



ДВУХСТУПЕНЧАТАЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБЫКНОВЕННОГО ТРОСТНИКА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА

Мансуров Олим Пардабоевич

аспирант,

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420111, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, д.4/5,

e-mail: manolimjon3110@mail.ru

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7316308>

ARTICLE INFO

Received: 02nd November 2022

Accepted: 11th November 2022

Online: 12th November 2022

KEY WORDS

Биоэтанол, кислотная и щелочная обработка, спиртовое брожение, целлюлаза, ферментация, гидролиз, лигноцеллюлоза.

ABSTRACT

Производство этанола второго поколения из лигноцеллюлозных биомасс, потенциал которых еще не полностью изучен в качестве сырья, имеет большое значение. Обыкновенного тростника является одной из таких биомасс. Это многообещающее травянистое растение для использования в качестве возобновляемого ресурса для производства топлива и химикатов из-за его быстрого роста, способности расти в различных типах почв и климатических условиях. Настоящее исследование оценило его использование в качестве сырья для производства этанола второго поколения.

Энергетические культуры – это растения, которые выращивают с целью энергетического использования их биомассы и одновременного сокращения выбросов углекислого газа [1]. Тростник гигантский, является одной из наиболее перспективных культур для производства энергии из-за его быстрого роста, способности расти на разных типах почвы и климатических условиях, устойчивых урожаев и устойчивости к длительному периоду засухи [2]. Обыкновенного тростника (ОТ) - это многолетняя корневищная трава, произрастающая в Азии, которая спонтанно растет в различных регионах многих стран, таких как Узбекистан, Россия и Бразилия. Он обычно встречается в

теплоумеренной среде с повышенной температурой и влажных местах. Имеются сообщения о том, что ОТ может достигать урожайности до 100 т/га⁻¹ зеленой биомассы со второго-третьего года выращивания в лучших условиях климата и орошения [2], что соответствует от 3 до 37 т дм/га⁻¹, несколько выше того, что дает сахарный тростник, от 5 до 23 т дм/га⁻¹ [1]. Благодаря легкой приспособляемости к различным условиям окружающей среды, быстрому росту и высокой продуктивности биомассы в последнее время он рассматривается как потенциальное сырье для производства топлива и химикатов [3, 4].



Включение этанола в глобальную энергетическую матрицу все чаще рассматривается из-за неоспоримых экологических преимуществ, которые способствует его использованию, связанных с осознанием снижения спроса на энергию из ископаемых источников. Поэтому для снижения себестоимости производства этанола необходимо внедрять технологические инновации, включая диверсификацию сырья. В этом контексте лигноцеллюлозная биомасса является объектом интенсивных исследований во всем мире, поскольку она представляет собой возобновляемое сырье углерода и энергии, доступное в больших количествах.

Эволюция технологии производства лигноцеллюлозного этанола, также называемого этанолом второго поколения, включает в себя поиск видов с высокой продуктивностью биомассы, экономичную предварительную обработку и выбор концепции процесса [5].

На эффективность преобразования лигноцеллюлозной биомассы в этанол могут влиять несколько факторов, при этом особое внимание уделяется необходимости улучшения доступа ферментов к биомассе для процесса гидролиза. В связи с этим несколько типов предварительной обработки могут улучшить выход сбраживаемых сахаров для повышения эффективности производства этанола, например, паровой взрыв, химическая предварительная обработка кислотами или основаниями, ферментативная предварительная обработка и другие [5]. Сообщалось, что в этом подходе различные технологии обработки

биомассы увеличивают контактную поверхность, чтобы обеспечить больший доступ для ферментов, снижение кристалличности и сопротивляемости целлюлозы, а также удаление гемицеллюлозы и лигнина [6]. После предварительной обработки ферментируемые сахара получают путем гидролиза целлюлозы под действием специфических ферментов (целлюлаз). Обычно эти целлюлозолитические ферменты состоят из смеси эндоглюканаз, которые расщепляют внутренние связи целлюлозного волокна с образованием целлодекстринов; экзоглюканазы, продуцирующие целлобиозу из восстанавливающего и невозстанавливающего концов цепей целлюлозы, и β -глюкозидаза, гидролизующая целлобиозу и небольшие олигомеры с высвобождением глюкозы [7].

