

КИНЕТИКА ТВЕРДОФАЗНОГО БИОКАТАЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ В СТАТИКО-ДИНАМИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ НА СУБСТРАТАХ РАЗЛИЧНОГО ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА

**В. Н. Долгунин, И. А. Протопопов,
А. А. Жило, А. Н. Куди, В. А. Пронин**

*Кафедра «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»,
dolgunin-vn@yandex.ru; ФГБОУ ВО «ТГТУ», Тамбов, Россия*

Ключевые слова: биоконверсия; степень дисперсности; твердофазное ферментирование; твердый субстрат; целлюлозосодержащее сырье.

Аннотация: Приведены результаты исследования кинетики твердофазного ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья в статико-динамическом режиме с использованием культуры микроскопического гриба *Trichoderma viride* в зависимости от фракционного состава субстрата. Исследованы варианты организации процесса с твердым субстратом тонкой (0...1 мм), умеренной (1...3 мм) и грубой (3...5 мм) дисперсности. Установлено, что наиболее высокая концентрация ростовых факторов достигается в ферментативной среде, приготовленной с использованием твердого субстрата умеренной дисперсности. Применение такого субстрата обеспечивает благоприятные условия для интенсивного объемного аэрирования ферментативной среды и диффузионного контакта компонентов фермент-субстратного комплекса. Степень биоконверсии целлюлозы, достигаемая в течение четырех суток ферментализации на субстрате с умеренной дисперсностью, на 20 % выше, чем на тонко- и грубодисперсных субстратах.

Введение

При сохраняющемся мировом дефиците пищевых и энергетических ресурсов и постоянно возрастающем их потреблении наиболее актуальной задачей является поиск и технологическое освоение надежных возобновляемых источников сырья, остро необходимых для преодоления названного дефицита. В настоящее время одним из наиболее перспективных возобновляемых источников жизненно важных ресурсов признано целлюлозосодержащее сырье [1]. Это объясняется глобальным относительно однородным континентальным распределением целлюлозосодержащего сырья и высочайшей интенсивностью его ежегодного воспроизводства в процессе фотосинтеза растительной биомассы, существенной частью которой является целлюлоза (по некоторым данным до 700 млрд т в год). Кроме того, важным фактором является то, что целлюлозосодержащее сырье имеет большие перспективы для переработки с использованием экологически безопасных технологий, предотвращающих тепловое и химическое загрязнение окружающей среды.

В настоящее время основным способом многоцелевого использования целлюлозосодержащего сырья является его гидролиз, позволяющий осуществить конверсию полисахаридов в простые сахара, широко востребованные во многих отраслях промышленности и АПК. Среди существующих методов гидролиза,

к которым относятся физические, химические и биологические методы, последние являются наиболее перспективными для широкого применения. Это связано с тем, что биологические методы предотвращают загрязнение окружающей среды и являются менее энергоемкими. В основе биологических методов переработки целлюлозосодержащего сырья лежит ферментативный гидролиз, представляющий собой биокаталитическую реакцию, в которой в качестве катализатора используются вырабатываемые микроорганизмами целлюлолитические ферменты.

Во многих отраслях промышленности, сельского и лесного хозяйства, занятых производством и переработкой растительного сырья, образуется большое количество целлюлозосодержащих отходов, компоненты которых имеют богатый сырьевой потенциал [2]. Однако для использования этого потенциала в целях пополнения пищевых, кормовых и энергетических ресурсов требуется конверсия целлюлозосодержащих компонентов до легко усвояемых и перерабатываемых форм сахаридов. Осуществление конверсии традиционным биотехнологическим методом (глубинным жидкофазным ферментализмом) является низко рентабельным, вследствие низкого выхода продукта, и характеризуется значительным отрицательным экологическим эффектом при необходимости потребления больших объемов растворителя.

Во многом перечисленные недостатки глубинного жидкофазного ферментализма могут быть преодолены с использованием методов твердофазного ферментативного гидролиза. Преимущества твердофазного ферментализма обусловлены низким содержанием влаги, высокой концентрацией питательных веществ и других ростовых факторов в ферментативной среде и, как следствие, более высокой удельной производительностью, а также резким снижением остроты экологических проблем [3, 4]. Еще одним существенным преимуществом твердофазного ферментирования является возможность организации процесса с использованием экономичного и надежного в эксплуатации оборудования [3, 4].

Результаты исследований, представленные в работах [5 – 7], свидетельствуют о целесообразности организации твердофазного ферментализма целлюлозосодержащих отходов деревообрабатывающего производства в статико-динамическом режиме с использованием целлюлаз, продуцируемых в процессе метаболизма культуры микроскопического гриба *Trichoderma viride*. Установлено, что в статико-динамическом режиме ферментализма достигается более высокая интенсивность биоконверсии при высоких показателях объемной однородности формирования больших плодовых тел и минимальном спорообразовании по сравнению, как со статическим, так и динамическим режимами [6]. Наибольшая эффективность ферментализма по основным показателям обеспечивается, если статико-динамический режим организуется при продолжительности периода между операциями перемешивания ферментативной среды, равной трем часам [7]. При соответствующей частоте операций перемешивания, с одной стороны, достигается достаточно интенсивное обновление поверхности межфазного контакта, а с другой – сводится к минимуму негативное механическое воздействие на культуру микроскопического гриба.

Однако в работах [5 – 7] без должного внимания остается влияние дисперсности твердого субстрата на интенсивность ферментализма, в то время как размер частиц субстрата определяет удельную поверхность и условия межфазного контакта компонентов ферментативной среды. Настоящая работа посвящена исследованию влияния степени дисперсности отходов деревообрабатывающего производства на эффективность их ферментативного гидролиза с использованием культуры микроскопического гриба *Trichoderma viride*, который характеризуется высокой целлюлазной активностью [8, 9].

