

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ НА СОСТАВ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

© 2010 г. Э.М. Сульман,
М.Г. Сульман,
Е.А. Прутенская

Тверской государственный технический университет

Введение

Растительные материалы резистентны к действию гидролизующих агентов. Это обусловлено их нерастворимостью, высокой степенью кристалличности природной целлюлозы, защитной матрицей, образованной лигнином и гемицеллюлозой, в которую погружены целлюлозные волокна [1]. Размеры пор лигнифицированных тканей растений слишком малы для прохождения молекул ферментов. Поэтому для использования растительной биомассы необходимо увеличить ее реакционную способность, прибегнув к эффективным методам обработки для разрушения кристаллической высокоупорядоченной структуры целлюлозы и (удаления) лигнина. При этом увеличивается поверхность целлюлозы, доступная молекулам ферментов [2].

Чистая природная целлюлоза (например, отходы хлопка) и лигноцеллюлоза (древесина) — субстраты с низкой реакционной способностью [3]. Всестороннее их использование возможно только при наличии методов предварительной делигнификации и декристаллизации [4].

Исследования по предобработке растительного материала для получения целевого продукта ведут многие химические и микробиологические лаборатории Европы, Японии, Америки и др. [1, 2, 4–7]. Разработаны четыре группы методов предобработ-

ки растительного сырья: механические, физические, химические, биологические.

Механические методы обработки субстратов заключаются в их измельчении мельницами (шаровыми, коллоидными, вибрационными), дезинтеграторами, дробилками, диспергированием в вальцах. [9].

Физические методы — обработка γ -лучами или потоком электронов, микроволновым излучением, нагревание на воздухе или в инертном газе, воде или органическом растворителе, охлаждение, обработка при повышенном или пониженном давлении, ультразвук [10–13].

Химические — основаны на способности соединений при гидролизе, окислении и т.п. переводить субстрат в более доступную для превращения форму.

Биологические — предусматривают деструкцию сырья под действием ферментов.

Для увеличения реакционной способности сырья по отношению к лигнолитическим и целлюлолитическим ферментам предварительная подготовка субстрата должна:

- приводить к разрушению связей между лигнином и углеводным комплексом;
- увеличивать поверхность целлюлозы, доступной для ферментов;
- быть экономичной и не загрязнять окружающую среду.

Предварительная обработка природного сырья может определять последующие скорость и глубину биодеструкции лигнина [2, 9, 12], что позволит целенаправленно изменять структуру и свойства материалов, что особенно актуально в целлюлозно-бумажной промышленности и в производстве биодизельтоплива. При этом используются самые разные методы модификации: термokatалитичес-

Сульман Э.М. — докт. хим. наук, профессор, зав. кафедрой Биотехнологии и химии Тверского государственного технического университета. Тел.: (8 4822) 44-93-17. E-mail: sulman@online.tver.ru.

Сульман М.Г. — докт. хим. наук, профессор, зав. научно-исследовательской лабораторией «Катализатор» Тверского государственного технического университета. Тел.: (8 4822) 44-93-17. E-mail: sulman@online.tver.ru.

Прутенская Е.А. — канд. биол. наук, доцент кафедры Биотехнологии и химии Тверского государственного технического университета. Тел.: (8 4822) 44-93-17. E-mail: prutenskaya@mail.ru.

кая активация в условиях взрывного автогидролиза, ультразвуковая обработка, органо-растворительные способы делигнификации и др [14].

Применение ультразвука для интенсификации экстракции разных веществ из растительного сырья или усиления действия реагентов, а также собственно ультразвука на конечный продукт исследуется достаточно широко [11–16]. За увеличение скорости экстракции веществ «отвечают» кавитация, частичное разрушение клеток, усиление обтекания частиц потоками растворителя и, следовательно, массопереноса. Кроме того, кавитация вызывает химические эффекты, приводящие к накоплению в среде гидроксил-радикалов и пероксида водорода [13]. Обработка древесины ультразвуком на воздухе даже при значительном увеличении ее продолжительности (с 15 до 35 мин) практически не влияет на количества лигнина определяемого и способного растворяться в спирте, тогда как в результате обработки древесины ультразвуком в воде растворимость лигнина в спирте повышалась в 2,5 раза по сравнению с растворимостью лигнина из необработанной древесины [13, 15, 16]. Б.А. Янковским [17] показано, что ультразвуковая обработка древесины сосны способствует извлечению лигнина, особенно в водной среде. Нарушения структуры лигнина обусловлены химическими эффектами, возникающими под влиянием кавитации при ультразвуковых колебаниях.

