

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБА ПЕРЕРАБОТКИ ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО И ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, Э.М. Сульман, И.П. Шкилева, О.С.Бурматова

Наталья Валерьевна Лакина*, Валентин Юрьевич Долуда, Эсфирь Михайловна Сульман, Ирина Павловна Шкилева, Ольга Сергеевна Бурматова

Кафедра биотехнологии и химии, Тверской государственной технической университета, наб. А. Никитина 22, г. Тверь, Российская Федерация, 170026

E-mail: lakina@yandex.ru*, doludav@yandex.ru, sulman@online.tver.ru, shkileva@yandex.ru, burmatova_olia.boss@mail.ru

В работе приведены результаты исследования получения биоэтанола и других ценных продуктов гидролитической трансформацией торфа. Определены факторы устойчивости целлюлозолигнинового сырья (торф и древесные опилки) к действию различных гидролизующих агентов. Полученные экспериментальные данные указывают на эффективность предобработки образцов торфа и древесных опилок H_2SO_4 (90%), которая выражается в наиболее высоком выходе редуцирующих веществ в ходе гидролиза образцов, по сравнению с результатами, полученными при предобработке H_2SO_4 с более низкой концентрацией. В работе приведены результаты гидролиза целлюлозосодержащего сырья различными способами, включая ферментативную обработку. В качестве ферментативного комплекса целлюлозолитических ферментов использовался отечественный ферментный препарат - Целловиридин, содержащий как экзо-, так и эндо-ферменты. Качественный и количественный анализ продуктов гидролиза целлюлозо- и лигнинсодержащего сырья проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Было установлено, что максимальная скорость накопления глюкозы (конечного продукта гидролитического процесса целлюлозолигнинового сырья) наблюдается при использовании образцов торфа и опилок, предобработанных H_2SO_4 (90%). В результате применения последующего ферментативного гидролиза целлюлозолигнинового сырья с помощью препарата Целловиридин увеличилось количество D-глюкозы в гидролизате по сравнению с ее количеством на стадии предобработки H_2SO_4 . Представлена сравнительная характеристика эффективности используемого сырья по выходу целевого продукта - D-глюкозы в процессе комбинированного гидролиза целлюлозного и лигнинсодержащего сырья, максимальный выход моносахарида наблюдался при гидролизе образцов торфа. Полученный гидролизный раствор, после соответствующей нейтрализации, может быть использован для получения этанола и бактериальных сред в микробном синтезе продуктов, применяемых в животноводстве, а также в фармацевтической практике.

Ключевые слова: целлюлоза, гидролиз, ферменты, D-глюкоза, биоэтанол

STUDY OF METHOD OF PROCESSING CELLULOSIC AND LIGNIN-CONTAINING RAW MATERIALS USING CELLULOLYTIC ENZYMES

N.V. Lakina, V.Yu. Doluda, E.M. Sulman, I.P. Shkileva, O.S. Burmatova

Natalia V. Lakina*, Valentin Yu. Doluda, Esfir M. Sulman, Irina P. Shkileva, Olga S. Burmatova

Department of Biotechnology and Chemistry, Tver State Technical University, Nab. A. Nikitina, 22, Tver, 170026, Russia

E-mail: lakina@yandex.ru*, doludav@yandex.ru, sulman@online.tver.ru, shkileva@yandex.ru, burmatova_olia.boss@mail.ru

