

УДК 66.094.941:661.728.7

ПРОБЛЕМЫ МАСШТАБИРОВАНИЯ В ВОДНОЙ СРЕДЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПРОДУКТА АЗОТНОКИСЛОЙ ОБРАБОТКИ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА – ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Байбакова О.В.

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

В данной работе рассмотрены проблемы перехода от ацетатного буфера к водной среде в процессе ферментативного гидролиза и масштабирования в водной среде ферментативного гидролиза продукта азотнокислой обработки плодовых оболочек овса. Показано, что при переходе к водной среде выход редуцирующих веществ от массы субстрата снижается на 4,1 % по сравнению с ацетатным буфером. Кривые накопления концентрации редуцирующих веществ показывают, что концентрация редуцирующих веществ увеличивалась экспоненциально и через 24 ч от начала ферментативного гидролиза достигла значений от $(32,3 \pm 0,2)$ г/л до $(48,8 \pm 0,2)$ г/л. Установлено, что при поэтапном масштабировании ферментативного гидролиза по объему в водной среде происходит снижение выхода редуцирующих веществ: в колбе объемом 1 л выход редуцирующих веществ составил $(73,3 \pm 0,3)\%$ от массы субстрата, а при переходе к ферментеру объемом 11 л выход снизился еще на 9 % и составил $(64,3 \pm 0,2)\%$ от массы субстрата. В емкостном оборудовании объемом 63 л благодаря постоянному контролю и корректировке активной кислотности был достигнут выход РВ $(66,0 \pm 0,2)\%$ от массы субстрата.

Ключевые слова: плодовые оболочки овса, азотнокислая обработка, ферментативный гидролиз, питательная среда, бактериальная целлюлоза, производственные условия

SCALE-UP PROBLEMS OF AQUEOUS ENZYMATIC HYDROLYSIS OF NITRIC-ACID PRETREATMENT PRODUCT OF OAT HULLS AS A NUTRIENT BROTH FOR BACTERIAL CELLULOSE BIOSYNTHESIS

Baybakova O.V.

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

This study deals with difficulties of passing to aqueous medium during enzymatic hydrolysis. The complexity of scaling up enzymatic hydrolysis by volume in aqueous medium was investigated. It was found while passing from acetate buffer to aqueous medium that the yield of reducing sugars (RS) decreased by 4,1 % of the substrate weight. The RS concentration was exponentially increasing and reached the values ranging from $32,3 \pm 0,2$ to $48,8 \pm 0,2$ g/L in 24 h after the enzymatic hydrolysis started, as demonstrated by the RS concentration profiles. When the enzymatic hydrolysis was scaled up stepwise by volume in aqueous medium, the RS yield diminished: in an 11-L flask, the yield lowered 9 % more and was $64,3 \pm 0,2\%$ on substrate weight basis. The enzymatic hydrolysis performed in a 63-L vessel with constant monitoring and adjustment of pH afforded a $66,0 \pm 0,2\%$ RS yield on substrate weight basis.

Keywords: oat hulls, nitric-acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, nutrient broth, bacterial cellulose, production environment

Стремительное развитие биотехнологической промышленности стало одним из ключевых трендов мировой науки. Особое внимание при этом уделяется процессу биосинтеза бактериальной целлюлозы (БЦ) [1]. Ученые всего мира считают БЦ уникальным материалом будущего, который может быть использован в различных отраслях. Широкое применение БЦ нашла в медицине – гель-пленки БЦ можно использовать в микрохирургии при протезировании кровеносных сосудов [1], также на их основе можно восстанавливать суставные хрящи у больных, страдающих от болей в суставах и потери подвижности. Для биосинтеза БЦ классической является стандартная синтетическая среда [2], она была многократно модифицирована, одна-

коо ее дороговизна увеличивает стоимость целевого продукта [2].

В ИПХЭТ СО РАН предложено получать питательную среду из отходов сельского хозяйства – плодовых оболочек овса (ПОО) [3]. Данный вид сырья сохраняет продовольственную безопасность страны и характеризуется массовостью, доступностью, ежегодной возобновляемостью и низкой себестоимостью. Ранее нашим коллективом плодовые оболочки овса использовались в качестве сырья для получения биоэтанола [4], кормового белка [5], нитратов целлюлозы [6].

