

**М.В. Постникова, А.П. Павлова**

Пермский национальный исследовательский  
политехнический университет

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА СУБСТРАТА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ДРЕВЕСНОГО СЫРЬЯ ПЕРЕКИСНЫМ СПОСОБОМ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ**

*Изучен процесс преобработки древесного сырья к ферментативному гидролизу с использованием перекисных растворов. С целью получения сахаров для производства биоэтанола изучен процесс ферментации подготовленного древесного сырья.*

В настоящее время актуальными являются исследования, направленные на получение биоэтанола из древесного сырья [1–3]. Для получения биоэтанола необходимы сахара, которые сбраживаются в спирт. Из древесного сырья сахара можно получать двумя способами: химическим и ферментативным. В основе химического гидролиза лежит реакция



Данная реакция протекает под действием кислот, поэтому существует проблема, связанная с утилизацией отходов [4].

Большие перспективы в этом направлении открывает ферментативный гидролиз, основанный на природных процессах и механизмах конверсии микробного происхождения. Механизм ферментативного гидролиза несколько сложнее химического, но позволяет селективно проводить гидролиз и в отличие от химического гидролиза не приводит к образованию целого ряда побочных продуктов и большого количества отходов [5, 6]. Ферментативный гидролиз растительного сырья осложнен поликомпонентностью его химического состава и низкой реакционной способностью основного количества целлюлозы с высокоупорядоченной структурой. Для эффективной работы ферментов необходимо обеспечить им доступ к молекулам, которые необходимо гидролизовать. Ферментативный гидролиз древесного сырья требует предварительной его подготовки. Предварительная подготовка подразумевает удаление геми-

целлюлоз и лигнина, нарушение структурной целостности сырья. Это осуществляется под действием температуры и давления или химической обработки. После проведения предварительной подготовки массы при ферментативном гидролизе происходит расщепление молекул целлюлоз и гемицеллюлоз на простые сахара, пригодные к сбраживанию [7, 8]. Для практического использования процессов ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья необходимы: получение высокоэффективных ферментных препаратов, активация исходных субстратов, выбор оптимальных параметров процесса ферментации.

Процессы делигнификации древесины в последнее время интенсивно изучаются. Поиск оптимальных условий проведения процессов делигнификации для получения целлюлозного материала, пригодного для ферментации, должен быть направлен на применение экологически безопасных методов, не предусматривающих применения серо- и хлорсодержащих реагентов и позволяющих одновременно с целлюлозой получать лигнин и гемицеллюлозы в форме, доступной для дальнейшего использования. Перекись водорода является наиболее приемлемым в экологическом отношении реагентом для процессов делигнификации древесного и растительного сырья [9]. Поэтому мы в данной работе исследовали перекисные способы предобработки древесного сырья.

Делигнификация древесины перекисными растворами была изучена на опилках древесины березы. При использовании в качестве реагента для делигнификации перекисного раствора в кислой среде (10%-ный раствор надуксусной кислоты) были получены образцы лигноцеллюлозного материала с относительно невысоким содержанием лигнина при высоком содержании целлюлозы. Недостатком этого метода является большой расход концентрированных реагентов для получения 10%-ной надуксусной кислоты. Делигнификация щелочным раствором перекиси водорода является экологически приемлемым способом удаления лигнина. На основании проведенных исследований был разработан перекисный метод предобработки древесного сырья, включающий в себя окислительную делигнификацию перекисью водорода массы, полученной из лигноцеллюлозного сырья путем водного гидролиза, пропитки гидролизованного сырья едким натром и массного размола. Были разработаны условия получения волокнистого целлюлозного материала:

температура водного гидролиза, °С .....	100
продолжительность гидролиза, мин .....	30
температура щелочной варки, °С .....	160

продолжительность стоянки на 160 °С, мин ..... 50  
 расход щелочного реагента на варку в ед. Na<sub>2</sub>O, %:  
     NaOH ..... 4,0  
     Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ..... 4,0  
 температура окислительной обработки, °С ..... 70–90  
 расход перекиси водорода, % к массе волокна ..... 2,0–4,0  
 степень размола щепы после пропитки (варки), °ШР .... 15–20

Окислительная обработка полученного волокнистого материала проводилась при рН 9–10, концентрация массы при обработке составляла 10 %. Результаты щелочной перекисной обработки приведены в табл. 1 (т.о. – твердый остаток).

