

УДК 547.52

**ИЗУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СПОСОБА ПЕРЕРАБОТКИ  
ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО И ЛИГНИНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ****THE STUDY OF THE BIOCATALYTIC METHOD OF PROCESSING CELLULOSE  
AND LIGNIN-CONTAINING RAW MATERIALS**©**Лакина Н. В.***Тверской государственной технической университет  
г. Тверь, Россия, lakina@yandex.ru*©**Lakina N.***Tver State Technical University  
Tver, Russia, lakina@yandex.ru*©**Долуда В. Ю.***Тверской государственной технической университет  
г. Тверь, Россия, doludav@yandex.ru*©**Doluda V.***Tver State Technical University  
Tver, Russia, delude@yandex.ru*©**Сулман М. Г.***Тверской государственной технической университет,  
г. Тверь, Россия, science@science.tver.ru*©**Sulman M.***Tver State Technical University  
Tver, Russia, science@science.tver.ru*

*Аннотация.* Изучены преимущества предобработки концентрированной серной кислотой целлюлозолигнинового сырья: торфа и древесных опилок перед другими методами химической предобработки с целью получения D-глюкозы. Количество редуцирующих веществ в предобработанных образцах составило 30% для торфа и 26% для древесных опилок. При дальнейшем ферментативном проведении количество редуцирующих веществ увеличилось соответственно до 40% и 34%. Полученные результаты комплексного применения химического и биокаталитического способов гидролиза торфа и древесных опилок, являются перспективными для дальнейших исследований по получению биоэтанола из возобновляемых источников.

*Abstract.* Studied the benefits of pretreatment with concentrated sulfuric acid cellulosolvents raw materials: peat and sawdust over other methods of chemical preprocessing with the purpose of obtaining D-glucose. The amount of reducing substances in prepared before samples was 30% for the peat and 26% for sawdust. In further carrying out the enzyme amount of reducing substances increased respectively to 40% and 34%. The obtained results of the integrated use of chemical and biocatalytic methods of hydrolysis of peat and wood shavings are promising for further studies on production of bioethanol from renewable sources.

*Ключевые слова:* возобновляемые источники энергии, химический гидролиз, биокатализ, D-глюкоза, целлюлозолитические ферменты.

**Keywords:** renewable energy, chemical hydrolysis, Biocatalysis, D–glucose, cellulolytic enzymes.

В настоящее время к возобновляемым источникам энергии, таким как торф и древесные опилки, уделяется большое внимание. Продукты их гидролиза могут быть использованы для получения биоэтанола. Но современные способы получения биоэтанола и биогаза из целлюлозолигнинового (ЦЛ) 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 до этанола является возможность использования большого количества сырья, предотвращение сжигания или захоронения отходов, что желательно, и чистота топливного этанола [1–3].

После преобразования целлюлозы в глюкозу, глюкозу легко ферментировать дрожжами до этанола.

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 как 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 [1–3].

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 отдельных ферментов.

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% [4, 5].

Нахождение новых высокоактивных штаммов микроорганизмов способных проводить лигно– и целлюлозолитическую трансформацию исходного сырья, а также более активных продуцентов биоэтанола и биогаза, является в настоящее время актуальным.

#### Экспериментальная часть

В данной работе изучалась эффективность процесса предобработки концентрированным раствором серной кислоты образцов торфа и древесных опилок. На последующем этапе биотрансформации образцов торфа и древесных опилок изучалась эффективность ферментного препарата Целловиридин, представляющий собой концентрат культуральной жидкости штаммов гриба *Trichoderma viride*. Эффективность процесса ферментативного гидролиза оценивалась по количеству образовавшейся D–глюкозы и редуцирующих веществ (РВ) с помощью метода ВЭЖХ (анализатор UltiMate 3000) с использованием рефрактометрического детектора. Разделение катализата на фракции осуществлялось с помощью колонки Reprogel–H (500×10 мм, число теоретических тарелок 160 000).

Хроматографическое разделение проводят при следующих условиях:

расход элюэнта (9 Ммоль раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) — 0,5 мл/мин; температура колонки 25 °С; давление элюэнта 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) в 0,5 л концентрированного раствора серной кислоты выдерживали 2 часа при  $T = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$ . По окончании выдержки охлаждали, фильтровали, промывали образцы на стеклянном фильтре водой.