Материалы и методы исследования

Исследование кинетики твердофазного ферментативного гидролиза проведено в статико-динамическом режиме организации процесса, технологические параметры которого оставались инвариантными и соответствующими условиям ферментолиза, рекомендованным в результате ранее проведенных исследований [7]. Исследование выполнено с использованием трех вариантов субстрата в виде смеси древесных опилок лиственных пород деревьев определенного фракционного состава, пшеничных отрубей и солодового экстракта [5]. Соотношение компонентов субстрата и процедура его подготовки изложены в работах [5, 6]. Единственным отличием вариантов субстрата был фракционный состав древесных частиц мелкой (0...1 мм), средней (1...3 мм) и крупной (3...5 мм) дисперсности. Ферментолиз проведен с использованием целлюлаз, являющихся продуктом метаболизма микроскопического гриба *Trichoderma viride*, вводимого в стерилизованный субстрат в виде водной суспензии (28,5 %) спор в количестве 10 масс. %. Ферментативный гидролиз имеет своей целью получение твердофазного субстрата, который может быть использован для выращивания макроскопических грибов продовольственного назначения и в качестве кормовой добавки для животноводства. Такого рода продукты остро востребованы на предприятиях АПК [10, 11].

Условия мягкого механического воздействия на мицелий микроскопического гриба в процессе ферментолиза обеспечены путем перемешивания ферментативной среды в режиме гравитационного обрушения ее откосов, периодически формируемых в засыпке медленно вращающегося барабана [5]. Скорость вращения барабана обеспечивала трехчасовую продолжительность периода статического состояния культуры между операциями перемешивания ферментативной среды. Аэрирование среды осуществлялось с использованием устройства ввода кондиционированного воздуха, размещенного по центру циркуляции материала в засыпке барабана [5]. Согласно результатам ранее проведенных исследований [5 – 7] длительность процесса ферментолиза ограничена 96 часами.

В процессе ферментолиза контролировались концентрация протеина, редуцирующих сахаров и содержание остаточной целлюлозы в ферментативной среде. Концентрация протеина определялась колориметрическим методом с применением биуретового реактива [12], содержание редуцирующих (восстанавливающих) сахаров – йодометрическим методом [13]. Содержание целлюлозы и целлюлазная активность в ферментативной среде контролировались с использованием методик, регламентированных действующими стандартами [14, 15]. Кроме измерения перечисленных характеристик ферментативной среды осуществлялся визуальный контроль ее состояния с целью оценки состояния плодовых тел и спорообразования для различных вариантов фракционного состава целлюлозосодержащего субстрата.

В процессе экспериментального исследования с периодом 24 часа проводился отбор образцов ферментативной среды для измерения концентрации протеина, сахаров и остаточной целлюлозы для трех вариантов фракционного состава целлюлозосодержащего субстрата. В целях снижения влияния случайных факторов на результат измерения и статистической оценки допущенной погрешности осуществлялся параллельный отбор проб для определения каждой измеряемой характеристики среды. Результаты параллельных измерений после проверки их статистической однородности при 5%-м уровне значимости использовались для вычисления среднего измеренного значения.

При анализе результатов исследования исходили из основных общепринятых положений теории ферментативных реакций, в соответствии с которыми биокатализ представляется в упрощенном виде как совокупность двух последовательных стадий [1]. На первой стадии при взаимодействии фермента и субстрата формиру-

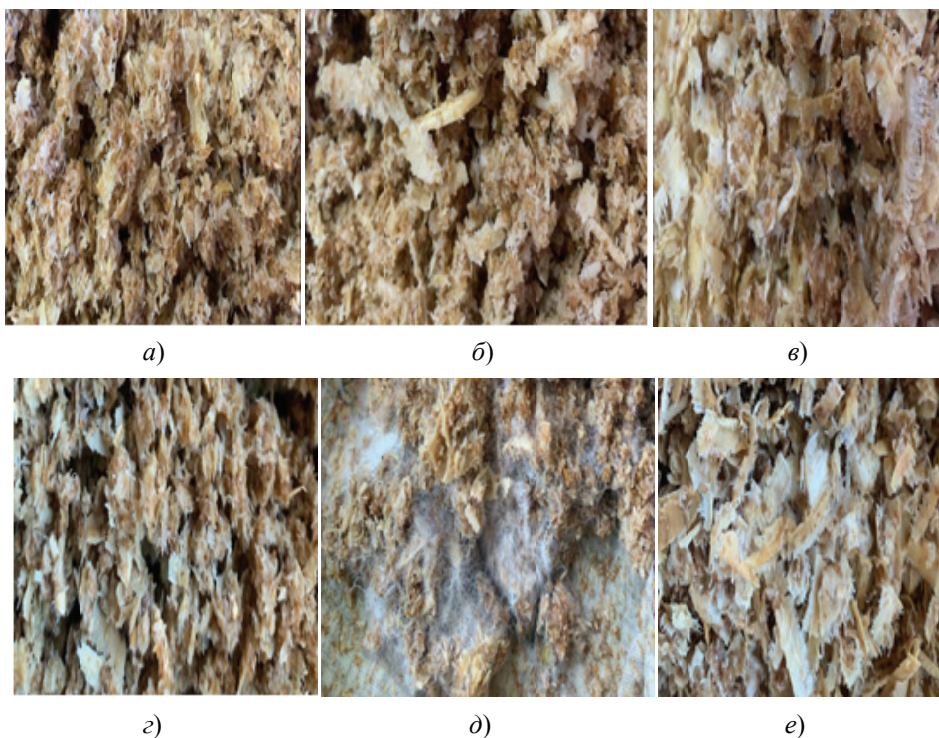
ется фермент-субстратный комплекс, на второй – происходит диссоциация комплекса с образованием ферментолизата и несвязанного фермента, сохранившего свою каталитическую активность.

