

УДК 547.458.8+ 577.15

## Механическая активация процесса ферментативного осахаривания углеводов рисовой шелухи

Е. Г. ШАПОЛОВА<sup>1,2</sup>, А. Л. БЫЧКОВ<sup>1,2</sup>, О. И. ЛОМОВСКИЙ<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН, ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)<sup>2</sup>НОЦ “Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии”, Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

(Поступила 17.07.12; после доработки 01.08.12)

### Аннотация

Исследовано влияние механической активации рисовой шелухи на протекание последующего ферментативного гидролиза. Установлено, что механическая обработка способствует увеличению удельной площади поверхности, разрушению кремнеземной оболочки, покрывающей лигноцеллюлозу, и значительной аморфизации кристаллических участков целлюлозы. В результате степень конверсии полимерных углеводов в растворимые сахара возрастает практически в 13 раз. Таким образом, механоферментативная обработка шелухи риса позволяет получить углеводсодержащий полупродукт, который может быть использован для дальнейшей микробиологической переработки.

**Ключевые слова:** механоферментативный гидролиз, рисовая шелуха, биотопливо, углеводы

### ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия опубликовано множество работ, посвященных строению и свойствам рисовой шелухи [1–4]. Известно, что она отличается высокими прочностными характеристиками, химической стойкостью, низкой питательностью, низким объемным весом, высокой зольностью. Эти свойства обусловлены высоким содержанием неорганического компонента – диоксида кремния, доля которого может достигать 20 %. Кроме того, рисовая шелуха содержит 34–43 % целлюлозы, 5–37 % гемицеллюлозы и 19–47 % лигнина [5]. Благодаря этому ее можно рассматривать в качестве источника углеводов, которые могут быть использованы для микробиологического получения биотоплива, в первую очередь биоэтанола и биогаза – наиболее развивающихся направлений в альтернативной энергетике и “зеленой химии” последних лет.

Однако углеводы исходной рисовой шелухи характеризуются низкой конверсией в растворимые сахара и, как следствие, низкой питательностью для продуцентов компонентов биотоплив. Это связано с тем, что, наряду со сложным супрамолекулярным строением лигноуглеводного комплекса клеточных стенок, частицы рисовой шелухи покрыты сплошной кремнеземной мембраной, препятствующей непосредственно ферментативному гидролизу и эффективному осуществлению известных в химической технологии процессов предобработки, которые могли бы увеличить реакционную способность полимерных углеводов.

Ввиду высокой химической стойкости, обусловленной строением, для переработки рисовой шелухи в настоящее время применяют достаточно жесткие методы обработки, преимущественно гидролитические. Так, в работах [6–9] проиллюстрировано влияние кислотного и щелочного гидролиза на разрушение

структуры рисовой шелухи (деградация гемицеллюлоз, лигнина и частично диоксида кремния) и высвобождение целлюлозы. Для увеличения растворимости компонентов рисовой шелухи предложено использовать предварительное карбоксилирование и последующий тонкий помол [10]. Модификация поверхности карбоксилированием предотвращает агрегацию частиц сырья, поскольку придает гидрофильные свойства поверхности.

Недостатки большинства предлагаемых решений связаны с проведением предварительной обработки рисовой лузги в жидкой фазе, сложностью и многостадийностью процессов, применением агрессивных или опасных реагентов (концентрированных щелочей, кислот, органических растворителей и т. д.), высоких давлений и температур. В таких условиях возможно протекание различных реакций деградации сахаров и конденсации лигнина, в результате которых образуются побочные продукты. Кроме того, использование гидролизованной рисовой шелухи в качестве пищевой или кормовой добавки требует обеспечения необходимой чистоты продуктов, так как они могут содержать остатки токсичных реагентов.

Цель данной работы – экспериментальное изучение влияния механической активации на протекание ферментативного гидролиза шелухи риса. Исследование ферментативного гидролиза непищевых целлюлозных субстратов, к которым относится рисовая шелуха, и влияния на этот процесс механической активации важны, поскольку использование ферментов обеспечивает экологичность утилизации отходов переработки растительного сырья в продукты, востребованные в народном хозяйстве.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реактивы и материалы

В работе использовали *D*(+)-глюкозу (99 %, Acros Organics), целлюлозолитический ферментативный препарат; калий (III) железосинеродистый квалификации “х. ч.” (ГОСТ 4206–75), ацетатный буфер с pH 4.7, шелуху риса (Краснодарский край, Россия).

