

УДК 663.53

DOI 10.26456/vtchem2024.3.14

## Оптимизация продолжительности стадии ферментативного гидролиза льняной костры в процессе биосинтеза этанола

А.В. Уткина, Е.В. Ожимкова

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», Тверь

На сегодняшний день все большую актуальность приобретают вопросы разработки экономически целесообразных и экологически рациональных способов получения возобновляемых энергетических носителей. Перспективным направлением в этой области является получение биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов. В качестве источника моносахаридов для сбраживания дрожжевой культурой в работе рассмотрена льняная костра (крупнотоннажный агропромышленный отход переработки льноволокна). Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозных материалов требует тщательного подбора параметров процесса, в частности – определения оптимальной продолжительности гидролиза, вследствие влияния последней на развитие дрожжевой культуры и эффективность процесса спиртового брожения.

**Ключевые слова:** биоэтанол, лигноцеллюлоза, льняная костра, ферментативная обработка, оптимизация параметров, повышение эффективности.

Развитие человеческого общества, рост населения Земли, расширение индустриальных направлений и наращивание производственных мощностей приводят к увеличению энергопотребления во всем мире, что инициирует в научном секторе поиск и разработку устойчивых и возобновляемых энергоносителей. Кроме того, использование традиционных источников энергии (уголь, нефть, природный газ) сопряжено с усугублением глобальных экологических проблем, поэтому уже сегодня на мировом рынке можно наблюдать продукты «новой» энергетики, характеризующиеся относительно низкими нагрузками на экологию и отвечающие положениям концепции устойчивого развития [1].

Среди всего многообразия возобновляемых энергетических носителей лидерами по объему производства являются жидкие биотоплива, наиболее известным представителем которых в транспортном секторе является биоэтанол.

Во многих странах (Бразилия, Германия, Франция, США и др.) широкомасштабная разработка и запуск технологических линий по

производству этилового спирта начались в 1980-х годах. В Европе и Соединенных Штатах Америки альтернативное топливо использовалось еще в конце 19 века, однако экономический и научный кризисы в послевоенное время остановили этот процесс до «нефтяного вопроса», обострившегося в 1970-х годах [2].

На протяжении длительного времени рынок биоэтанола формируется за счет производственных мощностей нескольких стран: США, Бразилия, Китай, Евросоюз, Индия. Используемое сырье разнообразно и зависит от климатических условий региона, в котором локализовано производство.

В зависимости от типа сырьевого источника, из которого получено топливо, биоэтанол подразделяют на 4 поколения: биоэтанол первого поколения получают на основе сахаро- и крахмалосодержащих источников пищевого назначения (сахарный тростник, сладкое сорго, фрукты, кукуруза, рис, маниока, пшеница и т.д.); для получения биоэтанола второго поколения используются группы лигноцеллюлозных материалов (например, отходы агропромышленных комплексов); для выработки топлива третьего поколения применяется биомасса макро- и микроводорослей, а получение биоэтанола четвертого поколения предполагает использование инструментов генной инженерии [3].

Наиболее перспективным материалом для получения возобновляемого топлива является лигноцеллюлозная биомасса, которая характеризуется низкой себестоимостью, широкой распространенностью и доступностью. Особую ценность в этой группе сырьевых источников представляют крупнотоннажные отходы сельскохозяйственных и агропромышленных комплексов. В последние годы в Центральных и Западно-Сибирских регионах России регистрируется рост производства и переработки льняных культур, что приводит к накоплению большого количества отходовных материалов, не имеющих прямого практического применения; частным примером является льняная костра.

Костра представляет собой отпадающие одревесневшие части, образующиеся в процессах мятья и трепания льняных стеблей. Объем отхода (костры), образующегося при переработке льняной тресты, по оценкам научно-исследовательских центров, специализирующихся на исследовании лубяных культур, составляет порядка 110 тысяч тонн ежегодно [4].

Выпускаемый биоэтанол может либо использоваться как самостоятельное топливо, либо смешиваться с бензином (газохол) для улучшения эксплуатационных характеристик последнего (увеличение октанового числа, теплоты испарения, сокращение выброса токсичных соединений и т.п.)

