



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО
КАТЕДРА „ЦЕЛУЛОЗА, ХАРТИЯ И ПОЛИГРАФИЯ”

инж. Стойко Александров Петрин

**Кинетични закономерности на ензимна хидролиза на
лигноцелулозни материали**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност 5.10. Химични технологии

(Технология, механизация и автоматизация на лесохимичните производства)

Научен ръководител: доц. д-р инж. Иво Вълчев

Научно жури:

1. Проф. д-р инж. Санчи Ненкова – председател, рецензент
2. Проф. д-р инж. Панайот Панайотов - рецензент
3. Доц. д-р инж. Евда Петкова - становище
4. Доц. д-р Гинка Антова - становище
5. Доц. д-р инж. Иво Вълчев - становище

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 168 страници, съдържа 89 фигури, 88 уравнения и 23 таблици. Цитирани са 207 източника. Номерата на фигурите, уравненията и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на катедрен съвет на научното звено на катедра „Целулоза, хартия и полиграфия”, състояло се на 21.02.2017 г. с протокол №716/21.02.2017

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 05.06.2017г. от 14.00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Изказвам най-сърдечната си благодарност на научния си ръководител, доц. д-р инж. Иво Владимиров Вълчев, за гласуваното ми доверие, указаната помощ при разработване на дисертационният труд и за предоставената ми възможност за обучение в катедрата „Целулоза, хартия и полиграфия“, където успях да придобия нови знания и умения и засили интереса ми към изучаваните в катедрата различни тематика.

Изказвам най-искренна благодарности на всички помогнали ми при разработването на дисертационният труд.

Благодаря на родителите си – Таня Тодорова Стоева-Петрина и Александър Ангелов Петрин за подкрепата и помощта която ми оказват както в радостни така и трудни моменти за мен. Благодаря им че са постигнали да възпитат и изградят човека който съм в момента.

Посвещавам дисертационния си труд на човека на който нося името си, но за съжаление вече не е сред нас, моята скъпа баба Стойка Костадинова Стоева.

Сърдечно благодаря !

У В О Д

В последните години, в опит да се намали използването на фосилни горива и да се ограничи количеството на въглероден диоксид, изхвърлян в атмосферата, все по-сериозно внимание се обръща на производството и използването на биогорива. Едно от най-широко използваните в световен мащаб е биоетанолът. Той се явява основен заместител на петрола и се използва като една от най-обещаващите както и краткосрочен, така и в дългосрочен план алтернативи на транспортните горива. Като възобновяем енергиен източник, биоетанолът е въглеродно неутрално гориво, допринасящо за намаляване на количеството парникови газове в атмосферата. Това дава възможност биоетанолът да бъде произвеждан навсякъде по света.

Лигноцелулозната или дървесната биомаса се счита за бъдещата алтернатива на селскостопанските култури, използвани в момента като основна суровина за производството на биоетанол. Сред основанията за това са по-големите количества и по-ниската цена в сравнение с богатите на растителни захари и скорбяла култури, които в същото време се явяват и суровина за основни хранителни продукти. Използването на лигноцелуозна биомаса е по-атрактивно и от гледна точка на енергийния баланс и емисии.

Сред основните предизвикателства пред производството на биоетанол от лигноцелуозна биомаса е подобряването на методите за раздробяване на биомасата, така че да бъдат подходящи за различни видове биомаса. До момента има няколко разработени метода – механичен, топлинен, химичен и биологичен, както и комбинация от тях. Въпреки това, никой от тях все още не е доказано подходящ поради високите разходи, ниските добиви, производството на отпадни продукти или нежелани странични продукти. Друг важен момент за изследване е свързан със сегашните високи разходи и ниска продуктивност на ензима целулаза, който е необходим за превръщането на целулозата в глюкоза при ензимната хидролиза. Алтернативата киселинна хидролиза е подходяща, но за хидролизирането на целулозни материали, процесът е капиталоемък и има негативен ефект върху добива на захар

Търсят се пътища за повишаване на ефективността на ензимната хидролиза на лигноцелулозни материали посредством разработване на нови ензимни продукти, както и средства за увеличаване на активната повърхност на влакната. Липсата на обобщен модел за ензимно действие на целулазния комплекс, както и хетерогенната природа на

лигноцелулозните субстрати, налага научните изследвания да бъдат насочени към комплексно решаване на проблема. От тази гледна точка, широко използван в теорията и практиката на химичната кинетика, е методът на корелационните съотношения.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се изследват кинетичните закономерности на ензимната хидролиза, за получаване на захари за производството на биоетанол от лигноцелуозна биомаса, които да послужат за изясняване на кинетичният механизъм на процеса с оглед на оптимизирането и повишаването на неговата ефективност.

За постигане на поставената цел изследванията бяха насочени към разработване на следните задачи:

1. Установяване на кинетични модели, описващи най-точно кинетиката на предварителното третиране и последващата ензимна хидролиза с различни ензимни комплекси и лигноцелулозни субстрати.
2. Изучаване на температурната и концентрационната зависимост на скоростта на процеса.
3. Установяване на общи кинетични закономерности, които отчитат хетерогенната природа на системата ензимен комплекс лигноцелулозен субстрат.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Химичен анализ на лигноцелулозните суровини

Изследваните суровини са дезинтегрирани на сухо в мелница и след това фракционирани. Анализирана е фракция с размер на частиците от 0.5 до 1 mm.

