

УДК 612.015.161

БИОКОНВЕРСИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СУБСТРАТА МИСКАНТУСА В ЭТАНОЛ

Байбакова О.В.

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

Установлено, что химическая предобработка мискантуса раствором азотной кислоты в одну стадию позволяет получать субстрат с высокой реакционной способностью к ферментативному гидролизу: выход редуцирующих веществ при последовательном процессе осахаривания-сбраживания (ППОС) составил 65,4 г/л, при одновременном процессе осахаривания-сбраживания (ОПОС) – 64,5 г/л. Исследована возможность получения биоэтанола на среде ферментативного гидролизата лигноцеллюлозного субстрата мискантуса с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693. При ППОС синтезируется биоэтанол с выходом 70,9% от теоретического, выход биоэтанола из 1 т мискантуса составляет 19,4 дал. При ОПОС биоэтанол синтезируется с выходом 83,7% от теоретического, а выход биоэтанола из 1 т мискантуса – 22,6 дал. Показано, что при проведении процессов осахаривания-сбраживания выход биоэтанола увеличивается в 1,2 раза по сравнению с последовательным процессом. ОПОС позволяет сократить продолжительность стадий в 1,5 раза и исключить фильтрацию промежуточного продукта – ферментативного гидролизата.

Ключевые слова: биоэтанол, лигноцеллюлозный субстрат, мискантус, ферментативный гидролизат, спиртовое брожение

BIOCONVERSION OF MISCANTHUS LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATE INTO ETHANOL

Baibakova 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 one-stage chemical pretreatment of Miscanthus with dilute nitric acid is shown herein to afford a substrate with a high reactivity to enzymatic hydrolysis. Depending on the duration of the saccharification-fermentation stages, the yield of reducing sugars was as follows: 65,4 g/L in the sequential process and 64,5 g/L in the simultaneous process. Bioethanol was produced by the *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 yeast in an enzymatic hydrolyzate medium of the Miscanthus lignocellulosic substrate. Bioethanol was found to be synthesized in 70,9% yield of the theoretical in the sequential saccharification-fermentation, the bioethanol yield amounted to 19,4 dal from 1 t of Miscanthus. The simultaneous saccharification-fermentation provides bioethanol in 83,7% yield of the theoretical, and the bioethanol yield from 1 t of Miscanthus is 22,6 dal. The bioethanol yield was shown to increase by a factor of 1,2 in the simultaneous saccharification-fermentation compared to the sequential process. The simultaneous process allows the time of the stages to be reduced by 1,5 times and excludes filtration of the intermediate – enzymatic hydrolyzate.

Keywords: bioethanol, lignocellulosic substrate, Miscanthus, enzymatic hydrolyzate, alcohol fermentation

Биомасса является возобновляемым ресурсом и привлекает внимание в качестве альтернативы ископаемому топливу, а производство этанола из биомассы (биоэтанол) представляет собой практическую альтернативу бензину. Преобразование растительных клеточных стенок представляет собой получение биоэтанола второго поколения [8]. Лигноцеллюлоза – это самая распространенная биомасса на земле. Однако прочность биомассы стала главным фактором, влияющим на производство биотоплива [7]. Целлюлозосодержащее сырье представляет собой прочную матрицу, образованную целлюлозой, гемицеллюлозой и лигнином; взаимосвязь этих компонентов обуславливает устойчивость матрицы ко всем внешним воздействиям, поэтому для ее деструкции применяют различные способы предобработки. Следовательно, предобработка служит важным этапом устранения прочности

сырья и повышения выхода сбраживаемых сахаров на этапе ферментативного разрушения [6]. Наиболее перспективным для России сырьем в производстве биоэтанола является непищевое целлюлозосодержащее сырье (древесина, солома, отходы обработки зерна), поскольку крахмало- и сахаросодержащее сырье дорого и в наших природно-климатических условиях может быть использовано только для выработки спирта пищевого и медицинского назначения. В ИПХЭТ СО РАН в качестве сырья используется возобновляемый источник сырья: биомасса энергетической злаковой культуры – *Мискантус китайский* (М). Сейчас это растение позиционируют в качестве перспективного целлюлозосодержащего сырья для производства целлюлозы и продуктов ее модификации [1, 4–5]. **Целью** данной работы являлось исследование ферментативного гидролиза в водной

среде лигноцеллюлозного субстрата (ЛЦС) из мискантуса и последующее получение биоэтанола, а также изучение влияния последовательности технологических стадий осахаривания-сбраживания на процесс биосинтеза этанола.