Результаты исследования и их обсуждение

Визуальная информация, отражающая состояние ферментативной среды после двух и четырех суток биоконверсии твердофазного целлюлозосодержащего субстрата, приведена на рис. 1 для трех вариантов его фракционного состава: мелкодисперсного, умеренной и крупной дисперсности. Анализ информации, представленной в виде характерных фрагментов поверхностной культуры, приводит к следующим выводам:

1) при культивировании микроскопического гриба на мелкодисперсном субстрате (см. рис. 1, *a* и *з*) на всех стадиях процесса наблюдается наличие относительно слабо развитых плодовых тел только на отдельных ограниченных участках объема культуральной среды при относительно слабых признаках ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего субстрата;

2) при культивировании микроскопического гриба с использованием целлюлозосодержащего субстрата умеренной дисперсности (1...3 мм) после двух суток ферментативного гидролиза (см. рис. 1, *б*) объем плодовых тел меньше, чем в культуральной среде с крупным субстратом (см. рис. 1, *в*). Однако после четырех суток ферментолиза на субстрате с умеренной дисперсностью формируются



**Рис. 1. Характерные фрагменты ферментативной среды после двух (*a – в*) и четырех (*з – е*) суток культивирования микроскопического гриба *Trichoderma viride* в статико-динамическом режиме в процессе твердофазного ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья для субстратов различного фракционного состава, мм:
a, з – 0...1; *б, д* – 1...3; *в, е* – 3...5**

плодовые тела, имеющие наибольший объем и однородное высокоплотное распределение в реакционном пространстве (см. рис. 1, *д*);

3) в процессе ферментализа, организованного с использованием крупнодисперсного субстрата, после двух суток (см. рис. 1, *е*) в ферментативной среде наблюдаются наиболее ярко выраженные плодовые тела при относительно однородном их распределении в реакционном объеме. Однако после четырех суток ферментализа на крупнодисперсном субстрате (см. рис. 1, *е*) плодовые тела значительно уступают по объему телам, культивируемым на субстрате с умеренной дисперсностью (см. рис. 1, *д*). Это косвенно свидетельствует о снижении интенсивности биоконверсии целлюлозы и снижении доступа микроскопического гриба к ферментализату на завершающей стадии процесса в культуральной среде с крупнодисперсным целлюлозосодержащим субстратом.

Результаты исследования динамики прироста биомассы в процессе ферментализа целлюлозосодержащего сырья с использованием культуры микроскопического гриба *Trichoderma viride* представлены на рис. 2 в виде зависимостей кон-

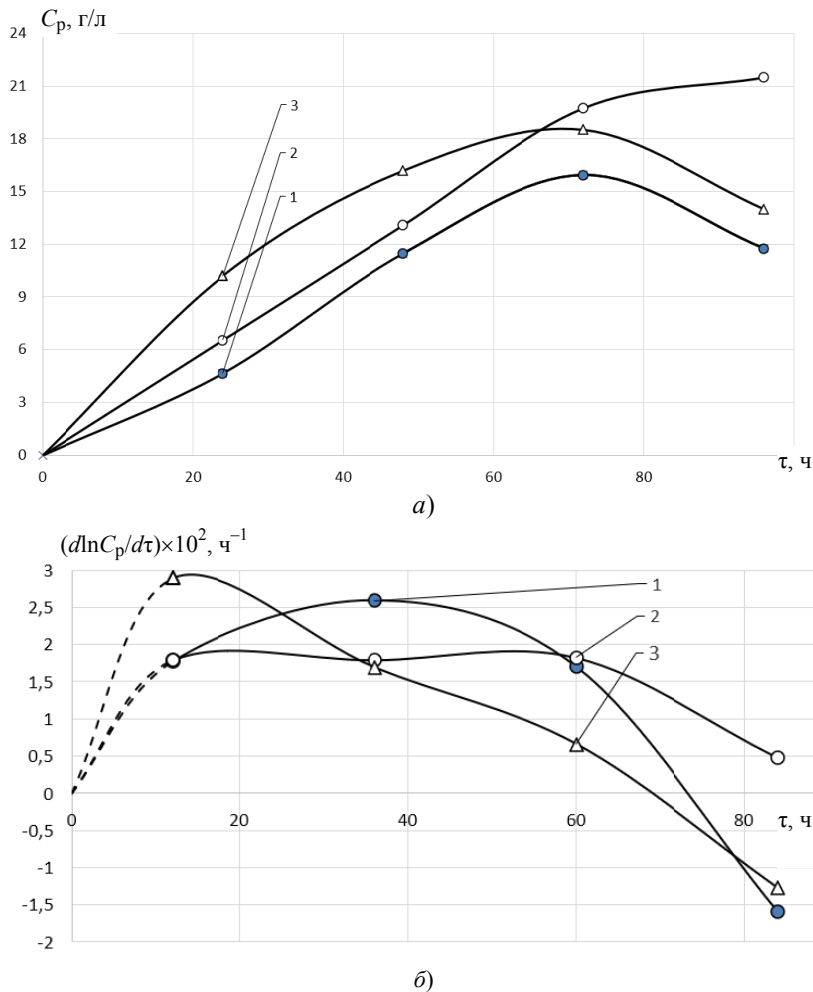


Рис. 2. Динамика изменения концентрации белка (*а*) и относительной скорости ее прироста (*б*) в процессе твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья при различном фракционном составе частиц целлюлозосодержащего твердого субстрата: 1 – 0...1 мм; 2 – 1...3 мм; 3 – 3...5 мм

центрации белка и относительной скорости ее изменения от времени. Представленные результаты отражают зависимость концентрации белка и относительной скорости ее изменения от времени в ферментативной среде в процессе статико-динамического твердофазного ферментолиза при различной дисперсности частиц целлюлозосодержащего субстрата.

