

УДК 577.15 : 661.722.2

Биоэтанол из плодовых оболочек овса, предварительно обработанных методом щелочной делигнификации. II. Масштабирование процесса получения биоэтанола в условиях опытного производства

© 2017 г. Е.А. СКИБА*, О.В. БАЙБАКОВА, В.В. БУДАЕВА, И.Н. ПАВЛОВ, Е.И. МАКАРОВА, Г.Ф. МИРОНОВА, Ю.А. КРЮКОВ, Г.В. САКОВИЧ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем химико-энергетических технологий» (ИПХЭТ), Сибирское отделение Российской академии наук, Бийск, 659322

e-mail: ipcet@mail.ru, eas08988@mail.ru**

Поступила 31.08.2016

Принята в печать 22.11.2016

Исследован процесс ферментативного гидролиза продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса в водной среде. Установлено, что при начальной концентрации продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса 60 г/л и замене ацетатного буфера на воду наблюдается снижение выхода редуцирующих веществ на 9% от массы субстрата; при масштабировании процесса выход снижается еще на 13,6%. Одновременное проведение процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения позволяет увеличить выход этанола в 1,2 раза по сравнению с их последовательным проведением; при этом исключается стадия фильтрования ферментативного гидролизата и в 1,5 раза сокращается продолжительность указанных стадий. Получение этанола из продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса успешно масштабировано в условиях опытного производства (объем ферментера 63 л): коэффициент масштабирования составил 1:400, выход биоэтанола – 12 дал/т плодовых оболочек овса. Опытный образец биоэтанола характеризуется крайне низкой концентрацией метанола (0,005 об.%).

Ключевые слова: плодовые оболочки овса, ферментативный гидролиз в водной среде, спиртовое брожение, биоэтанол, масштабирование по объему.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-47-56

Технология получения биоэтанола из целлюлозосодержащих материалов динамично развивается последние 30 лет. Большой интерес в качестве источника лигноцеллюлозного сырья во всем мире представляют отходы сельского хозяйства, не имеющие пищевой ценности (солома, плодовые оболочки злаков, кожура цитрусовых, жом сахарного тростника и т.п.). Прогнозируется, что в ближайшем будущем это сырье станет основным для производства этанола [1–4].

Работы по совершенствованию технологии получения биоэтанола ведутся в следующих направлениях: поиск новых сырьевых источников [4–5]; использование методов генетической инженерии для конструирования растений с низким содержанием лигнина [6–7]; создание эффективных способов предварительной обработ-

ки сырья [8–11]; разработка новых ферментных комплексов для конверсии целлюлозосодержащего сырья в глюкозу и детальное изучение молекулярных механизмов действия ферментов [12–14]; поиск и создание методами генетической инженерии новых эффективных продуцентов биоэтанола [15–16]; совершенствование технологических режимов ключевых стадий биосинтеза этанола [17–19]; конструирование нового более эффективного оборудования [20]; повышение рентабельности процесса за счет комплексного использования сырья и биотехнологической переработки отходов производства [1, 15, 16, 21–23].

Одной из самых обсуждаемых тем является финансовая составляющая процесса. В настоящее время можно констатировать, что производство биоэтанола рентабельно, причем востребованным

Список сокращений: ГЖХ – газо-жидкостная хроматография; ПОО – плодовые оболочки овса; ПЩД – продукт щелочной делигнификации; РВ – редуцирующие вещества; ТЦ – техническая целлюлоза, продукт двухстадийной химической обработки ПОО; ФП – ферментный препарат.

является именно целлюлозосодержащее сырье, а не только сахарный тростник из Бразилии или кукуруза и маниока из США [1–5, 8–23].

В Канаде корпорация Iogen перерабатывает в биоэтанол отходы сельского хозяйства, в том числе плодовые оболочки овса, и лесные отходы общей массой более 2,8 млн. т в год. [15]. Партнеры этой корпорации в Бразилии производят биоэтанол из жмыха сахарного тростника (багассы). Корпорация Inbicon A/S (Дания) разработала интегрированную систему утилизации биомассы, предполагающую использование не только полисахаридов растительного сырья, но и лигнина. Заводы Inbicon A/S в ряде европейских стран, США, Канаде используют в качестве сырья пшеничную солому и отходы деревообработки, в Китае – сельскохозяйственные отходы, в Бразилии – багассу, в Малайзии – целлюлозную составляющую фруктов и шрот от производства пальмового масла ([23], <http://www.inbicon.com/en>). В каждой корпорации принята собственная схема получения биоэтанола, при этом описания технологических режимов не публикуются.

Технология производства биоэтанола из целлюлозосодержащего сырья актуальна и для Российской Федерации, так как в силу природно-климатических условий аграрные культуры могут давать только один урожай в год и использование пищевого сырья в технических целях не только непозволительно дорого, но и представляет угрозу продовольственной безопасности. В советское время технический биоэтанол получали путем химического гидролиза древесины с последующим сбраживанием гидролизата, а также из сульфитных щелоков, получаемых при варке древесины [24, 25]. Пионерская технология производства гидролизного спирта в настоящее время востребована в Японии [26, 27], Великобритании и Бразилии [27]. Технический биоэтанол является универсальным, дешевым, широко востребованным растворителем, экстрагентом, реагентом в химическом синтезе важнейших соединений, компонентом различных видов топлива, антифризом, веществом, востребованным в радиоэлектронике, вычислительной технике, приборостроении, в работе систем навигации, авиационно-космической промышленности и других технологиях двойного назначения. В связи с этим актуальной является разработка эффективной технологической схемы получения биоэтанола из массового, возобновляемого, промышленно доступного сырья и масштабирование процесса в производственных условиях.

