

УДК 544.032 : 577.15

DOI: 10.15372/KhUR20160222

Механическая активация ферментативного гидролиза высоколигнифицированного растительного сырья

Е. М. ПОДГОРБУНСКИХ¹, А. Л. БЫЧКОВ^{1,2}, О. И. ЛОМОВСКИЙ¹¹Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН, ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

E-mail: podgorbunskikh@bk.ru

²Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

Аннотация

Изучено влияние условий механохимической активации на эффективность ферментативного гидролиза углеводов, входящих в состав высоколигнифицированного растительного сырья – биомассы стеблей тростника. Сложное супрамолекулярное строение и высокое содержание лигнина в структуре негативно сказываются на процессе ферментативного гидролиза. В работе рассмотрены модельные условия крупного измельчения и пластической деформации материала, происходящие при различной температуре механической активации. Образцы, полученные механической активацией лигноцеллюлозного материала, характеризуются повышенной реакционной способностью ферментативного гидролиза за счет увеличения площади поверхности и разупорядочения кристаллических областей целлюлозы. Установлены оптимальные условия проведения механической активации растительного сырья для получения реакционноспособных продуктов.

Ключевые слова: механическая активация, высоколигнифицированное растительное сырье, стебли тростника, ферментативный гидролиз, биотопливо

ВВЕДЕНИЕ

В современном обществе актуальны вопросы экологической безопасности, снижения выбросов, эффективного использования лигноцеллюлозного сырья и отходов сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности. Многочисленные исследования показывают, что производством возобновляемых источников биотоплива второго поколения, такого как этанол, позволяет снизить количество вредных выбросов при его применении в качестве моторного топлива [1, 2].

Сложное супрамолекулярное строение лигноцеллюлозных материалов и наличие ингибирующих веществ препятствуют эффективному переводу сложных углеводов в низкомолекулярные сахара, поэтому требу-

ется предварительная обработка (активация) сырья [3].

В основном переработка и утилизация растительного сырья осложняются наличием лигнина – компонента сырья, препятствующего действию ферментов [4–6]. Основные известные результаты, как правило, получены на низколигнифицированном сырье с содержанием лигнина менее 20 % [7, 8]. Исследования механической активации (МА) и последующего ферментативного гидролиза высоколигнифицированного растительного сырья, напротив, малочисленны [9, 10]. Перспективы использования “трудного” высоколигнифицированного сырья связаны с расширением сырьевой базы получения биотоплива, как жидкого, так и твердого лигнинсодержащего [11], а также получения гетерополимерных гелеобразующих материалов.

Цель данной работы – изучение процессов, которые протекают при МА высоколигнифицированного лигноцеллюлозного материала и приводят к получению реакционноспособного продукта, пригодного для дальнейшей ферментативной переработки в низкомолекулярные углеводы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и материалы: тростник обыкновенный (*Phragmites australis*) (Новосибирская обл.), D(+)-глюкоза (99 %, Acros Organics), ферментативный комплекс “ЦеллоЛюкс 2000” ед./г (ПО “Сиббиофарм”, г. Бердск Новосибирской обл.), гексацианоферрат (III) калия (квалификация “х. ч.”, ГОСТ 4206–75), ацетатный буфер с рН 4.6.

Ферментативный комплекс “ЦеллоЛюкс 2000” обладал следующей биокаталитической активностью на модельных субстратах: ксиланаза – 8000 ед./г, целлюлаза – 2000 ед./г, β-глюканаза до 1500 ед./г, глюкоамилаза – 20 ед./г.

Содержание восстанавливающих углеводов определяли спектрофотометрическим методом Хагедорна–Йенсена [12].

Удельную поверхность механически активированных и исходных образцов определяли по тепловой десорбции азота на приборе “Сорбтометр М” (“Катакон”, Россия) и рассчитывали в рамках приближения Грегга и Синга [13].

Химический состав растительного сырья определен по гравиметрической методике, основанной на последовательном растворении компонентов и описанной ранее в [14].