В данной работе рассматриваются проблемы получения питательной среды методом ферментативного гидролиза, в качестве субстрата для которого используется про-

дукт азотнокислой обработки (ПАО) ПОО. Предварительная обработка сырья в одну стадию разбавленным раствором азотной кислоты позволяет достичь высоких результатов, поскольку химическое воздействие сочетает три функции: гидролиза, нитрования и окисления. Этот способ многократно апробирован в условиях опытно-промышленного производства ИПХЭТ СО РАН. Ферментативный гидролиз полученных субстратов осуществляется промышленно доступными ферментными препаратами. Успешность проведения ферментативного гидролиза в производственных условиях не является очевидной. Это связано с необходимостью тщательной промывки субстратов от ингибиторов [7] на стадии предварительной химической обработки, а также с сохранением микробиологической чистоты биотехнологических процессов, проводимых в емкостном оборудовании.

Следует отметить, что процесс получения питательной среды характеризуется сложностью масштабирования, как на этапе предварительной обработки сырья [8], так и на этапе ферментативного гидролиза [9]. В Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. № 1853п-П8 от 24 апреля 2012 г. обращается внимание на то, что в России полностью отсутствует система «масштабирования» научных биотехнологических разработок для целей промышленного производства и другие элементы биоэкономики, необходимые для преобразования научных знаний в коммерческие продукты. Таким образом, исследования возможности получения питательной среды в производственных условиях для биосинтеза БЦ являются актуальными.

Целью данной работы являлось исследование преодоления проблем получения питательной среды в производственных условиях из плодовых оболочек овса для биосинтеза бактериальной целлюлозы.

Материалы и методы исследования

Определение основных характеристик сырья до и после предварительной химической обработки (массовые доли (м.д.) целлюлозы по Кюршнеру, пентозанов, кислотонерастворимого лигнина, зола) проводилось по стандартным методикам [10]. Нарботка субстратов проводилась на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН согласно действующей нормативной документации.

Одностадийная обработка плодовых оболочек овса проводилась 4%-ным раствором азотной кислоты при атмосферном давлении, температуре 90–96 °С в течение 4 ч, в результате был получен продукт азотнокислой обработки (ПАО) [4].

После азотнокислой обработки субстрат был промыт до нейтральной реакции и отжат на фильтпрессе. Ферментативный гидролиз проводился в ацетатном буфере и водной среде в колбах Эрленмейера

емкостью 0,5 л при концентрации субстрата 33,3 г/л, в водной среде при концентрации субстрата 60,0 г/л в трех вариантах: в колбах Эрленмейера емкостью 1 л, ферментере объемом 11 л и емкостном оборудовании объемом 63 л. Процесс ферментативного гидролиза проводился при непрерывном перемешивании с частотой колебаний 150 мин⁻¹ в шейкере-инкубаторе «Unimax 1010». В работе использовались промышленно доступные ферментные препараты «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск) и «Брюзайм ВГХ» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diadic International Inc.», США). Препарат «Целлолюкс-А» позиционируется на рынке как целлюлаза для расщепления некрахмалистых полисахаридов, «Брюзайм ВГХ» – как гемицеллюлаза. Температура ферментативного гидролиза составила 46–47 °С. Продолжительность ферментативного гидролиза составила 24 ч, при этом активная кислотность поддерживалась вручную на уровне 4,7–4,9.

Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу определялась спектрофотометрическим методом с помощью реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты на «UNICO UV-2804». Выход редуцирующих веществ (РВ) от массы субстрата рассчитан с учетом коэффициента 0,9, обусловленного присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

Результаты исследования и их обсуждение

Химический состав сырья до и после обработки представлен в табл. 1.

Одностадийная обработка сырья раствором азотной кислоты приводит к следующим изменениям по сравнению с нативным сырьем: повышению массовой доли целлюлозы от (44,7 ± 0,2)% до (79,2 ± 0,3)%, снижению массовой доли пентозанов с (30,8 ± 0,2)% до (9,2 ± 0,2)% и уменьшению массовой доли кислотонерастворимого лигнина с (18,1 ± 0,1)% до (13,8 ± 0,1)%, при этом повысилась зольность. Продукт азотнокислой обработки ПОО представляет собой многокомпонентную смесь, включающую различные примеси, в том числе растворимые в осажаренном субстрате продукты окислительного нитрования лигнина. Однако достаточно высокая сумма гидролизующих компонентов позволяет предположить высокую реакционную способность субстрата к ферментативному гидролизу и успешность дальнейшего синтеза бактериальной целлюлозы.

Работы по исследованию ферментативного гидролиза в ацетатном буфере ПАО ПОО [11] позволили сделать оптимистический прогноз относительно возможности получения питательной среды в производственных условиях для биосинтеза бактериальной целлюлозы – для начальной концентрации ПАО ПОО 33,3 г/л выход РВ составил 91,4% от массы субстрата.