Кроме отходов деревообработки, эффективным сырьем для производства биоэтанола в РФ представляются сельскохозяйственные отходы с нулевой себестоимостью, такие как плодовые оболочки злаков и солома.

Цель данной работы – исследование процесса получения этанола из плодовых оболочек овса (ПОО) в лабораторных условиях, а затем масштабирование полного цикла с использованием оборудования объемом 63 л на опытном производстве.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Биоэтанол вырабатывали из продукта щелочной делигнификации (ПЩД) ПОО, полученного на опытном производстве ИПХЭТ [28] и имеющего следующие химические показатели: содержание целлюлозы по Кюршнеру – 86,7%; пентозанов – 7,0%, кислотонерастворимого лигнина – 5,4%, золы – 1,1 %.

Для ферментативного гидролиза использовали промышленно доступные ферментные препараты (ФП) в следующей дозировке: «Целлюлюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», Бердск) – 0,04 кг/кг субстрата; «Брюзайм» (BrewZyme BGX, Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A., Польша) – 0,02 л/кг субстрата. В соответствии с аналитическими паспортами оба ФП стандартизованы по целлюлазной и ксиланазной активности.

Ферментативный гидролиз и спиртовое брожение ПЩД ПОО осуществляли последовательно или одновременно. Для проведения процессов в колбу Эрленмейера емкостью 1000 мл помещали навеску субстрата и дистиллированную воду. Концентрация субстрата составляла $60,0 \pm 0,1$ г/л.

При последовательном процессе ферментативный гидролиз осуществляли в воде при pH 4,7–4,9 (pH регулировали добавлением растворов ортофосфорной кислоты и аммиака) и непрерывном перемешивании с частотой 150 мин^{-1} . Температура гидролиза составляла 46°C , продолжительность – 72 ч. Полученный ферментативный гидролизат отфильтровывали и стерилизовали методом автоклавирования при 0,5 атм в течение 30 мин.

При одновременном процессе ферментативный гидролиз проводили в описанных выше условиях, но лишь 24 ч, а затем среду охлаждали до 28°C , вносили инокулят дрожжей и в течение двух последующих суток осуществляли спиртовое брожение, совмещенное с продолжающимся ферментативным гидролизом ПЩД.

Сбраживание осуществляли с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва) в экспоненциальной фазе роста. Вносимый инокулят составлял 12% от объема среды; брожение проходило в анаэробных условиях при 28°C. Общую численность дрожжей и их физиологическое состояние определяли с использованием камеры Горяева. Инокулят вносили в экспоненциальной фазе развития; при этом общее количество клеток в инокуляте составляло $1,52 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, из них почкующихся клеток – 29,2%.

На втором этапе биоэтанол получали в ферментере объемом 63 л на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН. Опыты повторяли дважды. Культуру дрожжей для сбраживания готовили следующим образом: чистую культуру инокулировали в среду с неохмеленным солодовым суслom (приготовленным по стандартной методике) в количестве 5% от объема среды, культивирование проводили в течение 1 сут при температуре 28°C и затем выращенную культуру дрожжей в количестве 5 об.% переносили в среду, состоящую из ферментативного гидролизата ПЩД и неохмеленного солодового сусла в соотношении 2:1. Выращивание продолжали в течение 1 сут при температуре 28°C. Полученные дрожжи в объеме 12% вносили в ферментативный гидролизат ПЩД ПОО в качестве инокулята так, что общее количество клеток составляло $0,93 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, из них почкующихся – 17,2%.

Концентрацию РВ в гидролизате определяли спектрофотометрически с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) на приборе UNICO UV-2804 (UNICO, США) с относительной погрешностью 3,45% и пересчитывали на глюкозу.

Выход РВ соотносили с массой субстрата и с массой гидролизуемых компонентов (за вычетом нецеллюлозных примесей – золы и лигнина). В обоих случаях для расчета использовали коэффициент 0,9, что обусловлено присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев полисахаридов в результате ферментативного гидролиза.

Объемную долю спирта в бражке определяли ареометром в дистилляте, полученном пере-

гонкой спирта из бражки, согласно ГОСТ Р 51135-2003¹. Этанол из бражки выделили методом простой перегонки и не подвергали дополнительной очистке.