Ферментативный гидролиз целлюлозы можно проводить последовательно с последующей ферментацией в схеме процесса, называемой отдельным гидролизом и ферментацией (РГФ), или он может происходить в одновременном процессе, называемом одновременным осахариванием и ферментацией (ООФ). В процессе ООФ объединяются два этапа (осахаривание и ферментация), и этот процесс способствует снижению затрат на промышленном предприятии. Кроме того, в этом процессе ферменты менее восприимчивы к ингибированию продуктами их гидролиза, поскольку глюкоза одновременно высвобождается и ферментируется [5,8]. С другой стороны, оптимальная температура для активности гидролитических



ферментов и дрожжевого брожения сахаров различна, а это означает, что условия не являются оптимальными как для ферментов, так и для дрожжевых клеток в процессе ООФ [9]. В этой работе нашей целью было охарактеризовать фракции целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина ОТ; исследовать влияние частичной делигнификации разбавленным NaOH на ферментативный гидролиз биомассы ОТ и оценить процесс ООФ для производства этанола второго поколения из частично делигнифицированной биомассы обыкновенного тростника.

2. Материалы и методы

Предварительная обработка

Один килограмм биомассу подвергали предварительной кислотной обработке 1,1% раствором серной кислоты при соотношении твердой и жидкой фаз 1:2,8 (г/мл) и нагревали в автоклаве при 121°C с выдержкой 30 мин в течение раскрытия волокон [11]. Твердый остаток, называемый кислым целлюлигнином (КЦЛ), неоднократно промывали водой для удаления кислоты. pH доводили до 5,0 с помощью 2 М раствора NaOH. КЦЛ сушили в печи с принудительной подачей воздуха при 60°C в течение ночи. Высушенный остаток взвешивали для оценки предварительной обработки кислотой. КЦЛ подвергали предварительной щелочной обработке, чтобы уменьшить содержание лигнина и тем самым повысить эффективность ферментативного гидролиза. Предварительную щелочную обработку проводили 0,5 М раствором NaOH. Условия реакции для

предварительной обработки щелочью: соотношение твердое вещество:жидкость 1:20 г/мл, 120°C в течение 30 мин, как рекомендовано [7]. Затем суспензию фильтровали и остаток промывали водой не менее трех раз, а pH доводили до 5,0 с помощью 0,1 М H₂SO₄ раствор. Твердую фракцию сушили в сушильном шкафу при 60°C так же, как и исходную биомассу ОТ. Эта фракция была названа частично делигнифицированным целлюлигнином (ДЦЛ).

Ферментативный гидролиз

ОТ (в натуре без предварительной обработки), КЦЛ и ДЦЛ анализировали на предмет ферментативного гидролиза с использованием ферментной нагрузки 25г твердого вещества, суспендированного в цитратном буфере (pH 5,0). Используемая концентрация твердого вещества составляла 100 г/л, pH 5,4 50°C в течение 30 ч во встряхиваемых колбах (200 об/мин). Образцы брали в заранее определенное время и центрифугировали для количественного определения количества высвобождаемой глюкозы.

Этанольная ферментация

Ферментативность ферментативного гидролизата осуществляли с использованием концепции ООФ, однако была задумана стадия предварительного гидролиза перед ООФ для увеличения потока гликолиза в начале стадии ферментации. Эксперимент проводился в биореакторе, с твердой загрузкой 250 г/л и рабочим объемом 1 л. ДЦЛ и буфер, содержащий питательные вещества для добавок, стерилизовали при 0,5 атм в течение 15 мин.



Пред гидролиз проводили с использованием 100 г ДЦЛ цитратом натрия растворе с ферментной нагрузкой 25 г твердых веществ и с добавками для процесса ООФ: мочевины (1,25 г/л), K_2HPO_4 (1,1 г /л). л), дрожжевой экстракт (2 г/л) и солевой раствор (40 мл/л), как рекомендовано [12]. Температуру и скорость перемешивания поддерживали на уровне 50°C и 200 об/мин соответственно в течение 12 часов. Два образца были собраны во время стадии предварительного гидролиза (6 ч и 12 ч) для определения высвобождающихся сахаров. После этого температуру доводили до 37°C и в среду инокулировали клетки коммерческого штамма *Saccharomyces cerevisiae* в концентрации 6 г/л для начала одновременного процесса осахаривания и брожения. По мере разжижения среды в среду добавляли дополнительно 50 г ДЦЛ с интервалом 12 ч до загрузки 250 г/л.