Таблица 1

Химический состав сырья до и после предварительной химической обработки

Наименование	Массовая доля, %				Сумма гидролизуемых компонентов, %
	целлюлозы	пентозанов	лигнина	зола	
Плодовые оболочки овса	44,7 ± 0,2	30,8 ± 0,2	18,1 ± 0,1	4,6 ± 0,1	75,5 ± 0,3
Продукт азотнокислой обработки	79,2 ± 0,3	9,2 ± 0,2	13,8 ± 0,1	8,2 ± 0,1	88,4 ± 0,3

Таблица 2

Результаты проведения ферментативного гидролиза в лабораторных условиях (колбах Эйленмейера) в ацетатном буфере и водной среде, а также при масштабировании процесса в ферментере и в производственных условиях (емкостном оборудовании)

Показатель	Колба, объем 0,5 л	Колба, объем 0,5 л	Колба, объем 1 л	Ферментер, объем 11 л	Емкостное оборудование, объем 63 л
Среда для ферментативного гидролиза	ацетатный буфер [11]	водная среда			
Начальная концентрация субстрата, г/л	33,3		60,0		
Концентрация РВ, г/л	33,8 ± 0,2	32,3 ± 0,2	48,8 ± 0,2	42,8 ± 0,2	44,0 ± 0,2
Выход РВ, % от массы субстрата	91,4 ± 0,3	87,3 ± 0,3	73,3 ± 0,3	64,3 ± 0,2	66,0 ± 0,2

Опыты по исследованию ферментативного гидролиза были проведены поэтапно. Результаты проведения ферментативного гидролиза в лабораторных условиях (колбах Эйленмейера) в ацетатном буфере и водной среде, а также при масштабировании процесса в ферментере и в производственных условиях (емкостном оборудовании) отражены в табл. 2 и на рисунке.

Результаты, полученные в лабораторных условиях, а также при дальнейшем масштабировании процесса в ферментере и в емкостном оборудовании, демонстрируют схожий характер кривой зависимости концентрации РВ от продолжительности процесса ферментативного гидролиза (рисунок). Кривые накопления концентрации РВ показывают, что концентрация РВ увеличивалась экспоненциально и через 24 ч от начала ферментативного гидролиза достигла значений от (32,3 ± 0,2) г/л до (48,8 ± 0,2) г/л.

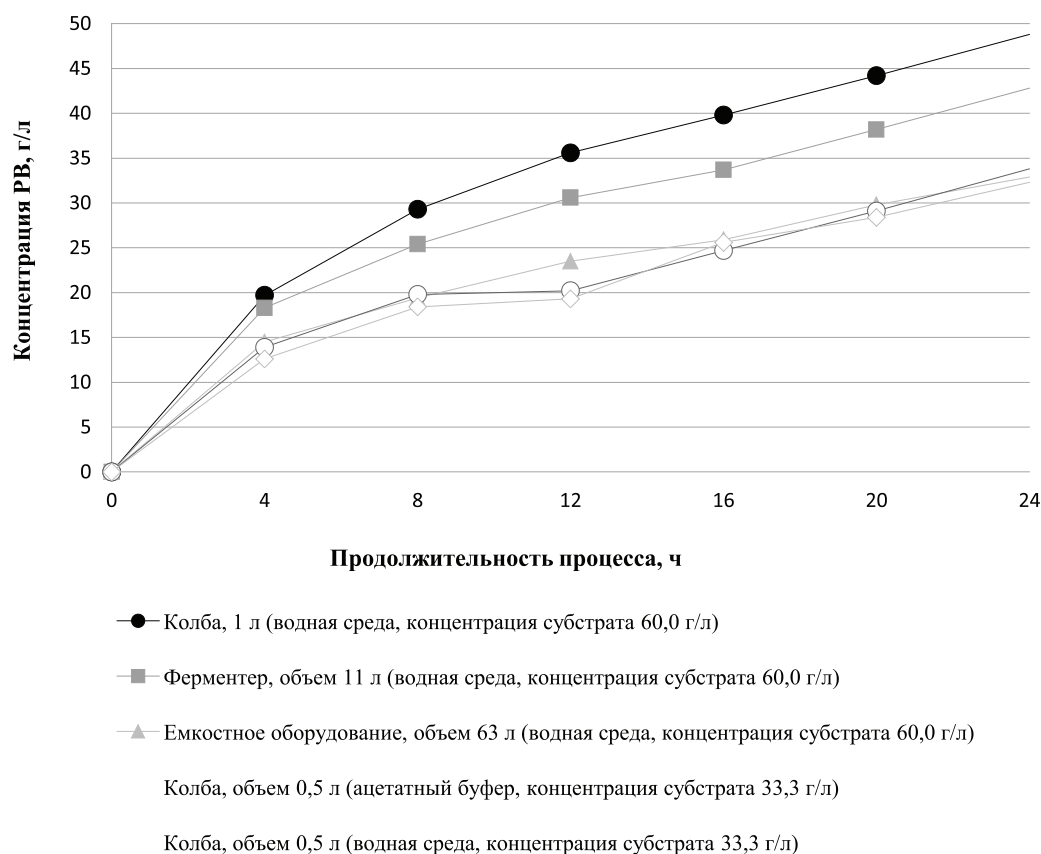
Концентрация РВ, полученная в результате ферментативного гидролиза в ацетатном буфере и водной среде (колбы объемом 0,5 л), практически совпадает и равна (33,8 ± 0,2) г/л и (32,3 ± 0,2) г/л соответственно. Это связано с тем, что проведение ферментативного гидролиза в водной среде в небольших объемах не осложнено трудностями корректировки активной кислотности, по сравнению с осуществлением процесса в емкостном оборудовании.