Анализ этилового спирта выполняли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) по ГОСТ Р 51786-2001² на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) «Кристалл-2000М» фирмы «СКБ Хроматэк», (Йошкар-Ола, Россия). Условия определения были следующие: колонка газохроматографическая капиллярная ZB-FFAP (США) (50 м×0,32 мм×0,52 мкм); температура детектора 220°C; температура испарителя 190°C; время выдерживания пробы при температуре 77°C 6 мин 30 с, затем нагрев со скоростью 10°C/мин до температуры 210°C и выдерживание в течение 15 мин; коэффициент деления потока 40:1; газ-носитель – сжатый азот; давление газа-носителя 77 кПа; соотношение воздух : водород = 250:25; построение калибровочного графика по государственным стандартным образцам (ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии», Москва); расход газа (сброс) – 30 мл/мин; расход газа (поддув в ПИД) – 30 мл/мин, расход газа (водорода в ПИД) – 20 мл/мин; расход газа (воздуха в ПИД) – 200 мл/мин; объем пробы 1 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты замены ацетатного буфера при ферментативном гидролизе на дистиллированную воду

Обоснование выбора сырья приведено в работе [28], там же дано описание разрабатываемой базовой технологии получения биоэтанола и приведены результаты исследования стадий химической и энзиматической трансформации сырья. В отличие от указанной работы в данном исследовании ферментативный гидролиз проводили в воде, а не в ацетатном буфере. Данное решение было вызвано тем, что ацетатный буфер является ингибитором спиртового брожения, а целью ферментативного гидролиза является получение биологически доброкачественного гидролизата. Однако в отсутствие буфера исчезает механизм под-

¹ Изделия ликероводочные. Правила приемки и методы анализа. Технические требования.

² Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности.

держания необходимого значения рН и колебания рН негативно сказываются на биохимической стабильности ферментных препаратов. Поэтому для достижения рН 4,7–4,9 и поддержания этого уровня в среде была выбрана ортофосфорная кислота в сочетании с аммиаком, которые добавляли вручную по мере необходимости. В отличие от уксусной кислоты соли фосфорной кислоты интенсифицируют генеративную и сбрасывающую активность дрожжей [25].

Сравнивали динамику концентрации РВ при последовательном и одновременном процессе ферментативного гидролиза и спиртового брожения, проводимом с использованием воды и регуляторов рН, а также при ферментативном гидролизе в ацетатном буфере (рис. 1; данные по гидролизу в ацетатном буфере взяты из работы [28]). При ферментативном гидролизе в ацетатном буфере концентрация РВ в каждый момент времени была выше, чем при последовательном процессе в водной среде. Через 72 ч содержание РВ в ацетатном буфере составила $51,1 \pm 0,2$ г/л, что соответствует выходу от массы субстрата $76,6 \pm 0,3\%$, в то время как в водной среде концентрация РВ при последовательном процессе составила $44,9 \pm 0,1$ г/л, что соответствует выходу $68,0 \pm 0,2\%$.

В процессе ферментативного гидролиза ПЩД ПОО наблюдается снижение рН. Уменьшение содержания РВ в водной среде, по-видимому, было связано с тем, что принятая схема регуляции кислотности не обеспечивала постоянное поддержание этого показателя на оптимальном уровне, что снижало активность ферментного комплекса.

Исследование последовательного и одновременного процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения

Главным показателем эффективности брожения является выход этанола. В случае одновременного проведения процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения невозможно рассчитать выход РВ, так как через 24 ч в реакционную массу добавляют клетки дрожжей, которые потребляют сахара в качестве компонента питания. Поэтому выход этанола был рассчитан от массы ПЩД ПОО; он представлял собой произведение величин теоретического выхода целевых продуктов ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Так, при 100%-ной конверсии 60 г/л ПЩД ПОО в РВ теоретически возможно получение 66,7 г/л РВ, а из них, согласно стехиометрическому уравнению брожения, теоретический выход этанола возможен в концентрации 4,32 об. %. Результаты, полученные при одновременном и последовательном процессах, представлены в табл. 1.

Видно, что при одновременном процессе выход этанола увеличивается по сравнению с последовательным процессом в 1,2 раза (с $41,7 \pm 0,3\%$ до $48,6 \pm 0,2\%$ от массы ПЩД ПОО). Кроме того, в первом случае исключается стадия фильтрования ферментативного гидролизата и в 1,5 раза сокращается продолжительность процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения – с 6 сут до 4 сут. Остаточная концентрация редуцирующих веществ в бражке при одновременном процессе ниже, чем при последовательном ($2,3 \pm 0,2$ г/л против $9,0 \pm 0,2$ г/л), что также

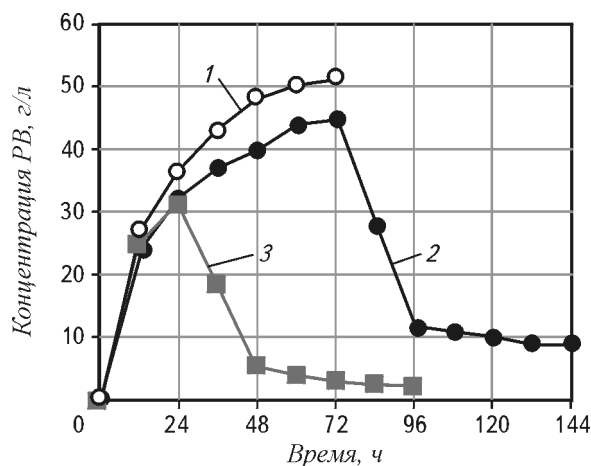


Рис. 1. Концентрация РВ в колбах Эрленмейера в ходе ферментативного гидролиза ПЩД ПОО в ацетатном буфере (кривая 1), последовательного (кривая 2) и одновременного (кривая 3) процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения ПЩД ПОО в водной среде

