

**УДК 663.53**

УТКИНА А.В., студент 2 курса магистратуры (ТвГТУ)  
Научный руководитель ОЖИМКОВА Е.В., к.х.н, доцент (ТвГТУ)  
г. Тверь

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОБРАБОТКИ  
КОСТРЫ ЛЬНА В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ЭТАНОЛА**

Роль и важность биоэтанола как технического продукта в мировой и российской экономике ежегодного возрастают, что вызвано увеличением объемов потребления этого ресурса в ключевых областях современной промышленности. С одной стороны, наблюдается повышенный интерес к альтернативным экологически безопасным видам топлива, с другой — не теряют актуальности вопросы внедрения принципов «зеленой химии» в традиционные процессы производства универсальных растворителей и круга химических веществ, прекурсором для синтеза которых выступает этанол [1].

Общий объем производства биоэтанола в мире в 2022 году составил 106,4 млрд литров. Согласно данным аналитиков, практически весь мировой рынок этанола из растительного сырья формируется исключительно за счет внутреннего производства нескольких стран. На протяжении длительного времени наблюдается тенденция локализации крупнотоннажных производств в пяти регионах: Соединенные Штаты Америки, Бразилия, Евросоюз, Китай, Индия. Более 80% объема мирового производства биоэтанола приходится на первые две страны.

На сегодняшний день в России не функционирует ни одного специализированного завода по производству биоэтанола. Однако задачи перехода на альтернативные источники энергии и развития энергосберегающих технологий занимают ведущее место в научных и технологических изысканиях представителей российской энергетики. Развитая сырьевая база, высокий уровень технологий, доступные производственные площади открывают для страны перспективы широкого внедрения биосинтеза этанола для преодоления барьеров, вызванных ограниченным запасом традиционных источников энергии [1, 2].

Преобразование лигноцеллюлозного сырья в этанол полностью соответствует принципам циркулярной экономики и отвечает концепции опережающего развития [3]. Среди всего многообразия целлюлозосодержащего сырья особое место занимают именно отходы агропромышленного комплекса, конкретный вид которых определяется климатическими условиями и внутренней политикой региона.

Традиционной сельскохозяйственной культурой Тверской области является лен-долгунец. В настоящее время на территории региона функционируют более двадцати льносеющих предприятий, шесть заводов по первичной переработке льна, два предприятия по переработке льноволокна и две льносеменоводческие станции. В процессе первичной переработки льна образуется значительное количество промышленных отходов, которые накапливаются и лишь частично разлагаются в естественных условиях. Основные виды таких отходов — костра,

пакля и льняная пыль. Костра представляет собой измельченные одревесневшие части стеблей льна и составляет примерно 60-70% от массы переработанной льняной тресты, из-за чего остро встает вопрос оптимальной утилизации лигно-целлюлозного сырья.

Известные традиционные химические, физические и физико-химические методы переработки лигноцеллюлозного сырья сопряжены с высокими финансовыми затратами и значительной нагрузкой на экологию Тверского региона, а использование отходов льноводства в качестве топлива в гранулированном/брикетированном виде является нерациональным в связи с высокой зольностью сырья и накоплением зольных частиц в факелах вытяжных труб [3].

Трансформация лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол решает две важные задачи: утилизируются трудно разлагаемые отходы, а также открываются принципиально новые возможности для получения биоэтанола 2-го поколения с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве продуцента.

Производство биоэтанола из сырья, содержащего лигноцеллюлозу, является привлекательным и устойчивым, поскольку, с одной стороны, лигноцеллюлозная биомасса является возобновляемой, а с другой, замена сырья с пищевых источников на крупнотоннажные отходы способствует преодолению продовольственного кризиса [1, 3].

Один из ключевых технологических барьеров использования целлюлозосодержащего сырья — его отличительная прочность, обусловленная формированием устойчивого биокomпозиционного материала из полимеров, входящих в состав матрицы растительного материала. Лигноцеллюлозное сырье состоит из трех основных полимерных компонентов, связанных в сложную структуру, — целлюлозы (40–50%), гемицеллюлозы (20–30%), лигнина (10–25%). В состав также входит незначительное количество пектина, белковых и экстрактивных веществ (хлорофилл, неструктурные сахара, воски). Сырье не является постоянным по составу: процентное содержание компонентов варьируется в зависимости от природных и климатических условий полосы выращивания, возраста, процессов сбора и хранения растительного материала [3].