Для изучения в данной работе возможности использования разрушающего влияния ультразвукового воздействия на лигноцеллюлозный материал предусматривалось:

- выбрать параметры ультразвуковой предобработки для наиболее полного разрушения структуры лигноцеллюлозного матрикса;
- исследовать влияние ультразвука и биоконверсии на структуру лигнина;
- изучить деструкцию основных компонентов предобработанного ультразвуком лигноцеллюлозного субстрата при культивировании бактериями рода *Bacillus*.

Оборудование и методы исследований

Обрабатывая сырье ультразвуком частотой 30 кГц, использовали генератор «IKASONIC U 50 control» (рис. 1), преобразующий электрические колебания в механические упругие и передающий их обрабатываемой среде. Прибор имеет насадку «US 50-3 Sonotool» диаметром 3 мм обеспечивающую интен-

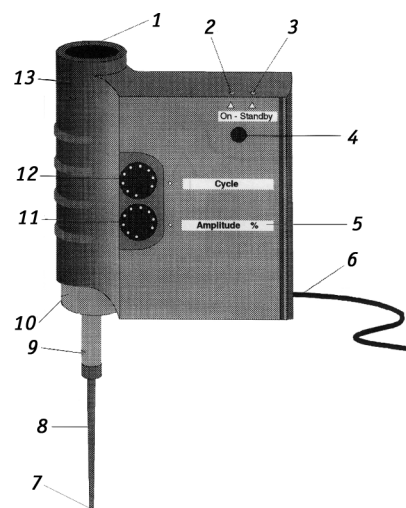


Рис. 1. Ультразвуковой генератор «IKASONIC U 50 control» 1 – кнопка пуска; 2 – зеленый светодиод; 3 – красный светодиод; 4 – резервный пуск; 5 – держатель; 6 – кабель; 7 – излучатель; 8 – концентратор излучателя; 9, 10 – подготавливающие устройства для излучателя; 11 – ручка настройки амплитуды; 12 – ручка настройки цикла и пульсация/пауза; 13 – корпус

сивность до 460 Вт/см². Предобработка сырья проводилась с охлаждением.

Для биодеструкции использовали штамм бактерий рода *Bacillus*, выделенный на кафедре биотехнологии и химии. Культура депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, как *Bacillus subtilis* PrEA под номером В-10040. Выделенный штамм обладает лигноцеллюлозной активностью (в частности, полифенолоксидазной, тирозиназной).

По окончании процесса во всех образцах определяли (стандартными методиками [18]) массу остатка, содержание целлюлозы (методом Кюршнера) и лигнина (методом Комарова), легко- и трудногидролизуемых полисахаридов.

Определение оптимальных условий ультразвуковой обработки лигноцеллюлозного материала

Выбор среды очень важен для определения оптимальных условий ультразвуковой обработки. В качестве жидкой фазы использовали дистиллированную воду, так как, во-первых, за счет водородных связей молекулы воды прочно взаимосвязаны, во-вторых, у воды низок порог кавитации из-за большого поверхностного натяжения, в-третьих, дистил-

лированная вода содержит небольшое количество растворенных газов, «смягчающих» кавитационные эффекты или даже препятствующих им [12].

Кавитация наиболее интенсивна на границе фаз «вода—твердое вещество», благодаря чему поверхность растительного материала испытывает постоянное сжатие и расширение вследствие появления и схлопывания кавитационных пузырьков [12].

В качестве модельного субстрата для исследования была взята лузга подсолнечника. В эксперименте на опытной установке варьировали интенсивность и продолжительность ультразвуковой обработки. Полученные данные свидетельствуют о деструкции растительного материала под воздействием ультразвука (рис. 2). Увеличение интенсивности ультразвука позволяет увеличить выход легко- (ЛГ) и трудногидролизуемых (ТГ) полисахаридов соответственно до 14,2 % и 16 % а.с.в. (абсолютно сухого вещества).