Целлюлозолитический препарат “Целловиридин” (торговая марка “Целлолюкс 2000”,

производства ПО “Сиббиофарм”, г. Бердск) представляет собой смесь ферментов, образующуюся при сушке культуральной жидкости грибов *Trichoderma viride*. Препарат характеризуется следующей гидролазной активностью, ед. активн./г: ксиланаза 8000, целлюлаза 2000, β-глюканаза до 1500, глюкоамилаза 20.

### Механическая активация шелухи риса

Обработка проводилась в роликовой мельнице РМ-20 и планетарно-центробежной мельнице АГО-2, оснащенных водяным охлаждением. Условия механической обработки в АГО-2: частота вращения реакторов 630 мин<sup>-1</sup>, ускорение рабочих тел 20g, время механической активации 60–600 с. В случае мельницы РМ-20 частота вращения составляла 1000 мин<sup>-1</sup>, время пребывания обрабатываемого материала в зоне механического воздействия 40–60 с.

### Ферментативный гидролиз

Навеску исходной либо механически активированной рисовой шелухи суспендировали в буферном растворе с pH 4.7 и гидромодулем 5000. Затем вносили 2 % (от массы взятой шелухи) ферментативного комплекса “Целловиридин” и инкубировали при 50 °С при автоматическом встряхивании с частотой 120 мин<sup>-1</sup>. Через каждый час отбирали пробы для определения количества восстанавливающих углеводов.

### Определение суммарного количества восстанавливающих углеводов

К 1.0 мл растворов углеводов с концентрацией от 30 до 150 мг/л добавляли по 3.0 мл 0.06 % раствора  $K_3[Fe(CN)_6]$ , перемешивали и выдерживали при 100 °С в течение 10 мин. После охлаждения растворы фотометрировали при длине волны 420 нм. Для построения калибровочных кривых использовались стандартные растворы глюкозы с концентрациями 30.0–150 мг/л.

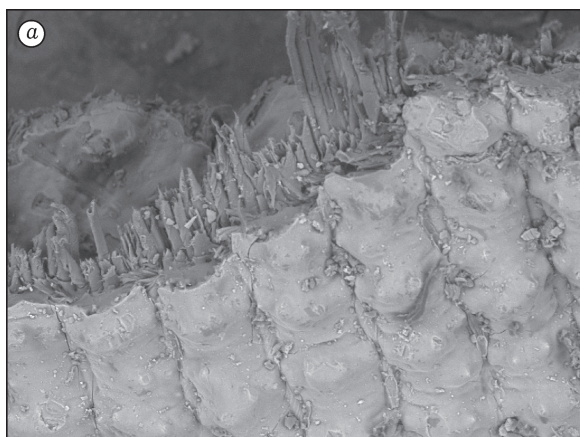
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в рисовой шелухе и некоторых растениях кремний входит в состав гидратированного аморфного кремнезема в форме силикагеля или опала. Кремнезем концентрируется у внешних поверхностей растительных тканей, где конденсируется с образованием целлюлозно-кремнеземной оболочки [2]. Эта плотная и жесткая оболочка препятствует как механическим, так и химическим воздействиям на глубинные ткани. Кроме того, микрофибриллы целлюлозы в растительном сырье погружены в аморфный лигнино-гемицеллюлозный матрикс. Такая ультраструктура лигноцеллюлозных компонентов способствует устойчивости растительных материалов к большим механическим нагрузкам. В этой связи основной задачей механической обработки является удаление кремнеземной