Рентгенофазовый анализ для определения степени кристалличности целлюлозы по Сегалу [15] проводился с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (Германия).

Морфологию частиц изучали методом сканирующей электронной микроскопии с помощью прибора “ТМ-1000” (Hitachi, Япония). Для снятия накопленного заряда на поверхность образца наносилось золотое покрытие (сила ионного тока 30 мА, время напыления 60 с).

Гранулометрический анализ выполнен с использованием вибрационного грохота Analysette-3 Pro, оборудованного набором сит Fritsch (Германия). Средневзвешенный размер частиц определялся по формуле

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i x_i}{\sum_{i=1}^n \omega_i}$$

где x – размер фракции, мкм; ω – доля фракции, отн. ед.

Модельным высоколигнифицированным сырьем служила биомасса тростника. Для проведения экспериментов отобранные стебли растений с удаленными листьями длиной 0.5–1 м с влажностью 4 % измельчали на ножевой мельнице до среднего размера частиц примерно 2 мм. Механическую обработку стеблей тростника проводили в лабораторной мельнице-активаторе атритторного типа (стальные шары диаметром 5 мм, частота вращения ротора 600 мин⁻¹), оснащенном системой термостатирования (ИХТТМ СО РАН, Новосибирск). Обработка проводилась в течение 10 и 20 мин при температурах –196, 10, 100 и 180 °С.

Ферментативный гидролиз проводили при 50 °С в ацетатном буфере с рН 4.6 и гидромодулем 20.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результативность ферментативного гидролиза растительного сырья во многом зависит от содержания в нем лигнина, который необратимо адсорбирует ферменты из реакционной смеси. Широко исследуется низколигнифицированное растительное сырье, например биомасса соломы кукурузы (содержание лигнина примерно 20 % [16]) и пустые грозди масличной пальмы с содержанием лигнина 10 % [17]. Показано [18], что предварительная МА соломы кукурузы в энергонапряженных аппаратах приводит к аморфизации целлюлозы и позволяет перевести в растворимые сахара до 85–90 % высокомолекулярных углеводов. При этом начальная скорость гидролиза механически активированного материала в 2–3 раза выше по сравнению со скоростью гидролиза исходного сырья.

Сырье характеризуется однородным строением. На СЭМ-изображениях (рис. 1) видна регулярная волокнистая структура. Неоднородностей морфологии чрезвычайно мало, благодаря чему его удобно использовать для

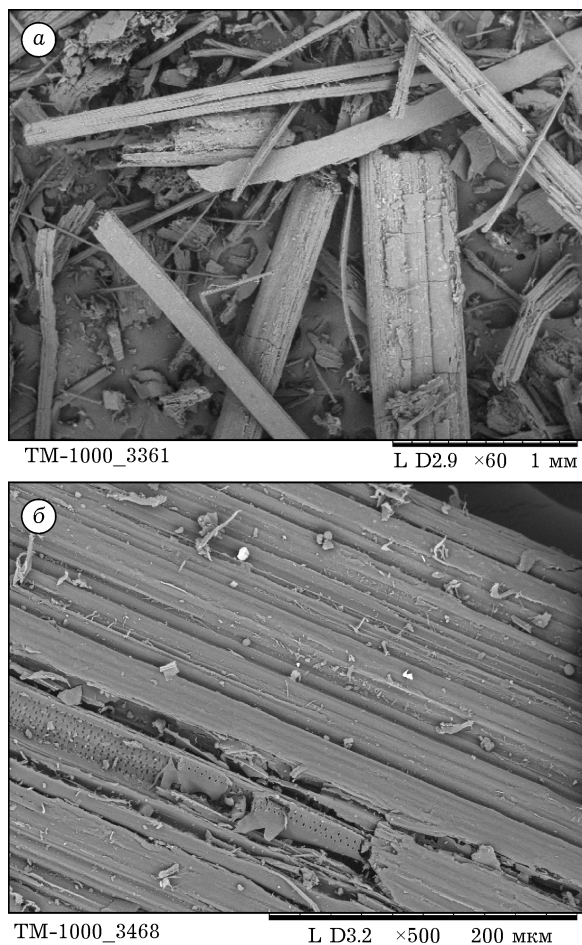


Рис. 1. Морфология стеблей тростника, измельченных на ножевой мельнице: а – обзорная микрофотография, б – волокнистое строение сырья.