Таблица 1

Характеристика образцов целлюлозного материала при перекисном способе предобработки

Номер образца	Условия окислительной обработки			Выход т.о., % от абс. сух. древ.	Содержание в т.о., %	
	расход H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , % от абс. сух. древ.	T, °С	время обработки, мин		целлюлозы	лигнина
1	2	70	60	63,2	74,9	10,8
2	2	80	60	63,7	75,1	10,6
3	2	80	180	62,0	75,0	11,4
4	3	90	180	61,3	75,1	10,5
5	4	90	90	60,1	75,2	10,2
6	4	90	90	59,2	80,1	7,9
7	4	90	120	58,0	79,0	7,0

*Примечание:* степень размола 15 °ШР.

Изучение окислительной перекисной делигнификации получаемых волокнистых материалов для ферментативного гидролиза показало, что при комплексной перекисной обработке древесного сырья при расходе на окислительную обработку раствора перекиси водорода 2–4 % и проведении окислительной обработки при температуре 70–90 °С в течение 60–120 мин можно получить образцы с выходом 58,0–63,2 %, в которых содержание целлюлозы 74,9–80,1 %, а лигнина 7,0–10,8 %.

С целью получения математической модели объекта при минимальном количестве поставленных опытов были проведены планирование и оптимизация окислительной перекисной обработки волокнистого материала. Изучено влияние концентрации перекиси водорода, температуры и времени обработки на выход волокнистого продукта и содер-

жание в нем целлюлозы и лигнина. Расход перекиси водорода при этом составлял от 2 до 10 % от абсолютно сухой древесины, температура процесса варьировалась в интервале 80–100 °С, продолжительность 60–180 мин (табл. 2).

Таблица 2

Условия проведения эксперимента

Фактор	Нижний уровень	Верхний уровень	Основной уровень	Интервал варьирования
Расход перекиси водорода, %	2	6	4	2
Температура обработки, °С	80	100	90	10
Время обработки, мин	60	180	120	60

Для планирования эксперимента был выбран метод полного факторного эксперимента [10]. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Планирование перекисного способа предобработки древесного сырья

Номер опыта	Условия проведения эксперимента			Выход т.о., % от абс. сух. дрв.	Содержание в т.о., %	
	расход H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , %	T, °С	время обработки, мин		целлюлозы	лигнина
1	2	80	60	63,7	75,1	10,6
2	2	80	180	62,0	75,0	11,4
3	2	100	60	61,6	74,9	11,0
4	2	100	180	61,3	75,1	10,5
5	6	80	60	57,4	81,2	6,9
6	6	80	180	57,2	80,9	6,6
7	6	100	60	56,7	81,0	6,8
8	6	100	180	56,5	80,7	6,5

В результате планирования перекисного способа предобработки древесного сырья получилось три уравнения регрессии:

$$y' = 59,55 - 2,6x_1 - 0,525 x_2 - 0,3 x_3 + 0,2 x_1, \quad (2)$$

$$y'' = 77,99 + 2,96 x_1 - 0,0625 x_2, \quad (3)$$

$$y''' = 8,79 - 2,09 x_1 - 0,1625 x_2 x_3. \quad (4)$$

По полученным уравнениям видно, что выход т.о. (2) и содержание в нем лигнина (4) зависят от всех параметров оптимизации (концентрация перекиси водорода, температура и время обработки),

а содержание целлюлозы в т.о. (3) зависит от концентрации перекиси водорода и температуры обработки и не зависит от продолжительности обработки.

Полученные в результате планирования эксперимента уравнения были использованы для оптимизации процесса предобработки лигно-целлюлозного материала. Критерием оптимальности считали содержание целлюлозы в т.о. Для оптимизации процесса предобработки древесного сырья для ферментативного гидролиза воспользовались методом крутого восхождения.