Независимо от типа сырья, которое выбрано в качестве источника углеводов, ключевым этапом технологического процесса по синтезу

биоэтанола является спиртовое брожение, традиционно осуществляемое с использованием дрожжевых культур, что обусловлено их ценными свойствами: высокий выход этанола (более 90,0% от теоретически возможного), устойчивость к высоким концентрациям этилового спирта (более 40,0 г/л), высокая скорость синтеза целевого продукта (более 1,0 г/л/ч), способность расти на простых, недорогих питательных средах, устойчивость к ингибиторам [5].

Дрожжи – микроскопические грибы, способные к размножению путем почкования или деления и образующие споры, незаклученные в плодовое тело. На сегодняшний день известно порядка 1500 видов дрожжей, что, по оценкам специалистов, составляет лишь 1% от общего количества видов на Земле. Морфологические и культуральные признаки отдельных видов заметно варьируются внутри группы микроскопических грибов: длина некоторых дрожжевых клеток составляет всего 2–3 мкм, в то время как длина других может достигать 20–50 мкм; ширина клеток большинства дрожжей находится в диапазоне от 1 до 10 мкм, при этом, как правило, размеры пивоваренных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* несколько больше, чем лабораторных. Многие виды дрожжей, включая *Saccharomyces* spp., имеют эллипсоидную или яйцевидную форму, а для колоний характерен кремовый оттенок [6].

Типичная схема получения биоэтанола из льняной костры включает в себя следующие этапы: предварительная обработка материала с использованием физических, химических, физико-химических или биологических методов, ферментативный или кислотный гидролиз полисахаридов сырья, трансформация моносахаридов в этиловый спирт с использованием дрожжевых культур, дистилляция и обезвоживание «бродильного бульона» [2].

Существует два основных подхода к трансформации лигноцеллюлозного материала в биоэтанол: отдельный гидролиз и ферментация и совмещенный процесс. В первом варианте организации процесса гидролиз проводят до завершения, а затем в смесь вносят микроорганизмы для сбраживания сахаров. Данный метод имеет ряд присущих ему недостатков: риск загрязнения культуры и реакционной среды, образование ингибиторов. Во втором случае ферментативный гидролиз и ферментация не имеют пространственного и временного разделения: в реактор одновременно вносятся ферменты и микроорганизмы. В настоящее время последняя технология считается оптимальным методом преобразования лигноцеллюлозы в биоэтанол и характеризуется высоким выходом целевого продукта. Недостатком метода является несоответствие оптимальных температур двух процессов: оптимальная температура ферментативного гидролиза составляет 45-50°C, в то время как наибольшая эффективность процесса ферментации регистрируется при 28-35°C.

Процесс синтеза этанола дрожжами в анаэробных условиях может быть успешно описан традиционными кинетическими моделями. Большинство из них относятся к так называемым неструктурированным моделям, цель которых – одновременно связать рост биомассы, потребление субстрата и продукцию этанола на протяжении всего процесса ферментации. Обработка экспериментальных данных показала, что кинетика роста клеток и накопления этанола сильно зависит от pH и состава питательной среды [3].

Рационализация процесса спиртового брожения является фактором, определяющим эффективность и экономическую целесообразность линии по выпуску биоэтанола, поскольку предполагает высокие капитальные и эксплуатационные затраты.

Целью данной работы являлась оптимизация продолжительности стадии ферментативного гидролиза с целью повышения выхода биоэтанола при сбраживании льняной костры штаммом спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для составления мультиэнзимной композиции в данной работе были применены следующие ферментные препараты: «Целлюлаза», «Ксиланаза», «Пектиназа» (растворимый порошок, Россия). Характеристика ферментных препаратов (активность, оптимальные значения температуры и pH) приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика ферментных препаратов

Ферментный препарат	Активность	Оптимальная температура, °С	Оптимальный pH
«Целлюлаза»	5000 ед/г	50-60	3,5-4,5
«Ксиланаза»	10000 ед/г	50-60	5,0-7,0
«Пектиназа»	30 ед/г	35-50	3,7-4,3

В качестве продуцента, трансформирующего моносахаридный гидролизат в биоэтанол, в работе были рассмотрены спиртовые дрожжи SafSpirit D-53 Fermentis (Франция). В состав коммерческого препарата входят дрожжи (штамм *Saccharomyces cerevisiae*), эмульгатор: Е491 (сорбитан моностеарат).