Fig. 1. Dependency of RS concentration on time of the following processes: enzymatic hydrolysis of oat hulls PAD in acetate buffer in Erlenmeyer flasks (curve 1); sequential (curve 2) or simultaneous (3) enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation in aqueous medium

Показатели брожения при последовательном и одновременном ферментативном гидролизе и спиртовом брожении в водной среде в колбах Эрленмейера

Characteristics of fermentation after sequential or simultaneous enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation in aqueous medium in Erlenmeyer flasks

Характеристика	Процесс ферментативного гидролиза и спиртового брожения	
	последовательный	одновременный
Концентрация субстрата (ПЩД ПОО), г/л	60,0±0,1	60,0±0,1
Крепость бражки, об. %	1,8±0,1	2,1±0,1
Остаточная концентрация РВ, г/л	9,0±0,2	2,3±0,2
Выход этанола, % от массы ПЩД ПОО	41,7±0,3	48,6±0,2

указывает на на повышение эффективности синтеза биоэтанола.

Одно из объяснений этого явления заключается в том, что жизнедеятельность дрожжей связана с расходом РВ и при одновременном процессе глюкоза непрерывно отводится из реакционной смеси, что вызывает смещение равновесия гидролиза целлюлозы в сторону образования его продуктов.

Сравнение эффективности ПЩД и ТЦ как субстратов для ферментативного гидролиза и брожения

Ранее [29] была описана технология получения технической целлюлозы (ТЦ) в результате двухстадийной химической обработки ПОО (пер-

вая стадия – щелочная делигнификация, вторая – азотнокислотная варка). ТЦ, как и ПЩД, подвергали последовательному процессу ферментативного гидролиза и спиртового брожения; сравнение значений выхода РВ на стадии ферментативного гидролиза и биоэтанола на стадии спиртового брожения приведены на рис. 2. Можно отметить, что ПЩД проявил себя как менее эффективный субстрат: выход РВ на стадии ферментативного гидролиза ПЩД оказался на 10,5 % ниже, чем в случае ТЦ (68,1±0,2% против 78,6±0,2%), а выход этанола от концентрации РВ при сбраживании – на 15,0% (61,3±0,3% против 76,3±0,2%).

Полученные результаты существенно отличаются от описанных ранее, когда нами было показано, что в ацетатном буфере при начальной концентрации ПЩД ПОО 30 г/л их эффективность как субстрата ферментативного гидролиза

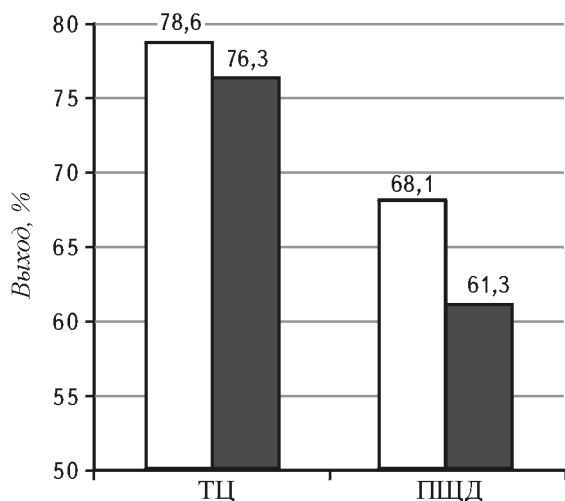


Рис. 2. Зависимость выхода РВ (белые столбики) и биоэтанола (черные столбики) в результате последовательного проведения ферментативного гидролиза и спиртового брожения от вида субстрата: ТЦ (обработка ПОО в две стадии) и ПЩД (обработка ПОО в одну стадию)

Fig. 2. Dependency of RS (white bars) or bioethanol (black bars) contents resulting from sequential processes of enzymatic hydrolysis and fermentation on type of substrate: technical cellulose (two-stage treatment) and oat hulls PAD (one-stage treatment)

была выше, чем ТЦ ПОО [28]. Причины указанного расхождения в результатах экспериментов возможны следующие:

– сложность химического состава используемого субстрата (ПЩД содержит больше нецеллюлозных компонентов, чем ТЦ);

– наличие в ПЩД ингибиторов ферментов. Известно, что при обработке сырья щелочами образуется меньше ингибиторов, чем при обработке кислотами [8], однако отмыть субстрат от остатков щелочи намного сложнее, чем от остатков кислоты, особенно в производственных условиях;

– необратимая адсорбция ферментов на поверхности субстратов [30] (известно, что ПЩД отличается более развитой поверхностью [8]);

– трудность массопереноса целлюлолитических ферментов в высоковязкой суспензии субстрата [31] (суспензия ПЩД ПОО более вязкая, чем суспензия ТЦ ПОО);

– ингибирующий эффект образованных сахаров [31] (известно, что в гидролизате ПЩД больше ксилозы, чем в гидролизате ТЦ);

– колебания pH в процессе ферментативного гидролиза в водной среде, что стало критичным при масштабировании процесса с использованием ПЩД.