В результате полного факторного эксперимента получено адекватное уравнение регрессии

$$y'' = 77,99 + 2,96 x_1 - 0,0625 x_2, \quad (5)$$

где  $y''$  – содержание целлюлозы в т.о., %;  $x_1$  – безразмерная концентрация перекиси водорода;  $x_2$  – безразмерная температура.

В табл. 4 приведены рассчитанные значения содержания целлюлозы в волокнистом материале и результаты, полученные в процессе оптимизации данного метода предобработки.

Таблица 4

Результаты опытов по методу крутого восхождения

Номер опыта	Расход $H_2O_2$ , %	$T$ , °C	$\hat{y}_1$	$y_1^{\text{э}}$	$y_2^{\text{э}}$
1	5,2	91,3	80,33	80,1	7,5
2	6,4	92,6	82,66	81,9	7,2
3	7,6	93,9	85,0	84,7	6,6
4	8,8	95,2	87,34	87,1	6,2
5	10,0	96,5	89,67	85,8	6,5

*Примечание:*  $\hat{y}_1$  и  $y_1^{\text{э}}$  – расчетные и экспериментальные значения содержания целлюлозы, соответственно;  $y_2^{\text{э}}$  – экспериментальные значения содержания лигнина.

При расходе на окислительную обработку раствора перекиси водорода 5,2–10,0 % и проведении окислительной обработки при температуре 90–100 °C в течение 120 мин были получены образцы с содержанием целлюлозы 80,1–85,5 %, лигнина 6,2–7,5 %. При сравнении полученных результатов с расчетными значениями можно наблюдать, что расчетные значения содержания целлюлозы растут, а полученные в результате эксперимента значения сначала увеличиваются и, пройдя оптимальное значение, уменьшаются. Следовательно, оптимальными

условиями проведения окислительной обработки являются: расход перекиси водорода 8,8 % и температура обработки 95,2 °С.

Задача оптимизации сводилась к определению значений параметров, обеспечивающих увеличение содержания целлюлозы и уменьшение содержания лигнина в целлюлозосодержащем материале. Таким образом, в результате оптимизации процесса окислительной перекисной обработки при оптимальных условиях получен образец волокнистого материала, в котором содержание целлюлозы 87,1 %, а содержание остаточного лигнина 6,2 %.

Для выявления изменений в составе и структуре березовой древесины, произошедших в результате предварительной обработки, был проведен ИК-спектроскопический анализ материалов до и после предварительной обработки. ИК-спектры исследуемых образцов древесины березы приведены на рис. 1.