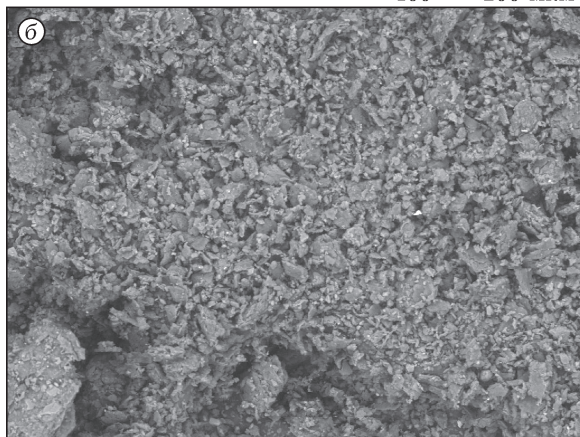
мембраны, измельчение лигноцеллюлозы, аморфизация кристаллических участков целлюлозы, увеличение удельной площади поверхности сырья, пригодной для взаимодействия с ферментами.

Определены оптимальные условия механохимического извлечения диоксида кремния из матрицы растительного сырья. С этой целью исходную шелуху риса обрабатывали в механических активаторах с различными типами воздействия. Установлено, что наилучшим образом измельчение протекает с использованием активаторов с истирающе-раздавливающим типом механического воздействия, который реализуется в роликовых мельницах. При менее эффективном ударно-сдвиговом режиме обработки, характерном для мельниц планетарного типа, за 1–10 мин не происходит значительных изменений растительных тканей данного сырья, кремнеземная мембрана сохраняется и препятствует сорбции ферментов на поверхности углеводов.

При обработке рисовой шелухи в роликовой мельнице РМ-20 происходит значительное нарушение морфологии растительных тканей (рис. 1): существенно уменьшается размер частиц, удаляется кремнеземная мембрана, частицы различных тканей исходной биомассы гомогенизируются. По-видимому, в результате наблюдаемых процессов облегчается доступ молекул ферментов к поверхности субстрата, что должно приводить к более высоким скоростям ферментативного гидролиза.



×400 200 мкм



×400 200 мкм

Рис. 1. Микрофотографии образцов исходной (а) и механически активированной (б) рисовой шелухи.

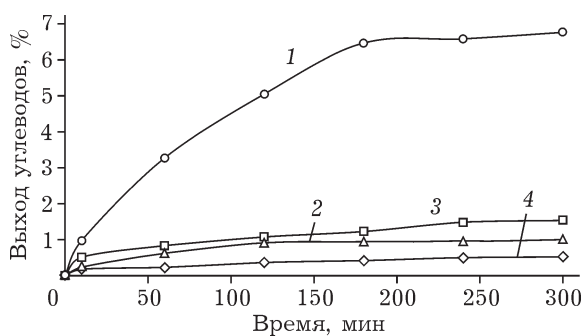


Рис. 2. Выход водорастворимых углеводов: 1 – водная экстракция исходной рисовой шелухи (без добавления ферментов), 2 – ферментативный гидролиз исходной рисовой шелухи, 3 – водная экстракция шелухи после механической активации, 4 – ферментативный гидролиз рисовой шелухи после механической активации.