In the research the results of bioethanol and other valuable products formation are described during peat hydrolytic formation. The factors of cellulose-lignin raw materials (peat and wood sawdust) stability to the action of various hydrolyzing agents were determined. The obtained experimental data indicate the efficiency of peat and sawdust samples pre-treatment with H₂SO₄ (90 wt.%), which is expressed in the highest yield of reducing substances during hydrolysis of the samples, in comparison with the results obtained with H₂SO₄ pretreatment of a lower concentration. The article shows the results of cellulose-containing raw materials hydrolysis process study with various ways, including enzymatic treatment. Enzyme complex sample of Celloviridine, containing both exo-and endo-enzymes, was used. Qualitative and quantitative analysis of the cellulose-lignin-containing raw materials hydrolysis products was carried out using high-performance liquid chromatography. It was found that the maximum rate of glucose accumulation (the final product of the hydrolytic process of cellulose-lignin raw materials) was observed when using samples of peat and sawdust pretreated with H₂SO₄ (90wt.%). As a result of cellosulignin raw material subsequent enzymatic hydrolysis, the amount of D-glucose in the hydrolyzate increased with the help of the Celloviridin preparation in comparison with its amount in the H₂SO₄ pretreatment. A comparative characterization of the raw material efficiency for the yield of the desired product - D-glucose is shown. In the process of combined hydrolysis of cellulose and lignin-containing raw materials the maximum yield of the monosaccharide was observed during the hydrolysis of peat samples. After appropriate neutralization the resulting hydrolysis solution can be used to produce bioethanol and bacterial biomass in the microbial synthesis of products used for animal feed, as well as for pharmaceutical practice.

Key words: cellulose, hydrolysis, enzyme, D-glucose, bioethanol

Для цитирования:

Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Сульман Э.М., Шкилева И.П., Бурматова О.С. Изучение способа переработки целлюлозного и лигнинсодержащего сырья с применением целлюлозолитических ферментов. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2018. Т. 61. Вып. 1. С. 78–83

For citation:

Lakina N.V., Doluda V.Yu., Sulman E.M., Shkileva I.P., Burmatova O.S. Study of method of processing cellulosic and lignin-containing raw materials using cellulolytic enzymes. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2018. V. 61. N 1. P. 78–83

ВВЕДЕНИЕ

Продолжающееся истощение запасов традиционных источников органического топлива способствует повышению интереса к получению его синтетических аналогов из возобновляемого сырья. Биотопливо второго поколения, получаемое из непищевых источников углеводов и целлюлозо-лигнинового (ЦЛ) сырья, может стать альтернативой нефтяным дистиллятам и природному газу.

Современные способы получения этанола и биогаза из целлюлозолигнинового сырья обладают целым рядом недостатков. Среди основных недостатков необходимо отметить низкий выход целевых продуктов, большое количество агрессивных реагентов и, как следствие, сложность аппаратного оформления. Преимуществами преобразования ЦЛ сырья с получением этанола является возможность использования как частично возобновляемых ресурсов – таких как торф, так и отходов различных отраслей промышленности [1, 2].

Устойчивость природных ЦЛ-материалов к действию различных гидролизующих агентов определяется в основном двумя факторами:

- 1) защитной матрицей, образованной лигнином и гемицеллюлозой, в которую погружены целлюлозные фибриллы;
- 2) кристалличностью природной целлюлозы.

Целлюлоза (рис. 1) представляет собой полимер простого сахара, глюкозы, ковалентно связанного β-1,4-связями (рис. 1).

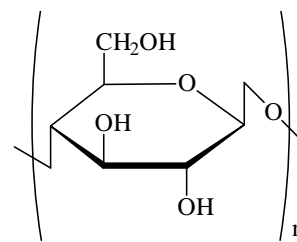


Рис. 1. Химическая структура целлюлозы
Fig. 1. Chemical structure of cellulose

В древесине к трудногидролизуемым полисахаридам относится целлюлоза как кристаллический полимер, целлюлозаны – гемицеллюлозы, совместно закристаллизованные с целлюлозой в паракристаллической части ее микрофибрилл. Целлюлозаны – это те же самые гемицеллюлозы, т.е. ксиланы и маннаны, но гидролизующиеся только вместе с целлюлозой и труднее извлекаемые щелочами.