Таким образом, видно, что эффективность как субстрата ферментативного гидролиза при низкой концентрации этого субстрата в ацетатном буфере не позволяет прогнозировать дальнейший выход биоэтанола. Наоборот, ферментативный гидролиз в водной среде при высокой концентрации субстрата является важным критерием, определяющим уровень последующего синтеза биоэтанола.

Масштабирование процесса получения биоэтанола в условиях опытного производства

Учитывая результаты лабораторных исследований, процессы ферментативного гидролиза и спиртового брожения при масштабировании проводили одновременно. Биоэтанол получали в емкостном 63-литровом оборудовании на опытном производстве. Коэффициент масштабирования по объему составил при этом 1:400. На рис. 3 представлена динамика процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения в указанном емкостном оборудовании.

Из рис. 3 видно, что в течение первых 24 ч ферментативного гидролиза при температуре $46 \pm 1^\circ\text{C}$ происходило активное накопление РВ: через 20 ч их содержание достигло 36,3 г/л, что соответствует выходу РВ от массы субстрата $54,4 \pm 0,2\%$, и далее не изменялось. Таким образом, при масштабировании процесса выход РВ снизился на $13,6 \pm 0,2\%$ по сравнению с опытами в колбах Эрленмейера. Если сравнить полученные результаты с данными эксперимента с использованием ацетатного буфера, это снижение достигает 1,4 раза ($54,4 \pm 0,3\%$ против $76,6 \pm 0,3\%$, см. раздел «Результаты замены ацетатного буфера при ферментативном гидролизе на дистиллированную воду»).

Через 24 ч после начала процесса в течение 32 ч производили охлаждение реакционной массы до $28 \pm 1^\circ\text{C}$ и после этого вносили в среду инокулят дрожжей. В последующие 4 ч концентрация РВ не изменялась, а затем наблюдалось ее интенсивное снижение. Начиная с 40-го и до 64-го часа наблюдали экспоненциальное накопление биоэтанола.

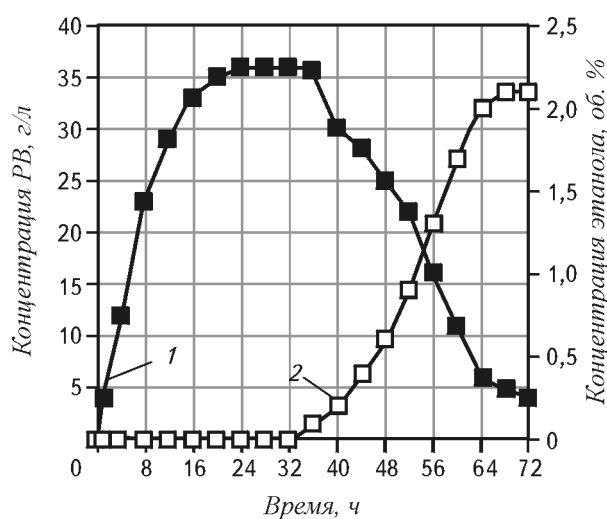


Рис. 3. Концентрация РВ и биоэтанола в ходе процессов ферментативного гидролиза и спиртового брожения ПЩД ПОО в ферментере емкостью 63 л: 1 – концентрация РВ; 2 – концентрация этанола

Fig. 3. RS and bioethanol contents during the process of enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation of oat hulls PAD in a 63-L fermenter: (1), RS concentration; and (2), ethanol concentration

Значение рН в ходе ферментативного гидролиза и спиртового брожения поддерживалось на уровне 4,7–5,1, что было необходимо для стабилизации работы целлюлазного ферментного комплекса и ферментов зимазного комплекса дрожжей. Проблемой являлось снижение активной кислотности смеси (рис. 4): добавление ортофосфорной кислоты и аммиака производили вручную каждые 2 ч на стадии ферментативного гидролиза и каждые 4 ч – на стадии спиртового брожения.

Как следует из рис. 4, максимальные колебания рН отмечены между 12-м и 44-м часами, что соответствует выходу кривой РВ на плато при ферментативном гидролизе и спиртовом брожении. Снижение рН при ферментативном гидролизе обусловлено химизмом процесса, а при спиртовом брожении – потреблением клетками азотистых и фосфористых веществ, в которых дрожжи особенно нуждаются в период накопления клеточной биомассы.

Известно, что гидролизаты однолетнего целлюлозосодержащего сырья микробиологически нестабильны [25]. Кроме того, ферментативные гидролизаты, полученные из продуктов переработки ПОО, отличаются высокой доброкачественностью [32] и, следовательно, легко контаминируются посторонней микрофлорой. Для предотвращения микробной контаминации в производственную емкость добавляли бензилпенициллин (1000000 ед., ОАО «Биосинтез»).