При получении питательной среды в емкостном оборудовании концентрация РВ снижается на 4,8 г/л по сравнению с результатами, полученными в колбе Эйленмейера (объем 1 л) и на 2,8 г/л по сравнению с ферментером. Это объясняется не только коле-

баниями активной кислотности в процессе ферментативного гидролиза, но и с недостаточной промывкой продукта азотнокислой обработки ПОО от ингибиторов на стадии предварительной химической обработки сырья, а также снижением активной кислотности в процессе ферментативного гидролиза и сложностью ее корректировки в производственных условиях вручную.

Проведение ферментативного гидролиза в ацетатном буфере при начальной концентрации субстрата 33,3 г/л (колба Эйленмейера, объем 0,5 л) позволяет достичь максимального выхода РВ от массы субстрата – (91,4 ± 0,3)%. Переход от ацетатного буфера при ферментативном гидролизе к водной среде является важным этапом для дальнейшего биосинтеза бактериальной целлюлозы, так как ацетатный буфер может оказывать ингибирующее действие на уксуснокислые бактерии и биосинтез бактериальной целлюлозы из-за избытка ацетат-ионов. Однако осуществить ферментативный гидролиз в водной среде сложнее по сравнению с ацетатным буфером, так как в процессе гидролиза снижается активная кислотность среды, что негативно влияет на биохимическую стабильность ферментных препаратов.

При ферментативном гидролизе в водной среде в колбе при начальной концентрации субстрата 33,3 г/л выход РВ снижается на 4,1% и составляет (87,3 ± 0,3)% от массы субстрата, что связано с колебаниями активной кислотности при проведении процесса, так как в процессе ферментативного гидролиза наблюдается подкисление, а поскольку рН поддерживался на заданном уровне вручную, то периодически рН отклонялся.



Зависимость концентрации РВ от продолжительности процесса ферментативного гидролиза в ацетатном буфере и водной среде

При дальнейшем увеличении объема ферментативного водного гидролизата и начальной концентрации субстрата до 60 г/л, происходило еще большее снижение выхода РВ: в колбе объемом 1 л выход РВ составил $(73,3 \pm 0,3)\%$ от массы субстрата, а при переходе к ферментеру объемом 11 л выход снизился еще на 9% и составил $(64,3 \pm 0,2)\%$ от массы субстрата. Таким образом, переход от ацетатного буфера к водной среде и дальнейшее масштабирование процесса ферментативного гидролиза по объему при одновременном повышении концентрации субстрата является сложной проблемой, требующей постоянного контроля активной кислотности на протяжении всего процесса. В связи с этим при переходе в производственные условия для реализации ферментативного гидролиза ПАО ПОО в емкостном оборудовании объемом 63 л было принято решение о ежечасном контроле и корректировке активной кислотности. Это позволило достичь положительных результатов – в емкостном оборудовании был получен выход РВ $(66,0 \pm 0,2)\%$ от массы субстрата.

Выполненные исследования свидетельствуют о том, что для получения питательной среды в производственных условиях для последующего биосинтеза бактериальной целлюлозы возможно применение одностадийной химической обработки сырья раствором азотной кислоты.

