

ЕКОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО БІОЕТАНОЛУ З СОЛОМИ ПШЕНИЦІ

С. М. Кухарець, д. т. н., доцент
Н. М. Цивенкова, к. т. н., доцент
А. А. Голубенко, асистент

Житомирський національний агроекологічний університет

Сучасний стан справ свідчить, що виробництво біоетанолу з лігноцелюлозних матеріалів все частіше переходить від експериментальних досліджень до серійного виробництва [1, 5]. Як правило, спочатку лігноцелюлозний матеріал нагрівається, надалі – підлягає процесам ферментативного гідролізу та бродіння. Однак, кожен з етапів потребує досконалого вивчення з метою підвищення ефективності та зменшення загальних витрат на виробництво.

Попередня температурна обробка лігноцелюлозного матеріалу руйнує цілісність волокон, тим самим підвищуючи ефективність та економічність процесу сахарифікації [2]. Для попередньої підготовки соломи пшениці можна використати процес парової експлозії за температури $+210...225^{\circ}\text{C}$ протягом 5,5–6 хв [2, 3]. Процеси гідролізу та бродіння можуть протікати як послідовно (окремо гідроліз і ферментація – ВГФ), так і одночасно (одночасна сахарифікація та ферментація – ОСФ). ВГФ і ОСФ мають ряд переваг та недоліків.

ВГФ вигідно відрізняється високою швидкістю сахарифікації та ефективністю процесу, оскільки протікає при оптимальній робочій

температурі ферментації (+40–50 °С). Водночас, висока температура створює асептичні умови, що призводить до необхідності використовувати в технологічному процесі другий реактор з нижчою температурою. Це є необхідним для ферментації вивільненого цукру та завершення процесу біоконверсії в етанол.

Перевагою ОСФ є забезпечення уникнення інгібування ферментів глюкозою через постійне виведення мікроорганізмами цукру та перетворення його на етанол. Процес протікає в одному біореакторі. Однак, в даному випадку, для збереження етанологенних мікроорганізмів температура процесу не повинна перевищувати +35 °С, що значно зменшує ефективність ферментації.

В даній роботі висвітлені результати щодо екологічного виробництва біоетанолу з соломи пшениці в біореакційній системі, що складається з двох сполучених між собою камер, в яких процеси гідролізу та ферментації протікають одночасно, але при різних температурах (рис. 1).



Рис. 1. Принципова схема роботи двокамерного біореактора

Полісахариди деполімеризуються ензимами при T=45 °С (ліва камера), отримані молекули глюкози дифундують крізь фільтр в праву камеру з T=30 °С, в якій мікроорганізми метаболізують їх (утворюється етанол). Непрореагована солома пшениці та залишки лігніну залишаються в камері.

Технологічний процес виробництва етанолу з соломи наступний: солома пшениці з метою пошкодження цілісності волокон подрібнювалася у поліфракційну суміш і оброблялася в паровому реакторі (об'ємом 15 л, місткістю 1,5 кг) протягом 6,5 хв за температури 212 °С, який працює за принципом парового вибуху; отриманий субстрат висушувався при температурі +60 °С для видалення розчинної геміцелюлози та інгібіторів і, надалі, підлягав ферментативному гідролізу та бродінню; субстрат додатково

екстрагували при температурі +90 °С 1% розчином NaOH для видалення лігніну, який сповільнює ферментативну активність.

Двокамерний біореактор був спроектований та виготовлений в лабораторії факультету інженерії та енергетики ЖНАЕУ.

Циліндричні камери були виготовлені з антикорозійного матеріалу і розділені сталеву решіткою, яка є опорою фільтру (акрилова тканина з порами 10 мкм). За допомогою двох термостатів і рідинного охолодження в камерах забезпечується різний температурний режим. Робочий об'єм камер становив приблизно 250 мл. Під час процесів сахарифікації і ферментації реактор струшувався на орбітальному струшувачі.

З метою оптимізації температурних режимів процесу та вибору оптимальних доз ферменту для ферментативного гідролізу проводився багатфакторний аналіз з подальшою обробкою даних за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.1. Для отримання моделей процесу у вигляді поліномів другого ступеню вибрано некомпозитивний план другого порядку на кубі типу Бокса-Бенкіна. Мінімальна кількість вимірів становила 10. Діапазон варіювання температури (Т, °С) становив 38...48 °С, а дози ферментів (Д, ФП/г) – 5...15 ФП/г (аркуш фільтрувального паперу на грам субстрату). В якості ферментів використовувався повноцінний целюлазний комплекс *T reesei* [3]. Дозу ферменту визначали за ДСТУ 8617:2016. Ферментативний гідроліз здійснювався в колбі V=150 мл у 7% (мас/мас) суспензії з використанням делігніфікованого субстрату (10,5 г твердої речовини в 150 мл рідкої фази) при рН 5 та обертанні колби 145 об/хв. З метою збереження отриманої глюкози від дії бактерій додавали 150 мкл формальдегіду. Процеси гідролізу та бродіння протікали за схемою ОСФ протягом 5 діб з використанням *Saccharomyses C* у вигляді суспензії 7% (мас/мас), використовуючи нерозчинний у воді субстрат з рН 5, ензимами 10 ФП/г, дріжджами 3 г/л при обертанні 100 об/хв. Температура процесу ОСФ становила 38 °С, тоді, як у двокамерному реакторі температура сахарифікації складала +45 °С, а ферментації – +30 °С.

