

УДК 577.114:663.12
doi: 10.17223/19988591/18/7

Е.А. Скиба, С.Е. Орлов, В.В. Будаева

Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН (г. Бийск, Россия)

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СИНТЕТИЧЕСКОЙ ГЛЮКОЗО-АММОНИЙНОЙ СРЕДЫ ПО ВЫХОДУ ЭТАНОЛА ДЛЯ ШТАММА *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693

Показана зависимость накопления продукта метаболизма – этанола – штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 от состава синтетической глюкозо-аммонийной среды. В опытах варьировались три параметра: концентрация глюкозы, концентрация монозамещённого фосфата калия и концентрация сульфата аммония. Для выявления взаимовлияния этих параметров построено уравнение регрессии. Методом наименьших квадратов рассчитаны коэффициенты уравнения регрессии. Адекватность построенного уравнения проверена на практике постановкой трех дополнительных опытов и расчетом критерия Фишера. Установлено, что уравнение регрессии адекватно описывает эксперимент с достоверностью 95%. По составленному уравнению рассчитаны рекомендуемые концентрации монозамещённого фосфата калия и сульфата аммония, которые необходимо вносить в среду с известной концентрацией глюкозы. Результаты, полученные на модельных глюкозо-аммонийных средах, будут использованы для оптимизации состава питательных сред на основе гидролизатов нетрадиционного недревесного растительного сырья.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*; питательная среда; оптимизация; уравнение регрессии; адекватность уравнения.

Введение

Алтайский край представляет собой уникальную природно-климатическую зону Западной Сибири. Большие объемы отходов сельского хозяйства и наличие земельных угодий, позволяющих выращивать возобновляемое целлюлозосодержащее сырье в значительных количествах, создают предпосылки для разработки и использования технологий интенсивной переработки дешевого целлюлозосодержащего сырья. Одним из направлений переработки таких видов растительного сырья является производство биоэтанола, получившее особое развитие за рубежом [1, 2]. Так, например, в США к 2012 г. запланировано снизить стоимость биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья с 0,59 (цена 2006 г.) до 0,28 долларов за литр. В прошлом веке в СССР была создана и успешно развивалась гидролизно-дрожжевая промышленность, преимущественно перерабатывались химические гидролизаты древесного лигноцеллюлозного сырья. В настоящее время в России в рамках программ по рациональному природопользованию и созданию альтернативных источников энергии активно проводятся исследования по получению биоэтанола сбраживанием ферментативных гидролизатов, полученных из отходов сельскохозяйственной переработки и

биомассы быстро возобновляемого растительного сырья, так называемых энергетических растений. Полученные по данному научному направлению в Институте проблем химико-энергетических технологий СО РАН (г. Бийск) предварительные результаты исследований позволили объединить солому, плодовые оболочки злаков и российский мискантус в одну большую группу целлюлозо-содержащего сырья для биотехнологической переработки в биоспирты [3–6].

Известно, что гидролизаты являются средами, плохо пригодными для жизнедеятельности дрожжей, поскольку в них недостаточное содержание азотных и фосфорных соединений, отсутствуют витамины и стимуляторы роста. Эти вещества должны вноситься в состав сред дополнительно в оптимальном количестве.

Для каждого источника сырья и способа получения гидролизата должны быть определены некоторые нормативы внесения питательных солей. Кроме того, разные штаммы имеют разные потребности в питательных веществах и обладают различной толерантностью к вредным примесям гидролизатов (фурфуролу, оксиметилфурфуролу, формальдегиду, лигногуминовым веществам) [2, 7, 8]. Для обеспечения нормальной работы штамма биотехнологические характеристики гидролизата должны быть стабилизированы.

В связи с этим первостепенными задачами являются изучение питательных потребностей выбранного штамма сахаромикетов и оптимизация состава синтетической глюкозо-аммонийной среды по выходу этанола.

Материалы и методики исследования

В работе использован штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693, полученный из Всероссийской коллекции промышленных штаммов микроорганизмов (г. Москва). Он был выделен из ферментера Котласского ЦБК Архангельской области и использовался для производства этанола на гидролизатах древесины. Особенностью штамма является его устойчивость к вредным примесям гидролизатов.

Для выявления питательных потребностей штамма Y-1693 были проведены эксперименты с использованием синтетических глюкозо-аммонийных сред. В качестве базовой использовалась стандартная синтетическая среда (табл. 1). Сбраживание проводили в анаэробных условиях при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Таблица 1

Базовый состав синтетической среды [9, 10]

Компонент среды	Концентрация, г/л
Глюкоза	20,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,00
KH_2PO_4	0,80
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50
NH_4Cl	0,50
K_2HPO_4	0,15
Дрожжевой автолизат	1,00–2,00

В экспериментах варьировали три параметра (компонента питательных сред): концентрация глюкозы, фосфора (в виде монозамещенного фосфата калия) и азота (в виде сульфата аммония). Крепость бражек (объемную долю спирта) определяли ареометром для спирта в дистилляте, полученном после предварительной перегонки спирта из бражки [11]. Поскольку концентрация субстрата в опытах изменялась, то биосинтетическую активность штамма оценивали не по крепости полученной бражки, а по выходу этанола, выраженный в процентах от теоретически возможного [12].