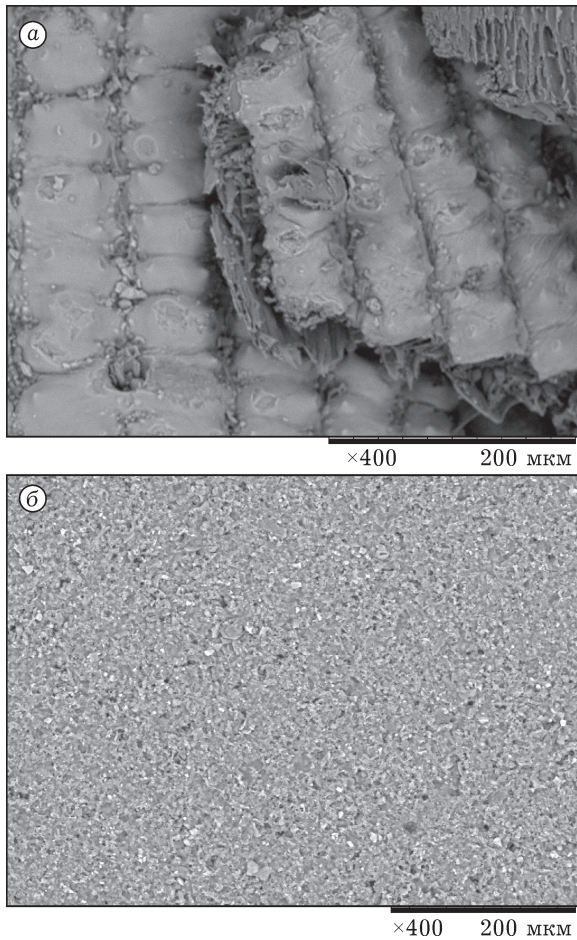


Рис. 3. Микрофотографии образцов исходной (а) и механически активированной (б) рисовой шелухи после проведения ферментативного гидролиза.

Результаты экспериментов по ферментативному гидролизу исходной и активированной шелухи подтвердили наше предположение. Из данных рис. 2 видно, что в результате механической активации первоначальная скорость ферментативного гидролиза увеличивается в несколько раз, а это может указывать на увеличение поверхности, пригодной для сорбции ферментов. Также наблюда-

ется увеличение общего выхода углеводов, что свидетельствует о переходе значительной части полимерных углеводов в пригодную для гидролиза форму.

Для отдельной интерпретации процессов, протекающих при ферментативном гидролизе, исходные и гидролизованные образцы изучены с помощью методов электронной микроскопии (вклад морфологии тканей), дифракции рентгеновских лучей (вклад кристаллической структуры целлюлозы) и тепловой десорбции аргона (вклад удельной площади поверхности).

По данным электронной микроскопии (рис. 3), механически активированный образец подвергается гидролизу в большей степени, нежели исходное растительное сырье. На микрофотографиях исходной рисовой шелухи заметны лишь небольшие изменения поверхности, покрытой кремнеземной оболочкой. Наблюдаются незначительные по площади разрушенные области, в углублениях тканей скапливаются мелкие гидролизованные частицы биомассы, однако слой диоксида кремния по-прежнему защищает от воздействия основную часть лигноцеллюлозы. В то же время гидролизованные частицы активированной шелухи значительно уменьшаются в размерах, изменяется их структура, они становятся более гладкими и округлыми, что свидетельствует о протекании ферментативного гидролиза равномерно со всей поверхности.

Для определения вклада поверхности в увеличение реакционной способности сырья измеряли удельную площадь поверхности по методу тепловой десорбции аргона. Как видно из данных табл. 1, в результате механической активации удельная площадь поверхности возрастает с 0.43 до 2.26 м<sup>2</sup>/г. В работах [11, 12] показано, что среди других процессов, протекающих при механической активации, увеличение площади поверхности

ТАБЛИЦА 1

Значения индекса кристалличности и удельной поверхности для шелухи риса, обработанной в различных условиях

Образцы рисовой шелухи	Индекс кристалличности, %	Удельная площадь, м <sup>2</sup> /г
Исходный	36.6	0.43
После ферментативного гидролиза	39.1	0.67
Механически активированный	12.8	2.26
После ферментативного гидролиза	22.7	2.38

вносит наибольший вклад в повышение первоначальных скоростей гидролиза.

Кроме того, известно [12], что на суммарный выход растворимых углеводов в большей степени влияет соотношение кристаллической и аморфной долей целлюлозы в материале. Данный параметр можно оценить по методу Сега-ла [13], исходя из данных дифракции рентгеновских лучей.

Показано (см. табл. 1), что механическая обработка рисовой шелухи приводит к существенной аморфизации целлюлозы, способствуя повышению суммарной степени конверсии, так как ферментные препараты легче гидролизуют аморфные неструктурированные субстраты, нежели кристаллические.

Необходимо отметить, что после проведения гидролиза индекс кристалличности образцов увеличивается. Это, во-первых, может быть связано с тем, что гидролиз целлюлозы протекает преимущественно в аморфных участках. Как следствие, отношение кристаллической части к аморфной возрастает по мере протекания гидролиза. Во-вторых, повышение степени кристалличности целлюлозы может быть вызвано известным эффектом рекристаллизации аморфной целлюлозы обратно в кристаллическую форму при смачивании водой. Но поскольку в нашем случае значительная часть аморфной целлюлозы гидролизована и не может участвовать в рекристаллизации, то увеличение индекса кристалличности обусловлено в большей мере растворением аморфных частей, нежели рекристаллизацией целлюлозы.