В данной работе в качестве сырья для получения гидролизата моносахаридов использован многотоннажный отход агропромышленного комплекса — костра льна. Отходы переработки льняного волокна предоставлены ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур».

Химические показатели (%) анализируемой льняной костры представлены в таблице 1. Массовая доля целлюлозы определена азотно-спиртовым методом (метод Кюршиера). О содержании пентозанов можно судить по результатам фотокolorиметрического метода с использованием раствора орси́на. Массовая доля лигнина оценена сернокислотным методом. Для определения зольности образец сжигается при 600°C в течение 3 ч.

Таблица 1. Химические показатели сырья

Сырье	Массовая доля компонента в образце костры льна, %			
	Целлюлоза	Пентозаны	Лигнин	Зола
Костра льна	40,9±0,1	40,9±0,1	19,1±0,1	5,3±0,05

Целлюлоза и гемицеллюлозы, входящие в состав клеточной стенки льняной костры, представляют собой потенциальные субстраты для получения моносахаридов, доступных для биотехнологического превращения в биоэтанол. Как уже было указано выше, лигноцеллюлозное сырье является довольно прочным и устойчивым к переработке в связи с жесткой структурой композиционного материала и присутствием ацетильных групп, белков и золы.

Первая стадия трансформации лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол — предварительная обработка природного материала, основная цель которой состоит в снижении степени полимеризации, разрушении лигнин-углеводных связей, удалении лигнина и гемицеллюлозы и увеличении пористости материала.

До 2000-х годов на отечественных предприятиях по производству этанола из древесины применялось два основных подхода к деструкции биокomпозиционного материала: гидролиз концентрированной кислотой и гидролиз разбавленной кислотой. Данные методы имеют ряд существенных недостатков: в частности, при использовании концентрированных растворов кислот резко возрастает стоимость производства за счет затрат на утилизацию кислот и приобретения дорогостоящего оборудования, устойчивого к коррозии [2, 3]. Кроме того, гидролиз разбавленными кислотами приводит к синтезу токсичных для *Saccharomyces cerevisiae* соединений (фурфурол, гидроксиметилфурфурол, органические кислоты, фенольные соединения), что вызывает ингибирование процесса брожения.

Альтернативным методом обработки лигноцеллюлозного материала является использование ферментных препаратов, позволяющих вести процесс в мягких условиях без склонности к коррозии или к образованию ингибиторов.

Ключевыми ферментами процесса гидролиза являются целлюлазы, которые осуществляют разложение целлюлозы до редуцирующих моносахаридов. В гидролизе целлюлозы принимают участие по меньшей мере три основные группы целлюлаз: эндоглюканазы (атакуют участки низкой кристалличности в целлюлозном волокне, открывая свободные концы цепей), экзоглюканазы/целлобиогидролазы (продолжают процесс деполимеризации молекулы путем удаления целлобиозных звеньев с концов свободных цепей) и  $\beta$ -глюкозидазы (гидролизуют целлобиозу с образованием шестиуглеродного фрагмента – глюкозы) [3].

Ферментативный гидролиз фактически можно разделить на две стадии: первичную и вторичную. На первой стадии процесс идет на поверхности твердого субстрата: эндоглюканазы и экзоглюканазы приводят к высвобождению олигосахаридов в жидкую фазу. Вторичный гидролиз способствуют накоплению в растворе глюкозы, которая образуется за счет гидролиза олигосахаридов целлобиогидролазой до целлобиозы. Последняя разлагается  $\beta$ -глюкозидазами до моносахаридных звеньев [1, 2].