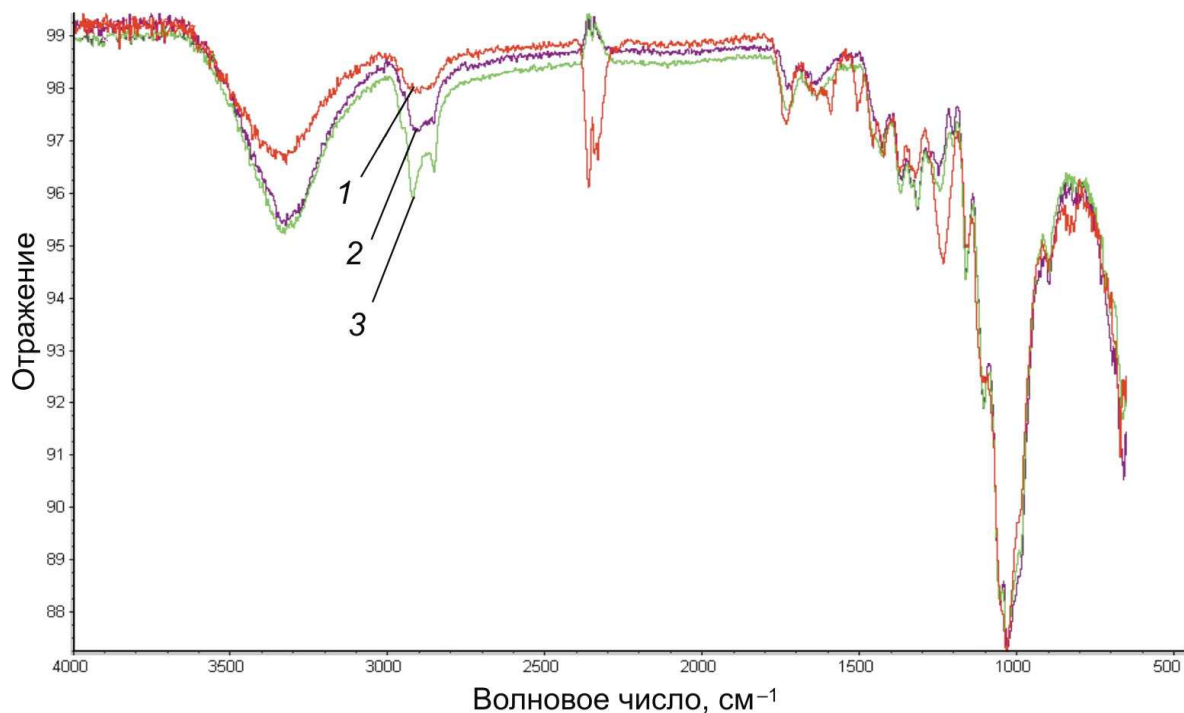


Рис. 1. ИК-фурье-спектры образцов березовой древесины до и после обработки: 1 – исходный образец древесины; 2, 3 – соответственно образцы № 1, 2 волокнистого материала, полученного после перекисной обработки

Известно, что в ИК-спектрах целлюлозы большая размытая полоса 3300–3400 см<sup>-1</sup> связана с валентными колебаниями ОН-групп, а относительно четко выделяющаяся полоса 1430 см<sup>-1</sup> связана с внутренними деформационными колебаниями СН<sub>2</sub> в группах СН<sub>2</sub>ОН, являющимися концевыми (боковыми) группами макромолекул целлюлозы.

Известно также, что в спектрах сахаров частоты внутренних деформационных колебаний этих метиленовых групп очень чувствительны к структурным факторам, поэтому полосу  $1430\text{ см}^{-1}$  в спектре целлюлозы следует отнести за счет  $\text{CH}_2$ -групп в участках с определенным силовым полем окружающих структурных элементов, а не ко всем группам  $\text{CH}_2$ , из чего большинство исследователей ИК-спектров целлюлозы связывают эту полосу с колебаниями  $\text{CH}_2$  около боковой группы атома  $\text{C}_6$ . Маятниковые деформационные колебания  $\text{C}_6\text{—OH}$  связаны с полосами в области  $1300\text{—}1400\text{ см}^{-1}$  [11].

В процессе предобработки происходит увеличение интенсивности полосы при  $1738\text{—}1709\text{ см}^{-1}$ , характеризующей  $\text{C=O}$  – валентные колебания в неконъюгированных кетонах, карбонилах, сложноэфирных группах. Возможно, это происходит из-за окисления лигнина. Определенные перестройки структуры лигнина видно по снижению интенсивности полос при  $1591$  и  $1506\text{ см}^{-1}$ , отражающих колебания в ароматических единицах лигнина. Происходит выравнивание этих полос по интенсивности, что говорит об изменении окружения бензольного кольца в молекуле лигнина. Также происходит резкое уменьшение полосы при  $1233\text{ см}^{-1}$ , отражающей колебания сиригильного кольца, что, возможно, связано с его деметилированием. Данные изменения подтверждают результаты химических анализов, в ходе которых определено снижение количества лигнина в волокнистом материале. Помимо этого, ослабляется полоса при  $1370\text{ см}^{-1}$ , свойственная алифатическим  $\text{CH}$ -симметричным деформационным колебаниям в метильных группах и плоскостным деформационным  $\text{OH}$ -колебаниям в фенолах.