Изменение содержания ЛГ и ТГ полисахаридов, определяемых в виде концентрации редуцирующих веществ, свидетельствует о деструкции целлюлозы и гемицеллюлозы.

В состав растительного материала наряду с органическими входят также минеральные вещества в свободном и связанном состоянии. Результаты исследования свидетельствуют, что наряду с разрушением полимеров высвобождаются минеральные вещества (рис. 3). Следовательно, при ультразвуковой обработке происходит дезинтеграция растительной клетки.

Быстрее всего разрушаются вещества с наибольшей относительной молекулярной массой (лигнин). Экспериментальные кривые (рис. 4) для всех образцов сближаются на последних стадиях процесса, до-

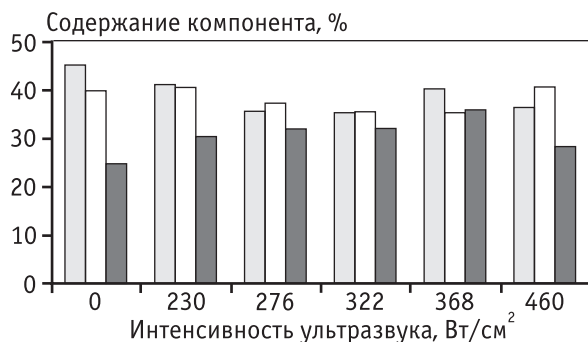


Рис. 2. Зависимость остаточного содержания компонентов растительного материала: ■ – целлюлозы, □ – лигнина, ■ – легкогидролизуемых полисахаридов от интенсивности ультразвука

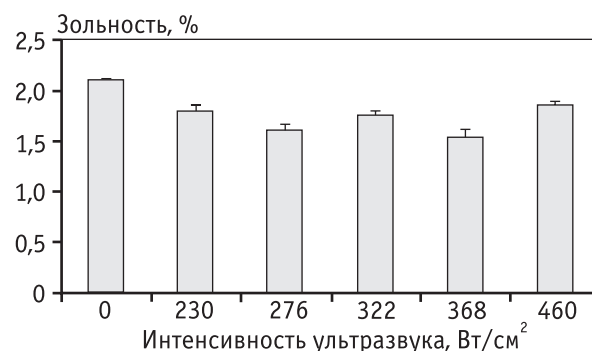


Рис. 3. Зависимость остаточного содержания минеральных компонентов растительного материала от интенсивности ультразвука

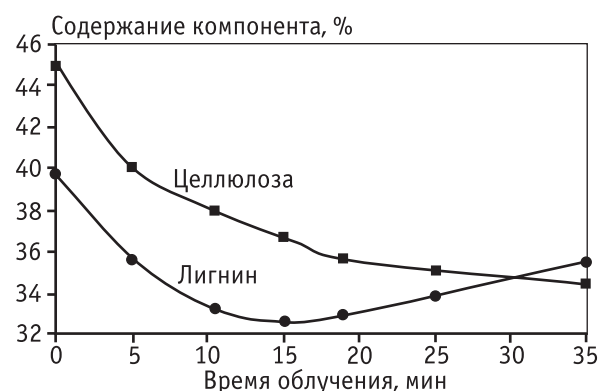


Рис. 4. Влияние ультразвука интенсивностью 368 Вт/см² на содержание основных компонентов в растительном материале

стигая одного и того же уровня. Эти результаты объясняются обычно тем, что с ростом относительной молекулярной массы макромолекулы понижается вероятность, что она будет двигаться в изменяющемся акустическом поле как единое целое. Скорее всего, именно быстро движущиеся молекулы растворителя будут разрывать связь С—С при соударении с участком биополимера. Однако не исключена возможность разрыва связей С—Н. Места разрыва не зависят от прочности связи и имеют гауссово распределение. Тем не менее, где бы не разрывалась макромолекула, в результате образуются макрорадикалы [12].

Как показано на рис. 4, в течение 15 мин происходит деструкция лигнина, после чего содержание его постепенно увеличивается, что, вероятно, связано с инициирующим действием ультразвука на полимеризацию лигнина. При этом инициирующими частицами могут быть образующиеся при кавитации радикалы $H^\bullet$ или $OH^\bullet$ (порознь или вместе), либо

радикалы, образующиеся при деструкции полимера [12, 19].