Вследствие непродуктивной адсорбции целлюлаз на лигнине доступность целлюлозы для ферментативного гидролиза зависит от степени удаления ксилана из структуры лигноцеллюлозы с помощью соответствующих ферментов – ксиланаз. Ксилан характеризуется рыхлой структурой, что делает его более восприимчивым к действию ферментных препаратов. Полный гидролиз ксилана требует совместного действия нескольких ферментов: эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы,  $\beta$ -

ксилозидазы,  $\alpha$ -арабинофуранозидазы и  $\alpha$ -глюкуронидазы. Эстеразы действуют на сложноэфирные связи между ксилозными звеньями ксилана и уксусной кислоты (ацетилксиланэстераза) или между остатками боковой цепи арабинозы и фенольными кислотами, такими как феруловая кислота (эстераза феруловой кислоты) и п-кумаровая кислота (эстераза п-кумаровой кислоты).

Ферментативный гидролиз очень специфичен и протекает в мягких условиях с меньшим потреблением энергии и воздействием на окружающую среду, чем кислотный гидролиз лигноцеллюлозы. Кроме того, процесс характеризуется высоким выходом глюкозы при низком образовании побочных продуктов [3].

Для составления мультиэнзимной композиции в работе были применены следующие ферментные препараты: «Целлюлаза» (порошкообразный, ООО Торговый дом «Биопрепарат», Россия), «Ксиланаза» (порошкообразный, ООО Торговый дом «Биопрепарат», Россия), «Пектиназа» (порошкообразный, ООО Торговый дом «Биопрепарат», Россия).

Эффективность процесса ферментативного гидролиза льняной костры определяется составом мультиэнзимной композиции.

Ферментативный гидролиз субстрата проводится при pH=5 в ацетатном буфере. Начальная концентрация субстрата составляет 50,0 г/л. Процесс ведется при постоянной температуре порядка  $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$  с перемешиванием.

Экспериментально установлено, что максимальный конечный выход редуцирующих веществ (33 г/л) в гидролизате достигается при следующих концентрациях ферментных препаратов, мг/г субстрата: «Целлюлаза» – 165, «Пектиназа» – 54, «Ксиланаза» – 15.

Зависимости концентрации глюкозы и редуцирующих веществ от продолжительности ферментативного гидролиза при концентрациях мультиэнзимной композиции 234 мг/г субстрата представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

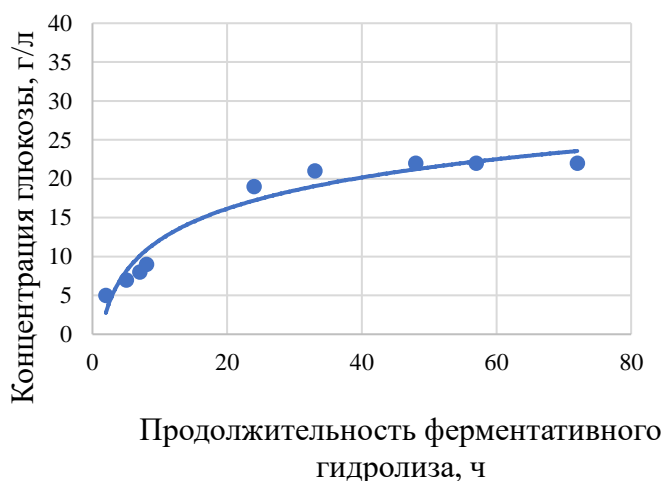


Рисунок 1. Зависимость содержания глюкозы в гидролизате от продолжительности процесса

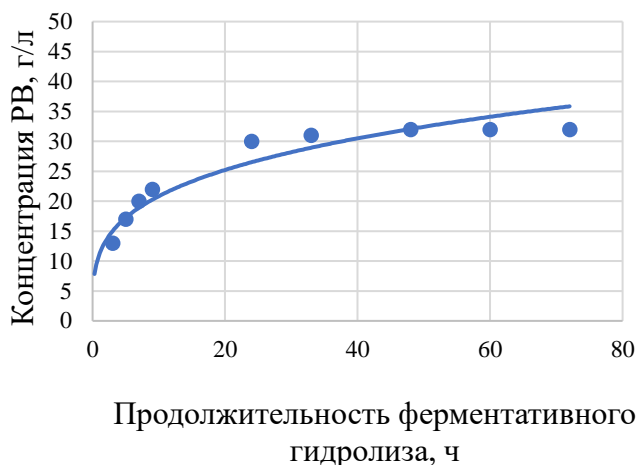


Рисунок 2. Зависимость содержания редуцирующих веществ в гидролизате от продолжительности процесса

Графическая зависимость наглядно демонстрирует оптимальную продолжительность процесса – 48 часов; увеличение продолжительности стадии ферментативной обработки не приводит к большему накоплению редуцирующих веществ в гидролизате.