На опытном производстве в емкостном оборудовании этанол синтезировался с выходом $48,6 \pm 0,2\%$ от массы ПЩД ПОО; остаточная концентрация редуцирующих веществ в бражке составляла $3,8 \pm 0,1$ г/л, что соответствует результа-

там лабораторных исследований при одновременном проведении ферментативного гидролиза и спиртового брожения. Выше было отмечено, что при ферментативном гидролизе наблюдалось снижение выхода РВ на опытном производстве по сравнению с лабораторными опытами. Однако на стадии спиртового брожения был получен высокий выход биоэтанола: при концентрации РВ в гидролизате 36,3 г/л объемная концентрация биоэтанола в бражке составила 2,1%, т.е. его выход был равен 89,4% от массы РВ. Это, вероятно, объясняется сохранением чистоты культуры дрожжей с помощью антибиотика и целевым расходом сахаров. Таким образом, можно заключить, что процесс масштабирования прошел успешно: результатом его стал выход биоэтанола, равный 12 дал/т ПОО.

Эта величина меньше опубликованных данных о выходе биоэтанола из древесины, полученного с использованием химического гидролиза сырья (17–18 дал/т [25]), но значительно выше данных о выходе этанола из химически гидролизованных ПОО (5,7 дал/т [33]).

Изучение состава примесей в биоэтаноле, полученном из продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса

Одним из основных маркеров качества этилового спирта является содержание в нем метанола. В исследованных образцах биоэтанола объемная доля метилового спирта ($0,005 \pm 0,001$ об.%) намного меньше регламентированного показателя для спирта из пищевого (0,13 об.%) и непивцевого (0,1 об.%) сырья (табл. 2). Отметим, что об-

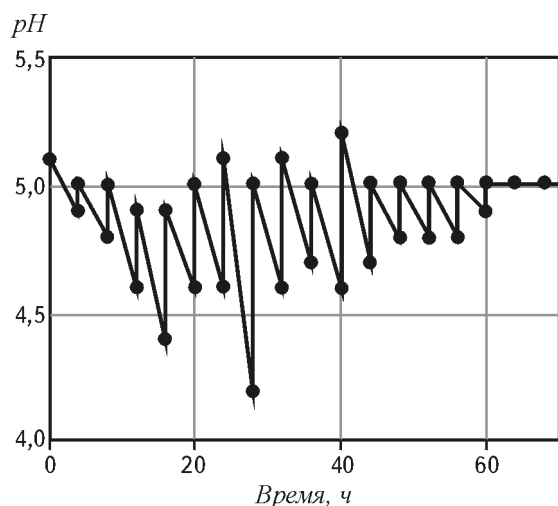


Рис. 4. Колебания рН в процессе ферментативного гидролиза и спиртового брожения ПЩД ПОО в ферментере емкостью 63 л

Fig. 4. Fluctuations in pH during enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation of oat hulls PAD in a 63-L apparatus

Содержание примесей в этиловом спирте из пищевого и непищевого сырья и в полученных опытных образцах биоэтанола в пересчете на безводный спирт

Content of impurities in ethylic alcohol from food-grade and non-food materials and in obtained ethanol samples in terms of unhydrous alcohol

Этиловый спирт	Альдегиды, мг/дм ³	Сивушное масло, мг/дм ³	Эфиры, мг/дм ³	Метанол, об. %
Спирт-сырец из пищевого сырья*				
все виды сырья или их смеси за исключением мелассы	< 300	< 5000	< 500	< 0,13
меласса	< 500	< 5000	< 700	–
Спирт этиловый из непищевого сырья**				
марка А ОКП 91 8213 1100	< 200	< 500	< 80	< 0,1
марка Б ОКП 91 8213 1200	< 350	< 1000	< 180	< 0,1
Биоэтанол из ПЩД ПОО	7100±200	2700±100	800±200	0,005±0,001

*ГОСТ Р 52193-2003. Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Технические условия.

**ГОСТ 17299-78. Спирт этиловый технический. Технические условия.

разцы биоэтанола, полученные нами из различных видов сырья с использованием разных видов предварительной химической обработки, всегда характеризовались крайне низкой объемной долей метанола [19, 29] Очевидно, это объясняется энзиматическим превращением целлюлозы в глюкозу, при котором исключается образование фурфурола, оксиметилфурфурола, метанола и других нежелательных примесей.

Представленный образец биоэтанола характеризуется массовой концентрацией сивушного масла 2700±100 мг/дм³, что ниже, чем норматив для спирта-сырца из всех видов пищевого сырья. Это объясняется низкой концентрацией предшественников биосинтеза сивушных масел – аминокислот и пептидов – в ферментативном гидролизате ПЩД ПОО.

Содержание альдегидов, сложных эфиров и сивушного масла в исследованном опытном образце превышает нормы для технического этилового спирта; это связано с тем, что исследованный образец не подвергался ректификации. Имеющиеся данные дают основания предположить, что продуктом ректификации спирта из ПЩД ПОО будет биоэтанол высокого качества.

Данный образец биоэтанола был направлен в Институт катализа им. Борескова как сырье для

синтеза этилена. До этого коллектив изучил процесс дегидратации на модельных образцах биоэтанола [36].