Кинетические профили потребления субстрата и продукции этанола отслеживали в течение 78 часов. Эффективность превращения целлюлозы в этанол рассчитывали по [формула 1].

$$Э_{\phi} = (C\% / ((C\%_{\text{ДЦЛ}} * 1,11) * 0,511)) * 100$$

где:

$Э_{\phi}$ -Эффективность ферментации для преобразования целлюлозы в этанол (%)

$C\%$ конечная концентрация этанола (г/л)

$C\%_{\text{ДЦЛ}}$ концентрация целлюлозы в ДЦЛ

0,511 коэффициент пересчета теоретический максимальный субстрат в этаноле

1.11 коэффициент пересчета, относящийся к превращению целлюлозы в глюкозу.

3. Результаты и обсуждение

Характеристика различных фракций биомассы ОТ

Химический состав цельной биомассы ОТ и ее предварительно обработанных фракций по основным компонентам представлен в [таблице 1](#).

Таблица 1. Процентный состав цельного ОТ и его предварительно обработанных фракций.

Образец	Целлюлоза (%)	Гемицеллюлоза (%)	Лигнин (%)
ОТ	31,10 ± 1,03	35,27 ± 2,80	18,49 ± 0,10
КЦЛ	42,49 ± 1,88	18,53 ± 1,42	24,75 ± 0,32
ДЦЛ	72,17 ± 5,90	11,53 ± 1,61	10,05 ± 0,20

КЦЛ: кислый целлюлигинин;

ДЦЛ: частично делигнифицированный целлюлигинин.

Обыкновенного тростник содержит примерно 31% целлюлозы, 35% гемицеллюлозы и 6,1% золы. [7] обнаружили 7,9% золы жмыха сорго и сравнили его с рисовой и пшеничной соломой, которые содержат 17 и 11% золы соответственно. Преимуществом интегрального ОТ можно считать более

низкое содержание золы, так как при предварительной обработке биомасса содержащие соли растворяются в гемицеллюлозе и гидролизатах целлюлозы. Это увеличение концентрации ионов приводит к увеличению осмотического давления в



среде, что затрудняет сбраживаемость образующихся гидролизатов.

Кислотная предварительная обработка удалила 28,6% (масс./масс.) исходной массы ОТ (Таблица 2) за счет удаления 62,5% гемицеллюлозы, что снизило ее содержание до 18,5% по сравнению с

Таблица 2. Массовый выход после кислотной и щелочной предварительной обработки ОТ.

Предварительная обработка	Начальная масса (г)	Конечная масса (г)	Массовый выход (%)
Кислота	1000,0 (ОТ)	713,6 (КЦЛ)	71,4
Кислота + щелочь	500,0 (АККЛ)	337,0 (ДЦЛ)	64,7

При предварительной щелочной обработке общее снижение содержания гемицеллюлозы и удаления лигнина составило примерно 85% и 75% соответственно. Эта частичная делигнификация необходима для последующего ферментативного гидролиза, так как улучшает доступ ферментов к целлюлозе. Кроме того, лигнин ограничивает скорость и степень ферментативного гидролиза, действуя как «щит», предотвращая гидролиз перевариваемых частей субстрата.

Хотя предварительная обработка кислотой с последующей щелочной обработкой привела к низкому массовому выходу (64,7%), что и ожидалось, поскольку удаление гемицеллюлозы, лигнина и экстрактивных веществ приводит к потере веса (таблица 2), делигнификация оказалась существенной для увеличения выхода ферментативного гидролиз. Делигнификация позволяет набухать волокнам и разрушает структурную связь между лигнином и углеводами.

исходным составом 35,3%. Фракция объекта исследования - целлюлоза - была сконцентрирована с 31 до 72% при использовании обеих предварительных обработок, что увеличило ее процентное содержание в сухом веществе в 2,3 раза.

Другим фактором, непосредственно влияющим на выход ферментативного гидролиза, является концентрация кислоты и основания, используемых при предварительной обработке. Таким образом, кислотную и щелочную предварительную обработку следует применять в возможно меньшей степени жесткости (сочетание температуры, времени воздействия и концентрации средства предварительной обработки). Эксперименты по оценке уровней щелочной предварительной обработки багассы сахарного тростника показали, что количество гидроксида натрия, используемого для делигнификации, можно уменьшить до 0,25 М или даже 0,125 М без существенной потери выхода ферментативного гидролиза [13].