В ИК-спектре образцов древесины, прошедших предобработку, видно исчезновение полосы, свойственной целлюлозе, в области  $1456\text{—}1455\text{ см}^{-1}$  и несколько понизилась интенсивность полос при  $1421\text{—}1427\text{ см}^{-1}$  (особенно, в образце № 1). В то же время происходит усложнение спектра в области  $950\text{—}770\text{ см}^{-1}$  с одновременным усилением интенсивности полосы при  $897\text{ см}^{-1}$ , что, обычно, наблюдается при химической и механической модификации целлюлозы. Сравнивая интенсивности полос при  $1421$  и  $897\text{ см}^{-1}$ , нельзя однозначно говорить об аморфизации целлюлозы. Полоса около  $1430\text{ см}^{-1}$  соответствует маятниковым деформационным колебаниям связи  $\text{CH}_2\text{—OH}$ . Уменьшение интенсивности этой полосы, тем более ее сглаживание, свидетельствует об исчезновении данной группы. По-видимому, наблюдаемые изменения отражают процессы, затрагивающие лигноцеллюлозный комплекс в целом. Предобработка способствует разрыхлению структуры дре-

веса. По этой причине в ИК-спектрах происходит одновременное снижение интенсивности полосы «кристалличности» ( $1421 \text{ см}^{-1}$ ) и повышение интенсивности полосы «аморфности» ( $897 \text{ см}^{-1}$ ).

Лучшие образцы полученного целлюлозного материала были использованы в качестве субстрата для ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз проводился при температуре  $50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 4,7 (0,1 М ацетатный буфер) и концентрации субстрата 10 г/л. Для эксперимента использовались ферментные препараты «Целлюлозим ультра» (с целлюлазной активностью 519,7 ед./г) и «ЦеллоЛюкс-Ф» (с целлюлазной активностью около 2000 ед./г) в разных концентрациях. В гидролизате определяли содержание редуцирующих сахаров. Результаты по ферментативному гидролизу (накопление РВ в гидролизатах) приведены в табл. 5 и на рис. 2, 3.

Таблица 5

Накопление сахаров (РВ) в гидролизате при ферментативном гидролизе

Номер опыта	Концентрация РВ, мг/мл, при времени ферментации (ч)						
	2	4	6	8	24	48	72
1	0,35	0,55	0,57	0,6	0,63	0,67	0,67
2	0,41	0,58	0,62	0,66	0,71	0,72	0,73
3	0,82	1,21	1,45	1,64	2,45	2,78	2,80
4	1,81	2,18	2,32	2,51	3,0	3,25	3,27

*Примечание:* опыт № 1 – образец 1 с ферментом «Целлюлозим ультра» (2 г/л), опыт № 2 – образец 2 с ферментом «Целлюлозим ультра» (2 г/л), опыт № 3 – образец 2 с ферментом «ЦеллоЛюкс-Ф» (2 г/л), опыт № 4 – образец 2 с ферментом «ЦеллоЛюкс-Ф» (4 г/л); температура  $50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 4,7 (0,1 М ацетатный буфер), концентрация субстрата 10 г/л.

