *S. cerevisiae* ВКПМ У-1693;

Г – *S. cerevisiae* ВКПМ У-1693.

Брожение проводилось в анаэробных условиях при рН 4,5 и температуре 28°C, продолжительность брожения для различных вариантов составила от 7 до 10 суток.

Общее количество дрожжевых клеток в бражках определялось прямым подсчётом на камере Горяева. Редуцирующие вещества (РВ) в средах определялись спектрофотометрическим методом (спектрофотометр «UNICO UV-2804», США) в пересчёте на глюкозу, для ПДС-3 – в пересчёте на ксилозу. Концентрация ксилозы в ферментативном гидролизате определялась железосульфидным способом. Крепость бражек (объёмная доля спирта) определялась ареометром для спирта в дистилляте, полученном после предварительной перегонки спирта из бражки согласно ГОСТ Р 51135-98-2003.

Результаты исследования и их обсуждение

Кинетика утилизации субстратов на синтетических глюкозных средах

Основное потребление субстрата *P. tannophilus* ВКПМ У-1532 произошло через трое суток брожения на ПДС-1 и через пять на ПДС-2 (рис. 1).

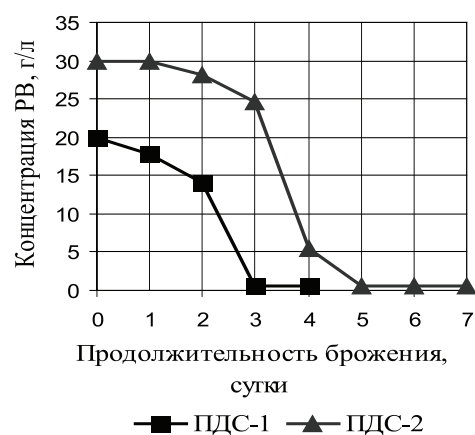


Рис. 1. Зависимость концентрации РВ от продолжительности брожения *P. tannophilus* на глюкозных средах

Скорость сбраживания глюкозы была рассчитана по формуле

$$K_{сб} = \frac{2,303}{\tau_{сб}} \cdot \lg \frac{s_0}{s},$$

где $K_{сб}$ – константа скорости сбраживания, $ч^{-1}$; $\tau_{сб}$ – фиксируемый период времени от начала брожения; s_0 и s – концентрация РВ в начале брожения (в сусле) и во время $\tau_{сб}$ (в бражке) [6].

Для ПДС-1 $K_{сб}$ составляет $0,049 ч^{-1}$, для ПДС-2 – $0,033 ч^{-1}$, что свидетельствует о субстратном ингибировании метаболизма дрожжей при повышении концентрации субстрата всего на 10 г/л. Получен хороший выход этанола: на ПДС-1 через четверо суток синтезируется 1,1 об. % этанола, что соответствует выходу 85% от теоретического; на ПДС-2 через 7 суток синтезируется 1,7 об. % этанола, что соответствует выходу 88%.

Аналогичным образом проведены опыты по сбраживанию синтетических сред с помощью продуцента *S. cerevisiae* ВКПМ У-1693. Получены типичные для данного рода дрожжей кривые прироста биомассы и утилизации субстрата. Результаты определения кинетических параметров приведены в табл. 2.

Таблица 2

Кинетика прироста биомассы дрожжей и утилизации субстрата и расчет экономического коэффициента брожения для продуцентов *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693

Показатель	<i>P. tannophilus</i> ВКПМ Y-1532		<i>S. cerevisiae</i> ВКПМ Y-1693	
	ПДС-1	ПДС-2	ПДС-1	ПДС-2
Удельная скорость прироста биомассы μ , ч ⁻¹	0,047	0,036	0,086	0,124
Время удвоения, ч	14,8	19,2	8,1	5,6
Константа сбраживания сахара, $K_{сб}$, ч ⁻¹	0,049	0,033	0,068	0,077
Конечная концентрация этанола в бражке, об. %	1,10	1,70	1,25	1,70
Выход этанола, % от теоретического	85	88	92	88
Экономический коэффициент брожения, $Y_{p/s}$	0,550	0,567	0,625	0,567

Если сравнить кинетику прироста биомассы дрожжей и утилизации субстрата для дрожжей *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 при концентрации субстрата 20 г/л, то удельная скорость прироста биомассы сахаромисцетов выше в 1,8 раза, чем пахизолена, а скорость сбраживания глюкозы выше в 1,4 раза.