3.2. Ферментативный гидролиз

Обыкновенного тростник, КЦЛ и ДЦЛ гидролизовали в течение 24 часов, используя ферментную нагрузку 25 г твердого вещества (рис.1). Выход глюкозы и скорость гидролиза увеличивались за счет предварительной обработки кислотой и щелочью.

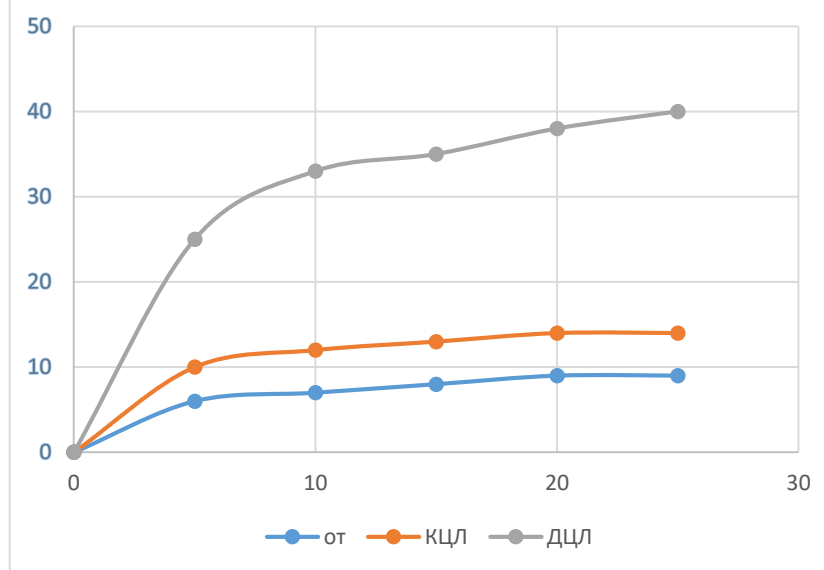


Рис. 1. Ферментативный гидролиз целлюлозы различных ОТ. КЦЛ: кислый целлюлигин; ДЦЛ: частично делигнифицированный целлюлигин.

Самая высокая концентрация глюкозы 42,0 г/л была получена с ДЦЛ с 30-часовым гидролизом, тогда как с необработанной биомассой (ОТ) и КЦЛ максимальные полученные концентрации глюкозы составили только 6,8 и 13,9 г/л соответственно. Максимальное значение конверсии целлюлозы, равное 52%, для гидролиза ДЦЛ может оказаться относительно низким, но это может быть связано с ингибированием целлюлозолитического комплекса конечными продуктами гидролиза [7] получили максимальную концентрацию глюкозы 40,4 г/л из жома сахарного тростника с помощью ферментативного гидролиза с использованием коммерческой целлюлазы, что также соответствует эффективности конверсии целлюлозы 50%. Гидролиз биомассы с высокой степенью кристалличности происходит медленнее, потому что аморфная

целлюлоза легче превращается в глюкозу, чем кристаллическая целлюлоза. Эта тенденция, однако, не была полностью выяснена в других исследованиях. Размер пор субстрата по отношению к размеру ферментов является основным лимитирующим фактором в ферментативном гидролизе лигноцеллюлозной биомассы. Коммерческий ферментный препарат, использованный в настоящей работе, также проявлял ксиланолитическую активность, поскольку остаточный ксилан в частично делигнифицированном целлюлине гидролизовался, что приводило к накоплению ксилозы в среде (рис.2). Эта особенность представляет интерес для изучения в будущем концепции гидролизатов гемицеллюлозы ОТ, включая дополнительно ксилозу из предварительной кислотной обработки.