Таким образом, нами описаны процессы, протекающие при механической активации рисовой шелухи и ее последующем ферментативном гидролизе. Можно заключить, что механическая активация приводит к увеличению реакционной способности полимерных углеводов, входящих в состав сырья, за счет разупорядочения структуры тканей и удаления экранирующей кремнеземной мембраны, уменьшения размеров частиц и увеличения площади поверхности, а также аморфизации кристаллических участков целлюлозы. Проведение ферментативного гидролиза активированной рисовой шелухи позволяет за 5 ч гидролизовать 6.7 % углеводов (от общей массы сырья). Для сравнения, исходная рисовая шелуха практически не гидролизует фер-

ментами, а выход углеводов при тех же условиях составляет около 0.5 %.

## ВЫВОДЫ

1. Для эффективной механической активации рисовой шелухи наиболее пригодны измельчающие аппараты с истирающим и раздавливающим типом действия (например, роликовые мельницы). Механическая обработка в подобных аппаратах позволяет значительно повысить реакционную способность сырья.

2. Помимо уменьшения размеров частиц и удаления кремнеземной мембраны механическая активация позволяет существенно увеличить доступную площадь поверхности субстрата и снизить степень кристалличности целлюлозы. Данные эффекты вносят заметный вклад в увеличение скоростей гидролиза и общего выхода растворимых углеводов.

3. Полученный в результате механической активации и ферментативного гидролиза полупродукт подходит для дальнейшей микробиологической переработки в биоэтанол и биогаз.

4. Применение механоферментативного гидролиза позволяет значительно повысить выход водорастворимых соединений и уменьшает экранирующее влияние кремнеземной мембраны, благодаря чему возрастает пищевая ценность рисовой шелухи. Таким образом, гидролизованную рисовую шелуху можно рассматривать в качестве дешевого компонента кормов для животноводства и птицеводства.

Исследования выполнены в рамках работ по Государственному контракту № 16.512.11.2165 Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг."

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Адэйр К. Рис и его качество. Пер. с англ. / Под ред. Козьминой. М.: Колос, 1976. 400 с.
- 2 Parka B., Wib S., Leeb K., Singhb A., Yoonc T., Kimb Y. // *Biomass and Bioenergy*. 2003. Vol. 25. P. 319.
- 3 Sun L. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001. Vol. 40. P. 5861.
- 4 Govindarao V. M. H. // *J. Sci. Ind. Res.* 1980. Vol. 39, No. 9. P. 495.
- 5 Сергиенко В., Земнухова Л., Егоров А., Шкорина Е., Василюк Н. // *Рос. хим. журн.* 2004. Т. XLVIII, № 3. С. 116.
- 6 Ndazi B., Nyahumwa C., Tesha J. // *BioResources*. 2008. Vol. 3, No. 4. P. 1267.
- 7 Luduena L., Fasce D., Alvarez V., Stefani P. // *BioResources*. 2011. Vol. 6, No. 2. P. 1440.
- 8 Markovska I., Bogdanova B., Nedelchev N., Gurova K. // *J. Chin. Chem. Sci.* 2010. Vol. 57. P. 411.

- 9 Пат. 226224 РФ, 2005.
- 10 Choi K., Yang S., Kim D., Kang W., Choi Y. // *Food Sci. Biotechnol.* 2009. Vol. 18, No. 6. P. 439.
- 11 Клесов А., Синицын А. // *Биоорганическая химия*. 1981. Т. 7, № 12. С. 1801.
- 12 Silva G., Couturier M., Berrin J. // *Biores. Technol.* 2012. Vol. 103. P. 192.
- 13 Segal L., Creely J., Martin A., Conrad C. // *Text. Res. J.* 1959. Vol. 29, No. 10. P. 786.