Анализ приведенных зависимостей позволяет сделать вывод о принципиально различной динамике прироста биомассы в случаях мелкой, средней и крупной дисперсности твердой фазы. Так, начальный этап культивирования характеризуется ускоренным ростом биомассы для мелкодисперсного субстрата, отрицательным ускорением роста для крупнодисперсного и устойчивым темпом роста в случае субстрата средней дисперсности. Еще более значительное различие в кинетике культивирования наблюдается на четвертые сутки процесса, когда стадия устойчивого роста концентрации белка на субстрате средней дисперсности сменяется стадией замедленного роста, а при культивировании на тонко- и грубодисперсных субстратах в этот период происходит переход от стадии замедленного роста к стадии снижения белковой массы.

Такого рода весьма резкий переход от стадии роста к стадии деградации белковой массы для процесса ферментолиза на тонкодисперсном субстрате объясняется, очевидно, блокированием центров роста мицелия микроскопического гриба под действием эффекта агломерирования ферментативной среды. Данный эффект, характерный для тонкодисперсных материалов с высокой связностью частиц, приводит к резкому возрастанию диффузионного и теплового сопротивлений газообменных и теплообменных процессов, которые увеличиваются пропорционально квадрату диаметра формируемых агломератов [15, 16], что становится причиной ингибирования жизнедеятельности микроорганизмов. Таким образом, следствием процесса агломерирования ферментативной среды является формирование в ней центров с высокой концентрацией факторов, которые инициируют автолиз микроорганизмов. В первую очередь к таким факторам следует отнести дефицит газообразного субстрата и повышенные значения температуры и концентрации газообразного метаболита.

Высокая интенсивность роста биомассы в первые сутки ферментирования на крупнодисперсном субстрате объясняется высокой интенсивностью диффузионных и теплообменных процессов вследствие того, что центры роста мицелия концентрируются на поверхности крупных частиц субстрата. Поверхность таких частиц обогащена питательными веществами, входящими в состав жидкой фазы ферментативной среды, что обусловлено низкой диффузионной проницаемостью крупных частиц и относительно малой их удельной поверхностью межфазного контакта. В таких условиях межфазное взаимодействие ферментативной среды с аэрирующим воздухом характеризуется минимальными значениями диффузионного и тепловых сопротивлений.

Однако по этой же причине уже на вторые сутки ферментирования возможности для интенсивного протекания процесса культивирования исчерпываются и культура микроскопического гриба входит в стадию замедленного роста. Это связано, с одной стороны, с быстрым истощением питательных веществ в жидкой фазе культуральной среды в благоприятных условиях для жизнедеятельности микроорганизмов и, с другой стороны, является следствием ограниченного доступа питательных веществ, генерируемых в процессе биокатализа. Интенсивность биокатализа ограничена вследствие неблагоприятных условий формирования фермент-субстратных комплексов по причине большого внутридиффузионного сопротивления переносу целлюлазы в частицах субстрата крупного размера. В связи с этим за стадией замедленного роста закономерно следует фаза деградации белковой массы микроскопического гриба при отрицательном значении коэффициента скорости культивирования.

В случае организации процесса ферментализации с использованием твердофазного субстрата фракции 1...3 мм, очевидно, достигается сочетание ростовых факторов, способствующее устойчивому развитию культуры микроскопического гриба и интенсивному протеканию ферментализации целлюлозосодержащего сырья. К числу таких факторов относится развитая поверхность межфазного контакта твердой, жидкой и газообразной фаз, относительно низкое диффузионное и тепловое сопротивление процессов взаимосвязанного массотеплопереноса. Сочетание названных факторов способствует интенсивному формированию фермент-субстратных комплексов и последующей их диссоциации на продукт ферментализации и несвязанный фермент – активный биокатализатор.

Динамика изменения содержания сахаров в ферментативной среде в процессе биоконверсии целлюлозосодержащего сырья при тестировании их концентрации йодометрическим методом представлена на рис. 3 в виде условной обобщенной зависимости.

Так как нередуцирующие сахара не имеют альдегидной группы в своем химическом составе, они не проявляют реакционную восстанавливающую способность и поэтому не обнаруживаются традиционным йодометрическим методом. Однако при подкислении контрольного раствора сахаров нередуцирующие сахара преобразуются в редуцирующие. Таким образом, получаемый в результате анализа отрицательный показатель содержания сахаров можно принять за условную характеристику степени присутствия в среде нередуцирующих сахаров. Анализ динамики содержания сахаров в процессе биоконверсии (рисунок 3) показывает, что в течение всего периода ферментализации условно тестируется присутствие только нередуцирующих сахаров. Отсутствие редуцирующих сахаров на начальной стадии ферментализации можно объяснить активным их потреблением интенсивно развивающейся культурой гриба. На последующих стадиях ферментирования потребление легкоперевариваемых сахаров снижается, очевидно, вследствие истощения культурой своего ростового потенциала (см. рис. 2), что сопровождается снижением концентрации ростовых факторов в ферментативной среде и приводит к меньшему потреблению редуцирующих сахаров.