Материалы и методы исследования

Субстратом для получения биоэтанола являлся ЛЦС мискантуса, полученный на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН в одну стадию обработкой мискантуса разбавленным раствором азотной кислоты при температуре 90–96 °С. Определение основных характеристик субстрата (массовой доли (м.д.) целлюлозы по Кюршнеру, м.д. пентозанов, м.д. кислотонерастворимого лигнина, зольность) проводилось по стандартным методикам. Характеристики ЛЦС М представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики используемого субстрата

Характеристики м.д., %	ЛЦС М
Целлюлоза по Кюршнеру	88,6
Пентозаны	7,9
Кислотонерастворимый лигнин	10,8
Зольность	4,8

В работе использовались ферментные препараты «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск) и «Брюзайм ВGX» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diacid International Inc.», США). Препарат «Целлолюкс-А» позиционируется на рынке как целлюлаза для расщепления некрахмалистых полисахаридов, «Брюзайм ВGX» – как гемицеллюлаза.

Технологические стадии осахаривания и сбраживания в данной работе проводились последовательно и одновременно. Для проведения процессов в колбу Эрленмейера емкостью 1000 мл помещали навеску субстрата и дистиллированную воду. Концентрация субстрата составила 90 г/л.

При последовательном процессе осахаривания-сбраживания (ППОС) ферментализ проводился в водной среде при pH 4,6–4,7 и при непрерывном перемешивании на платформе «ПЭ – 6410 М» с частотой 150 мин⁻¹. Температура гидролиза составляла (46 ± 2) °С, продолжительность – 72 ч. Мультиэнзимная композиция вносилась следующим образом: «Целлолюкс – А» в расчете 0,04 г фермента на 1 г субстрата и «Брюзайм ВGX» в расчете 0,2 г фермента на 1 г субстрата. Полученный ферментативный гидролизат стерилизовался методом автоклавирования при 0,5 атм в течение 40 мин.

При одновременном процессе осахаривания-сбраживания (ОПОС) ферментализ проводился в приведённых выше условиях, но его продолжительность составила 24 ч, после этого среда охлаждалась до 28 °С, вносились засевные дрожжи и в течение трех последующих суток проводилось спиртовое брожение, совмещенное с осахариванием.

Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу определялась спектрофотометрически с помощью реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты на «UNICO UV-2804». Вы-

ход редуцирующих веществ (РВ) рассчитан с учетом коэффициента 0,9, обусловленного присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

Ферментативные гидролизаты ЛЦС М сбраживались с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 (ФГУП «ГосНИИГенетика», г. Москва). Доза инокулята составляла 10%. Дрожжи находились в экспоненциальной фазе развития имели следующие характеристики: общее количество – 141,5 млн КОЕ/мл, из них почкующихся – 27,6%. Спиртовое брожение проводилось в анаэробных условиях при 28 °С в течение трех суток.

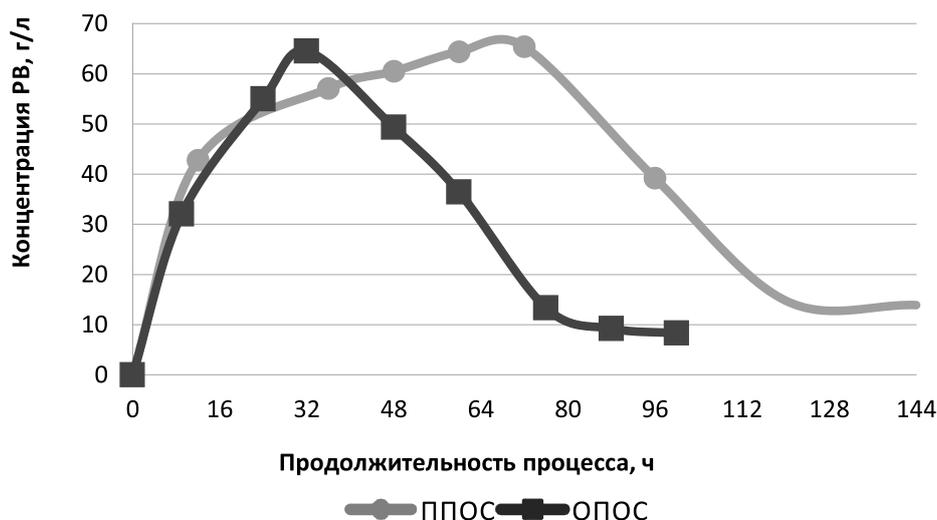
Объемная доля спирта в бражке определялась ареометром в дистилляте, полученном перегонкой спирта из бражки согласно ГОСТ Р 51135-2003 [2]. По крепости полученных бражек и концентрации РВ в исходной среде рассчитывался выход биоэтанола. Теоретическая концентрация этанола рассчитывалась по стехиометрическому уравнению брожения, выход биоэтанола – как отношение экспериментальной концентрации этанола к теоретической. Полученные образцы биоэтанола концентрировались методом простой перегонки, дополнительной очистки не проводилось. Анализ этанола выполнен методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) по ГОСТ Р 51786-2001 [3] на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором «Кристалл 2000М» фирмы «СКБ Хроматэк».

