

УДК 664.162.036.4:577.15

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТОЛИЗА ОБРАЗЦОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МИСКАНТУСА И ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА**Макарова Е.И., Будаева В.В., Кухленко А.А.,
Орлов С.Е.***Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН,
Бийск, e-mail: massl@mail.ru*

Изучена кинетика ферментации образцов целлюлозы, полученных азотнокислым и комбинированным способами из мискантуса и плодовых оболочек овса, и установлено, что независимо от вида сырья и начальной концентрации субстрата в диапазоне от 30 г/л до 120 г/л начальная скорость выше для образцов целлюлозы, полученных комбинированным способом, чем для образцов целлюлозы, полученных азотнокислым способом. Показано, что большей скоростью гидролиза характеризуются субстраты из плодовых оболочек овса.

Ключевые слова: мискантус, плодовые оболочки овса, целлюлоза, ферментация, редуцирующие вещества, концентрация субстрата, кинетика, математическая модель, константа модели

**FERMENTOLYSIS KINETICS OF MISCANTHUS
AND OAT HULL PULP SAMPLES****Makarova E.I., Budaeva V.V., Kukhlenko A.A.,
Orlov S.E.***Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, Bysk, e-mail: massl@mail.ru*

The fermentolysis kinetics of pulp samples derived by the dilute nitric-acid and combined methods from Miscanthus and oat hulls was studied, and the initial rate was found to be higher for the pulp samples obtained by the combined technique than for the pulp samples derived by the nitric-acid method, irrespective of the raw material type and initial concentration ranging from 30 to 120 g/L. The oat hull substrates were shown to be characterized by a greater hydrolysis rate.

Keywords: Miscanthus, oat hulls, pulp, fermentolysis, reducing sugars, substrate concentration, kinetics, mathematical model, model constant

Актуальность изучения кинетики ферментации целлюлозы обусловлена необходимостью прогнозирования реакционной способности к ферментации предварительно обработанного целлюлозосодержащего сырья. В связи с этим активно проводятся исследования ферментации различных по виду сырья и способу выделения образцов целлюлозы [3, 4, 9, 10]. Существуют различные точки зрения на зависимость способности к ферментации целлюлозы от степени полимеризации и степени кристалличности [4, 9, 10]. Как правило, исследуют кинетику ферментации при низких концентрациях субстрата 5-30 г/л, гарантирующих максимальную степень конверсии.

Цель исследования – экспериментальное изучение кинетики ферментации образцов целлюлозы, полученных различными методами из мискантуса и плодовых оболочек овса, при различных концентрациях субстрата.

**Материалы
и методы исследования**

В качестве субстратов использовали образцы целлюлозы, полученные химической обработкой

мискантуса и плодовых оболочек овса на опытно-производстве ИПХЭТ СО РАН: азотнокислым (АС) и комбинированным способами (КС). При азотнокислым способом получения целлюлозы сырье подвергалось последовательной обработке разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия. При комбинированном – теми же реактивами в обратном порядке [8]. Определение основных характеристик образцов целлюлозы, приведенных в табл. 1, проводилось по стандартным методикам [7]. Степень кристалличности рассчитывалась по методу Руланда по результатам рентгеноструктурного анализа (дифрактометр «ДРОН-3М» в геометрии на отражение FeK α -излучении с монохроматизацией падающих лучей кристаллом пиролитического графита) [4].

Очевидно (табл. 1), что компонентный состав образцов целлюлозы мискантуса (Ц М) и плодовых оболочек овса (Ц ПОО) представлен по большей части гидролизуемыми компонентами – целлюлозой (90-92%) и пентозанами (2-7%). Малая доля относится к негидролизуемым примесям – остаточному лигнину (0,5-3,6%) и золе (0,1-4,2%). В образцах целлюлозы, полученных комбинированным способом, наблюдается более высокое содержание гемицеллюлоз вследствие снижения продолжительности стадии обработки азотной кислотой. Значения степени полимеризации для образцов целлюлозы из одного вида сырья, но полученных различными способами, находятся на одном уровне, что позволяет предположить об отсутствии влияния способа обработки на величину данного показателя.

Таблица 1

Физико-химические характеристики образцов целлюлозы

Показатели	Образец Ц М		Образец Ц ПОО	
	АС	КС	АС	КС
М.д. α-целлюлозы, %	90,3	90,5	91,0	92,3
М.д. остаточного лигнина, %	3,6	1,4	0,8	0,5
М.д. золы, %	4,2	0,7	5,8	0,1
М.д. пентозанов, %	1,7	6,4	2,0	6,9
Степень полимеризации	660	760	1140	1140
Степень кристалличности, %	70	65	67	62

Примечание. м.д. – массовая доля.

