



Министерство просвещения Российской Федерации  
ОАНО «Школа «Летово»»

Исследовательский проект  
**Исследование методов получения биоэтанола второго  
поколения**

Выполнила: Базарсадаева Ирина Цыбендоржиевна  
ученица 9 класса

Руководитель: Котин Павел Александрович  
заведующий лабораторией

2024/2025 учебный год

## Содержание:

Введение:.....	2
Обзор литературы.....	4
Материалы и методы.....	5
Ход работы:.....	7
Результаты и обсуждение:.....	10
Выводы:.....	11
Список источников:.....	11

## Введение:

Биоэтанол, представляющий собой выделенный из возобновляемой биомассы этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ), активно разрабатывается как перспективное альтернативное топливо. Его получение состоит из нескольких этапов, таких как предобработка, сахарификация и ферментация моносахаридов в этанол, однако существующие технологии зачастую адаптированы для работы с определенными видами сырья, что может снижать их эффективность при использовании альтернативных материалов, таких как бумага

**Цель:** сравнить эффективность нескольких методов получения биоэтанола второго поколения с использованием бывшей в употреблении бумаги в качестве сырья

**Гипотеза:** различные методы предобработки бумаги по-разному влияют на выход моносахаридов, необходимых для последующего получения биоэтанола

**Объект исследования:** процессы получения биоэтанола второго поколения из лигноцеллюлозного сырья.

**Предмет исследования:** влияние различных методов предобработки использованной бумаги на эффективность ферментативного гидролиза и выход глюкозы.

**Актуальность и значимость:** переработка ископаемых источников энергии наносит значительный ущерб экологии, поскольку сопровождается выбросами парниковых газов в атмосферу, что, в свою очередь, способствует изменению климата. Сократить данное воздействие можно с помощью альтернативных источников энергии, таких как биоэтанол, который производится из возобновляемого растительного сырья и имеет повышенный класс экологичности. Применение использованной бумаги в качестве сырья поможет уменьшить ее количество на свалках, что, в свою очередь, предотвратит выброс метана — парникового газа, образующегося при разложении бумаги.

**Задачи:**

1. Изучить литературу по выбранной теме.
2. Изучить химический состав бумаги для выбора корректных методов ее переработки
3. Выбрать методы получения биоэтанола
4. Провести эксперименты по производству биоэтанола различными методами
5. Произвести математические расчёты и сравнить между собой эффективность исследованных методов

## Обзор литературы

Одним из наиболее перспективных решений для получения биоэтанола является использование лигноцеллюлозного сырья, включающего древесные отходы, сельскохозяйственные остатки и макулатуру. Получаемый из таких материалов биоэтанол называется биоэтанолом второго поколения.

Лигноцеллюлоза представляет собой сложный полимер, включающий три основных компонента: целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Первые два могут быть ферментативно деструктированы до моносахаридов, которые в дальнейшем претерпевают ферментацию и конвертируются в этанол. Однако лигнин, представляющий собой сложный фенольный полимер, выполняющий защитную функцию в растительных тканях, значительно снижает реакционную способность гемицеллюлоз и целлюлозы, то есть уменьшает эффективность действия ферментов и реагентов на них. Вторым фактором препятствующим гидролизу этих полисахаридов является высококристаллическая структура целлюлозы и ее нахождение в виде лигно–углеводных комплексов.

Из указанных выше факторов становится ясно, что перед проведением непосредственно ферментативного гидролиза необходим этап предварительной обработки для повышения реакционной способности полисахаридов. В их качестве могут выступать физические, химические и биологические методы, которые будут изучены в данной работе

Бумага, в зависимости от ее вида, может содержать различное количество целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина. В большинстве случаев бумага состоит преимущественно из целлюлозы (от 70 до 90%), однако вторичное сырье,

такое как газетная и упаковочная бумага, может содержать до 20–30% гемицеллюлоз и до 10% лигнина.