Результаты исследования и их обсуждения

На рисунке представлена зависимость концентрации РВ от продолжительности процессов осахаривания-сбраживания ЛЦС М, проводимых последовательно и одновременно.

Полученные результаты показали, что при ППОС накопление РВ происходит через 72 ч и составляет 65,4 г/л, а при ОПОС – через 32 ч и составляет 64,5 г/л. Это можно объяснить тем, что при добавлении дрожжей в ОПОС через 24 ч от начала процесса РВ начинают расходоваться на синтез этанола, то есть они отводятся из системы, и, таким образом, равновесие суммарной ферментативной реакции гидролиза целлюлозы постоянно смещается в сторону образования продуктов реакции. Этим достигается интенсификация процесса осахаривания.

Эффективность конверсии целлюлозы в РВ для ППОС составила 72,6%, а для ОПОС – 71,6%. Таким образом, химическая предобработка мискантуса в одну стадию методом азотнокислой варки позволяет получать качественный субстрат с высокой реакционной способностью к ферментализу. Результаты спиртового брожения ферментативного гидролизата ЛЦС мискантуса при проведении процессов осахаривания-сбраживания последовательно и одновременно представлены в табл. 2.



Зависимости концентрации РВ от продолжительности процессов при последовательном и одновременном осахаривании-сбраживании ЛЦС М

Таблица 2

Результаты ферментализа и спиртового брожения при проведении технологических стадий последовательно и одновременно для ЛЦС М

Показатель	ППОС	ОПОС
Концентрация РВ в ферментативном гидролизате, г/л	65,4	64,5
Крепость бражки, об. %	3,0	3,5
Остаточная концентрация РВ в бражке, г/л	10,0	8,3
Выход биоэтанола, % от теоретического	70,9	83,7
Выход биоэтанола из 1 т сырья, дал	19,4	22,6

Таблица 3

Содержание примесей в опытных образцах биоэтанола из ЛЦС М

Показатель	Опытные образцы биоэтанола при	
	ППОС	ОПОС
Массовая концентрация альдегидов, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³ , не более	6100	4100
Массовая концентрация сивушного масла, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³ , не более	2500	2400
Массовая концентрация эфиров, в пересчёте на безводный спирт, мг/дм ³ , не более	70	100
Содержание метанола в пересчёте на безводный спирт, об. %, не более	0,002	0,002

При ППОС синтезируется биоэтанол с выходом 70,9% от теоретического, выход биоэтанола из 1 т М составляет 19,4 дал. При ОПОС биоэтанол синтезируется с выходом 83,7% от теоретического, а выход биоэтанола из 1 т М – 22,6 дал. Сравнение синтеза биоэтанола, полученного при проведении процесса осахаривания-сбраживания последовательно и одновременно, показывает, что при одновременном процессе выход этанола увеличивается в 1,2 раза по сравнению с последовательным процессом.

Кроме того, при ОПОС исключается стадия фильтрования ферментативного гидролизата и в 1,5 раза сокращается продолжительность технологических стадий: для ППОС требуется 6 суток, для ОПОС – 4 суток. При ОПОС остаточная концентрация редуцирующих веществ в бражке ниже на 1,7 г/л, чем при ППОС, что также указывает на повышение эффективности процесса.

Результаты качества полученных образцов биоэтанола приведены в табл. 3.