В работе [12] показано, что максимальный выход БЦ (8,7–9,0%) обеспечивается при начальной концентрации глюкозы в среде 20–25 г/л. Таким образом, можно сделать вывод, что полученная ферментативным способом в производственных условиях питательная среда с концентрацией РВ $(44,0 \pm 0,2)$ г/л из сельскохозяйственных отходов – плодовых оболочек овса, предварительно обработанных разбавленным раствором азотной кислоты, может быть пригодна для дальнейшего биосинтеза бактериальной целлюлозы.

Выводы

Исследована возможность получения питательной среды в производственных условиях ферментативным способом из продукта азотнокислой обработки пло-

довых оболочек овса в водной среде для биосинтеза бактериальной целлюлозы. По результатам работы выявлено, что при переходе от ацетатного буфера к водной среде в процессе ферментативного гидролиза при начальной концентрации субстрата 33,3 г/л наблюдается снижение концентрации редуцирующих веществ от $(33,8 \pm 0,2)$ г/л до $(32,3 \pm 0,2)$ г/л или на 4,1% в пересчете на выход РВ от массы субстрата. Показано, что при поэтапном масштабировании ферментативного гидролиза по объему в водной среде при начальной концентрации субстрата 60,0 г/л происходит снижение выхода РВ: в колбе объемом 1 л выход РВ составил $(73,3 \pm 0,3)\%$ от массы субстрата, а при переходе к ферментеру объемом 11 л выход снизился еще на 9% и составил $(64,3 \pm 0,2)\%$ от массы субстрата. Постоянный контроль и корректировка активной кислотности в емкостном оборудовании позволили получить выход РВ $(66,0 \pm 0,2)\%$ от массы субстрата. Таким образом, установлено, что ферментативным гидролизом в водной среде при использовании ферментных препаратов Целлолюкс-А и Брюзайм ВГХ в производственных условиях можно получить питательную среду для последующего биосинтеза бактериальной целлюлозы из плодовых оболочек овса одностадийно обработанных раствором азотной кислоты.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Список литературы

1. Schumann A.D. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes / A.D. Schumann, J. Wippermann, O.D. Klemm, F. Kramer, D. Koth, H. Kosmehl, T. Wahlers, S. Salehi-Gelani // *Cellulose*. – 2009. – № 16. – P. 877–885.
2. Hestrin S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose / S. Hestrin, M. Schramm // *Journal of Biochemistry*. – 1954. – № 58. – P. 345–352.
3. Гладышева Е.К. Биосинтез бактериальной целлюлозы на ферментативном гидролизате технической целлюлозы из плодовых оболочек овса / Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 140–146.
4. Байбакова О.В. Масштабирование на опытно-производстве процесса получения биоэтанола из плодовых оболочек овса, предобработанных разбавленной азотной кислотой / О.В. Байбакова, Е.А. Скиба, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // *Катализ в промышленности*. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 145–152.
5. Скиба Е.А. Биосинтез кормовых дрожжей на средах, полученных из плодовых оболочек овса / Е.А. Скиба // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2016. – № 3. – С. 140–142.
6. Якушева А.А. Нитраты целлюлозы из нового источника целлюлозы – плодовых оболочек овса / А.А. Якушева // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 8–2. – С. 360–364.
7. Скиба Е.А. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов в зависимости от способа их подготовки / Е.А. Скиба, Т.О. Момот, Н.В. Бычин, В.Н. Золотухин // *Ползуновский вестник*. – 2013. – № 3. – С. 197–202.
8. Agrawal R. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation / R. Agrawal, A. Satlewal, R. Gaur, A. Mathur, R. Kumar, R.P. Gupta, D.K. Tuli // *Biochemical Engineering Journal*. – 2015. – № 102. – P. 54–61.
9. Baeyens J. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol / J. Baeyens, Q. Kang, L. Appels, R. Dewil, Lv. Yongqin, T. Tan // *Progress in Energy and Combustion Science*. – 2015. – № 47. – P. 60–88.
10. Оболенская А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – М.: Экология, 1991. – 320 с.
11. Budaeva V.V. Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials at Different Concentrations of the Substrate / V.V. Budaeva, E.A. Skiba, O.V. Baibakova, E.I. Makarova, S.E. Orlov, A.A. Kukhlenko, E.V. Udoratina, T.P. Shcherbakova, A.V. Kuchin, G.V. Sakovich // *Catalysis in Industry*. – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 81–87.
12. Гладышева Е.К. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* / Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба // *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. – 2015. – № 3. – С. 149–156.