## **Материалы и методы**

1. Изучение литературы по выбранной теме и выбор методов для обработки бумаги
2. Физическая обработка сырья

Для увеличения реакционной способности целлюлозы использовалось измельчение на частицы размером 0.5-1 см. Проводилось оно в течение 2 минут в блендере фирмы Kitfort, куда помещалась бумага, предварительно замоченная в воде. После измельчения полученная бумажная масса укладывалась тонким слоем в лоток для равномерного высушивания при комнатной температуре

3. Предобработка сырья

- a. Кислотная предобработка

Для гидролиза гемицеллюлоз использовалась варка измельченной бумажной массы в 0.3% растворе  $H_2SO_4$  в течение 2х часов при температуре 120°C. Компоненты брались в соотношении 1:25 по массе сухой части к раствору.

- b. Ферментативная предобработка

Для гидролиза одного из самых распространенных типов гемицеллюлоз в бумаге— ксиланов использовался фермент ксиланаза от фирмы БиоПрепарат. Использовалось 50 мл раствора дистиллированной воды с концентрацией фермента 3% (активность 10 000 ед/г), к которому добавлялось 25г субстрата,

разведенного 150 мл буферного раствора с  $\text{pH}=6.2$  для создания оптимальных условий работы фермента. Инкубация проходила при температуре  $55^{\circ}\text{C}$  в течение 6 часов.

с. Щелочная предобработка

проводимая с применением гидроксида кальция ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). В данном случае использовался 6% раствор щелочи, а обработка осуществлялась при температуре  $70^{\circ}\text{C}$  в течение 3 часов.

Соотношение массы бумаги к раствору составляло 1:12, что позволяло эффективно разрушать лигноцеллюлозный комплекс и повышать доступность субстрата для последующего ферментативного разложения. После завершения варки была использована 0.3% серная кислота для понижения  $\text{pH}$  с 13 до 7.

4. Ферментативный гидролиз целлюлазой

Гидролиз целлюлозы производился с помощью фермента целлюлаза(производитель "Биопрепарат") с активностью 10 000 ед/г при оптимальных условиях( $\text{pH}=4$ ,  $t=55^{\circ}\text{C}$ ) в течение 10 часов. Для понижения  $\text{pH}$  предобработанных образцов использовалась 5% серная кислота, после чего к смеси добавлялся буферный раствор ( $\text{pH}=4.0$ )(производитель "ЭКРОСХИМ") пока сухой образец не составлял 20% по массе. После этого добавлялось количество фермента, равное 3% от общей массы смеси.

5. Отделение моносахаридов

К высушенным образцам была добавлена дистиллированная вода в соотношении по массе 1:14 после чего при перемешивании происходило растворение моносахаридов и части растворимых полисахаридов. Для отделения нерастворимой части образцов использовалось фильтрование вакуумом через бумажные фильтры. Затем использовалась частичное

осаждение ацетоном растворимых полисахаридов, а также большей части прочих примесей, не являвшихся моносахаридами. Чистый ацетон и фильтрат брались в отношении 3:1, после чего выжидался 1 час для осаждения примесей. После этого пипеткой был собран слой жидкости над осадком, который после выпаривания ацетона применялся для дальнейшего анализа

#### 6. Анализ на содержание глюкозы

Для количественного определения глюкозы, использовались индикаторные полоски БИОСКАН в соответствии с инструкцией к применению, после чего с помощью математического анализа находился выход глюкозы из каждого из образцов.

#### **Ход работы:**

Этанол может быть получен ферментированием C5 и C6 сахаров, что послужило причиной к исследованию общего количества получаемых моносахаридов из сырья после разных методов обработки и ферментативного гидролиза. На первом этапе было проведено изучение научных статей на тему различных способов предварительной обработки сырья, в результате которого были выбраны 4 метода: механический, щелочной, кислотный и ферментативный. Несмотря на их известность и изученность, существовали лишь методологии, оптимальные для других видов сырья, а их эффективность при работе с бумагой и вовсе не было упомянуто в научной литературе. Вследствие этого было принято решение использовать методологии, оптимизированные под наиболее схожее с бумагой сырье.