Реакции полного гидролиза полисахаридов древесины можно представить следующим уравнением (условным для гексозанов), представленным на схеме 1:

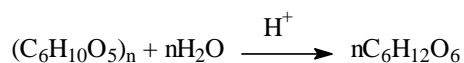


Схема. Реакция полного гидролиза полисахаридов древесины
Scheme. Reaction of complete hydrolysis of wood polysaccharides

Торф, древесина, отходы сельхозпроизводства, зеленые культуры и коммунально-бытовые твердые отходы рассматриваются в качестве источников получения этанола. Строение древесины представлено на рис. 2. Как видно из рисунка, ЦЛ-материалы прежде всего состоят из целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. После преобразования целлюлозы в глюкозу, ее легко ферментировать дрожжами до этанола.

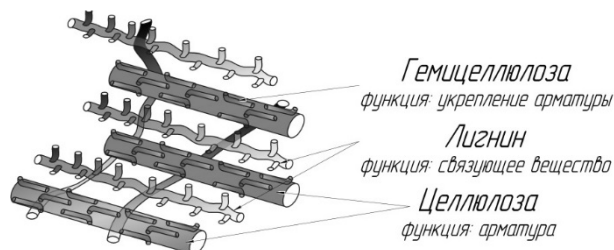


Рис. 2. Строение древесины
Fig. 2. Structure of wood

Первичная гидролитическая переработка исходных лигноцеллюлозных субстратов производится: а) физическими методами; б) химическими методами; в) биохимическими методами, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Выход биотрансформируемых сахаров остается небольшим, что связано с образованием побочных продуктов (фурфурол, фурфуриловый спирт, уксусная кислота, ацетальдегид и др). Химический гидролиз ЦЛ-сырья в настоящее время является самым распространенным и широко используемым видом первичной гидролитической переработки биомассы [3].

Однако использование сильных кислот предъявляет особые требования к оборудованию, а также ведет к необходимости очистки большого количества сточных вод. Перспективной альтернативой химического гидролиза ЦЛ-сырья является

биотехнологический способ гидролитической переработки ЦЛ-сырья, который включает применение как микроорганизмов, так и ферментов.

Большое число микроорганизмов продуцируют ферменты, гидролизующие β-связанные глюканы. К этим ферментам относятся эндоглюканызы, целлобиогидролазы и β-глюкозидазы. Эндоглюканызы расщепляют целлюлозный полимер в случайных положениях, делая его доступным для воздействия целлобиогидролаз. Целлобиогидролазы последовательно высвобождают молекулы целлобиозы с концов целлюлозного полимера. Целлобиоза представляет собой водорастворимый димер глюкозных остатков, связанных β-1,4-связью; β-глюкозидазы гидролизуют целлобиозу до глюкозы. Глубокий гидролиз целлюлозы осуществляется в результате согласованного действия полиферментной системы [4, 5].

Гидролитическая трансформация биомассы чаще всего производится при помощи микроорганизмов таких как *Trichoderma viride*, *Aspergillus terreus* при температуре 35-45 °С, при этом процесс может проводиться на протяжении 3-30 дней, а степень гидролиза сырья составляет до 75-80% [6].

Данные литературных источников указывают на актуальность нахождения новых высокоактивных штаммов микроорганизмов, способных проводить лигно и целлюлозолитическую трансформацию исходного сырья, а также более активных продуцентов биоэтанола и биогаза.

В данной работе изучалась эффективность процесса предобработки 70% и 90% раствором серной кислоты образцов торфа и древесных опилок. На последующем этапе биотрансформации образцов торфа и древесных опилок изучалась эффективность отечественного ферментного препарата Целловиридин, представляющий собой концентрат культуральной жидкости штаммов гриба *Trichoderma viride*. Препарат содержит комплекс целлюлолитических ферментов, включающий гемицеллюлазы, ксиланазы, β-глюкозидазы и другие ферменты, способные гидролизовать растительные полисахариды с образованием различных видов олигосахаридов, редуцирующих сахаров, в том числе и глюкозы. Эффективность процесса гидролиза оценивалась по количеству образовавшейся D-глюкозы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для проведения исследований использовался верховой торф 30% влажности с 15% степенью разложения, торф отбирался с месторождения Васильевский мох, Калининского района, Тверской области. Также были использованы опилки 30% влажности лиственных и хвойных пород деревьев; для предобработки образцов торфа и опилок использовалась H₂SO₄ (х.ч., 70%, 90%), препарат ферментный Целловиридин Г20х по ТУ 64-13-11-87.