Ферментативный гидролиз субстратов проводился высокоэффективной мультиэнзимной композицией из промышленных ферментных препаратов «Целлолюкс-А» (производитель ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск) и «Брюзайм ВГХ» (поставщик компания «Русфермент», г. Москва). Препараты вносились в композицию в соотношении 1:1. Параметры процесса: температура (45±2) °С, рН=(4,6±0,3) (ацетатный буфер), начальные концентрации субстрата от 30 г/л до 120 г/л с шагом 30 г/л, фермент-субстратное соотношение 1:50. Перемешивание осуществлялось на платформе «ПЭ – 6410 М» с частотой колебаний 150 об/мин. Продолжительность гидролиза 72 ч.

Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу в гидролизате определялась спектрофотометрическим методом с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) на «UNICO UV-2804» (США); относительная погрешность метода составляет 3,5%. Выход РВ рассчитывался на массу субстрата с учетом коэффициента

0,9, обусловленного присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате гидролиза.

Математические модели, описывающие кинетику процессов ферментации субстратов, строились по экспериментальным данным на основе модифицированного уравнения Михаэлиса-Ментен, предложенного Бриггсом и Холдейном [2, 6]. Константы скоростей реакций определялись путём аппроксимации экспериментальных данных методом наименьших квадратов [1].

Результаты исследования и их обсуждение

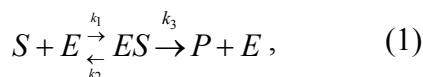
Зависимости концентрации и выхода РВ через 72 ч ферментации от начальной концентрации четырех субстратов Ц М и Ц ПОО представлены в табл. 2. Для всех начальных концентраций субстратов получены выходы РВ от 44 % до 92 %.

Таблица 2

Зависимости концентрации и выхода РВ через 72 ч ферментации от начальной концентрации субстратов в диапазоне 30-120 г/л

Продолжительность гидролиза, ч	Концентрация РВ, г/л							
	образец Ц М							
	АС				КС			
	30	60	90	120	30	60	90	120
8	7,8	14,8	19,6	25,1	13,8	22,7	28,4	26,0
16	13,3	18,9	23,5	27,3	22,4	32,7	42,5	47,1
32	18,0	26,7	36,3	41,1	27,3	45,5	58,3	68,2
40	19,6	33,0	41,8	47,1	28,3	50,2	63,1	74,0
48	21,0	35,3	46,0	51,2	29,0	53,2	67,2	78,0
64	22,2	38,0	50,0	58,7	30,0	55,0	71,8	84,3
72	22,2	38,0	50,0	58,7	30,0	55,0	72,0	84,3
Выход РВ, %	66,7	57,0	50,0	44,0	90,0	82,5	72,0	63,2
Продолжительность гидролиза, ч	образец Ц ПОО							
	АС				КС			
	30	60	90	120	30	60	90	120
8	11,5	20,2	22,2	40,0	22,8	26,9	38,4	39,3
16	17,0	28,5	38,4	53,1	27,8	35,2	52,5	60,4
32	23,2	38,7	59,1	65,1	30,0	45,3	68,3	81,3
40	25,3	41,7	66,5	72,0	30,4	48,3	73,1	87,3
48	26,5	46,0	70,9	79,5	30,5	52,7	77,2	91,3
64	27,5	53,7	77,6	87,5	30,8	60,0	81,3	96,9
72	27,5	53,8	77,9	87,5	30,8	60	81,3	96,9
Выход РВ, %	82,5	80,7	77,9	65,6	92,4	90,0	81,3	72,7

Согласно классической теории ферментативного катализа Михаэлиса-Ментен, получение конечного продукта (РВ) из субстрата (образца целлюлозы) проходит через образование фермент-субстратного комплекса ES. При этом реакция образования фермент-субстратного комплекса характеризуется константой скорости k_1 , реакция его распада – k_2 , реакция образования конечного продукта P – k_3 . Такой механизм описывается следующим уравнением химической реакции:



где S – субстрат; E – фермент; ES – фермент-субстратный комплекс; P – продукт [2, 6].