изучения механохимических процессов в модельных условиях.

Содержание лигнина, определенного по методике [14], достигает порядка 40 % (табл. 1), т. е. данный материал относится к классу высоколигнифицированных. Можно прогнозировать значительные различия в эффективности МА, проводимой при разных температурах, из-за последовательного рас-

ТАБЛИЦА 1

Химический состав биомассы тростника

Характеристики	Доля, %
Влажность	3.9±0.1
Зольность	3.4±0.1
Экстрактивные вещества	14.5±0.7
Целлюлоза	26.4±0.4
Гемичеселлюлоза	17.5±0.4
Лигнин	38.5±0.3

стекловывания высокомолекулярной и низкомолекулярной фракции лигнина [19].

Изменения морфологии образцов лигноцеллюлозы в зависимости от условий механической обработки можно отследить методом СЭМ. Выше показано, что морфология частиц исходной биомассы стеблей тростника, измельченных на ножевой мельнице, отличается волокнистым регулярным строением и малым количеством неоднородностей.

Механическая активация при температуре кипения жидкого азота в течение 10 мин приводит к образованию трещин в результате хрупкого измельчения. По морфологии частицы продукта не отличаются от исходного сырья и только уменьшаются в размерах (рис. 2, а). Увеличение времени обработки до 20 мин способствует дальнейшему хрупкому измельчению материала. На микрофотографиях (см. рис. 2, б) заметны мелкие частицы, не образующие агрегаты, характерные для длительного измельчения как природных, так и синтетических полимеров.

Повышение температуры активации до 10 °С приводит к расслаиванию волокнистой структуры материала (см. рис. 2, в). На поверхности частиц образуются ворсинки, слои частично отделяются друг от друга. После 20 мин (см. рис. 2, г) механической обработки наблюдается образование агрегатов с рыхлой структурой, что можно связать с недостатком высокой температурой для протекания пластической деформации.

При механической обработке при 100 °С и выше волокнистая структура поверхности начинает проявляться более четко (см. рис. 2, д). Возможно, это обусловлено частичным перераспределением лигнина, незначительно освобождающего волокна целлюлозы [20]. Видны плотные слоистые агрегаты (см. рис. 2, е).

В результате механической обработки при 180 °С материал пластично деформируется, все лигниновые компоненты переходят в расплавленное состояние. Спустя 10 мин частицы материала пластично деформированные (см. рис. 2, ж), через 20 мин весь материал представлен плотными слоистыми агрегатами (см. рис. 2, з).

Для продуктов МА с представленной морфологией следует ожидать изменения реакционной способности в процессе ферментатив-