Одновременно уменьшается выход твердого лигноцеллюлозного остатка до 92,6 %.

Полученные результаты позволяют считать оптимальными условия предварительной обработки субстрата, при которых достигается наилучшая деструкция растительного материала: интенсивность 368 Вт/см² и продолжительность не более 15 мин.

После ультразвукового воздействия при оптимальных параметрах в спектрах субстрата изменилось соотношение полос интенсивности полос при 1510 см⁻¹ и 1615 см⁻¹, возможно, в связи с деметилированием сиригильных единиц лигнина. Появляется четко выраженная линия 1428 см⁻¹, определяемая скелетными колебаниями ароматического кольца, и линия 1034 см⁻¹, характерная для деформационных плоскостных колебаний С—Н связей в ароматическом кольце гваяцильного типа. Все это указывает на преобладание в необработанном материале сиригильных, а в обработанном ультразвуком — гваяцильных структур.

Очевидно, что ультразвуковое воздействие в водной среде нарушает связи между субъединицами лигнина; в результате деградирует лигниновая сетка, что способствует увеличению доступной поверхности непосредственно целлюлозного ядра без снижения упорядоченности.

Частичное разрушение лигнина будет способствовать доступу ферментов к гликозидным связям полисахаридов, что должно привести к увеличению биоконверсии растительного субстрата.

Влияние ультразвуковой обработки на делигнификацию растительного материала

Процесс делигнификации в природе достаточно сложен и включает этапы механической, ферментативной, опосредованно ферментативной и неферментативной деструкции лигнина [1, 2]. Для изучения этого процесса в условиях *in vitro* обычно используется один штамм микроорганизма-делигнификатора, хотя в природе этот процесс осуществляется консорциумом микроорганизмов.

Исследование взаимосвязи между процессами разрушения целлюлозы и лигнина при культивировании на исходном и модифицированном субстратах — один из способов изучения механизма биодегradации лигноцеллюлозного сырья в приро-

де — позволит ускорить процесс делигнификации и биоконверсии лигнинсодержащих отходов, проводить контролируемое культивирование микроорганизмов для целенаправленного изменения структуры и свойств сырья.

Процесс ферментативного гидролиза целлюлозы осложняется наличием в исходной древесине лигнина, заполняющего пространство между структурами, состоящими из целлюлозы и гемицеллюлозы. К микробной деградации, как показывают результаты экспериментов, лигнин более стоек, чем целлюлоза. Он механически скрепляет и одновременно защищает целлюлозу от прямых внешних воздействий. В связи с этим исследовалось изменение объема пор лигнина при биоконверсии. Для анализа был выделен лигнин лужки подсолнечника на десять суток после ферментации обработанного ультразвуком субстрата и необработанного.

Экспериментальные данные (рис. 5) характерны для микропористых материалов со слоистой структурой [21].

В процессе биоконверсии растительного сырья под действием ферментов микроорганизмов происходит более интенсивное разрушение лигнинуглеводного комплекса предобработанного субстрата. В результате при выделении лигнина из обработанного ультразвуком субстрата вымывается кристаллическая составляющая гемицеллюлозы, что приводит к возрастанию объема пор на 10–30 %. Также возрастает и общая площадь поверхности сульфолигнина от 3,393 м²/г до 5,142 м²/г, наблюдается увеличение количества микропор с 9,5 до 11 % и макропор с 14 до 16 %. Таким образом, в процессе ультразвуковой предобработки лужки подсолнечника происходит изменение лигнинуглеводного

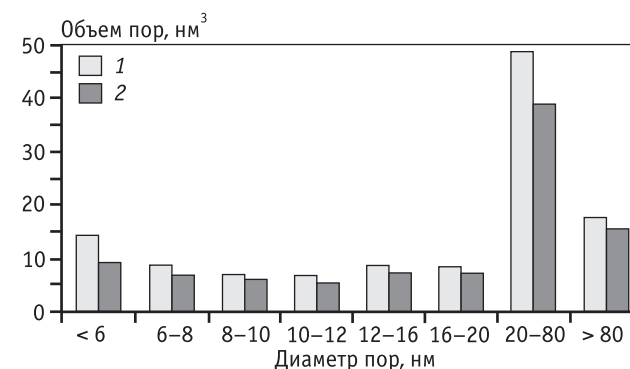


Рис. 5. Распределение объема пор сульфолигнина из предобработанного ультразвуком (1) и необработанного (2) субстрата