В таком случае, обозначив концентрации исходного и промежуточного веществ и продукта реакции (РВ) как C_S , C_{ES} и C_P , можно записать систему уравнений, описывающую кинетику ферментолитиза. Уравнения, описывающие процесс ферментолитиза всех образцов целлюлозы, при их математической записи будут идентичными и отличаются только значениями коэффициентов k_1 , k_2 , k_3 и C_m (C_m – равновесная концентрация РВ).

В начальный момент времени: $t=0$; $C_S=C_m$; $C_{ES}=C_P=0$.

Кинетические уравнения, описывающие превращения субстрата в РВ, будут записаны следующим образом:

Для построения математической модели необходимо определить величины C_m , k_1 , k_2 и k_3 . Коэффициенты скоростей реакций k_1 , k_2 и k_3 зависят от природы субстрата и от внешних условий (температуры, pH, условий перемешивания субстрата в процессе ферментолитиза и др.), которые не менялись. Поскольку в работе фермент взят в избытке, данные коэффициенты не зависят от соотношения фермента и субстрата. Коэффициент C_m , кроме отмеченных факторов, зависит также и от начальной концентрации субстрата, поэтому при нахождении коэффициентов системы уравнений для образцов Ц М и Ц ПОО данные обстоятельства были учтены. Обработка экспериментальных данных осуществлялась следующим образом: уравнения (3) и (4) были объединены в выражение (5), описывающее изменение концентрации РВ:

$$C_P = C_m - (C_S + C_{ES}). \quad (5)$$

Выражение (5) использовалось в качестве аппроксимирующей функции, определяющей коэффициенты моделей для субстратов. Аппроксимация экспериментальных данных, представленных в табл. 2, выполнялась по уравнению (5) методом наименьших квадратов [1].

Расчет коэффициентов математических моделей позволил определить константу диссоциации фермент-субстратного комплекса k_s (предложенную Михаэлисом

$$\begin{aligned} \frac{dC_S}{dt} &= -k_1 C_S + k_2 C_{ES}; \\ \frac{dC_{ES}}{dt} &= k_1 C_S - (k_2 + k_3) C_{ES}; \\ \frac{dC_P}{dt} &= k_3 C_{ES}. \end{aligned} \quad (2)$$

Решением системы уравнений (2) являются выражения [6]:

$$C_S = C_m \left\{ \frac{\lambda_2 - k_1^{-1} k_3}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_3)} \exp(-\lambda_2 k_1 t) + \frac{k_1^{-1} k_3 - \lambda_3}{\lambda_3 (\lambda_2 - \lambda_3)} \exp(-\lambda_3 k_1 t) \right\} \quad (3)$$

$$C_{ES} = \frac{C_m}{\lambda_2 - \lambda_3} [\exp(-k_1 \lambda_3 t) - \exp(k_1 \lambda_2 t)], \quad (4)$$

где $\lambda_2 = \frac{1}{2}(\alpha + \beta)$; $\alpha = 1 + \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_3}{k_1}$; $\lambda_3 = \frac{1}{2}(\alpha - \beta)$; $\beta = \left(\alpha^2 - \frac{4k_3}{k_1} \right)^{0,5}$.

и Ментен) и константу Михаэлиса k_m (предложенную Бриггсом и Холдейном) [2, 6]:

$$k_s = k_2/k_1;$$

$$k_m = k_s + k_3/k_1.$$

Из представленных в табл. 3 результатов следует, что с увеличением концентрации субстратов величина C_m , характеризующая конечную концентрацию РВ для субстратов, полученных комбинированным способом, выше, чем для субстратов, полученных азотнокислым способом. То есть превращение этих субстратов в РВ характеризуется более высоким выходом.

в табл. 3, была подтверждена по критерию Фишера [1].

Так как коэффициенты математической модели получены путем аппроксимации экспериментальных данных, то ограничения по модели в обоих случаях являлись области исходной концентрации субстратов от 30 г/л до 120 г/л и продолжительности процесса ферментализации от 0 ч до 72 ч.