Механическая предобработка заключалась в измельчении влажной бумаги, предварительно пропущенной через шреддер, на куски размером  $0.5-1\text{ см}^2$  (см рис 1). Путем измельчения повышается общая площадь поверхности сырья, что повышает доступность его обработки для ферментов и других реагентов



Рис. 1. Измельченная бумага до высушивания

Кислотная предобработка проводилась с использованием разбавленной серной кислоты (0.3%). Низкая концентрация кислоты позволяла воздействовать на гемицеллюлозы и частично на целлюлозу, но не допускала образования большого количества фурановых соединений – фурфурола из C5 сахаров и гидроксиметилфурфурола из C6 сахаров, способных к ингибированию микроорганизмов, необходимых при ферментации моносахаридов в этанол. Именно серная кислота была выбрана, поскольку она приводит к относительно низкому образованию фурфурола ( в среднем в 1,3 раза меньше по сравнению с азотной кислотой).

Щелочная предобработка проводилась с использованием раствора гидроксида кальция (6%). Этот метод позволял солубизировать лигнин за счет разрушения связей между ним и гемицеллюлозами и способствовал повышению реакционной способности целлюлозы при последующем ферментативном гидролизе.

Для ферментативной предобработки был выбран фермент ксиланаза, способный разрушать 1-4 гликозидные связи в самом распространенном типе гемицеллюлоз–ксиланах. Путем расщепления гемицеллюлоз повышалась доступность целлюлозы для реакций, а также увеличивалось возможное общее число получаемых моносахаридов



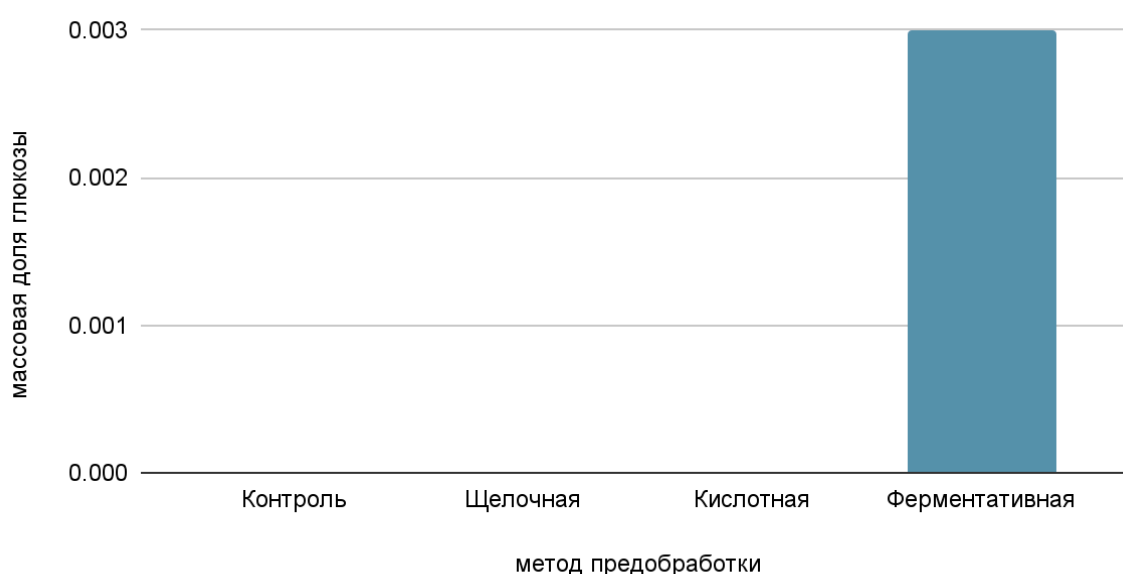
После завершения предобработки, при которой должна была повыситься реакционная способность целлюлозы и произойти расщепление гемицеллюлоз, проводился ферментативный гидролиз целлюлазой, расщепляющей 1-4 гликозидные связи в молекулах целлюлозы. После этого этапа было замечено значительное изменение в консистенции образцов прошедших предобработку, в то время как изменения в контрольном образце (измельченная бумага без химической и биологической предобработки), что позволяет сделать вывод о том, что хотя бы в некоторой степени реакционная способность целлюлозы была повышена вследствие предыдущих шагов.