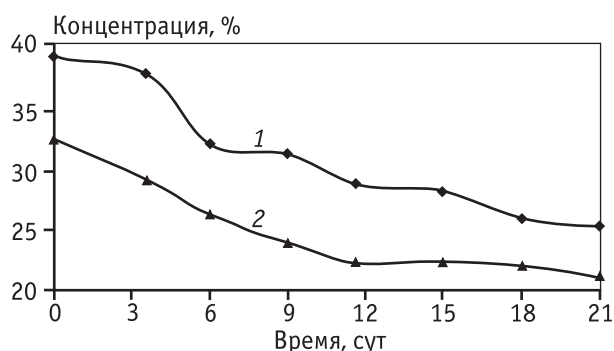


Рис. 6. Изменение содержания лигнина (%) при культивировании микроорганизмов на необработанном (1) и обработанном (2) ультразвуком субстрате

матрикса. В результате лигнин становится более доступным для деметоксилирования и разрушения сетчатой структуры. Данные на рис. 6 подтверждают количественное изменение лигнина при ферментации обработанного и необработанного ультразвуком субстрата.

Известно, что биосинтез лигнолитических ферментов микроорганизмов происходит на стадии вторичного метаболизма «в ответ» на недостаток углерода, азота или серы в питательной среде. По мере истощения доступной целлюлозы усиливаются биосинтез лигнолитических ферментов и деградация лигнина, что приводит к увеличению доступности целлюлозы. Таким образом, чередуются целлюлозо- и лигнолитическая активности [20]. Можно полагать, что биосинтез отдельных компонентов растительного материала определяется физико-химическими свойствами субстрата: соотношением основных компонентов, содержанием смолистых веществ, степенью кристалличности [1—3, 19].

Заключение

Ультразвуковая предобработка растительного материала наиболее способствует разрушению прочных связей между лигнином и гемицеллюлозным комплексом в сравнении с другими методами физического воздействия. Полученные данные свидетельствуют, что предварительная обработка субстрата ультразвуком изменяет скорость и глубину разложения сырья при культивировании и может быть применена для ускорения биоконверсии лигноцеллюлозных субстратов в производстве биодизельного топлива

В результате экспериментов были выбраны оптимальные условия ультразвуковой обработки модельного субстрата — луги подсолнечника в водной

среде: интенсивность 368 Вт/см², продолжительность обработки 15 мин. При выбранных параметрах деструкция целлюлозы достигает 16 % а.с.в., лигнина — 11,4 % а.с.в.

На основании сравнительных анализов с использованием физико-химических методов (ИК-Фурье спектроскопии и низкотемпературной адсорбции азота) показано, что ультразвуковая предобработка способствует увеличению биодоступности растительного субстрата для экзоферментов микроорганизмов вида *Bacillus subtilis*. В результате ультразвуковой обработки происходит деметилирование сиригильных единиц лигнина.

В ходе биодеструкции предобработанного субстрата лигнин преобразуется наиболее интенсивно вследствие разрушения связей его с целлюлозой при ультразвуковой обработке.

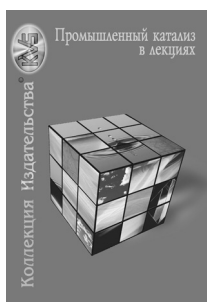
Дальнейшие исследования в этом направлении могут вестись с расширением сырьевой базы лигноцеллюлозных материалов, на опытно-промышленном уровне с использованием современных ультразвуковых промышленных установок объемом свыше 200 л.