В подготовленных к ферментации образцах определяли влажность, остаточный лигнин, количество глюкозы и редуцирующих сахаров (РВ). Результаты сведены в Таблицу 1.

#### *Проведение ферментативного гидролиза*

В коническую колбу емкостью 500 см<sup>3</sup> помещали 10 г ЦЛ–сырья, 200 см<sup>3</sup> ацетатного буфера (рН = 4,7), в котором растворен ферментный препарат Целловиридин. Образец ферментировали в течение 24 ч при  $50 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 часа.

#### *Обсуждение результатов*

*Исследование влияния предобработки на количество глюкозы и редуцирующих веществ в гидролизате*

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 наличием большого содержания лигнина, входящего в состав защитной матрицы, в которую погружены целлюлозные фибриллы. Однако необходимо отметить, что образец торфа №4, предобработанный 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, содержит наибольшее количество глюкозы, чем остальные образцы ЦЛ–сырья. Это, очевидно, является следствием наличия уже в исходном образце торфа элементов деструкции целлюлозы — олигосахаридов, появляющихся в результате ферментативных процессов, сообществами микроорганизмов торфяных геобиоценозов в течение определенного времени.

Таблица.

ЗАВИСИМОСТЬ ВЫХОДА ГЛЮКОЗЫ И РЕДУЦИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ  
ОТ СПОСОБА ПРЕДОБРАБОТКИ

<i>№ и вид образца</i>	<i>Масса глюкозы в гидролизате, %</i>	<i>Массовая доля лигнина, %</i>	<i>Массовая доля РВ в кислотном гидролизате, %</i>	<i>Массовая доля РВ в гидролизате после ферментации, %</i>
1. Торф верхового типа	6	40.01	3.1	7.4
2. Древесные опилки	2	61.50	1.6	6.2
3. Торф, 98% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	14.20	30	40
4. Древесные опилки, 98% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18	18.80	26	34

#### *Исследование зависимости количества глюкозы от времени ферментации*

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

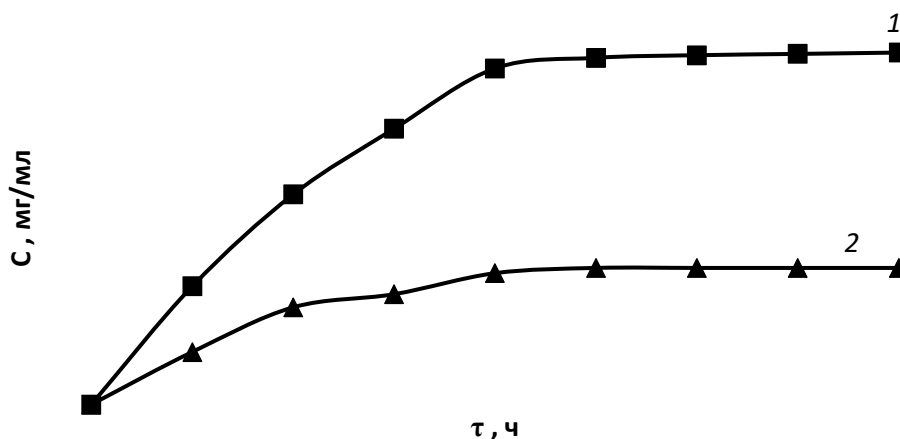


Рисунок. Зависимость концентрации глюкозы в гидролизате от времени ферментации, где 1 — изменение количества глюкозы в образце №3; 2 — изменение количества глюкозы в образце №4.

Данные эксперимента показывают, что в первые 12 часов наблюдается максимальная скорость гидролиза. В гидролизате образца №3 (торф, 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) накапливается 13.0 мг/мл глюкозы за 12 часов проведения процесса. Дальнейшее уменьшение скорости накопления глюкозы как в гидролизате образца №3, так и в гидролизате образца №4, можно объяснить уменьшением степени насыщения гидролитических ферментов препарата Целловеридин субстратом, то есть доступной для гидролиза целлюлозы и ее продуктов деструкции олигосахаридов, в ходе реакции. Наибольшая скорость накопления глюкозы при гидролизе образца торфа, предобработанного 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, также объясняется наличием в образце свободных олигосахаридов, изначально содержащихся в верховом торфе.