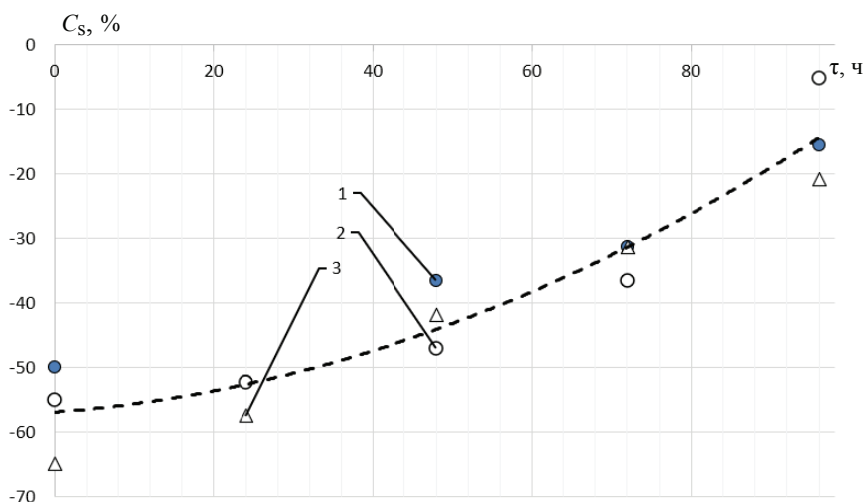


Рис. 3. Изменение тестовых показателей содержания сахаров в ферментативной среде в процессе статико-динамического культивирования в зависимости от времени для субстратов с различной дисперсностью частиц целлюлозосодержащей твердой фазы: 1 – 0...1 мм; 2 – 1...3 мм; 3 – 3...5 мм (штриховой линией показано изменение среднего значения содержания сахаров для различной дисперсности субстрата)

С течением времени потребление редуцирующих сахаров снижается и высвобождающийся биокаталитический потенциал продуцированных целлюлаз способствует уменьшению содержания олигосахаров в ферментативной среде [6]. Примерно одинаковая динамика отрицательных значений содержания сахаров для различных вариантов дисперсности субстрата косвенно свидетельствует об одинаковом составе и содержании олигосахаров в ферментативной среде в процессе биокаталитического гидролиза целлюлозы.

Исследование кинетики твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья проведено путем анализа содержания остаточной целлюлозы в ферментативной среде в процессе культивирования микроскопического гриба *Trichoderma viride*. Результаты исследования кинетики биоконверсии представлены на рис. 4 и 5 для вариантов с различной дисперсностью частиц субстрата. Притом, что зависимости концентрации остаточной целлюлозы от времени для исследованных вариантов ферментализации имеют тождественный вид, очевидно, что кинетические характеристики процесса существенно зависят от дисперсности твердофазного субстрата.

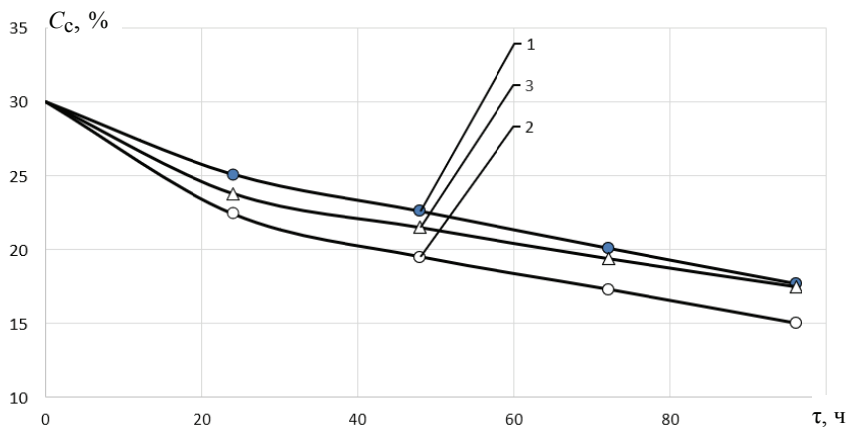


Рис. 4. Кривые изменения концентрации целлюлозы в процессе твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья при различном фракционном составе частиц твердого субстрата: 1 – 0...1 мм; 2 – 1...3 мм; 3 – 3...5 мм

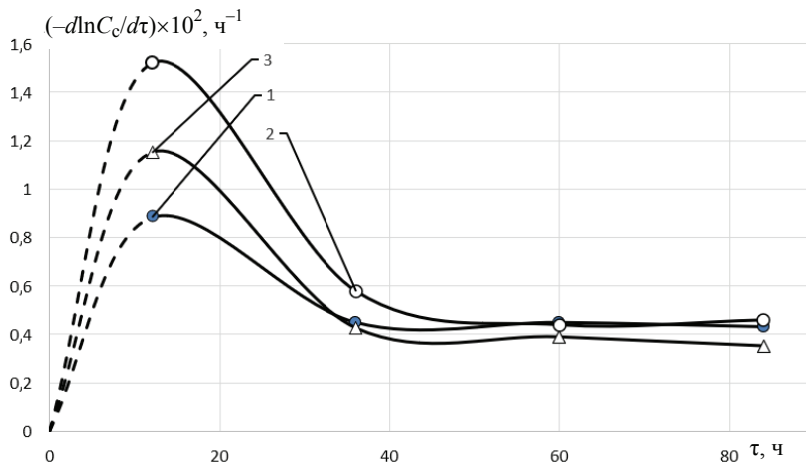


Рис. 5. Динамика изменения относительной скорости биоконверсии целлюлозы в процессе твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья при различном фракционном составе частиц целлюлозосодержащего твердого субстрата: 1 – 0...1 мм; 2 – 1...3 мм; 3 – 3...5 мм

Наблюдаемые различия в кинетике ферментолиза во многом объясняются кинетическими закономерностями прироста белковой массы в процессе культивирования микроскопического гриба (см. рис. 2).