Степень гидролитической эффективности применяемого метода переработки целлюлозного и лигнинсодержащего сырья оценивали методом отбора проб, определяя содержание редуцирующих веществ (РВ), глюкозы и сухого остатка.

Анализ пробы проводили методом ВЭЖХ (анализатор UltiMate 3000) с использованием рефрактометрического детектора. Разделение катализата на фракции осуществлялось с помощью колонки Repregel – H (500×10 мм, число теоретических тарелок 160000).

Хроматографическое разделение проводили при следующих условиях:

- расход элюента (9 Ммоль раствор H_2SO_4) – 0,5 мл/мин;
- температура колонки 25 °С;
- давление элюента 65 атм;
- время анализа 30 мин.

Качественная идентификация веществ проводилась с использованием эталонов чистых веществ.

Проведение химического гидролиза.

Для этого 10 г торфа (древесных опилок) заливали 1,5 л 70% или 90% раствором серной кислоты и выдерживали суспензию 2 ч при $T = 160$ °С. По окончании выдержки смесь охлаждали, фильтровали, промывали образцы на стеклянном фильтре водой и высушивали до постоянной массы.

Предобработанный материал фракционировали. Для работы отбирали фракцию с размерами частиц от 0,8 мм до 3,2 мм. В подготовленных к ферментации образцах определяли влажность, массу сухого остатка, количество глюкозы и редуцирующих сахаров (РВ). Таким образом, было приготовлено 6 образцов, отличающихся методами предобработки. Результаты сведены в таблицу.

Проведение ферментативного гидролиза.

В коническую колбу емкостью 500 см³ помещали 10 г ЦЛ-сырья, 200 см³ ацетатного буфера (рН = 4,7), в котором растворен ферментный препарат Целловиридин. Образец ферментировали в течение 24 ч при 50 ± 2 °С и интенсивном перемешивании. По окончании процесса остаток отфильтровывали под вакуумом, отжимали и высушивали. В гидролизате определяли содержание редуцирующих веществ (РВ) и глюкозы через каждые 3 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния предобработки на количество глюкозы, редуцирующих веществ и сухого остатка в гидролизате.

Данные таблицы показывают, что после предобработки торфа 90% H_2SO_4 (образец №4) массовая

доля сухого целлюлозолигнинового остатка является минимальной (48%) по сравнению с остальными образцами. Это можно объяснить тем, что с увеличением концентрации кислоты степень гидролиза целлюлозы возрастает, и соответственно увеличивается количество растворимых продуктов реакции.

Из результатов, представленных в таблице, видно, что содержание глюкозы и редуцирующих веществ (РВ) в гидролизате исходных торфа и древесных опилок меньше, чем в предобработанных образцах. Данный факт можно объяснить большим содержанием в исходных образцах лигнина, затрудняющего процесс гидролиза целлюлозы. Однако необходимо отметить, что образец торфа №4, предобработанный 90% H_2SO_4 , содержит наибольшее количество глюкозы (39% от исходной навески ЦЛ сырья (и.н.с.)), чем остальные образцы ЦЛ-сырья. Это, очевидно, является следствием предварительной деструкции целлюлозы и образования олигосахаридов, появляющихся в результате ферментативных процессов, производимых сообществами микроорганизмов торфяных геобиоценозов в течение длительного времени.