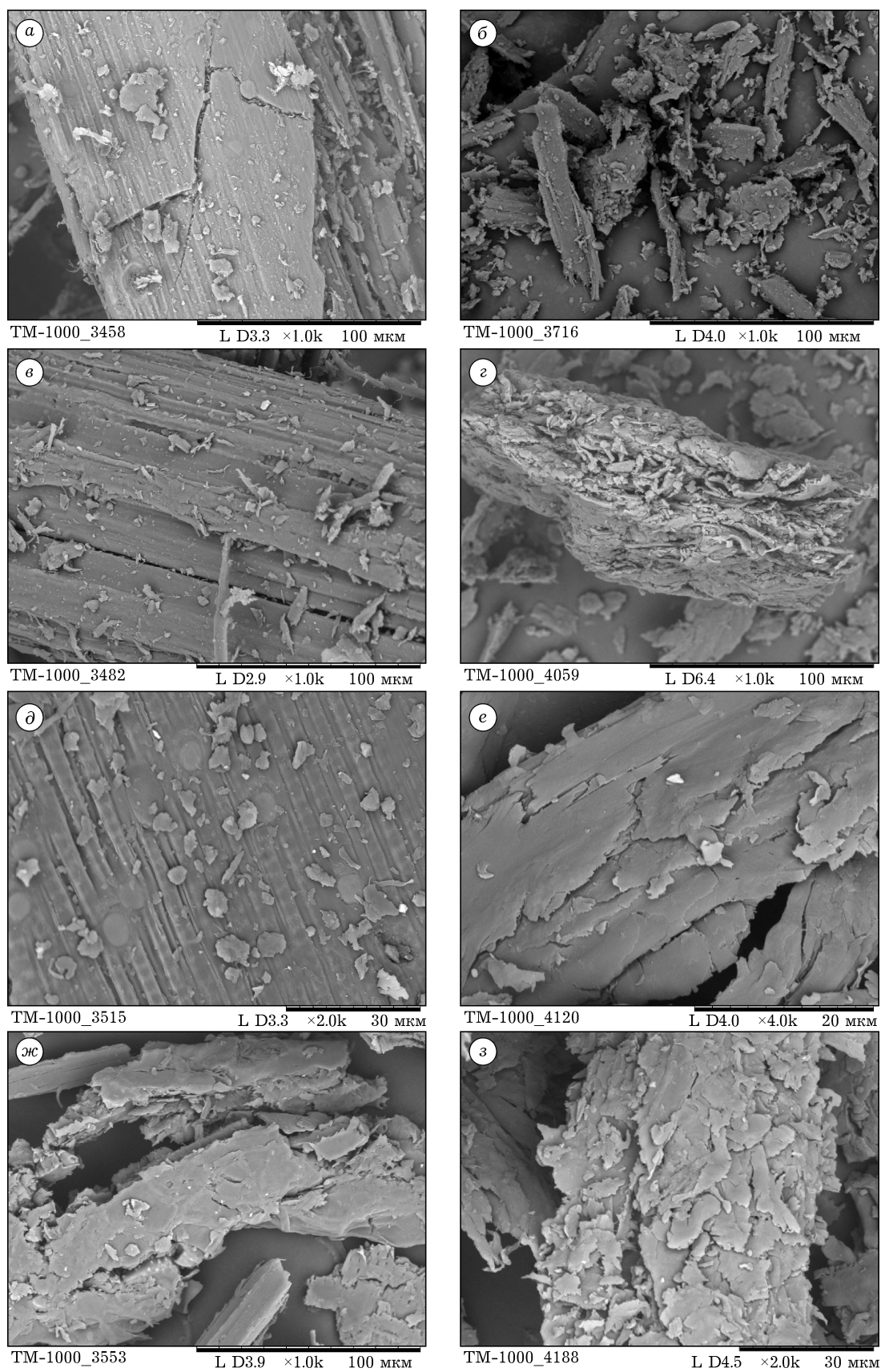


Рис. 2. Микрофотографии образцов после 10 (а, в, д, ж) и 20 мин (б, г, е, з) механической обработки при температурах, °С: -196 (а, б), 10 (в, г), 100 (д, е), 180 (ж, з).

ТАБЛИЦА 2

Средний размер частиц и удельная поверхность биомассы тростника после механической обработки при различных условиях в течение 20 мин

Способы обработки	Средний размер частиц, мкм	$S_{уд}$, г/см ²
Биомасса тростника после ножевой мельницы	500–1000	0.10±0.01
Механическая обработка при –196 °С	44±4	2.5±0.3
То же, при 10 °С	53±4	2.0±0.1
То же, при 100 °С	65±6	2.3±0.3
То же, при 180 °С	62±7	3.2±0.2

ного гидролиза, прежде всего за счет изменения удельной площади поверхности, степени кристалличности целлюлозы, а также структурных изменений лигноцеллюлозы.