Перед проведением гидролитического расщепления полисахаридов сырья ферментными препаратами костра льна очищалась от посторонних технологических примесей механическим способом. На аналитических весах с точностью до 0,0001 г взвешивалась навеска

льняной костры массой 1 г. Предварительно в конической колбе, предназначенной для проведения ферментативного гидролиза, в 0,1 М ацетатном буфере (20 мл) растворялись ферментные препараты в соотношениях, установленных планом эксперимента. После полного растворения мультиэнзимной композиции в колбу вносилась навеска льняной костры. Ферментативное расщепление проводилось в климатостате КС-200 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре  $50 \pm 0,1^\circ\text{C}$  с непрерывным перемешиванием со скоростью 150 об/мин. Продолжительность стадии отдельного ферментативного гидролиза перед внесением спиртовых дрожжей варьировалась и составляла 8,15,24,39,48,72 часа соответственно. Для более полного высвобождения целевых полисахаридов опытные образцы льняной костры подвергались ультразвуковой обработке.

Для анализа сахаров образцы гидролизатов и бражки центрифугировались на центрифуге ОПн-8 климатического исполнения УХЛ 4.2 в течение 10 мин при 7000 об/мин. Для обеспечения более высокой степени очистки анализируемых образцов от взвешенных частиц, остатков культуральной жидкости и биологических компонентов использовалась шприцевая фильтрующая насадка Millipore (Китай) с диаметром пор – 0,45 мкм; диаметр мембраны 25 мм; материал – политетрафторэтилен.

Качественный и количественный состав сахарного сиропа определялся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание определенного редуцирующего вещества определялось по заранее построенным градуировочным зависимостям для растворов моносахаридов известной концентрации (глюкоза, фруктоза, рамноза, мальтоза, ксилоза).

По окончании стадии отдельного процесса ферментативного гидролиза реакционная среда охлаждалась до  $28^\circ\text{C}$ , после чего в нее вносилось 10-15% засевных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые предварительно подвергались процессу регидратации: дрожжи обводнялись в соотношении 1:10 в дистиллированной воде при температуре  $25^\circ\text{C}$  в течение 15 минут, после чего полученная суспензия вносилась в бродильную емкость. Сбраживание, совмещенное с осахариванием, проводилось в анаэробных статистических условиях в течение 5 суток в климатостате КС-200 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре  $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Для определения в бражке концентрации этилового спирта использовался спиртовой ареометр АСп-1.

Оценка общего числа дрожжевых клеток осуществлять под микроскопом Optika B-150 POL-B (Италия) с использованием камеры Горяева (площадь =  $1/400 \text{ мм}^2$ ; высота = 0,100 мм).

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 синтез этанола, эффективность утилизации углеводов, физиологическое состояние дрожжей и др.).

Экспериментально установлено, что максимальный конечный выход редуцирующих веществ (35,97 г/л) в гидролизате достигается при соотношении ксиланазы:пектиназы:целлюлазы 1/4:1/2:1/4. Концентрации ферментных препаратов: «Ксиланазы»– 17,5; «Пектиназа» – 35; «Целлюлаза» – 17,5 мг/г субстрата.

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*.

По окончании ферментации в каждой пробе методом микропирования с использованием камеры Горяева определялось общее количество дрожжевых клеток (млн КОЕ/мл) и количество почкующихся клеток (%). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2  
Результаты эксперимента по определению оптимальной продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед ее совмещением со спиртовым брожением

Продолжительность отдельной стадии гидролиза, ч	Общее количество дрожжевых клеток, млн КОЕ/мл	Количество почкующихся клеток, %
8	2,5-3,0	5
15	3,0-3,3	6-7
24	9,0	29%
39	25,4	24%
48	45,6	22%
72	38,5	17%

Как видно из данных, представленных в таблице 2, продолжительность стадии ферментативного гидролиза 8-15 часов создаст неблагоприятные условия для жизнедеятельности дрожжей, что объясняется реологическими свойствами среды, обладающей высокой вязкостью среды вследствие большого количества негидролизованного субстрата.

При 72-часовом несомещенном 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 3-5 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.

Поскольку ферментативный гидролизат перед внесением засевных дрожжей не подвергался фильтрации/центрифугированию для удаления твёрдого остатка льняной костры, часть дрожжевых клеток адсорбировалась на субстрате, что не позволило учесть их в подсчете общего количества КОЕ в 1 мл сброженного гидролизата. Этим объясняются относительно невысокие значения полученных результатов по оценке физиологического состояния дрожжевой культуры.