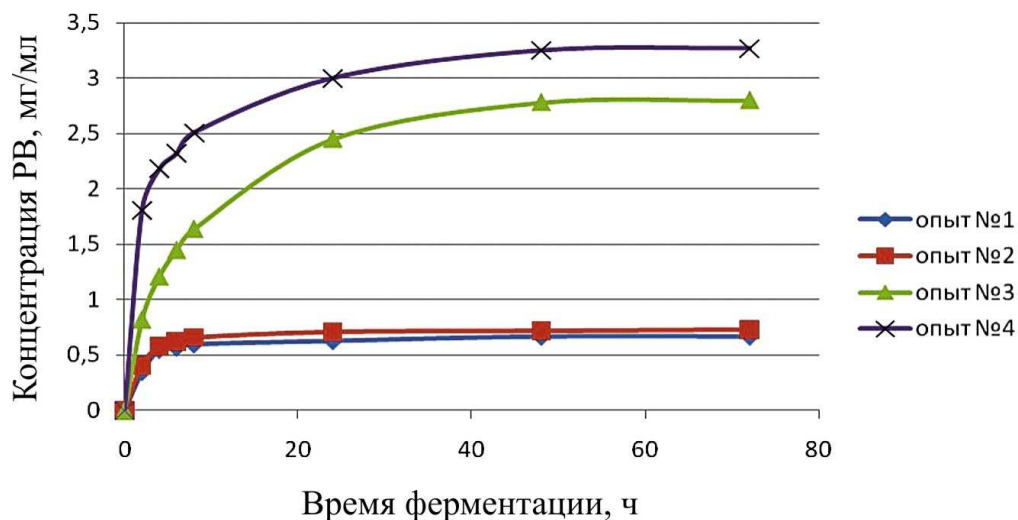


Рис. 2. Изменение концентрации РВ от времени ферментации



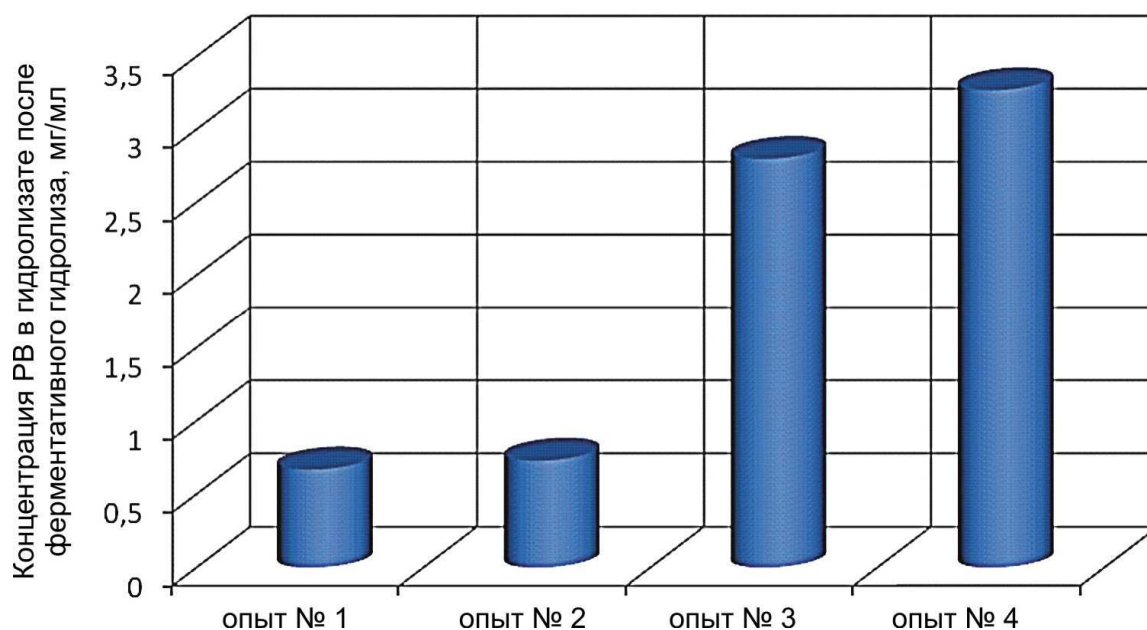


Рис. 3. Концентрация РВ в гидролизате после ферментативного гидролиза, мг/мл

По результатам эксперимента можно говорить о пригодности полученных перекисным способом образцов волокнистой массы к ферментативному гидролизу. При сравнении результатов опытов № 1 и 2, полученных при ферментативном гидролизе волокнистого целлюлозного материала, можно заметить, что более активно происходит осахаривание в опыте № 2. Вероятно, это происходит из-за меньшего содержания лигнина в образце (содержание лигнина в образце 1 – 7,0 %, в образце 2 – 6,2 %), т.е. целлюлозные волокна более доступны для ферментов.

В гидролизатах образцов 1 и 2 наблюдается довольно низкая концентрация РВ. Это можно объяснить низкой целлюлазной активностью ферментного препарата «Целлюлозим ультра», а также низким расходом этого препарата для проведения эксперимента. В работе был использован также фермент «ЦеллоЛюкс-Ф» с более высокой целлюлазной активностью (опыт № 3 и 4). Осахаривание массы происходит намного лучше в опыте № 3, чем в опыте № 2, что связано с большей активностью фермента. В опыте № 4 была увеличена концентрация фермента в 2 раза, что увеличило эффективность осахаривания. Но увеличение расхода фермента может быть экономически не выгодно. В дальнейших исследованиях планируется более детально изучить условия проведения ферментативного гидролиза, состава образующихся в ходе процесса продуктов (сахаров) и их сбраживаемость на спирт.