Таблица

Зависимость выхода глюкозы и редуцирующих веществ от способа предобработки ЦЛ сырья
Table. The dependence of glucose and reducing substances yield on the pretreatment method of row materials

Вид образца	Массовая доля сухого остатка от исходной навески ЦЛ сырья, %	Выход РВ от исходной навески ЦЛ сырья, %	Выход глюкозы от исходной навески ЦЛ сырья, %
Торф	77	22	15
Древесные опилки	61	19	5
Торф, 70% H_2SO_4	60	32	25
Торф, 90% H_2SO_4	48	47	39
Торф, 90% H_2SO_4 , ферментация	32	65	58
Древесные опилки, 70% H_2SO_4	58	38	9
Древесные опилки, 90% H_2SO_4	52	42	15
Древесные опилки, 90% H_2SO_4 , ферментация	34	50	23

В результате проведенного ферментативного гидролиза предобработанных образцов №4 и №6 увеличился выход глюкозы до 58% от и.н.с. и 23% от и.н.с. соответственно; сухой остаток составил 32% от и.н.с. и 34% от и.н.с. соответственно. Полученные результаты указывают на достаточно высокую эффективность последующего процесса ферментации.

Исследование зависимости количества глюкозы от времени ферментации

Образцы №4 и №6 были подвергнуты ферментации с помощью препарата Целловиридин в течение 24 ч. Пробы гидролизата отбирались каждые 3 ч, с помощью метода ВЭЖХ определялось содержание глюкозы (С, мг/мл). Полученные результаты графически отображены на рис. 3.

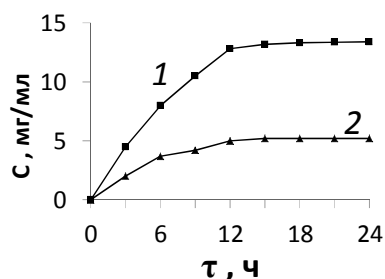


Рис. 3. Зависимость концентрации глюкозы в гидролизате от времени ферментации, где 1 – изменение количества глюкозы в образце №4; 2 – изменение количества глюкозы в образце №6
Fig. 3. The dependence of the glucose concentration in the hydrolyzate on the time of fermentation, where 1 is the change in the amount of glucose in the sample N 4; 2 – changes in the amount of glucose in the sample N 6

Данные эксперимента показывают, что в первые 12 ч наблюдается максимальная скорость образования глюкозы. В гидролизате образца №4

(торф, обработанный 90% H_2SO_4) накапливается 13,0 мг/мл глюкозы за 12 ч проведения процесса. Дальнейшее уменьшение скорости накопления глюкозы как в гидролизате образца №4, так и в гидролизате образца №6 можно объяснить уменьшением степени насыщения гидролитических ферментов препарата Целловиридин субстратом целлюлозы и ее продуктами деструкции – олигосахаридами в ходе реакции. Наибольшая скорость накопления глюкозы при гидролизе образца торфа, предобработанного 90% H_2SO_4 , также объясняется наличием в образце свободных олигосахаридов, изначально содержащихся в верховом торфе.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований и полученных данных можно сделать следующие выводы:

Предварительная предобработка ЦЛ-сырья 90% H_2SO_4 при $T = 160^\circ C$ повышает эффективность ферментативного гидролиза, так как увеличивается степень деструкции целлюлозы и ее доступность для активных центров целлюлолитических ферментов;

показана достаточно высокая активность отечественного мультиферментного препарата Целловиридин по отношению к таким сложным по химическому составу субстратам, как торф и опилки.