После внесения в реакционную среду дрожжей концентрация редуцирующих моносахаридов (преимущественно глюкозы) резко снижалась, что свидетельствовало о трансформации глюкозы в целевой продукт биосинтеза – этанол.

Было исследовано влияние продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед внесением засевных дрожжей на процесс накопления биоэтанола в среде. Результаты эксперимента отражены в таблице 3.

Таблица 3

Зависимость концентрации биоэтанола в среде от продолжительности стадии отдельного ферментативного гидролиза

Номер опыта	1	2	3	4	5	6
Продолжительность отдельной стадии ферментативного гидролиза, ч	8	15	24	39	48	72
Концентрация биоэтанола, % об	0,7	1,2	2,1	1,9	1,7	1,3

Как видно из данных, представленных в таблице 3, оптимальная продолжительность стадии раздельного ферментативного гидролиза перед внесением продуцента (с точки зрения накопления в среде целевого продукта) составляет 24 часа.

Следует учитывать, что несмотря на то, что максимальная концентрация глюкозы в гидролизате наблюдается при 72-часовом процессе раздельного ферментативного гидролиза, выход биоэтанола в данном опыте не являлся максимальным. Это объясняется тем, что высокие концентрации редуцирующих веществ ингибируют действие ферментов используемой композиции энзимных препаратов, а частичное снижение концентрации за счет трансформации моносахаридов в биоэтанол (как в случае опытов 3-5) не приводит к повторной активации ферментных комплексов, поэтому в опыте 6 отсутствует этап спиртового брожения, совмещенный с осахариванием льняной костры. Это приводит к снижению накопления в среде целевого продукта.

В опытах 1-2 концентрация биоэтанола в среде являлась минимальной. Это является следствием низкой концентрации глюкозы в момент внесения дрожжей. Кроме того, гидролиз, совмещенный с процессом брожения, в данном случае затруднен вследствие снижения температуры от 50 (оптимальная температура, обеспечивающая максимальную эффективность мультиферментного комплекса) до 28°C (оптимальный температурный режим развития дрожжевой культуры), а также адсорбции дрожжей на субстрате вследствие низкой степени гидролиза последнего – это затрудняет синтез этанола и диффузию углеводов в клетки дрожжей.

#### Список литературы

1. Вильданов Ф.Ш., Латыпова Ф.Н., Чанышев Р.Р., Николаева С.В. Современные методы получения биоэтанола // Башкирский химический журнал. 2011. №2. С. 128–134.
2. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. / A. Basic [and etc] // Food technology and biotechnology. – 2018. – №3. – P. 289–311.
3. Биоэтанол: технологии получения из возобновляемого растительного сырья и области применения / П.Е. Матковский [и др.] // Альтернативная энергетика и экология. – 2010. – №6. – С. 95 – 105.
4. Костра льна, как сырье для производства композиционных материалов / С.А. Угрюмов [и др.] // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2006. – №14. – С. 171 – 172.
5. Васильев И.Б., Мурашкина И.А. Получение и применение этилового спирта: учебное пособие. Иркутск: РПФ Весь Иркутск, 2013. 32 с.
6. Меледина Т.В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: учебное пособие / Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

*Об авторах:*

УТКИНА Алена Владимировна – аспирант, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22). e-mail: alena.svet.00@yandex.ru

ОЖИМКОВА Елена Владимировна, кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22). e-mail: eozhimkova@mail.ru

## **Optimization of duration of enzymatic hydrolysis stage of flaxseed bark in the process of ethanol biosynthesis**

**A.V. Utkina, E.V. Ozhimkova**

*Tver State Technical University, Tver*

Today the issues of development of economically feasible and ecologically rational ways of renewable energy carriers production are becoming more and more urgent. A promising direction in this area is the production of bioethanol from lignocellulosic wastes. As a source of monosaccharides for digestion by yeast culture, flax bark (large-tonnage agroindustrial waste of flax fiber processing) was considered in the work. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials requires careful selection of process parameters, in particular, determination of the optimal duration of hydrolysis, due to the influence of the latter on the efficiency of alcoholic fermentation.

**Keywords:** *bioethanol, lignocellulose, flaxseed bark, enzymatic treatment, optimization of parameters, efficiency increase.*

Дата поступления в редакцию: 04.09.2024.

Дата принятия в печать: 12.09.2024.