Данным исследованием показана возможность получения из древесного сырья целлюлозного материала, который можно использовать в качестве субстрата в процессе ферментативного гидролиза. Применение перекисного способа предобработки лигноцеллюлозного древесного сырья позволило получить волокнистый полуфабрикат, в котором содержание целлюлозы 89,1 %, лигнина 6,2 %. На основании данных исследований была разработана схема получения биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья. В качестве лигноцеллюлозной массы (древесного сырья) выбраны опилки березовой древесины. Схема предобработки растительного сырья перекисным способом следующая: водный гидролиз – щелочная пропитка гидролизованной древесины – полумасный размол пропитанных щелочным реагентом опилок – окислительная обработка перекисным раствором разволокненной массы. Водный предгидролиз в данном способе способствует разрыхлению структуры древесного сырья, что способствует глубокой щелочной пропитке опилок и качественному полумасному размолу. Раствор для пропитки предполагается повторно использовать. После размола масса промывается и сгущается для последующей окислительной обработки перекисным раствором. После окислительной обработки волокнистый материал промывается и направляется на ферментативный гидролиз для осахаривания. Полученные сахара далее сбраживаются в спирт. В результате брожения образуется биоэтанол. Промывные воды, а также растворы от ступеней предгидролиза, пропитки можно направлять на биохимическую переработку с получением дрожжей. После утилизации сахаров остаток, содержащий окисленный лигнин, можно использовать в полимерных композиционных материалах.

Таким образом, проведенное исследование ферментативного гидролиза субстрата, полученного из древесного сырья перекисным способом делигнификации, показало, что данный способ предобработки древесного сырья позволяет получить материал, пригодный для ферментативного гидролиза в производстве биоэтанола.

### Список литературы

1. Кошелева Д.А., Вольхин В.В. Влияние предварительной термохимической обработки древесины березы на результаты ее гидролиза // Вестник ПГТУ. Химическая технология и биотехнология. – Пермь, 2011. – № 12. – С. 172–185.

2. Кошелева Д.А., Вольхин В.В. Выбор метода и условий предобработки отходов березовой древесины при их подготовке к процессу биоконверсии в этанол // Вестник ПГТУ. Химическая технология и биотехнология. – Пермь, 2009. – № 10. – С. 5–15.

3. Изучение процесса подготовки лигноцеллюлозного материала для ферментативного гидролиза / М.В. Постникова, Е.В. Могрицкая, А.В. Виноградова, А.П. Павлова // Вестник ПГТУ. Химическая технология и биотехнология. – Пермь, 2011. – № 12. – С. 186–197.

4. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.

5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

6. Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н. Микробный синтез на основе целлюлозы: белок и другие ценные продукты. – Минск: Наука и техника, 1988. – 261 с.

7. Beng Guat Ooi, Ashley L. Rambo. Overcoming the recalcitrance for the conversion of Kenaf pulp to glucose via microwave-assisted pretreatment processes // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – № 12. – P. 1451–1463.

8. Kovacs K., Zacchi G. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichodema reesei* and *Trichodema atroviride* enzymes // Process Biochemistry. – 2009. – № 44. – P. 1323–1329.

9. Катализируемая делигнификация растительного сырья пероксидом водорода – новый перспективный способ производства технической целлюлозы / Р.З. Пен, А.В. Бывшев, И.Л. Шапиро [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 8. – С. 58–60.

10. Пен Р.З. Планирование эксперимента в Statgraphics. – Красноярск: Изд-во СибГТУ, 2003. – 246 с.

11. Базарнова Н.Г. Методы исследования древесины и ее производных. – Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та, 2002. – 160 с.

Получено 20.06.2012