Субстратова композиція (вуглеводи та лігнін) була отримана гідролізом первинної та вторинної кислот. Вміст цукру і концентрацію отриманої глюкози та етанолу в субстраті визначали за допомогою іонного хроматографа Professional IC Varіо – Metrohm. Ефективності (E, %) процесів сахарифікації та ферментації визначалися як:

$$E = \frac{m_1 \cdot 0,9}{m_2} \cdot 100\%; \quad E = \frac{m_{em1}}{m_{em2}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

де m_1 – маса глюкози, виявленої в субстраті, г; m_2 – маса завантаженої целюлози, г; 0,9 – масове співвідношення мономерної одиниці целюлози до глюкози; m_{e1} – маса етанолу, виявленого в субстраті, г; m_{e2} – маса етанолу, який отримали б з усієї завантаженої целюлози.

З обробленої гарячим паром та промитої гарячою водою соломи пшениці отримали нерозчинний у воді та багатий на целюлозу Субстрат 1. Субстрат 2 був отриманий із Субстрату 1 шляхом додаткового екстрагування при температурі $+90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 % розчином NaOH для видалення лігніну. Елементарний склад субстратів наступний. Субстрат 1: невизначені речовини – 7,8 %; лігнін – 43 %; неорганічні речовини (попіл) – 8,9 %; арабінан – 0,68 %; галактан – 0,2 %; ксилан – 1,5 %; глюкан – 37,9 %. Субстрат 2: невизначені речовини – 5,6 %; лігнін – 30,2 %; неорганічні речовини (попіл) – 9,2 %; арабінан – 0,32 %; галактан – відсутній; ксилан – 1,1 %; глюкан – 54,2 %.

Ферментаційний гідроліз проводився на Субстраті 2 з метою оптимізації температурного режиму та визначення оптимальних доз ферментаційного матеріалу. Вища ефективність процесу гідролізу спостерігалася у субстратах з високим співвідношенням целюлози до лігніну. Рівні варіювання Т та Д ферментаційного гідролізу наступні: 1 дослід – $T=48\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=5$ ФП/г; 2 дослід – $T=48\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=10$ ФП/г; 3 дослід – $T=48\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=15$ ФП/г; 4 дослід – $T=43\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=5$ ФП/г; 5 дослід – $T=43\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=10$ ФП/г; 6 дослід – $T=43\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=15$ ФП/г; 7 дослід – $T=43\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=5$ ФП/г; 8 дослід – $T=38\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=15$ ФП/г; 9 дослід – $T=38\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=10$ ФП/г; 10 дослід – $T=38\text{ }^{\circ}\text{C}$, $D=5$ ФП/г.

На кінцевий вихід глюкози через 96 годин значний вплив мали як температура, так і дози ферментів. У всіх випадках виробництво глюкози досягло рівня насиченості протягом 100 годин, навіть коли можливості субстрату не були цілком вичерпані, очевидно через незворотність процесу гальмування ферментів. Оптимальною стала температура $+43\text{ }^{\circ}\text{C}$, при якій спостерігалася найвища ефективність процесу. Це було пов'язано з протилежним впливом кінетичної константи реакції гідролізу та процесу денатурації білка, який інтенсифікується з підвищенням температури. Виробництво глюкози зросло із збільшенням дози ферментаційного матеріалу (Д).

Аналіз експериментальних даних перших 15 годин показує, що між експериментами 3 і 6, та 1 і 7 не існує суттєвих відмінностей (однакові Д, однак різні Т). Після 15 годин роботи ефективність процесу при $+43\text{ }^{\circ}\text{C}$ вища, ніж при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Отже, це пов'язано з тим, що більш високі температури негативно впливають на тривалість фази активності ферменту.

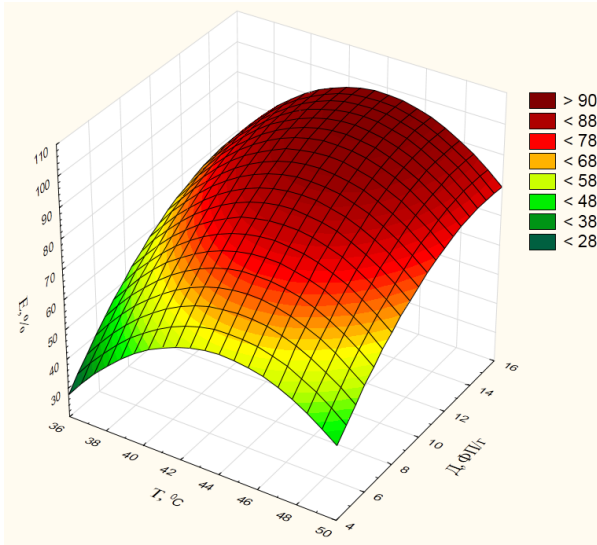


Рис. 2. Функціональна залежність ефективності процесу гідролізу (E , %) від температури (T , $^{\circ}\text{C}$) та доз ферментаційного матеріалу (D , ФП/г)

