

**АЦЕТОНОБУТИЛОВОЕ СБРАЖИВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ
С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БИОБУТАНОЛА**

Т.С. Морозова

Научный руководитель: доцент, к.б.н. С.Ю. Семёнов

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: Tsmorozova1991@gmail.com

**ACETONE-BUTANOL FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSIC HYDROLYSATES FOR THE
BUTANOL PRODUCTION**

T.S. Morozova

Scientific Supervisor : Assistant professor, Ph.D. S.Yu. Semyonov

National Research Tomsk State University, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: Tsmorozova1991@gmail.com

***Abstract.** In the present study, we evaluated of the use of lignocellulosic hydrolysates for the biobutanol production. We used an acid hydrolysate of spruce and an enzymatic hydrolysate of miscanthus cellulose. The obtained results confirmed the efficacy of the hydrolysates as sources of reducing substances. For the most successful application of the lignocellulosic hydrolysates for biobutanol production, it is necessary to apply an inexpensive and effective detoxification method and to use of cost-effective growth factors.*

Введение. Биобутанол – это альтернативное моторное топливо, получаемое путем сбраживания углеводсодержащих сред ацетонобутиловыми бактериями рода *Clostridium*. Он обладает рядом экологических и энергетических преимуществ в сравнении с биоэтанолом и бензином, однако, при использовании пищевого сырья для приготовления сбраживаемых сред, заметно проигрывает им в себестоимости [1]. Значительно снизить затраты на производство биобутанола позволяет использование в качестве источника углеводов гидролизатов лигноцеллюлозного сырья (ЛЦС) – отходов АПК и лесного хозяйства.

Несмотря на явное преимущество применения гидролизованных лигноцеллюлозных отходов как источников редуцирующих веществ, возникают проблемы на стадии подготовки сбраживаемых сред, связанные с токсичностью гидролизатов для продуцентов биобутанола и с отсутствием в них ростовых веществ, необходимых для биоагентов брожения. Эффективное решение данных проблем позволит успешно применять гидролизаты ЛЦС в технологиях получения биобутанола.

Целью работы являлась оценка эффективности ацетонобутилового сбраживания гидролизатов лигноцеллюлозного сырья в бутанол.

Материалы и методы исследования. Ацетонобутиловое брожение осуществлялось штаммом бактерий *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, полученным из ВКПМ. Данный штамм рода клостридий является одним из наиболее изученных штаммов, образующих растворители [2], обладает сахаролитической, амилолитической и протеолитической способностями [3].

В качестве источников редуцирующих веществ использовались кислотный гидролизат еловых опилок, содержащий 22,3 г/л глюкозы, 15,6 г/л маннозы и 7,9 г/л ксилозы, и ферментативный гидролизат целлюлозы мискантуса, включающий в себя 34,8 г/л глюкозы и 1,3 г/л ксилозы.

Детоксикация гидролизатов ЛЦС осуществлялась специально адаптированным активным илом, по методике, приведенной в [4]. Источником ростовых веществ выступал отжим с пивной дробины в количестве 6 об. %, в качестве контрольного варианта – факторы роста из полусинтетической среды, прописанной в паспорте культуры *S. acetobutylicum* ATCC 824 [г/л]: ПАБК – 0,001, тиамин – 0,001, биотин – 0,001, цистеин – 0,5, дрожжевой экстракт – 1.

В качестве контрольных сред были приготовлены 6 % кукурузный затор, полусинтетическая среда с содержанием глюкозы 20 г/л и среда, содержащая 45 г/л глюкозы и 6 об. % отжима с пивной дробины. Также для дополнительно контроля были приготовлены аналогичные среды с неочищенными гидролизатами ЛЦС. Стерилизацию кукурузного затора проводили при 0,2 МПа в течение 2 часов, остальных сред – при 0,15 МПа в течение 20 минут. Брожение осуществлялось при 37 °С.

Процесс ферментации оценивался визуально по времени начала, окончания и интенсивности газовой выделению и пенообразованию, а также по содержанию целевых продуктов. Концентрации бутанола, ацетона и этанола в отбродившей среде определялись на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл. 5000.2 (Россия).