Литература

1. Белова Н.В., Денисова Н.П. Грибы белой гнили древесины и возможность их использования для утилизации отходов // Биотехнология. 2005. № 4. С. 55.
2. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Шутова В.А. Влияние прессования на свойства лигнина древесины сосны, обработанной грибом *Panus tigrinus* // Химия растительного сырья. 2001. № 3. С. 111.
3. Алешина Л.А., Глазкова С.В., Луговская Л.А. и др. Современные представления о строении целлюлоз // Химия растительного сырья. 2001. № 1. С. 5.
4. Saddler J.N., Brownell H.H., Clermont L.F.P., Levitin N. // Biotechnol. Bioengng. 1982. Vol. 24. № 6. P. 1389.
5. Kahlon S.S., Neeraj K., Karla K.L., Grewal H.S. Bioconversion of rice straw into feed // J.Res. Punjab Ag.Univ. 1990. № 3. P. 447.
6. Madan Patrabansh S. The microbial conversion of different agricultural residues and its biological efficiency // Acta biotechnol. 1995. № 1. P. 131.
7. Bremner D. Historical introduction to sonochemistry // Advances in Sonochemistry. 1990. Vol. 1. P. 1.
8. Mosier N., Wyman C., Dale B. // Bioresource Technology. 2005. Vol. 96. P. 673.
9. Саловарова В.П., Козлов Ю.П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов. М.: РУДН, 2001.

10. Прутенская Е.А., Сульман М.Г., Ожимкова Е.В. Влияние ультразвуковой предобработки на состав лигноцеллюлозного материала // Изв. вузов. Химия и химическая технология. 2008. Т. 51. № 6. С. 97.
11. Margulis M.A. Sonochemistry and Cavitation. Luxemburg: Gordon and Breach Science Publishers, 1995.
12. Химия и ультразвук. Пер. с англ. / Под ред. Т. Мейсона. М.: Мир, 1993.
13. Антонова Г.Ф., Баженов А.В., Варахсина Т.Н. и др. Влияние ультразвука на лигнин древесины дуба // Химия растительного сырья. 2006. № 3. С. 5.
14. Аутлов С.А., Мамлеева Н.А., Базарнова Н.Г. и др. Превращения лигнина древесины осины под действием озона // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 87.
15. Киприанов А.И. Инициирование химических реакций в жидкофазной среде // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Матер. Всероссийского семинара (Барнаул, 28—29 марта, 2002 г.). С. 64.
16. Першина Л.А. Свойства лигнина, выделенного с помощью ультразвуковых колебаний // Изв. Томского политехнического института. 1969. Т. 69. С. 160.
17. Янковский Б.А., Першина Л.А. О действии ультразвука на древесину // Химия древесины. 1969. Вып. 3. С. 57.
18. Оболенская А.В. и др. Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Лесная пром-ть, 1965..
19. Каницкая Л. В., Козлов И.А., Бабкин В.А. и др. Химическое строение лигнинов, полученных разными способами щелочной делигнификации древесины сосны // Химия в интересах устойчивого развития. 1999. Т. 7. С. 49.
20. Прутенская Е.А., Быстрова Г.И., Потоцкая И.В. Изучение влияния низкочастотного ультразвукового поля на деструкцию лигноцеллюлозного материала // Вестник Тверского ГТУ. 2010. Вып. 16. С. 3.
21. Грег С., Синг К. Адсорбция. Удельная поверхность и пористость М.: Мир, 1984.

Книги издательства «Калвис»:



ПРОМЫШЛЕННЫЙ КАТАЛИЗ В ЛЕКЦИЯХ

Под общей редакцией докт. техн. наук, проф. А.С. Носкова.

В сборниках «Промышленный катализ в лекциях» отражены основы промышленного катализа и его применения. Материал лекций предназначен для инженерно-технических работников, занятых в производстве катализаторов и их носителей, в производстве химических продуктов с использованием каталитических технологий, а также для преподавателей и студентов химических и химико-технологических факультетов, специализирующихся в области катализа.

В настоящее время можно приобрести выпуски № 1—8 в бумажном или электронном виде. Серия продолжается.



ИЗ ИСТОРИИ КАТАЛИЗА: ЛЮДИ, СОБЫТИЯ, ШКОЛЫ

Под общей редакцией докт. техн. наук, проф. В.Д. Кальнера.

Книга — сборник авторских статей по истории катализа, в котором осмысливается зарождение и развитие разных направлений фундаментальной и прикладной каталитической науки; становление каталитической индустрии в разных отраслях химии, нефтехимии, нефтепереработки; создание и организация производства катализаторов для крупнотоннажных процессов; система подготовки кадров в области катализа в эпохи монархии, республики Советов, Советского Союза и новой России.

Для оформления подписки свяжитесь с нами по телефонам: (495) 913-80-94, 955-01-20, 955-01-97 или напишите по электронной почте: podpiska@kalvis.ru