При оценке эффективности проведенных процессов ферментализации субстратов необходимо совместно рассмотреть поведение начальной скорости гидролиза и выхода РВ. Из результатов, представленных в табл. 3, следует, что отношение коэффициентов k_2 к k_1 (величина k_s) для образцов целлюло-

Таблица 3

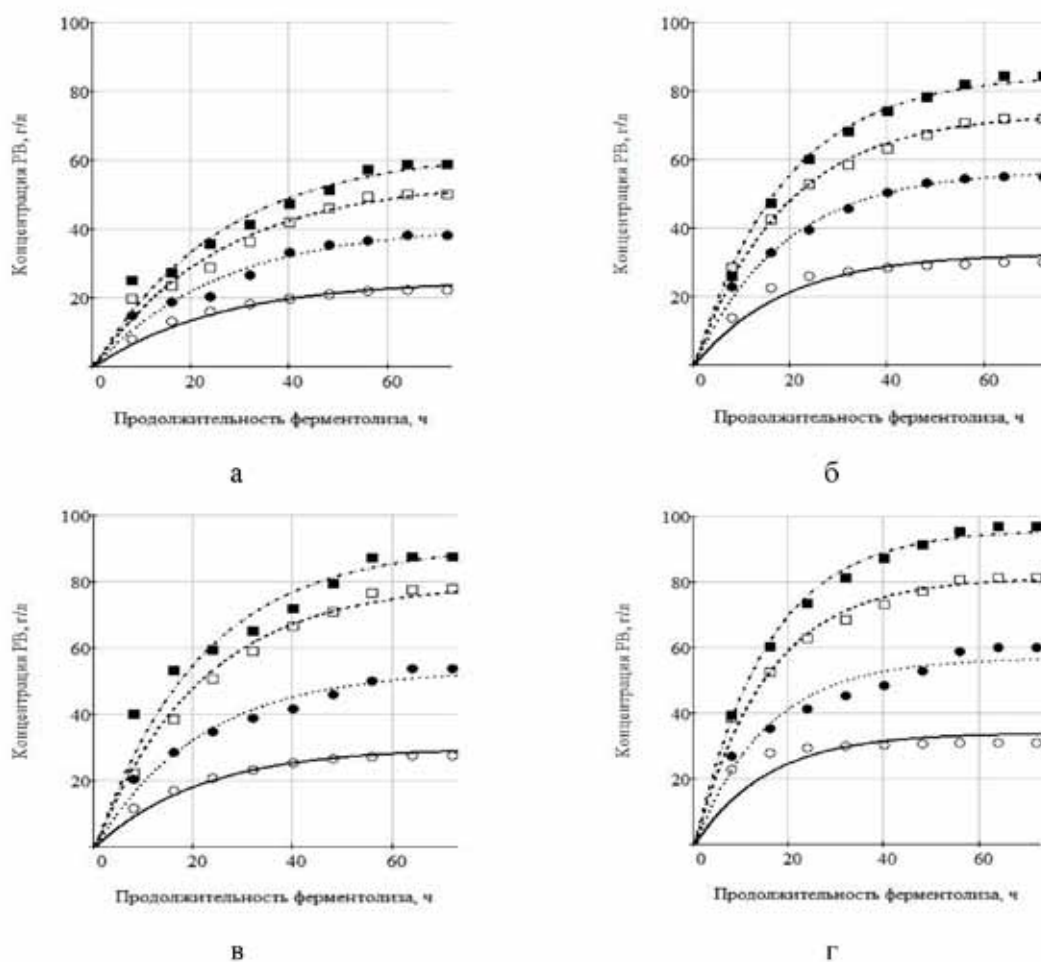
Расчетные значения коэффициентов и констант математических моделей процессов ферментализации для субстратов Ц М АС, Ц М КС, Ц ПОО АС, Ц ПОО КС

	Образец Ц М							
	АС				КС			
	30	60	90	120	30	60	90	120
C_m , г/л	24,90	40,76	53,78	62,28	32,43	56,79	73,30	84,81
k_{12} , ч ⁻¹	0,269				0,323			
k_{22} , ч ⁻¹	1,378				1,359			
k_{32} , ч ⁻¹	0,273				0,330			
k_s , ч ⁻¹	5,125				4,208			
k_{m2} , ч ⁻¹	6,141				5,228			
	Образец Ц ПОО							
	АС				КС			
	30	60	90	120	30	60	90	120
C_m , г/л	29,73	53,31	79,33	90,72	33,78	56,69	81,12	95,80
k_{12} , ч ⁻¹	0,299				0,363			
k_{22} , ч ⁻¹	1,369				1,348			
k_{32} , ч ⁻¹	0,305				0,370			
k_s , ч ⁻¹	4,577				3,715			
k_{m5} , ч ⁻¹	5,598				4,733			

Графическая интерпретация результатов численного моделирования в виде частных решений уравнения (5) с наложением на них экспериментальных точек представлена на рис. 1.