Рівняння регресії залежності ефективності процесу гідролізу від температури та доз ферментаційного матеріалу:

$$E = -917,34 + 42,57 \cdot T + 10,83 \cdot D - 0,482 \cdot T^2 - 0,304 \cdot D^2 - 0,04 \cdot T \cdot D \quad (2)$$

Отже, виходячи з отриманих результатів, найвищу ефективність процесу можна отримати при температурі $T=43^{\circ}\text{C}$ та дозі ферменту 15 ФП/г. Під час перевірки двокамерного реактора він був налагоджений саме на ці значення параметрів процесу.

Було проведено декілька експериментів для порівняння продуктивності процесу отримання глюкози та етанолу в двокамерному реакторі та в колбі 500 мл, яка періодично струшувалася. В обох випадках умови були однаковими, окрім того, що в двокамерному реакторі солома пшениці та дріжджі завантажувались у дві окремі камери. Завдяки фільтру дріжджі, завантажені в камеру бродіння, не можуть проникнути в камеру гідролізу, в якій знаходяться солома пшениці та лігнін, однак розчини, включаючи ферменти, вільно проникають крізь сітку фільтра з камери в камеру.

До початку процесу ферментації з 0 до 24 год концентрація глюкози досягла найвищих показників в двокамерному реакторі на

відміну від колби, через більш високу ефективність ферментів. На першій стадії бродіння концентрація етанолу в двокамерному реакторі становила близько 50 % його концентрації в колбі. Через два дні концентрація етанолу в колбі досягла порогу насичення (63 %), в той час як в реакторі концентрація неухильно зростала до 75 % (поріг насичення концентрації етанолу настав на 5 день).

За результатами хімічних аналізів протягом перших двох днів градієнт цукрів між двома камерами був незначним; хоча через два дні швидкість дифузії цукру сповільнювалась і глюкоза накопичувалась в камері гідролізу, тоді як в камері бродіння вона швидко конвертувалась. Зменшення швидкості дифузії могло бути спричинене засміченням пор сітки фільтру через тонькі частинки лігніну.

Цікаво зазначити, що, хоча дріжджі додавалися одночасно з біомасою та ферментом, однак процес ферментації в обох системах почався лише через 24 години. Це пояснюється необхідністю адаптації дріжджів до субстрату з високим вмістом лігніну.

Через наявність фільтру невелика кількість ферменту дифундувала по камері ферментації до області з нижчою температурою, де були лише розчинні олігомери, а не тверда біомаса в якості субстрату. Проте, нижча активність процесу в камері ферментації була компенсована вищою активністю в камері гідролізу і це призвело до підвищення ефективності на 10 % порівняно з ефективністю отриманою при середньому значенні температури +37,5 °C. Завдяки процесу дифузії через фільтр етанол було виявлено в подібних концентраціях як в камері гідролізу, так і в камері бродіння. Але це не призвело до втрати кінцевого продукту, оскільки субстрат в камері гідролізу відновлюється шляхом фільтрації.

З метою виробництва біоетанолу з соломи пшениці пропонується використовувати двокамерний реактор, який має високу ефективність процесів ферментативного гідролізу та бродіння лігноцелюлозних матеріалів. Реактор було випробувано в лабораторних умовах на базі факультету інженерії та енергетики ЖНАЕУ. Встановлено, що ферментативний гідроліз та ферментація можуть протікати одночасно, однак слід забезпечити температуру ферментативного гідролізу $T=45^{\circ}\text{C}$, а бродіння – $T=30^{\circ}\text{C}$. Експериментальні дослідження свідчать про збільшення виходу етанолу приблизно на 18 %.

Література

1. A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose / S. E. Levine, J. M. Fox, H. W. Blanch, D. S. Clark // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2010. – V. 107. – P. 37 – 51. 98.

2. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw / F. Alfani, A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, M. Cantarella // *J Ind Microbiol Biotechnol.* – 2000. – V. 25. – P. 184–92.

3. Computational simulations of the *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I acting on microcrystalline cellulose 1 beta: the enzymesubstrate complex / L. Zhong, J. F. Matthews, P. I. Hansen [et al.] // *Carbohydrate Research.* – 2009. – V. 344. – P. 1984 – 1992.

4. From wheat straw to bioethanol: integrative analysis of a separate hydrolysis and co-fermentation process with implemented enzyme production [Electronic resource] / V. Novy, K. Longus, B. Nidetzky // *Biotechnology for Biofuels.* – 2015. – Mode of access : [https : // www. scienceopen. com/document?vid=d5b62ac1-9dab-47db-857a-0c461f5d3215](https://www.scienceopen.com/document?vid=d5b62ac1-9dab-47db-857a-0c461f5d3215)

5. Смирнов К. А. Особенности твердофазной ферментации / К. А. Смирнов, Ю. Д. Алашкевич, Н. С. Решетова // *Химия растительного сырья.* – 2009. – № 3. – С. 161 – 164.