

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ОБРАБОТКА ЛЬНЯНОЙ КОСТРЫ В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ

А.В. Уткина, Е.В. Ожимкова

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Трансформация лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол решает две важные задачи: утилизируются трудно разлагаемые в естественных условиях крупнотоннажные отходы, а также открываются возможности для получения биоэтанола второго поколения с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В работе подобран оптимальный состав мультиэнзимной композиции (МЭК) для обработки льняной костры на основе трех коммерческих препаратов; обоснована необходимость предварительной обработки лигноцеллюлозного материала и оптимальная продолжительность стадии раздельного ферментативного гидролиза перед совмещением со спиртовым брожением.

Ключевые слова: лигноцеллюлозные материалы, биоэтанол, ферментативный гидролиз, оптимизация.

Стремительное истощение запасов традиционных энергетических источников, тенденции перехода на альтернативные зеленые технологии синтеза ряда органических веществ, активное внедрение подходов по организации безотходных производств инициируют исследования в области трансформации лигноцеллюлозных материалов в ценный продукт широкого потребления – биоэтанол, важность и значимость которого для мировой и российской экономике ежегодно возрастают [1].

Промышленное получение этанола может быть осуществлено двумя путями: биотехнологическая трансформация углеводсодержащих материалов, в основе которой лежит способность отдельных видов микроорганизмов к спиртовому брожению, и катализитическая гидратация этилена (химический способ). Объем этанола, получаемого химическим синтезом, постоянно сокращается, что связано с существенными недостатками технологии, среди которых выделяют: высокую стоимость материалов (этилена) и низкую конверсию этилена в целевой продукт (менее 5%). Кроме того, в последние десятилетия государственная поддержка направлена на разработку и внедрение преимущественно биотехнологических проектов.

Анализ рынка биоэтанола показал, что общий объем производства спирта в мире в 2023 году составил более 150 млрд. литров, при этом существенная доля этого объема приходится на производственные мощности нескольких стран, которые на протяжении длительного времени сохраняют конкурентное преимущество [2].

На сегодняшний день в России не функционирует ни один специализированный завод по производству биоэтанола, при этом производственные мощности страны, развитая научная база, доступные сырьевые ресурсы и потребность во внедрении ресурсосберегающих технологий создают благоприятные условия для разработки и реализации масштабных биотехнологических проектов по производству биоэтанола.

Сырьевые источники, используемые для синтеза биоэтанола, разнообразны и зависят в основном от климатических условий региона, в котором организовано производство: кукуруза (Соединенные Штаты Америки); сахарный тростник (Бразилия, Колумбия, Эквадор); пшеница, ячмень, рожь (Европейский Союз) и др. Таким образом, сырье представляет собой сахаро- и крахмалосодержащие культуры преимущественно пищевого назначения [3].

Альтернативными сырьевыми источниками, использование которых не сопряжено с риском истощения запасов продовольственной продукции, являются лигноцеллюлозные материалы. В отличие от пищевого крахмалосодержащего сырья, лигноцеллюлозные материалы

характеризуются широкой распространностью и доступностью, обилием (более 50 % биомассы в мире), возобновляемостью, низкой себестоимостью [1].

Традиционной сельскохозяйственной культурой Тверской области (а также других регионов Центрального и Западно-Сибирского районов России) является лен-долгунец. Согласно данным на 2024 год, в регионе активно функционируют более двадцати льносеющих предприятий, шесть заводов по первичной переработке льна, два предприятия по переработке льноволокна и две льносеменоводческие станции. Процесс переработки льняной тресты характеризуется накоплением большого количества отходных материалов, которые не находят прямого практического применения и лишь частично разлагаются в природных условиях.

Одним из крупнотоннажных агропромышленных отходов является льняная костра, которая представляет собой измельченные одревесневшие части стеблей льна и составляет примерно 60-70% от массы переработанной льняной тресты.

Ключевыми технологическими барьерами в производстве биоэтанола второго поколения, влияющими на экономическую составляющую проектных решений, является сложная структура лигноцеллюлозного сырья (формирование устойчивого биокомпозиционного материала из полимеров, входящих в состав матрицы растительного материала), низкие концентрации и выход биоэтанола, неспособность традиционных культур микроорганизмов сбраживать пятиуглеродные сахара и др [2].