При концентрации 30 г/л различие скоростей прироста биомассы дрожжей и утилизации субстрата для этих культур будет ещё выше. На повышение концентрации субстрата дрожжи реагируют неодинаково: для *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 повышается и скорость прироста биомассы (в 1,4 раза), и скорость сбраживания глюкозы (в 1,2 раза); для *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 наблюдается субстратное ингибирование: скорость прироста биомассы дрожжей снижается в 1,3 раза; скорость сбраживания – в 1,5 раза.

Таким образом, формальный анализ кинетики прироста биомассы дрожжей и утилизации субстрата продуцентами *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 позволяет сделать следующие выводы: при совместном использовании данных штаммов концентрация дрожжей *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 должна быть в два раза выше, чем *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693, а внесены они должны быть в конце брожения, при снижении концентрации субстрата до 20 г/л.

Определение биосинтетической способности продуцентов на синтетической ксилонной среде

В синтетические ксилонные среды (ПДС-3) было внесено 20% инокулята дрожжей рода *Pachysolen* или *Saccaromyces*. При культивировании на ксилонной среде *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 были подтверждены литературные данные: штамм не способен к утилизации ксилонной.

Концентрация редуцирующих веществ на 7 сутки культивирования *P. tannophilus* составила 13,1 г/л, то есть утилизация ксилонной среды штаммом идет крайне медленно, выход этанола составил всего 23%. Из литературных данных известно, что 50% ксилонной среды метаболизируется *P. tannophilus* в этанол и 50% – в ксилит [1]. Таким образом, эффективность синтеза этанола на ксилонной синтетической среде штаммом ВКПМ Y-1532 крайне низкая.

Определение биосинтетической способности продуцентов на среде ферментативного гидролизата целлюлозы мискантуса

Убыль редуцирующих веществ в процессе брожения гидролизатов представлена на рис. 2.

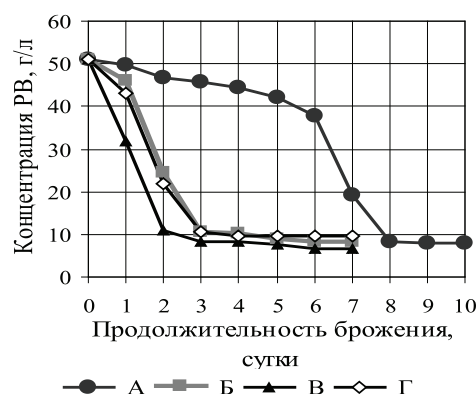


Рис. 2. Зависимость концентрации редуцирующих веществ от продолжительности брожения на среде ферментативного гидролизата

Для вариантов Б и Г кривые фактически совпадают, сахар утилизируется через 3 суток. Таким образом, внесение в среду *P. tannophilus* после утилизации *S. cerevisiae* основной части РВ (вариант Б)

не привело к положительным результатам. При совместном использовании культур (вариант В) утилизация сахаров интенсифицируется и наблюдается через двое суток. При использовании только *P. tannophilus* (вариант А) скорость сбраживания сахаров минимальна: их утилизация происходит только на 8 сутки.

В табл. 3 представлены результаты брожения. Скорость сбраживания РВ через трое суток продуцентом *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 в 13 раз ниже, чем *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693. При совместном использовании культур скорость сбраживания увеличивается в 1,1 раза по сравнению с *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693.

Таблица 3

Кинетика утилизации субстрата и расчет экономического коэффициента брожения для продуцентов *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 на среде ферментативного гидролизата

Показатель	Варианты			
	А	Б	В	Г
Константа сбраживания сахара через трое суток брожения, $K_{сб}$, ч ⁻¹	0,004	0,050	0,059	0,052
Остаточная концентрация РВ в гидролизате после брожения, г/л	9,5	8,0	6,7	8,0
Конечная концентрация этанола в бражке, об. %	1,4	2,0	2,0	2,0
Выход этанола, % от теоретического	44,0	62,5	62,5	62,5
Экономический коэффициент брожения, $Y_{p/s}$	0,270	0,390	0,390	0,390

Бродильная активность *P. tannophilus* достаточно низкая: через 10 суток культура синтезирует 1,4 об. % этанола или 44 % от теоретического при полной утилизации РВ гидролизата. В остальных вариантах получено 2 об. % этанола, причём дображивание шло крайне медленно. Таким образом, совместное использование штаммов нецелесообразно, так как оно не приводит к повышению выхода биоэтанола. Кроме того, усложняется технология получения биоэтанола, так как требуется проведение дополнительных работ на стадии культивирования засевных дрожжей.