Результаты и обсуждение. На первом этапе работ осуществлялось сбраживание очищенных гидролизатов ЛЦС с добавлением ростовых веществ по составу и концентрациям как в стандартной полусинтетической среде. В качестве контроля сбраживалась полусинтетическая среда. Для инокуляции образцов применяли музейную культуру, хранившуюся на полусинтетической среде, прописанной в ее паспорте. В опытах по сбраживанию гидролизатов во всех 16 повторностях брожение шло нормально, характеризовалось интенсивными процессами газовой выделению и пенообразованию. Однако брожение сред на основе обоих гидролизатов началось с задержкой – на 10–12 ч., окончание брожения было отмечено на 79–83 ч. В контрольном варианте начало брожения отмечено на 7–8 ч., а окончание – на 72–74 ч. По завершении брожения суммарный выход растворителей в опыте с гидролизатом мискантуса составил 15,4 г/л, с гидролизатом опилок ели – 16,2 г/л, в контрольном варианте – 17,7 г/л. При этом в последующих посевах, когда использовали инокулят из отбродивших сред на основе гидролизатов, суммарный выход растворителей в опытах повысился примерно в 1,2 раза (табл. 1); время начала и окончания брожения сократилось на 3–4 ч. Был сделан вывод, что культуре бактерий *S. acetobutylicum* ATCC 824 требуется адаптация к новым источникам редуцирующих веществ, после которой эффективность потребления субстратов повышается.

Далее оценивалась эффективность сбраживания гидролизатов ЛЦС, когда в качестве недорогого источника ростовых веществ используется отжим с пивной дробины. В контрольном варианте в качестве редуцирующего вещества выступала глюкоза. Начало брожения во всех случаях было отмечено через 8–10 ч., завершение – через 72–79 ч. Суммарный выход растворителей в опытных и контрольных образцах был примерно одинаковым (табл. 1), что говорит о возможности эффективного применения отжима с пивной дробины в качестве источника ростовых веществ.

Во всех контрольных вариантах с неочищенными гидролизатами брожение отсутствовало. В результате сбраживания мучной среды суммарный выход растворителей в среднем составил 20,6 г/л.

(табл. 1). Брожение характеризовалось интенсивными процессами газовой выделения и пенообразования. Начало отмечено на 7–8 ч., окончание на 72–73 ч. Более высокий выход растворителей в сравнении с опытными образцами, по нашему мнению, объясняется высоким содержанием в кукурузном заторе, помимо сахаров, крахмала. Поскольку клостридии обладают явно выраженной амилитической способностью, то они используют в качестве источника углерода обе группы соединений. При этом выход растворителей в данном варианте достиг максимума, после которого начинается бутаноловое ингибирование продуцентов.

Таблица 1

Средние результаты ацетонобутилового сбраживания различных сред бактериями *C. acetobutylicum* ATCC 824

Среда	Время брожения, ч.		Средний выход растворителей, [г/л]		
	Начало	Окончание	Бутанол	Ацетон	Этанол
Гидролизат опилок ели + компоненты полусинтетической среды	7–8	75–79	15,3±0,8	2,8±0,5	1,4±0,3
Гидролизат мискантуса + компоненты полусинтетической среды	7–9	75–78	14,1±1,4	2,2±0,6	1,0±0,4
Полусинтетическая среда	7–8	72–74	14,5±1,1	2,8±0,9	1,1±0,4
Гидролизат опилок ели + отжим с пивной дробины	8–10	72–79	15,1±0,7	2,4±0,2	1,4±0,4
Гидролизат мискантуса + отжим с пивной дробины	8–10	72–79	14,9±0,8	3,1±0,6	0,9±0,2
Глюкоза + отжим с пивной дробины	8–10	72–79	15,5±0,9	2,9±0,7	1,1±0,2
Кукурузный затор	7–8	72–73	17,2±0,3	3,2±1,3	1,3±0,8

Заключение. Полученные в ходе исследования результаты подтвердили возможность эффективного применения гидролизатов ЛЦС для получения биобутанола. При их сбраживании выход целевых продуктов был несколько ниже, чем при использовании кукурузной муки, вследствие чего затраты на перегонку могут незначительно повыситься. Для снижения этих затрат можно повысить выход растворителей при сбраживании сред на основе гидролизатов ЛЦС путем увеличения содержания в них редуцирующих веществ до предельной концентрации 6 %. Применение малозатратного способа детоксикации гидролизатов и использование недорогих источников ростовых веществ позволит еще более эффективно применять гидролизаты ЛЦС в технологиях ацетонобутилового производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shapovalov O.I., Ashkinazi L.A. Biobutanol: Biofuel of Second Generation // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2008. – Vol. 81. – № 12. – P. 2232–2236.
2. Croux Ch., Canard B., Goma G. Autolysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 // Journal of General Microbiology. – 1992. – Vol. 138. – P. 861–869.
3. Логоткин И.С. Технологии ацетон-бутилового производства. М. : Пищепромиздат, 1958. – 254 с.
4. Morozova, T. S., Semyonov, S.Y. Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Biobutanol Production // Key Engineering Materials. – 2016. – Vol. 683 – P. 525–530.