Основная цель исследований, которые ведутся в направлении улучшения технологических и экономических показателей производства биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья, – увеличение выхода целевого продукта и снижение производственных затрат, например, путем оптимизации ключевых параметров процесса.

Длительное время на отечественных предприятиях по производству биоэтанола деструкция биокомпозиционного материала осуществлялась посредством гидролиза концентрированной или разбавленной кислотой, что имело ряд существенных недостатков: повреждение целостности не только экранирующих, но и целевых полисахаридов; необходимость подбора дорогостоящих материалов для изготовления оборудования, контактирующего с кислотами; накопление в среде фурфуроловых соединений, подавляющих рост микроорганизмов на стадии ферментации. Использование ферментных препаратов для обработки льняной костры позволяет вести процесс в мягких условиях без склонности к коррозии или к образованию ингибиторов [3].

Фактически коммерческий энзимный препарат для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы представляет собой смесь нескольких различных видов ферментов, называемых целлюлазами, выделенных из соответствующих микроорганизмов. Эти ферменты расщепляют гликозидные связи в углеводах. В отличие от гемицеллюлозы, которая относительно легко подвергается гидролизу, целлюлоза имеет кристаллические области, оказывающие сопротивление деполимеризации. Ферменты, способные гидролизовать целлюлозу до мономерных звеньев (глюкозы), представляют собой мультиферментные комплексы, состоящие в основном из трех различных энзимов, а именно: эндо-1,4- β -D-глюканаза (КФ 3.2.1.4; случайным образом разрывает межмолекулярные связи в целлюлозе); экзо-1,4- β -D-глюканаза/экзоцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91; отщепляет мономеры и димеры с конца цепи целлюлозы); β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.21; гидролизует целлобиозу и другие короткие олигомеры целлюлозы в мономеры глюкозы).

В качестве дополнительных ферментов, облегчающих доступ целлюлаз к поверхности целлюлозы за счет деструкции ксиланов, являются ферменты ксиланазного комплекса. Обычно комплекс содержит эндо-1,4- β -ксиланазы, β -ксилозидазы, α -L-арабинофуранозидазу и ацетилксиланэстеразу. Для составления мультиэнзимной композиции (МЭК) в данной работе были применены следующие ферментные препараты: «Целлюлаза», «Ксиланаза», «Пектиназа» (растворимый порошок, ООО Торговый дом «Биопрепарат», Россия). В качестве сырья для получения гидролизата моносахаридов в работе исследован многотоннажный отход агропромышленного комплекса Тверской области – костра льна. Отходы переработки льняного волокна предоставлены ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур».

Характеристика химического состава льняной костры не постоянна и варьируется в зависимости от региона произрастания культуры, методов сбора и хранения материалов. Однако, как и любое лигноцеллюлозное сырье, отходы льняной переработки представляют собой биокомпозицию на основе трех полимеров – целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина. В состав также входят водорастворимые вещества (3,4%), смолы (19%), жиры и воск. Насыпная объемная масса костры составляет 110 кг/м³, средняя влажность (в отвалах) – 15–20%, гигроскопичность – 24,8%, водопоглощение – 220–240% (по массе), температура возгорания – 210–220°C, теплопроводность (в сухом состоянии) – 0,04–0,037 Вт/(м×°C).

Химический состав исходного сырья и полученных из него методами предварительной обработки продуктов представлен в таблице 1 [4].

Таблица 1
Химический состав льняной костры и продуктов ее предварительной обработки

Образец	Массовая доля компонента в образце, %			
	Целлюлоза	Пентозаны	Лигнин	Зола
Костра льна	42,9±0,1	34,1±0,1	19,1±0,1	3,8±0,05
Продукт ультразвуковой обработки	83,6±0,1	9,3±0,1	5,4±0,1	1,7±0,05
Продукт азотнокислой обработки	79,8±0,1	9,2±0,1	8,9±0,1	2,1±0,05

Оптимизация состава мультиэнзимной композиции, с одной стороны, предполагает нахождение оптимального соотношения ферментных препаратов, а с другой – изучение кинетики ферментативного гидролиза при различных концентрациях МЭК и обеспечение повышения выхода редуцирующих веществ (в т.ч. и глюкозы). Ферментативный гидролиз субстрата проводился в 0,1 М ацетатном буферном растворе (рН 5,0); начальная концентрация льняной костры – 50,0 г/л по сухим веществам, температурный режим – (50±0,1)°C, скорость перемешивания – 150 об/мин. Экспериментально установлено, что максимальный конечный выход редуцирующих веществ (36,3 г/л) в гидролизате достигается при соотношении ксиланазы:пектиназы:целлюлазы 1/4:1/2:1/4. Концентрации ферментных препаратов: «Ксиланаза» – 17,5; «Пектиназа» – 35; «Целлюлаза» – 17,5 мг/г субстрата.