Таким образом, в данной работе получены следующие результаты:

1) исследован процесс ферментативного гидролиза продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса в водной среде. Установлено, что для начальной концентрации ПЩД ПОО 60 г/л при замене ацетатного буфера на воду наблюдается снижение выхода РВ на 9 % от массы субстрата; при масштабировании процесса выход снижается еще на 13,6 %;

2) установлено, что при одновременном проведении ферментативного гидролиза и спиртового брожения выход этанола увеличивается в 1,2 раза по сравнению с последовательным проведением этих процессов. Кроме того, при одновременном проведении процессов исключается стадия фильтрования ферментативного гидролизата и в 1,5 раза сокращается общая продолжительность данных технологических стадий;

3) успешно масштабирован процесс получения биоэтанола в условиях опытного производства (ферментер емкостью 63 л); коэффициент масштабирования составил 1:400. Выход биоэтанола был равен 12 дал/т ПОО;

4) выявлено, что опытный образец биоэтанола характеризуется крайне низкой концентрацией метанола.

По результатам экономического расчета, выполненного стандартным образом [34, 35], себестоимость 1 л этанола, получаемого по представленной технологии, составляет 37,27 руб. при проектной мощности завода 768 тыс. дал биоэтанола в год.

ЛИТЕРАТУРА

- Somerville C. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*, 2010, 329(5993), 790–792. doi: 10.1126/science.1189268
- Jordan D.B., Bowman M.J., Braker J.D., et al. Plant cell walls to ethanol. *Biochemical J.*, 2012, 442(2), 241–252. doi:10.1042/BJ20111922
- Sun Y., Chehg J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1), 1–11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7
- Mussatto S.I., Dragone G., Guimaraes P.M.R., et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, 2010, 28(6), 817–830. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001
- Vohra M., Manwar J., Manmode R., et al. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *J. Env. Chem. Eng.*, 2014, 2(1), 573–584. doi: 10.1016/j.jece.2013.10.013
- Rastogia S., Dwivedib U.N. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. *Plant Science*, 2008, 174(3), 264–277. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.11.014
- VassΓJo D.G., Davin L.B., Lewis N.G. Metabolic engineering of plant allyl/propenyl phenol and lignin pathways: Future potential for biofuels/bioenergy, polymer intermediates, and specialty chemicals? *Adv. Plant Biochem. Mol. Biol.*, 2008, 1, 385–428. doi: 10.1016/S1755-0408(07)01013-2
- Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenerg. Res.*, 2012, 5(4), 1043–1066. doi: 10.1007/s12155-012-9208-0
- Maurya D.P., Singla A., Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Biotech*, 2015, 5(5), 597–609. doi: 10.1007/s13205-015-0279-4
- Mood S.H., Golfeshan A.H., Tabatabaei M., et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2013, 27, 77–93. doi: 10.1016/j.rser.2013.06.033
- Bychkov A.L., Buchtoyarov V.A., Lomovsky O.I. Thermal and mechanical denaturation of cellulase in solution and in solid phase. *J. Int. Sci. Publications: Materials, Methods & Technologies*, 2011, 5(1), 4.
- Rainina E.I., Bachurina G.P., Makhlis T.A., et al. Usage of *Zymomonas mobilis* bacteria for fermentation of cellulosic materials, *Biotehnologiya* (Biotechnology), 1986, (4), 65.
- Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Лушекина С.В., Поломских В.С. и др. Квантово-химическое моделирование в исследовании молекулярных механизмов действия ферментов. В кн.: Физическая химия биопроцессов [Под редакцией С.Д.Варфаломеева]. М.: КРАСАНД, 2014, 141–188.
- Новожилов Е.В., Аксенов А.С., Демидов М.Л., и др. Применение комплексных биокатализаторов на основе рекомбинантных ферментных препаратов *Penicillium verruculosum* для гидролиза полупеллелюзы из лиственной древесины. *Катализ в промышленности*, 2014, (4), 74–80. doi: 10.18412/1816-0387-2014-4-74-80
- Lawford H.G., Rousseau J.D., Tolan J.S. Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, 91(1), 133–146. doi: 10.1385/ABAB:91-93:1-9:133
- Yeping Huang, Xiulin Qin, Xue-Mei Luo, et al. Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulose from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. *Biomass Bioenergy*, 2015, 77, 53–63. doi: 10.1016/j.biombioe.2015.03.020
- Paschos T., Xiros C., and Christakopoulos P. Simultaneous saccharification and fermentation by co-cultures of *Fusarium oxysporum* and *Saccharomyces cerevisiae* enhances ethanol production from liquefied wheat straw at high solid content. *Industrial Crops and Products*, 2015, 76, 793–802. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.061
- Baibakova O.V., Skiba E.A. Biotechnological Aspects of Ethanol Biosynthesis from *Miscanthus*. *Russ. J. Genet.: Applied Res.*, 2015, 5(1), 69–74. doi: 10.1134/S2079059715010025
- Skiba E.A., Budaeva V.V., Baibakova O.V., et al. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials in aqueous media and the subsequent microbiological synthesis of bioethanol. *Catalysis Industry*, 2016, 8(2), 168–175. doi: 10.1134/S2070050416020100
- Pavlov I.N. A setup for studying the biocatalytic conversion of products from the processing of Nonwood Raw Materials. *Catalysis Industry*, 2014, 6(4), 350–360. doi: 10.1134/S207005041404014X
- Zhu J., Rong Y., Yang J., et al. Integrated production of xylonic acid and bioethanol from acid-catalyzed steam-exploded com stover. *Appl. Biochem. Biotechnology*, 2015, 176(5), 1370–1381. doi: 10.1007/s12010-015-1651-x
- Qi G., Xiong L., Huang C., et al. Solvents production from a mixture of glucose and xylose by mixed fermentation of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, 177(4), 996–1002. doi: 10.1007/s12010-015-1790-0
- Larsen J., Ostergaard Petersen M., Thirup L., et al. The IBUS Process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. *Chem. Engineer. Tech.*, 2008, 31(5), 765–772. doi: 10.1002/ceat.200800048

24. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. Учебник для вузов. М.: Лесная промышленность, 1989, 4-12.
25. Шарков В.И., Сапожников С.А., Дмитриева О.А. Технология гидролизных производств. М.: Лесная промышленность. 1973, 245–266.
26. Proenca A. G.. A process for rapid acid hidrolisis of lignocelulosic material and hidrolisis reactor. Patent of JP, 3615767, D 21 C 3/04, D 21 C 3/20, D 21 C 7/00, 2005.
27. Naoyuki O. Method for pretreating lignocelluloses and method for producing ethanol. Patent of JP, 4522797, B 09 B 3/00, C 12 P 12/02, C 12 P 7/08, C 1 K 1/02, 2010.
28. Скиба Е.А., Будаева В.В., Байбакова О.В., и др. Биоэтанол из плодовых оболочек овса, предварительно обработанных методом щелочной делигнификации. Часть 1. Химическая и ферментативная трансформация сырья. *Биотехнология*, 2017, 32(2), 68–75. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-2-68-75
29. Скиба Е.А., Будаева В.В., Макарова Е.И., и др. Биоэтанол из целлюлозы плодовых оболочек овса. *Вестник Казан. технол. ун-та*, 2013, 16(22), 202–205. http://www.kstu.ru/article.jsp?id=1910&id_e=23840
30. Zhiying Yu. Evaluation of the factors affecting avicel reactivity using multi-stage enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioengin.*, 2012, 109(5), 1131–1139. doi: 10.1002/bit.24386
31. Ioelovich M., Morag E. Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis. *BioResources*, 2011, 6(3), 2818–2834. doi: 10.15376/biores.6.3.2818_2835
32. Скиба Е.А. Методика определения биологической доброкачественности гидролизатов из целлюлозосодержащего сырья с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2016, 16(1), 34–44. http://journals.istu.edu/izvestia_biochemi/journals/2016/01
33. Chaud L.C.S., da Silva D.D.V., de Mattos R.T., and de Almeida Felipe M.G. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipites*. *Brazilian Archives Biology Technology*, 2012, 55(5), 771–777. doi: 10.1590/S1516-89132012000500017
34. Зайцев Н.Л. Экономика промышленного предприятия. М.: ИНФРА-М, 2008, 234–256.
35. Косинцев В.И., Михайличенко А.И., Крашенинникова Н.С., и др. Основы проектирования химических производств: Учебник для вузов. М.: Академкнига. 2010, 137–196.
36. Чумаченко В.А., Овчинникова Е.В. Активность промышленных катализаторов на основе оксида алюминия в дегидратации этанола в этилен. *Катализ в промышленности*, 2015, 15(6), 31–35. doi: <http://dx.doi.org/10.18412/1816-0387-2015-6-31-35>

Bioethanol from Oat Hulls Pretreated by Alkaline Delignification.

II. Scaling of Alcoholic Fermentation up to Pilot Process

E.A SKIBA*, O.V. BAIBAKOVA, V.V. BUDAIEVA, I.N. PAVLOV, E.I. MAKAROVA, G.F. MIRONOVA, Yu.A. KRIUKOV, and G.V. SAKOVICH

The Institute for Problems in Chemical-and-Energy Technologies, Russ. Acad. Sci., Siberian Branch, 659322, Byisk Russia
*e-mail: ipcet@mail.ru**, *cas08988@mail.ru**

Received August 08, 2016

Accepted November 11, 2016

Abstract—The enzymatic hydrolysis in aqueous medium of the product of oat hulls alkaline delignification has been studied. For the initial loading of the oat-hull alkaline delignification product of 60 g/L, The yield of reducing sugars was observed to decline by 9% of substrate weight when an acetate buffer was substituted by an aqueous medium; the yield reduced by more 13.6% as a result of the scaling-up. Simultaneous enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation enables a 1.2-fold increase in the ethanol yield as compared to the separate hydrolysis and fermentation, the filtration stage of the enzymatic hydrolysate being omitted and the total time of the process being shortened by a factor of 1.5. Under pilot production conditions (a 63-L digester), the process of ethanol production from alkali-treated oat hulls was successfully scaled with the ratio 1:400 and ethanol yield of 12 dal/t raw material. The pilot-scale ethanol sample has extremely low percentage of methanol (0.005 % vol.).

Key words: alcoholic fermentation, bioethanol, enzymatic hydrolysis in aqueous medium, oat hulls, scaling by volume.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-47-56