Большая скорость образования глюкозы в процессе ферментативного гидролиза предобработанных ЦЛ-сырья торфа и опилок является хорошим и перспективным результатом для дальнейшего получения биоэтанола из возобновляемых источников.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ №16-08-00158.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хуснутдинов И.Ш., Ахметзянов А.М., Гаврилов В.И., Заббаров Р.Р., Ханова А.Г. Исследование 1,1-диэтоксидетана как компонента дизельного топлива. *Иzv. вузов. Химия и хим. технология.* 2009. Т. 52. Вып. 11. С. 119-122.
2. Манаенков О.В., Долуда В.Ю., Филатова А.Е., Макеева О.Ю., Сульман Э.М., Сидоров А.И. Новый тип Ru-содержащего катализатора для процесса гидролитического гидрирования. *Иzv. вузов. Химия и хим. технология.* 2013. Т. 56. Вып. 8. С. 97-101.
3. Громов Н.В., Таран О.П., Сорокина К.Н., Мищенко Т.И., Утанди Ш., Пармон В.Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлоз и гемицеллюлоз) в ценные продукты. *Катализ в пром-ти.* 2016. Т. 16. № 1. С. 74-83.
4. Синицын А.П., Короткова О.Г., Синицына О.А., Рожкова А.М., Доценко Г.С., Проскурина О.В., Осипов Д.О., Кон-

REFERENCES

1. Khusnutdinov I. Sh., Akhmetzyanov A.M., Gavrilov V. I., Zabbarov P.P., Khanova A.G. A study of 1,1-diethoxyethane as a component of diesel fuel. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2009. V. 52. N 11. P. 119-122 (in Russian).
2. Manaenkov O.V., Doluda V.Yu., Filatova A.E., Makeeva O.Yu., Sulman E.M., Sidorov A.I. A new type of Ru-containing catalyst for hydrolytic hydrogenation process. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2013. V. 56. N 8. P. 97-101 (in Russian).
3. Gromov N.V., Taran O.P., Sorokina K.N., Michshenko T.I., Utandi Sh., Parmon V.N. New methods for one-step processing of polysaccharide components of lignocellulosic biomass (cellulose and hemicellulose) into valuable products. *Katal. Prom.* 2016. V. 16. N 1. P. 74-83 (in Russian). DOI: 10.18412/1816-0387-2016-74-83.
4. Sinitsin A.P., Korotkova O.G., Sinitsina O.A., Rozhkova A.M., Dotsenko G.S., Proskurina O.V., Osipov D.O., Kon-

- дятьева Е.Г., Чекушина А.В. Оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса *Penicillium Verruculosum*: увеличение гидролитической способности с помощью методов генетической инженерии. *Катализ в промышленности*. 2015. Т. 15. № 6. С. 78-83.
5. Синицын А.П., Скомаровский А.А., Чекушина А.В., Синицина О.А., Немашкалов В.А., Кондратьева Е.Г., Рожкова А.М., Кошелев А.В. Пергамент – потенциальное сырье для получения сахаров с помощью ферментативного гидролиза. *Катализ в пром-ти*. 2015. Т. 15. № 5. С. 74-77.
6. Будаева В.В., Скиба Е.А., Байбакова О.В., Макарова Е.И., Орлов С.Е., Кухленко А.А., Удоратина Е.В., Щербаклова Т.П., Кучин А.В., Сакович Г.В. Кинетика ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов при различных концентрациях субстрата. *Катализ в промышленности*. 2015. Т. 15. № 5. С. 60-66.
5. Sinitsin A.P., Skomarovskiy A.A., Chekushina A.V., Sinitsinzina O.A., Nemashkalov V.A., Kondratieva E.G., Rozhkova A.M., Koshelev A.V. Parchment – a potential raw material for producing sugars through enzymatic hydrolysis. *Katal. Prom.* 2015. V. 15. N 5. P. 74-77 (in Russian). DOI: 10.18412/1816-0387-2015-5-74-77.
6. Budaeva V.V., Skiba E.A., Baiybakova O.V., Makarova E.I., Orlov S.E., Kukhlenko A.A., Udoratina E.V., Shcherbakova T.P., Kuchin A.V., Sakovich G.V. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials at different concentrations of substrate. *Katal. Prom.* 2015. V. 15. N 5. P. 60-66 (in Russian). DOI: 10.18412/1816-0387-2015-5-60-66.

Поступила в редакцию 13.07.2016
Принята к опубликованию 28.07.2017

Received 13.07.2016
Accepted 28.07.2017