Для образцов, активированных в течение 20 мин, средний размер частиц уменьшается (табл. 2). Наиболее эффективно протекает измельчение в условиях хрупкого разрушения при температуре кипения жидкого азота. Снижение эффективности измельчения в процессе обработки при повышенных температурах указывает на более высокие затраты энергии на пластическую деформацию материала.

Уменьшение размеров частиц и увеличение удельной площади поверхности образцов при механической обработке происходит как за счет измельчения материала, так и за счет образования трещин и пор. С другой стороны, при механическом воздействии может происходить разрушение капилляров в структуре лигноцеллюлозы. В табл. 2 представлены данные по удельной площади поверхности, определенные методом тепловой десорб-

ции азота и с использованием внешнего стандарта (по Грегу и Сингу).

Хрупкое измельчение материала способствует существенному увеличению удельной площади поверхности. Незначительное снижение $S_{уд}$ при повышении температуры (до 10 и 100 °С) можно объяснить частичным переходом к пластическому измельчению ввиду расстекловывания низкомолекулярной фракции лигнина. Увеличение площади поверхности для образца, обработанного при 180 °С, объясняется, по-видимому, частичным разложением компонентов лигноцеллюлозы и образованием большого количества пор [21, 22].

При механической обработке твердых тел часть энергии расходуется на образование дефектов кристаллической структуры, в частности на аморфизацию кристаллитов целлюлозы. Для определения степени кристалличности лигноцеллюлозных материалов принято использовать метод дифракции рентгеновских лучей и расчет по уравнению, предложенному Сегалом [14].

На рис. 3 приведены дифрактограммы, полученные от исходного лигноцеллюлозного материала и продуктов его механической обработки в течение 20 минут.

В результате МА степень кристалличности уменьшается на 10–30 % (табл. 3). При переходе к повышенным температурам обработки степень аморфизации кристаллитов снижается. Данный эффект можно объяснить тем, что процесс МА в присутствии небольших количеств воды сопровождается частичной рекристаллизацией целлюлозы [23, 24]. Этому способствует повышение температуры, приводящее к ускорению процессов релаксации дефектов. Подвижность полимерных цепей при высоких температурах способствует частич-

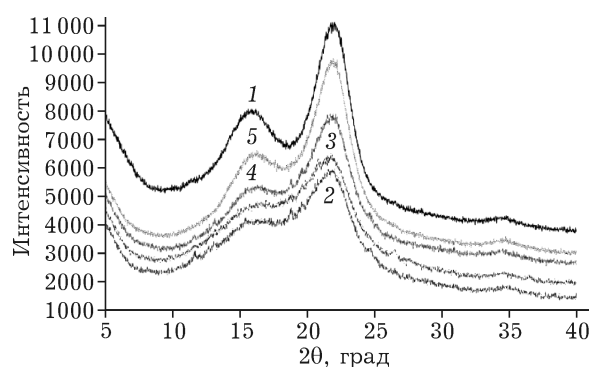


Рис. 3. Рентгенограммы исходной биомассы тростника (1) и продуктов механической обработки в течение 20 мин при –196 (2), 10 (3), 100 (4) и 180 °С (5).

ТАБЛИЦА 3

Индексы кристалличности исходной биомассы тростника и продуктов механической обработки в различных условиях в течение 20 мин

Способы обработки	Индекс кристалличности, %
Биомасса тростника	
после ножевой мельницы	69±6
Механическая обработка при -196 °С	48±5
То же, при 10 °С	42±5
То же, при 100 °С	57±7
То же, при 180 °С	59±5

ной рекристаллизации разупорядоченной целлюлозы, что снижает эффективность МА [21].

Как отмечалось ранее, ферментативный гидролиз – это сложный, многостадийный процесс, который зависит от ряда параметров, определяющих как начальную скорость, так и общий выход реакции [25]. На скорость протекания реакции ферментативного гидролиза в большей степени влияют химический состав материала, доступная для сорбции ферментов площадь и степень кристалличности целлюлозы.