Полученная крепость бражки соответствует выходу этилового спирта 62,5 % от теоретического, или 40 л из 100 кг сбраживаемых сахаров. Выход этанола меньше, чем на гидролизных заводах (55–58 л из 100 кг сбраживаемых сахаров [5]), что объясняется неполноценностью состава питательной среды. Можно предположить, что мискантус как сырье содержит компоненты, частично ингибирующие активность зимазного комплекса дрожжей.

Выводы

Сравнение кинетики прироста биомассы дрожжей и утилизации субстрата для дрожжей *P. tannophilus* ВКПМ

Y-1532 и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 при концентрации субстрата 20 г/л показывает, что удельная скорость прироста биомассы сахаромикетов выше в 1,8 раза, чем пахизолена, а скорость сбраживания глюкозы выше в 1,4 раза. При повышении концентрации субстрата до 30 г/л для *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 повышается и скорость прироста биомассы (в 1,4 раза), и скорость сбраживания глюкозы (в 1,2 раза); для *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 наблюдается субстратное ингибирование.

Получен биоэтанол на среде ферментативного гидролизата с помощью продуцентов *Pachysolen tannophilus* и *Saccharomyces cerevisiae*. Выход этанола составил для продуцента *P. tannophilus* ВКПМ Y-1532 44 % от теоретического, а для *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 – 62,5 %. При совместном применении культур скорость сбраживания увеличивается в 1,1 раза по сравнению с *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693, но повышения выхода этанола не наблюдается, поэтому совместное использование штаммов нецелесообразно. Таким образом, для получения биоэтанола на среде ферментативного гидролизата мискантуса рекомендовано применение штамма *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693.

Список литературы

1. Борисова С.В. Использование дрожжей в промышленности / С.В. Борисова, О.А. Решетник, З.Ш. Мингалеева. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 216 с.

2. Гисматулина Ю.А., Будаева В.В. Химический состав российского мискантуса и качество целлюлозы, полученной из него // Химия в интересах устойчивого развития. 2013. – Т. 21. – № 5. – С. 539–544.

3. Кузнецова О.Ю. Современные аспекты развития бионано- и/или нанобиотехнологии // Вестник Казан. техн. ун-та. – 2013. – Т. 16. – № 3. – С. 156–163.

4. Скиба Е.А., Орлов С.Е., Будаева В.В. Оптимизация состава глюкозо-аммонийной среды по выходу этанола для штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 // Вестник ТГУ. Биология. – 2012. – № 2. – С. 66–73.

5. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств / Ю.И. Холькин. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 314 с.

6. Яровенко В.Л. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов [и др.]; под ред. проф. В.Л. Яровенко – М.: Колос, 1999. – 464 с.

References

1. Borisova S.V. Ispol'zovanie drozhzhey v promyshlennosti / S.V. Borisova, O.A. Reshetnik, Z.Sh. Mingaleeva. SPb.: GIORD, 2008. 216 p.

2. Gismatulina Ju.A., Budaeva V.V. Himicheskij sostav rossijskogo miskantusa i kachestvo celljulozy, poluchennoj iz nego // Himija v interesah ustojchivogo razvitija. 2013. T. 21. no. 5. pp. 539–544.

3. Kuznecova O.Ju. Sovremennye aspekty razvitija bi-onano- i/ili nanobiotehnologii // Vestnik Kazan. tehnol. un-ta. 2013. T. 16. no. 3. pp. 156–163.

4. Skiba E.A., Orlov S.E., Budaeva V.V. Optimizacija sostava gl'jukoza-ammonijnoj sredy po vyhodu jetanola dlja shtamma *Saccharomyces serevisiae* Y-1693 // Vestnik TGU. Biologija. 2012. no. 2. pp. 66–73.

5. Khol'kin Ju.I. Tekhnologiya gidroliznykh proizvodstv / Ju.I. Khol'kin. M.: Lesnaya promyshlennost', 1989. 314 p.

6. Jarovenko V.L. Tehnologija spirta / V.L. Jarovenko, V.A. Marinchenko, V.A. Smirnov [i dr.]. Pod red. prof. V.L. Jarovenko M.: Kolos, 1999. 464 p.

Рецензенты:

Новожилов Е.В., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и биотехнических систем, Северный (Арктический) федеральный университет, г. Архангельск;

Разговоров П.Б., д.т.н., профессор кафедры технологии пищевых продуктов и биотехнологии, Ивановский государственный химико-технологический университет, г. Иваново;

Сечин А.И., д.т.н., профессор, Федеральное агентство по образованию, НИУ РЭТ Томский политехнический университет, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 15.07.2014.