На всех этапах ферментолиза высокие значения скорости процесса поддерживаются при его организации на субстрате с умеренной дисперсностью (1...3 мм), что подтверждается положением кривой 2 на рис. 5. Высокая интенсивность ферментативного гидролиза целлюлозы обеспечивается при этом за счет высокоразвитой и эффективно обновляемой при перемешивании субстрата поверхности межфазного контакта. Соответствующая дисперсность твердофазного субстрата оказывается благоприятной для организации эффективного объемного аэрирования ферментативной среды и, как следствие, для интенсивного теплообмена при контакте среды с газообразным субстратом. Вместе с тем умеренная дисперсность частиц субстрата, очевидно, обеспечивает достаточно высокую диффузионную проницаемость частиц твердофазного субстрата биокатализатором, который интенсивно генерируется поверхностной культурой микроскопического гриба. Таким образом, в случае умеренной дисперсности твердого субстрата обеспечивается благоприятное сочетание внешних и внутренних (в отношении частиц твердой фазы) факторов роста культуры микроскопического гриба. В результате достигается возможность поддержания высокой скорости явления внешнего и внутреннего массопереноса и оптимальных температурных условий в процессе твердофазного биокатализа. Как следствие, в процессе биокатализа целлюлозы на твердом субстрате с размером частиц 1...3 мм обеспечивается высокая интенсивность формирования фермент-субстратных комплексов с последующей их диссоциацией на ферментолизат и свободный биокатализатор. Степень биоконверсии целлюлозы, достигаемая в течение четырех суток ферментолиза на субстрате с умеренной дисперсностью, на 20 % выше, чем на тонко- и грубодисперсных субстратах.

Процесс биоконверсии целлюлозы с использованием крупнодисперсного твердого субстрата на начальном этапе протекает со значительно более высокой интенсивностью, чем в случае мелкодисперсного. Это объясняется высокой концентрацией ростовых факторов для культуры микроскопического гриба вблизи поверхности крупных частиц субстрата, вследствие низких значений диффузионных и тепловых сопротивлений теплообменным процессам, сопряженных с процессом биокатализа. Однако на последующих стадиях ферментолиз замедляется настолько, что скорость биоконверсии целлюлозы становится меньше скорости, имеющей место в процессе, организованном с использованием тонкодисперсного субстрата. Это объясняется снижением интенсивности формирования фермент-субстратных комплексов вследствие увеличения внутридиффузионного сопротивления твердой фазы в процессе углубления зоны проникновения биокатализатора в глубинные слои крупных частиц субстрата.

В исследованном периоде твердофазного ферментолиза целлюлозосодержащего сырья наблюдаются примерно равные средние интегральные значения скорости процесса в случаях крупно- и мелкодисперсного субстратов, что подтверждается для них практически одинаковой достигнутой степенью конверсии целлюлозы (см. рис. 4). Однако динамика изменения кинетических характеристик ферментолиза в названных вариантах организации процесса позволяет сделать вывод о том, что на начальной его стадии более высокой интенсивностью характеризуется вариант с крупнодисперсным твердым субстратом. На последующих же стадиях в таком варианте процесса, в отличие от альтернативных его вариантов, наблюдается существенное и систематическое снижение интенсивности ферментолиза, что, очевидно, связано с возрастающим доминированием в этом случае диффузионной кинетики.

Заключение

Таким образом, в результате исследования определен фракционный состав твердого целлюлозосодержащего субстрата (1...3 мм), при использовании которого достигается максимальная концентрация ростовых факторов культуры микроскопического гриба *Trichoderma viride*, способствующих интенсивному протеканию процесса ферментативного гидролиза. Высокая концентрация ростовых факторов при использовании субстрата такой дисперсности обеспечивается вследствие благоприятных условий для интенсивного объемного аэрирования ферментативной среды и диффузионного контакта компонентов фермент-субстратного комплекса в процессе ферментации целлюлозы и культивирования микроорганизмов в статико-динамическом режиме.

Список литературы

1. Инновационное развитие техники пищевых технологий : учеб. пособие / С. Т. Антипов, А. В. Журавлев, Д. А. Казарцев, А. Г. Мордасов [и др.] ; под ред. В. А. Панфилова. – СПб. : Лань, 2016. – 660 с.
2. Емцев, В. Т. Микробиология : учебник / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с.
3. Кулишов, Б. А. Применение технологии твердофазной ферментации в производстве биопродуктов / Б. А. Кулишов, Ле Ань Туан // Вестн. Казанского технол. ун-та. – 2014. – Т. 17, № 23. – С. 258 – 261.
4. Гнеушева, И. А. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение / И. А. Гнеушева, Н. Е. Павловская, И. В. Яковлева // Вестн. Орловского гос. аграрного ун-та. – 2010. – № 3 (24). – С. 36 – 39.
5. Долгунин, В. Н. К разработке технологии и аппаратурного оформления производства субстрата из целлюлозосодержащего сырья / В. Н. Долгунин, А. В. Слепых, В. А. Пронин // Вестн. Тамб. гос. техн. ун-та. – 2019. – Т. 25, № 4. – С. 595 – 602. doi: 10.17277/vestnik.2019.04.pp.595-602
6. Долгунин, В. Н. Кинетические закономерности биоконверсии целлюлозосодержащего сырья с использованием культуры гриба *Trichoderma viride* / В. Н. Долгунин, А. В. Слепых, В. А. Пронин // Вестн. Тамб. гос. техн. ун-та. – 2020. – Т. 26, № 3. – С. 393 – 401. doi: 10.17277/vestnik.2020.03.pp.393-401
7. Долгунин, В. Н. Кинетика и гидродинамические условия твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья в статико-динамическом режиме / В. Н. Долгунин, Д. А. Власов, В. А. Пронин // Вестн. Тамб. гос. техн. ун-та. – 2022. – Т. 28, № 2. – С. 269 – 278. doi: 10.17277/vestnik.2022.02.pp.269-278
8. Алимова Ф. К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф. К. Алимова. – Казань : Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. – 209 с.
9. Franco, P. F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4 / P. F. Franco, H. M. Ferreira, E. X. F. Filho // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2004. – Vol. 40 (Pt 3). – P. 255 – 259. doi: 10.1042/BA20030161
10. Гайва, Е. Топ-10 грибных проектов. Заявлены производства на 28 млрд рублей. – Текст : электрон. / Е. Гайва // Агроинвестор. – 2016. – № 9. – URL : <https://www.agroinvestor.ru/rating/article/24141/> (дата обращения: 12.05.2024).
11. Максимова, Е. Кризис на рынке кормовых добавок носит глобальный характер. – Текст : электрон. / Е. Максимова // Агроинвестор. 25 нояб. 2021. – URL : <https://www.agroinvestor.ru/markets/news/37096-krizis-na-rynke-kormovykh-dobavok-nosit-globalnyy-kharakter/> (дата обращения: 12.05.2024).

12. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Метод 5 (колориметрический метод с биуретовым реактивом). – Текст : электрон. // Фармакопей.рф. – URL : <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka/> (дата обращения: 12.05.2024).

13. Теоретические основы пищевой биотехнологии : лабораторные работы / О. В. Зюзина, О. Б. Шуныева, Е. И. Муратова, О. О. Иванов. – Тамбов : Изд-во ТГТУ, 2006. – 26 с.

14. ГОСТ Р 55293–2012. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения целлюлазной активности. – Введ. 2014-01-01. – М. : Стандартинформ, 2014. – 7 с.

15. ГОСТ 6840–78. Целлюлоза. Метод определения содержания альфа-целлюлозы. – Введ. 1979-01-01. – М. : Изд-во стандартов, 1988. – 7 с. URL : <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294822/4294822889.pdf> (дата обращения: 12.05.2024).

16. Лыков, А. В. Теплообмен: Справочник / А. В. Лыков. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Энергия, 1978. – 480 с.

17. Рудобашта, С. П. Массоперенос в системах с твердой фазой / С. П. Рудобашта ; под ред. А. Н. Плановского. – М. : Химия, 1980. – 248 с.

Kinetics of Solid-Phase Biocatalysis of Cellulose-Containing Raw Materials in Static-Dynamic Mode on Substrates of Various Fractional Compositions

V. N. Dolgunin, I. A. Protopopov, A. A. Zhilo, A. N. Kudi, V. A. Pronin

*Department of Technologies and Equipment for Food and Chemical Industries,
dolgunin-vn@yandex.ru; TSTU, Tambov, Russia*

Keywords: bioconversion; degree of dispersion; solid-phase fermentation; solid substrate, cellulose-containing raw materials.

Abstract: The results of a study of the kinetics of solid-phase enzymatic hydrolysis of cellulose-containing raw materials in a static-dynamic mode using a culture of the *Trichoderma viridemicoscopicum* fungus depending on the fractional composition of the substrate are presented. Variants of the process organization with a solid substrate of fine (0–1 mm), moderate (1–3 mm) and coarse (3–5 mm) dispersion are investigated. It was found that the highest concentration of growth factors is achieved in an enzymatic medium prepared using a solid substrate of moderate dispersion. The use of such a substrate provides favorable conditions for intensive volumetric aeration of the enzymatic medium and diffusion contact of the components of the enzyme-substrate complex. The degree of cellulose bioconversion achieved during four days of fermentolysis on a substrate with moderate dispersion is 20 % higher than on finely and coarsely dispersed substrates.

References

1. Antipov S.T., Zhuravlev A.V., Kazartsev D.A., Mordasov A.G. [et al.]; Panfilov V.A. (Ed.). *Innovatsionnoye razvitiye tekhniki pishchevykh tekhnologii: ucheb. posobiye* [Innovative development of food technology equipment: a textbook], St. Petersburg: Lan', 2016, 660 p. (In Russ.)

2. Yemtsev V.T., Mishustin Ye.N. *Mikrobiologiya: uchebnik* [Microbiology: a textbook], Moscow: Drofa, 2005, 445 p. (In Russ.)