Для проверки влияния механической активации на кинетику ферментативного гидролиза образцы, активированные в течение 20 мин в различных температурных режимах, подвергались действию ферментного комплекса “ЦеллоЛюкс-А” (рис. 4).

Для всех образцов характерно ускорение ферментативного гидролиза за счет увеличения площади поверхности и повышение выхода низкомолекулярных углеводов благода-

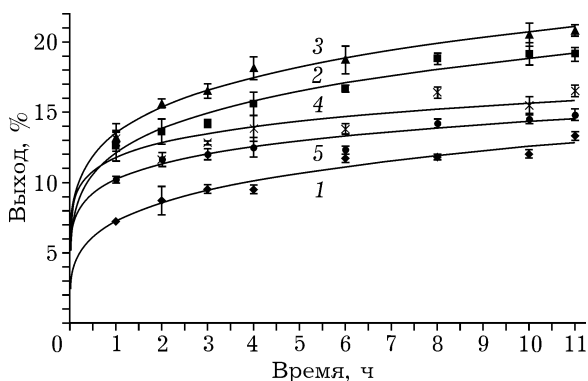


Рис. 4. Выход низкомолекулярных углеводов в процессе ферментативного гидролиза исходной (1) и механически активированной биомассы при -196 (2), 10 (3), 100 (4) и 180 °С (5).

ря разупорядочению кристаллических областей целлюлозы. При этом образцы, активированные при повышенных температурах, характеризуются наименьшей реакционной способностью, что, по-видимому, связано с морфологией продукта – перераспределением лигнина на поверхности частиц и образованием плотных агрегатов, сорбирующих целлюлозолитические ферменты, что препятствует взаимодействию последних с разупорядоченной целлюлозой и протеканию реакции [26].

Сравнение эффективности гидролиза образцов, активированных при -196 и 10 °С, позволяет заключить, что механическая обработка лигноцеллюлозы в условиях хрупкого разрушения не обеспечивает необходимое разупорядочение структуры материала и, как следствие, недостаточно активирует последующий ферментативный гидролиз.

Таким образом, оптимальным режимом для проведения МА растительного сырья следует считать промежуточный режим (10 °С), при котором все полимеры, кроме лигнина, подвергаются хрупкому разрушению. Такое состояние полимеров в составе клеточной стенки позволяет в полной мере разупорядочить структуру лигноцеллюлозы, но предотвратить перераспределение лигнина и образование на поверхности частиц слоя ингибиторов. Как показано методом СЭМ, агрегаты, образующиеся при МА в данных условиях, имеют рыхлую структуру и легко распадаются на составляющие частицы при проведении ферментативного гидролиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренный в работе лигноцеллюлозный материал – биомасса стеблей тростника – относится к высоколигнифицированному растительному сырью, которое затрудняет эффективность ферментативного гидролиза углеводов, входящих в его состав. Подобраны модельные условия механической активации, позволяющие изменять доступность полимеров растительного сырья для гидролиза. При МА в условиях хрупкого разрушения материал измельчается без глубокого изменения структуры благодаря образованию трещин. Повышение температуры механической акти-

вазии до 100 и 180 °С приводит к пластической деформации материала, обусловленной частичным плавлением полимеров, и к образованию плотных слоистых агрегатов из измельченных частиц.