В опытных образцах объёмная доля метанола крайне мала – 0,002 об. %. Также в опытных образцах мало эфиров, что косвенно может указывать на чистоту культуры дрожжей при брожении и благоприятные условия для биосинтеза этанола. Довольно высокая концентрация альдегидов в опытных образцах (от 4100 мг/дм³ до 6100 мг/дм³) связана с природой сырья, поскольку исключено накопление фракции альдегидов (фурфурола и оксиметилфурфурола) в процессе ферментативного гидролиза, так как процесс проводился при температуре (46 ± 2) °С и рН 4,6-4,7. Массовая концентрация сивушного масла значительно высокая (2400–2500 мг/дм³), что объяснимо, так как ректификация опытного образца не проводилась. Таким образом, ферментативный гидролиз ЛЦС М позволяет получить доброкачественный гидролизат с низким содержанием вредных примесей и обуславливает низкое содержание побочных и вторичных продуктов спиртового брожения в бражках.

Выводы

Выявлено, что химическая предобработка мискантуса раствором азотной кислоты в одну стадию позволяет получать субстрат с высокой реакционной способностью к ферментативному гидролизу: выход РВ при ППОС составил 65,4 г/л, при ОПОС – 64,5 г/л.

Получен биоэтанол на среде ферментативного водного гидролизата ЛЦС М с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693. При ППОС синтезируется биоэтанол с выходом 70,9% от теоретического, выход биоэтанола из 1 т М составляет 19,4 дал. При ОПОС биоэтанол синтезируется с выходом 83,7% от теоретического, а выход биоэтанола из 1 т М – 22,6 дал.

Установлено, что при проведении процессов осахаривания-сбраживания выход биоэтанола увеличивается в 1,2 раза по сравнению с последовательным процессом. Проведение технологических стадий одновременно позволяет сократить продолжительность процесса в 1,5 раза и исключить фильтрацию промежуточного продукта – ферментативного гидролизата. Это позволит уменьшить затраты при получении биоэтанола и упростить технологический процесс, что важно для его успешного масштабирования.

Показано, что спирты, полученные из ЛЦС М, характеризуются низким содержанием эфирной фракции и метанола.

Список литературы

1. Гисматулина Ю.А. Исследование химического состава мискантуса сорта Сорановский урожая 2013 года // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 1–1. – С. 47–50.
2. ГОСТ Р 51135-2003. Изделия ликеро-водочные. Правила приемки и методы анализа. Технические требования. – Введ. 1998-03-02. – М.: ИУС, 2003. – 116 с.
3. ГОСТ Р 51786-2001. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – М.: Изд-во стандартов, 2001. – 8 с.
4. Baibakova O.V., Skiba E.A. Biotechnological Aspects of Ethanol Biosynthesis from Miscanthus // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 69–74.
5. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Veprev S.G., Sakovich G.V., Shumny V.K. Cellulose from Various Parts of Soranovskii Miscanthus // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 60–68.
6. Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry // Bioenerg. Res. – 2012. – № 5. – P. 1043–1066.
7. Somerville C., Youngs H., Taylor C., Davis S.C., Long S.P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels // Science. – 2010. – V. 329. – P. 790–792.
8. Wagschal K. Plant cell walls to ethanol // Biochem. J. – 2012. – № 442. – P. 241–252.

References

1. Gismatulina Ju.A. Issledovanie himicheskogo sostava mискantusa sorta Soranovskij urozhaja 2013 goda // Fundamental'nye issledovaniya. 2014. no. 1–1. pp. 47–50.
2. GOST R 51135-2003. Izdelija likero-vodochnye. Pravila priemki i metody analiza. Tehnicheskie trebovanija. Vved. 1998-03-02. M.: IUS, 2003. 116 p.
3. GOST R 51786-2001. Vodka i spirt jetilovyj iz pishchevogo syr'ja. Gazohromatograficheskij metod opredelenija podlinnosti. M.: Izd-vo standartov, 2001. 8 p.
4. Baibakova O.V., Skiba E. A. Biotechnological Aspects of Ethanol Biosynthesis from Miscanthus // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2015. Vol. 5, no. 1. pp. 69–74.
5. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Veprev S.G., Sakovich G.V., Shumny V.K. Cellulose from Various Parts of Soranovskii Miscanthus // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2015. Vol. 5, no. 1. pp. 60–68.
6. Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry // Bioenerg. Res. 2012. no. 5. pp. 1043–1066.
7. Somerville C., Youngs H., Taylor C., Davis S.C., Long S.P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels // Science. 2010. V. 329. pp. 790–792.
8. Wagschal K. Plant cell walls to ethanol // Biochem. J. 2012. no. 442. pp. 241–252.

Рецензенты:

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

Комарова Л.Ф., д.т.н., профессор, заведующая кафедрой химической техники и инженерной экологии, ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 01.04.2015.