Предварительная обработка лигноцеллюлозного материала является необходимым этапом в цикле технологических операций, цель которых – производство этанола. Сравнивая два наиболее часто описываемых в литературе метода, установлено, что ультразвуковая обработка – наиболее эффективная технология предварительной обработки материала (с точки зрения увеличения степени аморфности материала и повышения чувствительности полисахаридов к действию ферментных препаратов). Микроскопирование лигноцеллюлозного материала, подвергшегося действию ультразвука/химических реагентов (разбавленная азотная кислота), показывает, что в материале увеличивается количество аморфных областей, которые легче подвергаются гидролизу по сравнению с кристаллическими формами. Кроме того, увеличивается пористость волокнистых матриц, что способствует проникновению в структуру химических веществ и ферментов.

После нахождения оптимального соотношения ферментов в составе МЭК с целью повышения эффективности ферментативного гидролиза проводилось исследование кинетики гидролитического расщепления льняной костры при различных концентрациях мультиэнзимной композиции с сохранением найденного оптимального соотношения ферментов. Наибольший выход редуцирующих веществ наблюдался при концентрации ферментной композиции 210 мг/г субстрата, что соответствует 3-х кратному увеличению концентраций ферментных препаратов по сравнению с исходными (при их оптимальном соотношении в МЭК). Зависимости концентрации редуцирующих веществ и глюкозы от продолжительности ферментативного гидролиза при концентрации мультиэнзимной композиции 210 мг/г субстрата (продукт ультразвуковой обработки льняной костры) представлены на рис. 1-2.

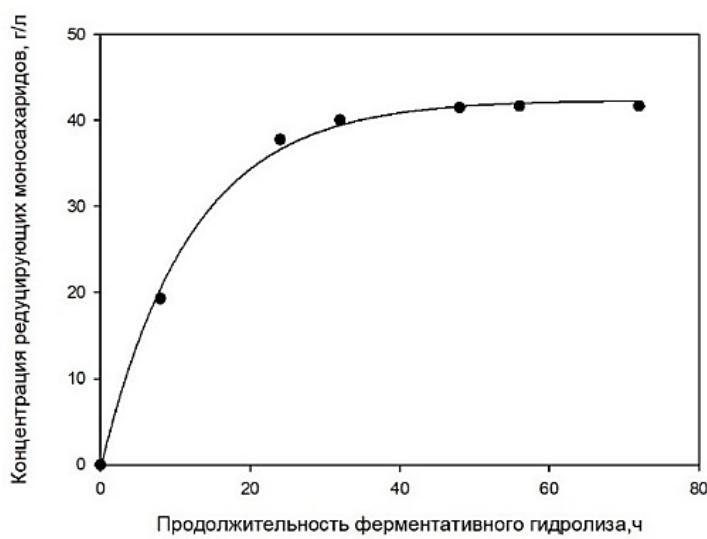


Рис. 1. Зависимость содержания редуцирующих веществ в гидролизате от продолжительности ферментативного гидролиза

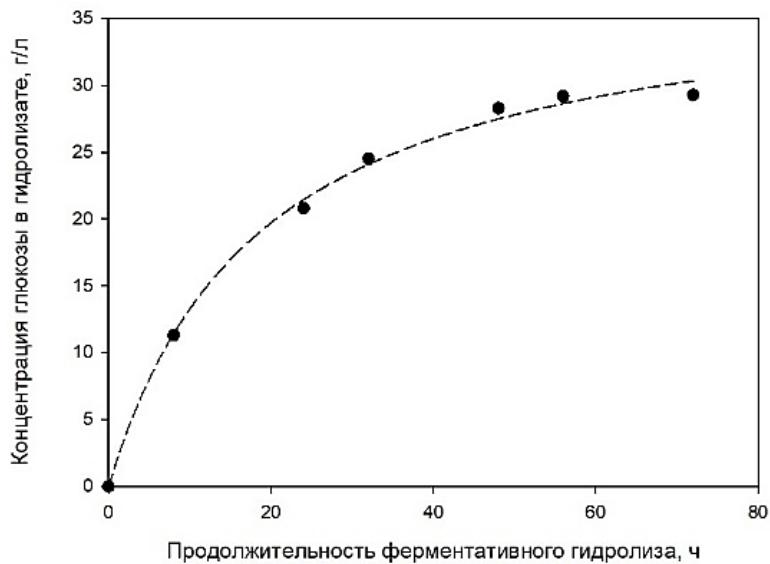


Рис. 2. Зависимость содержания глюкозы в гидролизате от продолжительности ферментативного гидролиза