Для изученных механически обработанных высоколигнифицированных образцов характерно ускорение ферментативного гидролиза за счет увеличения площади поверхности и повышение выхода низкомолекулярных углеводов благодаря разупорядочению кристаллических областей целлюлозы. Максимальной реакционной способностью обладает продукт активации при 10 °С, характеризующийся достаточным разупорядочением структуры, высокой удельной поверхностью и отсутствием продуктов разложения лигнина на поверхности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmitt E., Bura R., Gustafson R., Cooper J., Vajzovic A. // *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 104. P. 400–409.
- Farrell A. E., Plevin R. J., Turner B. T., Jones A. D., O'Hare M., Kammen D. M. // *Science*. 2006. Vol. 311. P. 506–508.
- Taherzadeh M. J., Karimi K. // *Int. J. Mol. Sci*. 2008. Vol. 9. P. 1621–1651.
- Rahikainen J., Mikander S., Marjamaa K., Tamminen T., Lappas A., Viikari L., Kruus K. // *Biotechnology and bioengineering*. 2011. Vol. 108, No. 12. P. 2823–2834.
- Zheng Y., Zhang S., Miao S., Zhiguo S., Wang P. // *J. Biotechnol*. 2013. Vol. 166. P. 135–143.
- Yoshida M., Liu Y., Uchida S., Kawarada K., Ukagami Y., Ichinose H., Kaneko S., Fukuda K. // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2008. Vol. 73, No. 3. P. 805–810.
- Sahare P., Singh R., Laxman R., Rao M. // *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2012. Vol. 168. P. 1806–1819.
- Zhong C., Lau M., Balan V., Dale B., Yuan Y.-J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2009. Vol. 84. P. 667–676.
- Barakat A., Mayer-Laigle C., Solhy A., Arancon R., Vries H., Luque R. // *RSC Adv*. 2014. Vol. 4. P. 48109–48127.
- Wang Q., Zhu Q., Xu J., Sun J. // *Bioresources*. 2014. Vol. 9, No. 4. P. 6841–6850.
- Lomovsky O., Bychkov A., Lomovsky I., Logvinenko V., Burdukov A. // *Thermal Sci*. 2015. Vol. 19. P. 219–229.
- Шапиро Д. К. Практикум по биологической химии. 2-е изд. Минск: Вышэйш. шк., 1976. 288 с.
- Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость: пер. с англ. М.: Мир, 1970. 408 с.
- Bychkov A. L., Ryabchikove E. I., Korolev K. G., Lomovsky O. I. // *Biomass and Bioenergy*. 2012. Vol. 47. P. 260–267.
- Segal L., Creely J. J., Martin A. E. Jr., Conrad C. M. // *Tex. Res J*. 1959. Vol. 29, No. 10. P. 786–794.
- Hames B. R., Thomas S. R., Sluiter A. D., Roth C. J., Templeton D. W. // *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2003. Vol. 105–108. P. 5–16.
- Umikalsom M. S., Ariff A. B., Karim M. I. A. // *J. Agricult. Food Chem*. 1998. Vol. 46, No. 8. P. 3359–3364.
- Golyazimova O. V., Politov A. A., Lomovsky O. I. // *Chemistry of Plant Raw Material*. 2009. Vol. 2. P. 53–57.
- Базарнова Н. Г., Карпова Е. В., Картаков И. Б., Маркин В. И., Микушина И. В., Ольхов Ю. А., Худенко С. В. Методы исследования древесины и ее производных: Учеб. пособие / Под ред. Н. Г. Базарнова. Барнаул: Изд-во Алтайского гос. ун-та, 2002. 160 с.
- Акопова Т. А. Твердофазный синтез, структура, свойства и перспективы применения материалов на основе полисахарида хитозана: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. Москва, 2013. 46 с.
- Zeng M., Mosier N. S., Huang C.-P., Sherman D. M., Ladisch M. R. // *Biotechnol. Bioeng*. 2007. Vol. 97, No. 2. P. 265–278.
- Zhang M., Chen G., Kumar R., Xu B. // *Biotechnol. Biofuels*. 2013. Vol. 6. P. 147–158.
- Ago M., Endo T., Okajima K. // *Polymer J*. 2007. Vol. 39, No. 5. P. 435–441.
- Avolio R., Bonadies I., Errico M. E., Gentile G., Avella M. // *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 87. P. 265–273.
- Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Био-конверсия целлюлозных материалов: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
- Zhang Y., Wang L., Chen H. // *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2013. Vol. 169. P. 359–367.