3. Kulishov B.A., Tuan Le An'. [Application of solid-phase fermentation technology in the production of bioproducts], *Vestn. Kazanskogo tekhnol. un-ta* [Bulletin of the Kazan Technological University], 2014, vol. 17, no. 23, pp. 258-261. (In Russ., abstract in Eng.)
4. Gneusheva I.A., Pavlovskaya N.Ye., Yakovleva I.V. [Biological activity of fungi of the genus *Trichoderma* and their industrial application], *Vestn. Orlovskogo gos. agrarnogo un-ta* [Bulletin of the Oryol State Agrarian University], 2010, no. 3(24), pp. 36-39. (In Russ., abstract in Eng.)
5. Dolgunin V.N., Slepikh A.V., Pronin V.A. [On the development of technology and equipment for the production of substrate from cellulose-containing raw materials], *Transactions of the Tambov State Technical University*, 2019, vol. 25, no. 4, pp. 595-602. doi: 10.17277/vestnik.2019.04.pp.595-602 (In Russ., abstract in Eng.)
6. Dolgunin V.N., Slepikh A.V., Pronin V.A. [Kinetic regularities of bioconversion of cellulose-containing raw materials using the fungus *Trichoderma viride* culture], *Transactions of the Tambov State Technical University*, 2020, vol. 26, no. 3, pp. 393-401. doi: 10.17277/vestnik.2020.03.pp.393-401 (In Russ., abstract in Eng.)
7. Dolgunin V.N., Vlasov D.A., Pronin V.A. [Kinetics and hydrodynamic conditions of solid-phase bioconversion of cellulose-containing raw materials in a static-dynamic mode], *Transactions of the Tambov State Technical University*, 2022, vol. 28, no. 2, pp. 269-278. doi: 10.17277/vestnik.2022.02.pp.269-278 (In Russ., abstract in Eng.)
8. Alimova F.K. *Promyshlennoye primeneniye gribov roda Trichoderma* [Industrial use of fungi of the genus *Trichoderma*], Kazan': Kazanskiy gosudarstvennyy universitet im. V.I. Ul'yanova-Lenina, 2006, 209 p. (In Russ.)
9. Franco P.F., Ferreira H.M., Filho E.X.F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2004, vol. 40 (Pt 3), pp. 255-259. doi: 10.1042/BA20030161
10. Available at: <https://www.agroinvestor.ru/rating/article/24141/> (accessed 12 May 2024).
11. Available at: <https://www.agroinvestor.ru/markets/news/37096-krizis-narynke-kormovykh-dobavok-nosit-globalnyy-kharakter/> (accessed 12 May 2024).
12. OFS.1.2.3.0012.15. *Opreddeniye belka. Metod 5 (kolorimetricheskiy metod s biuretovym reaktivom)* [Determination of protein. Method 5 (colorimetric method with biuret reagent)], available at: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka/> (accessed 12 May 2024).
13. Zyuzina O.V., Shunyayeva O.B., Muratova Ye.I., Ivanov O.O. *Teoreticheskiye osnovy pishchevoy biotekhnologii: laboratornyye raboty* [Theoretical foundations of food biotechnology: laboratory work], Tambov: Izdatel'stvo TGTU, 2006, 26 p. (In Russ.)
14. GOST R 55293-2012. *Fermentnyye preparaty dlya pishchevoy promyshlennosti. Metod opredeleniya tsellyulaznoy aktivnosti* [Enzyme preparations for the food industry. Method for determination of cellulase activity], Moscow: Standartinform, 2014, 7 p. (In Russ.)
15. GOST 6840-78. *Tsellyuloza. Metod opredeleniya sodержaniya al'fa-tsellyulozy* [Cellulose. Method for Determining Alpha-Cellulose Content], Moscow: Izdatel'stvo standartov, 1988, 7 p. available at: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4294822/4294822889.pdf> (accessed 12 May 2024).
16. Lykov A.V. *Teplomassoobmen: Spravochnik* [Heat and Mass Transfer: Handbook], Moscow: Energiya, 1978, 480 p. (In Russ.)
17. Rudobashta S.P.; Planovskiy A.N. (Ed.). *Massopereenos v sistemakh s tverdoy fazoy* [Mass Transfer in Systems with a Solid Phase], Moscow: Khimiya, 1980, 248 p. (In Russ.)

Kinetik der Festphasen-Biokatalyse der zellulosehaltigen Rohstoffe im statisch-dynamischen Regime auf Substraten unterschiedlicher fraktioneller Zusammensetzung

Zusammenfassung: Es sind die Ergebnisse der Untersuchung der Kinetik der enzymatischen Festphasenhydrolyse von zellulosehaltigen Rohstoffen im statisch-dynamischen Modus unter Verwendung der Kultur des mikroskopischen Pilzes *Trichoderma viride* in Abhängigkeit von der fraktionellen Zusammensetzung des Substrats vorgestellt. Die Varianten der Prozessorganisation mit festem Substrat von feiner (0...1 mm), mäßiger (1...3 mm) und grober (3...5 mm) Dispersität sind untersucht. Es ist festgestellt, dass die höchste Konzentration an Wachstumsfaktoren in dem enzymatischen Medium erreicht wird, das unter Verwendung des festen Substrats mit mittlerer Dispergierbarkeit hergestellt wird. Die Verwendung eines solchen Substrats bietet günstige Bedingungen für eine intensive volumetrische Belüftung des enzymatischen Mediums und einen Diffusionskontakt der Komponenten des Enzym-Substrat-Komplexes. Der Grad der Zellulose-Biokonversion, der während der viertägigen Fermentolyse auf einem mäßig dispergierten Substrat erreicht wird, ist um 20 % höher als auf fein und grob dispergierten Substraten.

Cinétique de la biocatalyse en phase solide de la matière première de maintien de la cellulose en mode statique et dynamique sur des substrats de différentes compositions fractionnaires

Résumé: Sont présentés les résultats de l'étude de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique en phase solide de la matière première contenant de la cellulose en mode statique-dynamique en utilisant une culture du champignon microscopique *Trichoderma viride* en fonction de la composition fractionnée du substrat. Sont étudiées les options d'organisation du processus avec un substrat solide de dispersion fine (0...1 mm), modérée (1...3 mm) et grossière (3...5 mm). Est établi que la concentration la plus élevée des facteurs de croissance est obtenue dans un milieu enzymatique préparé à l'aide d'un substrat solide de dispersion modérée. L'utilisation d'un tel substrat fournit des conditions favorables pour l'aération volumétrique intensive du milieu enzymatique et le contact de diffusion des composants du complexe enzyme-substrat. La bioconversion de la cellulose obtenue en quatre jours sur un substrat à dispersion modérée est supérieure de 20% à celle des substrats à dispersion fine et grossière.

Авторы: *Долгунин Виктор Николаевич* – доктор технических наук, профессор кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; *Протопопов Илья Андреевич* – магистрант; *Жило Андрей Андреевич* – аспирант кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; *Куди Андрей Николаевич* – доктор технических наук, доцент кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; *Пронин Василий Александрович* – кандидат технических наук, доцент кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств», ФГБОУ ВО «ТГТУ», Тамбов, Россия.