Результаты исследования и обсуждение

По полученным экспериментальным данным в программе Math CAD было составлено уравнение регрессии. Для составления уравнения использован массив данных, представленный в табл. 2. В общем виде зависимость функции от трех переменных можно представить как

$$f(x_1, x_2, x_3) = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_4 \cdot x_1 \cdot x_2 + a_5 \cdot x_1 \cdot x_3 + a_6 \cdot x_2 \cdot x_3 + a_7 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3. \quad (1)$$

В результате обработки методом наименьших квадратов экспериментальных данных были рассчитаны следующие коэффициенты регрессии: $a_0 = 94,572$; $a_1 = -0,474$; $a_2 = 5,107$; $a_3 = 1,177$; $a_4 = 2,585 \cdot 10^{-3}$; $a_5 = 3,218 \cdot 10^{-3}$; $a_6 = -0,192$; $a_7 = -3,117 \cdot 10^{-4}$. Тогда уравнение регрессии можно записать следующим образом:

$$f(x_1, x_2, x_3) = 94,572 - 0,474 \cdot x_1 + 5,107 \cdot x_2 + 1,177 \cdot x_3 + 2,585 \cdot 10^{-3} x_1 \cdot x_2 + 3,218 \cdot 10^{-3} \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,192 \cdot x_2 \cdot x_3 - 3,117 \cdot 10^{-4} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3. \quad (2)$$

Т а б л и ц а 2

Экспериментальные данные, использованные для построения уравнения регрессии

№ варианта	Концентрация глюкозы, г/л (x_1)	Концентрация KH_2PO_4 , г/л (x_2)	Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г/л (x_3)	Выход этанола, % от теоретич. (y)
0	160,0	6,4	20,0	58,82±0,05
1	160,0	6,4	40,0	58,82±0,05
2	160,0	9,6	20,0	57,86±0,05
3	160,0	9,6	40,0	47,25±0,05
4	160,0	6,4	20,0	89,51±0,05
5	100,0	6,4	40,0	84,88±0,05
6	100,0	9,6	20,0	83,33±0,05
7	100,0	9,6	40,0	72,53±0,05
8	100,0	3,1	10,0	70,99±0,05
9	100,0	3,4	15,0	75,62±0,05
10	100,0	3,6	20,0	77,16±0,05
11	160,0	3,2	20,0	54,97±0,05
12	20,0	0,8	5,0	95,00±0,05

Зависимость выхода этанола от концентрации глюкозы, фосфора и азота в составе питательной среды носит сложный характер. Каждый из параметров оказывает влияние друг на друга. График функции выхода целевого продукта (этанола), соответствующий выходу этанола 95% от теоретического, представляет собой поверхность, полученную по уравнению регрессии (рис. 1).

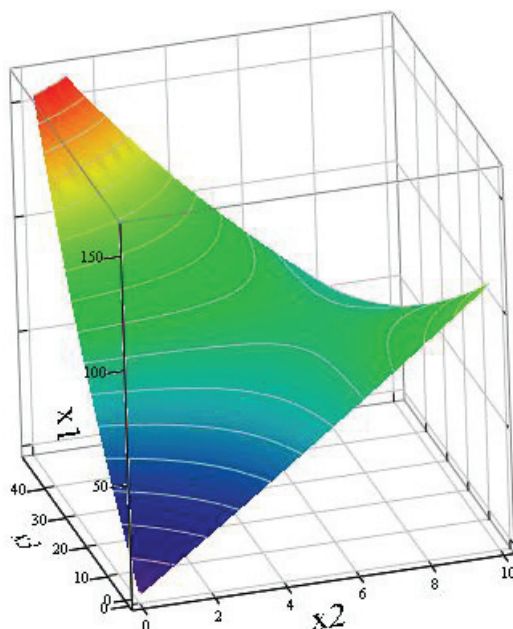


Рис. 1. Зависимость концентрации глюкозы (x_1) от концентраций монозамещенного фосфата калия (x_2) и сульфата аммония (x_3) при выходе этанола 95%

Для проверки адекватности составленного уравнения были проведены три дополнительных опыта (табл. 3), в которых произвольно варьировались исследуемые параметры. При этом концентрации питательных солей и глюкозы не выходили за пределы массива данных, по которому построено уравнение регрессии (2).