#### Выводы:

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

1. Предварительная предобработка ЦЛ-сырья 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при T=1600C повышает эффективность ферментативного гидролиза, так как увеличивается степень деструкции целлюлозы и ее доступность для активных центров целлюлолитических ферментов;
2. Показана достаточно высокая активность отечественного мультиферментного препарата Целловиридин по отношению к таким сложным по химическому составу субстратам, как торф и опилки.
3. 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.*

#### Список литературы:

1. Губина С. М., Стокозенко В. Г. Исследование процесса генерирования редокс-потенциалов в системе целлюлозный волокнистый материал — гидроксид натрия // Химия и химическая технология. 2008. Т. 51. №5. С. 75–77.

2. Долуда В. Ю., Макеева О. Ю. и др. Новый тип Ru–содержащего катализатора для процесса гидролитического гидрирования целлюлозы // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. 2013. Т. 56. №8. С. 97–101.

3. Громов Н. В., Таран О. П., Сорокина К. Н. и др. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты. Часть 1. Методы активации биомассы // Катализ в промышленности. 2016. Т. 16. №1. С. 74–83. DOI: <http://dx.doi.org/10.18412/1816-0387-2016-1-74-83>.

4. Синицын А. П., Короткова О. Г., Синицына О. А., Рожкова А. М., Проскурина О. В., Осипов Д. О., Кондратьева Е., Чекушина А. В. Оптимизация состава целлюлозного 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., Синицына О. А. Пергамент — потенциальное сырье для получения сахаров с помощью ферментативного гидролиза // Катализ в промышленности. 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.

#### References:

1. Gubina S. M., Stokozenko V. G. Issledovanie protsessa generirovaniya redoks–potentsialov v sisteme tsellyuloznyi voloknistyi material — gidroksid natriya. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya, 2008, v. 51, no. 5, pp. 75–77.

2. Doluda V. Yu., Makeeva O. Yu. et al. Novyi tip Ru–soderzhashchego katalizatora dlya protsessa gidroliticheskogo gidrirovaniya tsellyulozy. Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya, 2013, v. 56, no. 8, pp. 97–101.

3. Gromov N. V., Taran O. P., Sorokina K. N. et al. Novye metody odnostadiinoi pererabotki polisaharidnykh komponentov lignotsellyuloznoi biomassy (tsellyulozy i gemitsellyuloz) v tsennye produkty. Chast 1. Metody aktivatsii biomassy. Kataliz v promyshlennosti, 2016, v. 16, no. 1, pp. 74–83. DOI: <http://dx.doi.org/10.18412/1816-0387-2016-1-74-83>.

4. Sinitsyn A. P., Korotkova O. G., Sinitsyna O. A., Rozhkova A. M., Proskurina O. V., Osipov D. O., Kondrat'eva E., Chekushina A. V. Optimizatsiya sostava tsellyulaznogo fermentnogo kompleksa *Penicillium verruculosum*: uvelichenie gidroliticheskoi sposobnosti s pomoshch'yu metodov geneticheskoi inzhenerii. Kataliz v promyshlennosti, 2015, v. 15, no. 6, pp. 78–83.

5. Sinitsyn A. P., Skomarovskii A. A., Chekushina A. V., Sinitsyna O. A. Pergament — potentsialnoe syre dlya polucheniya sakharov s pomoshch'yu fermentativnogo gidroliza. Kataliz v promyshlennosti, 2015, v. 15, no. 5, pp. 74–77.

6. Budaeva V. V., Skiba E. A., Baibakova O. V., Makarova E. I., Orlov S. E., Kukhlenko A. A., Udoratina E. V., Shcherbakova T. P., Kuchin A. V., Sakovich G. V. Kinetika fermentativnogo gidroliza lignotsellyuloznykh materialov pri razlichnykh kontsentratsiyakh substrata. Kataliz v promyshlennosti, 2015, v. 15, no. 5, pp. 60–66.

Работа поступила  
в редакцию 19.10.2016 г.

Принята к публикации  
21.10.2016 г.