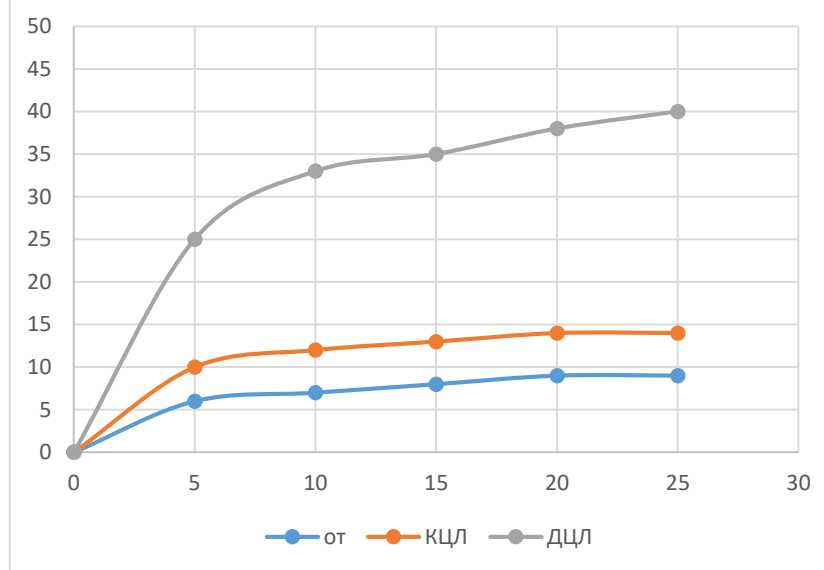


Рис. 2. Ксилановый ферментативный гидролиз различных фракций *ОТ*. КЦЛ: кислый целлюлигин; ДЦЛ: частично делигнифицированный целлюлигин.

Важным фактором, который также может влиять на эффективность гидролиза, является ферментная нагрузка. Протестировали ферментативную нагрузку в диапазоне от 25 г до 150 г для гидролиза предварительно обработанного щелочью багассы сахарного тростника и сообщили, что не было обнаружено значительного увеличения выхода ферментативного гидролиза с увеличением ферментативной нагрузки после 24 часов гидролиза. Эта статья и еще одна статья, опубликованная [11], послужили справочными материалами для определения ферментной нагрузки для настоящего исследования *ОТ*. Рационализация загрузки ферментов имеет экономическое значение для процесса, учитывая, что ферменты являются дорогостоящими, включая экономический эффект в процессе.

3.3. Одновременное осахаривание и ферментация фракции целлюлозы *ОТ*
Концентрация твердого вещества является лимитирующим фактором для

производства этанола в процессе *ООФ* [9]. В этом исследовании *ООФ* проводили с ДЦЛ при конечной твердой нагрузке 250 г/л. В биореактор подавали ДЦЛ постепенно, начиная со 100 г/л, с последующими тремя дополнительными загрузками (50 г) для достижения конечной твердой загрузки. Согласно Маеде и соавт. [14], периодическая система с подпиткой имеет несколько преимуществ, среди которых можно поддерживать низкие уровни ингибиторов ферментации, а что касается систем ферментации с подачей твердых веществ, этот режим работы облегчает перемешивание среды, уменьшая проблемы с передачей импульса, тепла и массы. Это связано с тем, что твердая суспензия, содержащая целлюлозу, разжижается под действием препарата целлюлазы, что позволяет добавлять дополнительные твердые вещества.

Перед добавлением дрожжей в ферментацию *ООФ* проводили пред гидролиз в течение 12 ч, в результате чего концентрация глюкозы составила



28 г/л. После предварительного гидролиза в систему инокулировали коммерческие дрожжи, которые быстро превращали выделившуюся глюкозу в этанол. В этой начальной фазе ферментации скорость превращения глюкозы высока из-за более высокой начальной доступности глюкозы. На втором этапе, когда концентрация глюкозы снижается, производство этанола регулируется активностью ферментов, и скорость производства этанола начинает снижаться из-за высокой популяции дрожжевых клеток, которые сразу потребляют все высвобождаемые глюкозу путем ферментативного гидролиза.

Таким образом, скорость ферментативной реакции не соответствует скорости брожения; однако концентрация сахаров (целлобиозы и глюкозы) оставалась на низком уровне, что указывает на то, что ферменты, добавленные в систему, оставались активными во время ферментации, а высвобождаемая глюкоза (конечный продукт ферментативного гидролиза) одновременно ферментировалась до этанола. Что касается присутствия ксилозы, то на стадии предварительного гидролиза наблюдалось небольшое увеличение ее концентрации, после чего она оставалась постоянной, что свидетельствует о неспособности дрожжей потреблять эту пентозу, как и ожидалось.

Конечная концентрация этанола составила 39,0 г/л, а объемная производительность – 0,56 г/л ч, что можно считать очень многообещающим

результатом, поскольку исследования по оптимизации еще не проводились.