Таблица 3

Экспериментальные данные, использованные для проверки адекватности

№ варианта	Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация KH_2PO_4 , г/л	Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г/л	Выход этанола, % от теоретического
1	97,0	0,8	5,0	$47,62 \pm 0,05$
2	97,0	3,2	20,0	$76,19 \pm 0,05$
3	90,0	9,6	15,0	$68,60 \pm 0,05$

Адекватность уравнения регрессии проверялась по критерию Фишера (F). Для этого вычислялись дисперсия расчетных данных и дисперсия экспериментальных данных: $D_{\text{теор}} = 148,91$; $D_{\text{эксп}} = 146,01$.

Количество независимых переменных в уравнении $N_{\text{теор}} = 8$, количество экспериментальных точек $N_{\text{эксп}} = 3$.

Расчетное значение критерия Фишера равно 1,02; число степеней свободы большей дисперсии 2; число степеней свободы меньшей дисперсии 7.

Для такого количества экспериментов и чисел степеней свободы табличное значение критерия Фишера ($F_{\text{т}}$) равно 19,35 (при достоверности 95%) [13]. Расчетное значение критерия Фишера (F) равно 1,02. Так как расчетное значение критерия Фишера (F) меньше табличного ($F_{\text{т}}$), то уравнение регрессии можно считать адекватно описывающим эксперимент с достоверностью 95%.

Поверхность, изображенную на рис. 1 и отвечающую уравнению регрессии (2), можно более наглядно представить в виде проекции на плоскость (x_2, x_3) при заданных значениях x_1 (концентрации глюкозы).

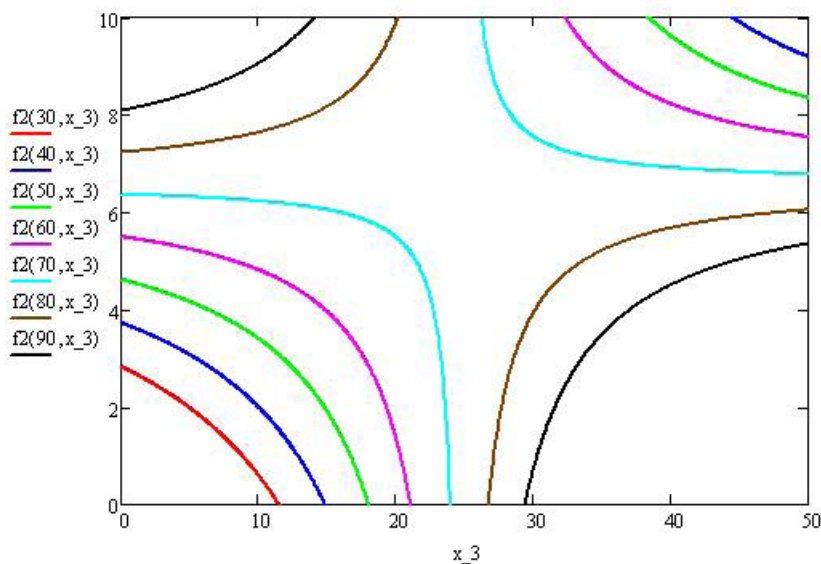


Рис. 2. Зависимости концентраций монозамещенного фосфата калия (x_2) от сульфата аммония (x_3) при различных концентрациях глюкозы для выхода этанола 95%

Согласно проекциям составлена таблица рекомендуемых концентраций солей азота и фосфора, которые необходимо внести в гидролизаты растительного сырья, при установленной в них концентрации глюкозы (табл. 4) для достижения выхода этанола 95% от теоретического.

Таблица 4

**Рекомендуемые концентрации монозамещенного фосфата калия (KH_2PO_4)
и сульфата аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) при установленной
концентрации глюкозы в гидролизате**

Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация KH_2PO_4 , г/л	Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, г/л
30,0	$1,2 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$
40,0	$2,3 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,2$
50,0	$3,0 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,2$
60,0	$4,0 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,2$
70,0	$5,8 \pm 0,2$	$18,9 \pm 0,2$
80,0	$7,7 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,2$

Таким образом, данные табл. 4 позволяют определить необходимые количества монозамещенного фосфата калия и сульфата аммония для введения в гидролизную среду. Например, для достижения высокого выхода этанола в гидролизат с концентрацией глюкозы 35 г/л, в соответствии с табл. 4, следует внести KH_2PO_4 – $1,7 \pm 0,2$ г/л и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $8,5 \pm 0,2$ г/л. При отсутствии приведенных питательных солей можно вносить другие, пересчитывая на содержание фосфора и азота в веществе [12].