Как видно из данных, представленных на рис. 1-2, накопление глюкозы в гидролизате идет медленнее, чем общее накопление редуцирующих веществ, однако доля глюкозы не остается постоянной и по мере протекания ферментативного гидролиза возрастает: через 24 ч после внесения ферментных препаратов доля глюкозы составляет 51,4% от общего количества редуцирующих веществ в гидролизате; а через 72 ч содержание декстрозы увеличивается до 70,3%. Наблюдаемая зависимость, вероятно, связана с особенностями механизма реакции ферментативного расщепления целлюлозы до глюкозы: на первом этапе целлюлоза превращается в дисахарид – целлобиозу; на втором – дисахарид гидролизуется до моносахаридного звена – глюкозы. Последняя стадия характеризуется низкой скоростью и является лимитирующей для процесса [5].

Одной из характеристик процесса ферментативного гидролиза, требующей обязательного обоснования при разработке технологии биосинтеза этанола, является продолжительность стадии перед совмещением со спиртовым брожением. Оптимальная продолжительность стадии ферментативного гидролиза является результатом учета двух основных факторов: накопления в гидролизате редуцирующих веществ, реологических свойств получаемого сахарного сиропа. Первый фактор определяет возможность наиболее полного сбраживания исходных полисахаридов сырья в целевой продукт – биоэтанол, последний влияет на процесс развития дрожжевой культуры (скорость адаптации и синтеза этанола, эффективность утилизации углеводов, физиологическое состояние дрожжей и др.).

Из данных, представленных на рис. 1-2, видно, что увеличение продолжительности стадии ферментативного гидролиза (более 48 ч) не приводит к существенно большему накоплению редуцирующих веществ в растворе: концентрация моносахаридов постепенно увеличивается до некоторого предельного значения, после чего выходит на плато и остается постоянной. В серии экспериментов, направленных на определение оптимальной продолжительности стадии отдельного гидролиза на основании физиологического состояния дрожжевой культуры, по истечении запланированного времени в реакционную массу вносились засевные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Сбраживание, совмещенное с осахариванием, проводилось в анаэробных статистических условиях в течение 5 суток.

Продолжительность стадии ферментативного гидролиза 8-15 часов создаст неблагоприятные условия для жизнедеятельности дрожжей, что объясняется реологическими свойствами среды, обдающей высокой вязкостью среды вследствие большого количества негидролизованного субстрата. При 72-часовом несовмещенном гидролизе концентрация редуцирующих веществ в гидролизате являлась максимальной, однако общее количество дрожжевых клеток снижалось. Это объясняется ингибированием процесса ферментативного гидролиза высокими концентрациями моносахаридов (ингибирование продуктом). В опытах с продолжительностью ферментативного гидролиза 24-48 часов концентрация редуцирующих веществ на момент внесения дрожжей не являлась максимальной, однако в процессе спиртового брожения благодаря утилизации углеводов дрожжами, ферментативный гидролиз возобновлялся и протекал одновременно с ферментацией, что способствовало более высокому выходу глюкозы на 1 т льняной костры.

Библиографический список

1. Tsegaye B. Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect. / B. Tsegaye, C. Balomajumder, P. Roy // Bull Natl Res Cent. – 2019. – №43 (51).
2. Биоэтанол: технологии получения из возобновляемого растительного сырья и области применения / П.Е. Матковский [и др.] // Альтернативная энергетика и экология. – 2010. - №6. – С. 95–105.
3. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. / A. Basic [et al.] // Food technology and biotechnology. – 2018. – №3. – P. 289–311.
4. Оболенская А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – Москва: Экология, 1991. – 320 с.
5. Миронова Г.Ф. Повышение эффективности процесса получения биоэтанола из шелухи овса: специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»: диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Миронова Галина Федоровна; Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева. – Москва, 2021. – 118 с.