4. Заключительные замечания

Лигноцеллюлозные материалы являются объектом интенсивных исследований во всем мире, поскольку они являются возобновляемым источником углерода и энергии, доступных в больших количествах во многих странах, что, вероятно, приведет к значительным перестройкам в ключевых секторах экономики этих стран (жидкое топливо, пищевая промышленность, корма, химикаты, целлюлоза и бумага и др.). Производство этанола второго поколения из лигноцеллюлозной биомассы, потенциал которой еще не полностью изучен, имеет большое значение обыкновенного тростника является сильным кандидатом для использования в качестве возобновляемого источника сырья на биохимической платформе в рамках концепции биопереработки, поскольку он был склонен к ферментативному гидролизу, гидролизат которого проявлял способность к быстрому брожению. Он содержит 31% целлюлозы, 35% гемицеллюлозы и 18% лигнина. Частичная делигнификация *OT* повышает эффективность его ферментативного гидролиза, так как позволяет быстро разжижать и гомогенизировать среду, благоприятствуя действию дрожжей. Из исследованного здесь процесса можно было оценить соотношение 75 л этанола на тонну биомассы *OT*. Однако возможность получения более высоких коэффициентов ферментативной ферментации гидролизата и включения сахаров, полученных из



гемицеллюлозы, может иметь исследований.
стратегическое значение для будущих

References:

1. Левандовски И., Скарлок ЖМО, Линдвалл Э., Кристоу М. Развитие и текущий статус многолетних корневищных трав как энергетических культур в США и Европе. Биомасса Биоэнергия 2003;25:335-61
2. Васконселос Г.К., Гомес Х.К., Корреа Л.А. Rendimento de biomassa da Cana-do-Reino (*Arundo donax* L.). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 42. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2007.
3. Папазоглу Э.Г., Карантуниас Г.А., Веммос С.Н., Буранис Д.Л. Реакция фотосинтеза и роста гигантского тростника (*Arundo donax* L.) на тяжелые металлы Cd и Ni. Environ Int 2005;31:243.
4. Пилу Р., Буччи А., Бадоне Ф.К., Ландони М. Гигантский тростник (*Arundo donax* L.): сорное растение или многообещающая энергетическая культура. 2012;11:9163-74.
5. Перейра-младший Н., Коуто М.А.П.Г., Санта-Анна ЛММ. Биомасса лигноцеллюлозного состава для производства топливного этанола в рамках биопереработки. Рио-де-Жанейро: Серия по биотехнологии, том. 2. Национальная библиотека; 2008.
6. Олофссон К., Бертилссон М., Лиден Г. Краткий обзор SSF — интересный вариант процесса производства этанола из лигноцеллюлозного сырья. Биотехнология Биотопливо 2008; 1:1-14.
7. Barcelos CA, Maeda RN, Betancur GJV, Pereira Jr N. Необходимость делигнификации при ферментативном гидролизе целлулигина жмыха сахарного тростника для производства этанола второго поколения. Повышение ценности отходов биомассы 2013;4:341-6.
8. Castro AM, Carvalho MLA, Leite SGF, Pereira Jr N. Целлюлазы из *Penicillium funiculosum*: получение, свойства и применение для гидролиза целлюлозы. J Ind Microbiol Biotechnol 2010;37:151-8.
9. Öhgren K, Rudolf A, Galbe M, Zacchi G. Производство топливного этанола из предварительно обработанной паром кукурузной соломы с использованием SSF при более высоком содержании сухого вещества. Биомасса Биоэнергия 2006;30:863-9.
10. Гхош Т.К. Измерение активности целлюлазы. Pure Appl Chem 1987; 59:257-68.
11. Betancur GJB, Pereira Jr N. Жом сахарного тростника как сырье для производства этанола второго поколения. Часть I: Оптимизация предварительной обработки разбавленной кислотой. Электрон Дж. Биотехнология 2010:13.
12. Маэда Р.Н., Серпаб В.И., Роча В.А., Мескитаб Р.А.А., Санта-Анна Л.М., Кастро А.М. и др. Ферментативный гидролиз предварительно обработанного багассы сахарного тростника с использованием целлюлаз *Penicillium funiculosum* и *Trichoderma harzianum*. Process Biochem 2011; 46: 1196-201.
13. Чанг В.С., Хольцэппл МТ. Фундаментальные факторы, влияющие на ферментативную реакционную способность биомассы. Appl Biochem Biotechnol 2000;84-86:5-37



14. Maeda RN, Barcelos CA, Santa Anna LMM, Pereira Jr N. Производство целлюлазы *Penicillium funiculosum* и ее применение в гидролизе багассы сахарного тростника для производства этанола второго поколения с подпиткой. Дж. Биотехнология 2013; 163:38-44