Следующим шагом исследования должен был быть количественный анализ моносахаридов в образцах. Вследствие отсутствия оборудования для проведения масс спектроскопии, было принято решение использовать качественную реакцию на моносахариды, проводить калибровку с помощью растворов с известной концентрацией и спектрофотометра, а затем математически вычислять концентрацию моносахаридов в образцах. Изначально планировалось использовать антроновый реактив, дающий раствору окраску при наличии восстанавливающих сахаров, в число которых входят все моносахариды, которые могут получаться при гидролизе гемицеллюлоз и целлюлозы. Для проведения адекватной оценки моносахаридов необходимо было избавиться от восстанавливающих олиго- и полисахаридов, что было выполнено с помощью частичного осаждения ацетоном. Из-за проблем с поставкой антронового реактива и сжатыми сроками пришлось использовать индикаторные полоски на глюкозу, являющуюся мономером, встречающимся в полисахаридах бумаги в наибольшем количестве.

## Результаты и обсуждение:

С помощью индикаторных полосок на содержание глюкозы удалось установить количество глюкозы в обработанных образцах.

Содержание глюкозы в образцах в зависимости от способа предобработки



Согласно полученным данным, измерения контрольного образца (без предобработки химико-биологическими методами), а также образцов, прошедших кислотную и щелочную предобработку, не выявили наличия глюкозы в растворе. Это может быть связано с тем, что данные методы предобработки не обеспечили достаточного разрушения лигно-углеводных комплексов и понижения кристалличности целлюлозы до состояния, пригодного для ферментативного расщепления. Еще одной причиной низкой эффективности могло стать неполное расщепление полисахаридов и взаимодействие примесей из сырья с реагентами. Перспективным направлением для дальнейших исследований является оптимизация исследованных методов под работу с бумагой

Единственным методом, который дал улавливаемое количество глюкозы в растворе, оказалась ферментативная предобработка ксиланазой. Это говорит о том, что ферментативное разрушение гемицеллюлоз оказалось наиболее эффективным методом предобработки сырья и обеспечило лучший доступ ферментов к целлюлозе.

### **Выводы:**

Гипотеза подтвердилась, различные методы предобработки бумаги действительно имеют разное влияние на выход моносахаридов. Кислотная и щелочная предобработки в комплексе с ферментативным гидролизом без оптимизации под работу с бумагой не обеспечивают достаточного разрушения ее структуры для последующего гидролиза целлюлозы на моносахариды. На данном этапе для получения биоэтанола из использованной бумаги с помощью ферментативного гидролиза наиболее перспективно применять ферментативную предобработку, поскольку при ее применении выход глюкозы максимальный

### **Список источников:**

1. Синицын А.П., Синицына О.А. Биоконверсия возобновляемой растительной биомассы на примере биотоплива второго поколения: сырьё, предобработка, ферменты, процессы, экономика // Успехи биологической химии. – 2021. – Т. 61. – С. 347–414. – URL: [https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2021/01/12-Sinitsyn\\_Sinitsyna.pdf](https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2021/01/12-Sinitsyn_Sinitsyna.pdf)

2. Deng W., et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels // Green Energy & Environment. – 2022. – Vol. 8, No. 1. – DOI: 10.1016/j.gee.2022.07.003.
3. Xu H., Li B., Mu X. A review of alkali-based pretreatment to enhance enzymatic saccharification for lignocellulosic biomass conversion // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2016. – DOI: 10.1021/acs.iecr.6b01907.
4. Латфуллина Р.Ш. Способ сбраживания углеводов до этанола // ELIBRARY.ru. – 1993. – 7 февр. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=41007307>.
5. Григорьева О.Н., Харина М.В. Кислотный гидролиз лигноцеллюлозосодержащего сырья в технологии получения биоэтанола // Вестник технологического университета. – 2016. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kislotnyy-gidroliz-lignotsellyulozosoderzhashego-syrya-v-tehnologii-polucheniya-bioetanola/viewer>.