Из представленных на рис. 1 результатов следует, что построенные математические модели хорошо согласуются с экспериментальными данными. Адекватность построенных моделей по выражению (5) с учетом коэффициентов моделей, приведенных

зы (АС) выше, чем для образцов целлюлозы (КС). Величина k_s обратно пропорциональна скорости образования фермент-субстратного комплекса: чем больше k_s , тем медленнее будет происходить образование фермент-субстратного комплекса. Из полученных данных можно сделать вывод, что из образцов целлюлозы (КС) будет значительно быстрее образовываться фермент-субстратный комплекс, что приведет к росту скорости образования РВ.



Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментализа для различных концентраций субстратов ЦМ (а – АС; б – КС); Ц ПОО (в – АС; г – КС)

эксперимент:
 ○○○ – 30 г/л, ●●● – 60 г/л, □□□ – 90 г/л, ■■■ – 120 г/л;
 расчет: — – 30 г/л, – 60 г/л, - - - - 90 г/л, - · - · - · - 120 г/л

Скорость процесса образования РВ зависит от величины коэффициента k_3 и величины C_{ES} . При этом у фермент-субстратных комплексов, образованных с участием образцов целлюлозы (КС), значения k_3 выше, чем для образцов целлюлозы (АС). Таким образом, скорость получения РВ в исследуемых процессах у образцов целлюлозы (КС) будет выше, чем у образцов целлюлозы (АС), независимо от вида сырья и начальной концентрации субстрата в рассмотренном диапазоне от 30 г/л до 120 г/л.

Сравнивая между собой аналогичным образом образцы целлюлозы, полученные из различных видов сырья, установлено, что большей скоростью гидролиза обладают образцы целлюлозы, полученные из плодовых оболочек овса.

Полученные результаты могут быть использованы для обоснования видов сырья, их способов химической обработки для получения субстратов для последующего эффективного превращения в продукты биотехнологической трансформации, в частности в этанол.

Заключение

Изучена кинетика ферментализа образцов целлюлозы, полученных азотнокислым и комбинированным способами (АС и КС) из двух видов сырья – мискантуса и плодовых оболочек овса. Установлено, что кинетика процессов ферментализа субстратов ЦМ и Ц ПОО может быть описана математической моделью, полученной по модифицированному уравнению Михаэлиса-Ментен.

На основе экспериментальных данных определены основные константы, характеризующие кинетику процесса ферментализации всех субстратов. Рассчитаны значения равновесных концентраций редуцирующих веществ в зависимости от начальной концентрации субстратов. Установлено, что начальная скорость процесса ферментализации выше для образцов целлюлозы (КС), чем для образцов целлюлозы (АС), независимо от вида сырья и начальной концентрации субстрата в указанном диапазоне от 30 г/л до 120 г/л.

При сравнении между собой образцов целлюлозы, полученных одним способом из различных видов сырья, установлено, что большей скоростью гидролиза характеризуются субстраты из плодовых оболочек овса.

Выход редуцирующих веществ зависит от начальной концентрации субстрата для всех образцов целлюлозы: при увеличении начальной концентрации субстрата от 30 г/л до 120 г/л наблюдается снижение выхода РВ в 1,3-1,5 раза, что обусловлено субстратным ингибированием.

Список литературы

1. Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика: Основы моделирования и первичная обработка данных. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 471 с.
2. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. – М.: Академия, 2005. – 472 с.
3. Иоелович М.Я. Изучение кинетики ферментативного гидролиза целлюлозных материалов // Химия растительного сырья. – 2014. – № 1. – С. 61-64.
4. Макарова Е.И., Будаева В.В., Золотухин В.Н., Люханова И.В., Алешина Л.А. // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 188-193.
5. Новожилов Е.В., Аксенов А.С., Демидов М.Л., Чухчин Д.Г., Доценко Г.С., Осипов Д.О., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. – 2014. – № 4. – С. 74-80.
6. Новый справочник химика и технолога. Процессы и аппараты химических технологий. Ч.II. – СПб.: НПО «Профессионал», 2006, 2007 – 916 с.
7. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. – М.: Экология, 1991. – 320 с.
8. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Veprev S.G., Sakovich G.V., Shumny V.K. // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2015. – Vol. 5, No. 1. – P. 60-68.
9. Hallac B.B., Ragauskas A.J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2010. – № 5. – P. 215-225.
10. Li L., Zhou W., Wu H., Yu Y., Liu F., Zhu D. // BioResources. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. 3993-4005.