Динамика накопления редуцирующих веществ отличается от накопления глюкозы. Образование последней идет медленнее, чем накопление редуцирующих веществ, но доля глюкозы не остается постоянной и медленно растет: через 24 ч гидролиза доля глюкозы составляет 63% (19 г/л), через 72 ч – 67% (22 г/л). Такое поведение системы объясняется механизмом реакции гидролиза целлюлозы с образованием дисахарида целлобиозы и моносахарида глюкозы. На заключительном этапе дисахарид целлобиоза медленно гидролизует до глюкозы.

Продолжительность стадии отдельного ферментативного гидролиза до внесения в среду посевного материала *Saccharomyces cerevisiae* должна быть технологически и экономически обоснованной.

В серии экспериментов в одинаковых условиях (температурный режим, pH, количество вносимого субстрата, состав МЭК) варьировалась продолжительность стадии гидролиза: 8 ч; 15 ч; 24 ч; 39 ч; 48 ч; 72 ч. По истечении запланированного времени отдельной стадии ферментативного гидролиза реакционная масса охлаждалась до 28°C и в нее вносилось 10-15% засевных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Сбраживание, совмещенное с осахариванием, проводилось в анаэробных статистических условиях в течение 5 суток.

В первый период, продолжающийся приблизительно 60 часов (взбраживание), происходит медленное накопление дрожжевой массы. Количество сброженных сахаров в гидролизате крайне незначительно. Во второй период (60 – 120 часов) размножение дрожжей и сбраживание сахаров за каждый час резко усиливаются, достигая максимума. Это стадия относится к главному брожению. В третий период кривая брожения выходит на плато, асимптотически приближаясь к оси абсцисс (дображивание) [3].

По окончании ферментации в каждой пробе методом микропирования (камера Горяева) определялось общее количество дрожжевых клеток (млн

КОЕ/мл) и количество почкующихся клеток (%). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Оптимизация продолжительности отдельной стадии ферментативного гидролиза перед её совмещением со спиртовым брожением

Продолжительность отдельной стадии гидролиза, ч	Общее количество дрожжевых клеток, млн КОЕ/мл	Количество почкующихся клеток, %
8	5,5-8,0	7
15	7,0-21,0	12-25
24	17,0-24,0	12-25
39	17,0-27,5	12-25
48	17,0-28,5	12-25
72	6-30,5	12

Как видно из таблицы 2, продолжительность стадии ферментативного гидролиза, составляющая от 8 до 15 часов, создает неблагоприятные условия для жизнедеятельности дрожжей. Это объясняется высокой вязкостью среды из-за большого количества негидролизованного субстрата.

Наибольшее количество клеток дрожжей наблюдается при 72-часовом несовмещенном гидролизе (30,5 млн КОЕ/мл), однако количество почкующихся клеток в этом случае не является максимальным.

#### Список литературы:

1. Биоэтанол: технологии получения из возобновляемого растительного сырья и области применения / П.Е. Матковский, Р.С. Яруллин, Г.П. Старцева, И.В. Седов. – Текст: непосредственный // Альтернативная энергетика и экология. – 2010. – №6. С. 95 – 105.
2. Современные методы получения биоэтанола / Ф.Ш. Вильданов, Ф.Н. Латыпова, Р.Р. Чанышев, С.В. Николаева. – Текст: непосредственный // Башкирский химический журнал. – 2011. – №2. С. 128 – 134.
3. Варфоломеев С.Д. Химия биомассы: биотоплива и биопластики / С.Д. Варфоломеев. – Москва: Научный мир, 2017. – 790 с. – Текст: непосредственный.