Заключение

Показана зависимость накопления этанола штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 от состава синтетической глюкозо-аммонийной среды. Для выявления взаимовлияния концентрации глюкозы, монозамещенного фосфата калия и сульфата аммония построено уравнение регрессии. Методом наименьших квадратов рассчитаны коэффициенты уравнения регрессии. Адекватность построенного уравнения проверена на практике постановкой трех дополнительных опытов и расчетом критерия Фишера. Установлено, что уравнение регрессии адекватно описывает эксперимент со статистической значимостью 95%.

По составленному уравнению рассчитаны рекомендуемые концентрации монозамещенного фосфата калия и сульфата аммония, которые необходимо вносить в среду с известной концентрацией глюкозы. Результаты, полученные на модельных глюкозо-аммонийных средах, будут использованы для оптимизации состава питательных сред на основе гидролизатов нетрадиционного недревесного растительного сырья (отходов злаков и биомассы российского мискантуса [14]).

Литература

1. J.-L. Wertz et. al. Cellulose science and technology. Boca Raton : EPFL press ; CRC press, 2010. 364 p.
2. Sun R.C. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose. Publisher : Elsevier, 2010. 300 p.

3. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков // Ползуновский вестник. 2008. № 3. С. 322–327.
4. Бурцева Е.А., Будаева В.В. Ферментный гидролиз продуктов химической переработки шелухи и соломы злаков, биомассы мискантуса китайского // Технологии и оборудование химической, биологической и пищевой промышленности : материалы 2-й Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Бийск : Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2009. С. 129–135.
5. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Переработка мискантуса китайского // Ползуновский вестник. 2009. № 3. С. 328–335.
6. Будаева В.В., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Архипова О.С. Обогащение отходов переработки злаков для ферментации // Сотрудничество для решения проблемы отходов : материалы VII Междунар. конф. Харьков : Независимое агентство экологической информации, 2010. С. 112–114.
7. Шарков В.И., Сапожников С.А., Дмитриева О.А. Технология гидролизных производств. М. : Лес. пром., 1973. 408 с.
8. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств : учеб. для вузов. М. : Лес. пром., 1989. 496 с.
9. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А.И. Нетрусова. М. : Академия, 2005. 608 с.
10. Градова Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. М. : ДеЛи принт, 2001. 131 с.
11. ГОСТ Р 51135-98-2003. Изделия ликероводочные. Правила приемки и методы анализа. Технические требования. Введ. 1998-03-02. М. : ИУС, 2003. 116 с.
12. Технология спирта / под ред. проф. В.Л. Яровенко. М. : Колос, 1999. 464 с.
13. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. М. : Наука, 1983. 416 с.
14. Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н. и др. Пути полной и экологически чистой переработки возобновляемого растительного сырья // Ползуновский вестник. 2010. № 4–1. С. 158–167.

Поступила в редакцию 20.09.2011 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 2 (18). P. 66–73

doi: 10.17223/19988591/18/7

Ekaterina A. Skiba, Sergey E. Orlov, Vera V. Budaeva

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russia*

ETHANOL YIELD OPTIMIZATION OF THE SYNTHETIC GLUCOSE-AMMONIUM MEDIUM COMPOSITION FOR THE *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 STRAIN

*One of the ways of processing unconventional non-wood plant raw materials is production of bioethanol. Since hydrolyzates are media that are hardly suitable for yeast life activity due to insufficient content of nitric and phosphoric compounds, nutrient salts must be additionally introduced into media compositions at an optimum quantity. The work is aimed at studying nutrient demands of *Saccharomyces cerevisiae* (Y-1693 strain) saccharomycetes and optimizing the synthetic glucose-ammonium medium composition by ethanol yield.*

Three parameters were varied in the experiments: glucose level, monosubstituted potassium phosphate concentration, and ammonium sulphate concentration. The dependence of the metabolism product accumulation, ethanol, by *Saccharomyces cerevisiae* strain Y-1693 on the synthetic glucose-ammonium medium composition was consequently demonstrated. To reveal the mutual influence between those parameters using Math CAD software, a regression equation was formulated. By the least square method, the regression equation coefficients were computed. Using the regression equation, a function graph for the desired product yield (ethanol) was plotted which corresponds to the ethanol yield of 95% of the theoretical one and represents a surface.

The adequacy of the constructed regression equation has been validated in practice by conducting three more experiments and calculating the Fischer's criterion. The regression equation has been found to describe adequately the experiment with 95% confidence. The recommended concentrations of monosubstituted potassium phosphate and ammonium sulphate which should be added to the medium with the known glucose level were calculated by the formulated equation. The results obtained on model glucose-ammonium media will be exploited to optimize the composition of nutrient media based on hydrolyzates of non-traditional non-wood plant raw materials.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; strain; nutrient medium; optimization; regression equation, equation adequacy.

Received September 20, 2011