Проведеният химичен анализ на остатъци от земеделски лигноцелулозни суровини показва очаквано високо съдържание на пепел, което се дължи на аморфен силиций (Таблица 1.). Високо е и съдържанието на водоразтворими вещества поради наличието на невлакнести компоненти и пектини, които лесно се екстрахират във гореща вода. Тези вещества се разграждат при последваща хидролиза, консумират химикали и намаляват общия добив на захари от тон суровина. При сламата те са в по-умерени количества.

Таблица 1. Химичен състав на отпадъчни селскостопански суровини

растителен вид	Царевични стъбла	Пшенична слама
Компоненти		
Целулоза, %	41.7	44.0
Лигнин, %	19.0	24.3
Пентозани, %	33.6	33.5
Вещества разтворими в гореща вода, %	11.3	5.8
Леснохидролизуеми полизахариди, %	19.7	20.7
Пепел, %	6.8	4.6

Високо е съдържанието на пентозани при царевичните стъбла и сламата. Получените резултати корелират с установените стойности за леснохидролизуеми вещества. Сумарно, целулоза и пентозани се съдържат най-много в сламата и царевичните стъбла.

Резултатите, получени за количеството на основните компоненти в изследваните широколистни дървесни видове са представени в Таблица 2., вижда се че пауловния от

вид *Tomentosa* се характеризира със съдържание на целулоза, хемицелулози и лигнин, подобно на установените при едногодишни растения.

Таблица 2. Химичен анализ на пауловния, топола и върба

Компоненти	Дървесен вид	Пауловния	Върба	Топола от
		от вид <i>Tomentosa</i>	<i>Salix</i> обща проба	вид <i>Populus</i> обща проба
Целулоза, %		39.2	50.3	49.7
Лигнин, %		20.2	24.9	25.9
Пентозани, %		23.8	-	20.6
Разтворими вещества в гореща вода, %		13.0	2.4	4.2
Пепел, %		1.4	0.54	0.34

Определеното високото количество на водоразтворими вещества вероятно се дължи на нискомолекулни екстрактивни и пектинови вещества, които се хидролизират и разтварят при нагряване до 100°C.

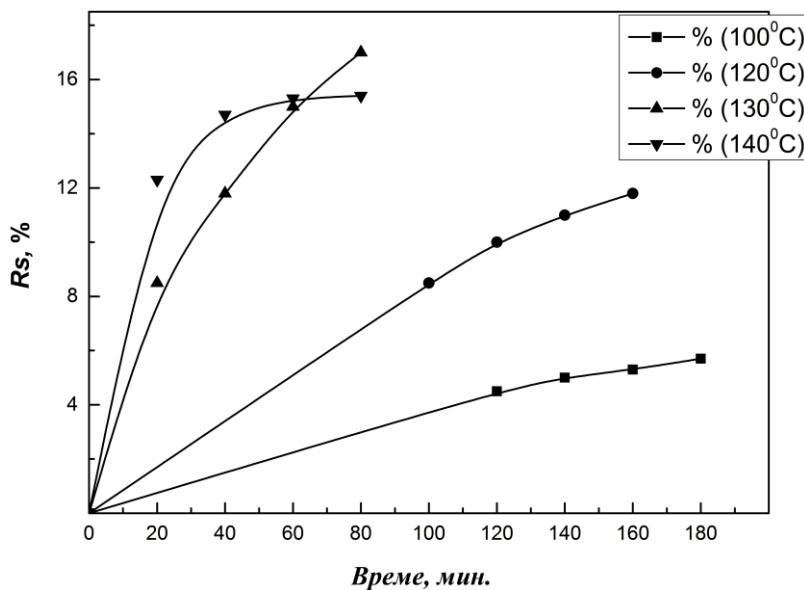
Предоставената от „опитната станция за бързорастящи дървесни видове” – гр. Свищов обща проба върба от вида *Salix*, целулозата надхвърля 50 %.

2. Кинетични зависимости на двустепенна хидролиза на дървесния вид Пауловния *Tomentosa*

2.1. Кинетиката на киселинна хидролиза

Проведена е с 1% сярна киселина като катализатор при температури 100°C, 120°C, 130°C и 140°C. Важно е да се отбележи, че съдържанието на редуциращите захари не зависи от формата на дървесината (трески или стърготини).

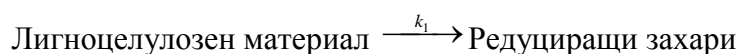
Като кинетична променлива е използвано количеството на редуциращи захари R_s в % по отношение на масата. Експерименталните данни са илюстрирани на *Фиг. 1*.



Фиг. 1. Кинетични криви на киселинна хидролиза на пауловния при различни стойности на температурата

Вижда се, че количеството на редуциращи захари се увеличава с времето и с повишаване на температурата. *Фиг. 1* показва също така, че количеството на редуциращи захари, остава относително непроменено след 40 мин. реакционно време при температура 140°C. Това се дължи на факта, че реакцията на деструкция на захарите започва при тази температура. Затова кинетичните изследвания са проведени в температурния интервал от 100°C до 130°C.

Тъй като експериментални условия (100°C - 130°C) не са благоприятни за деструкцията на захарите, киселинната хидролиза може да се представи със схемата:



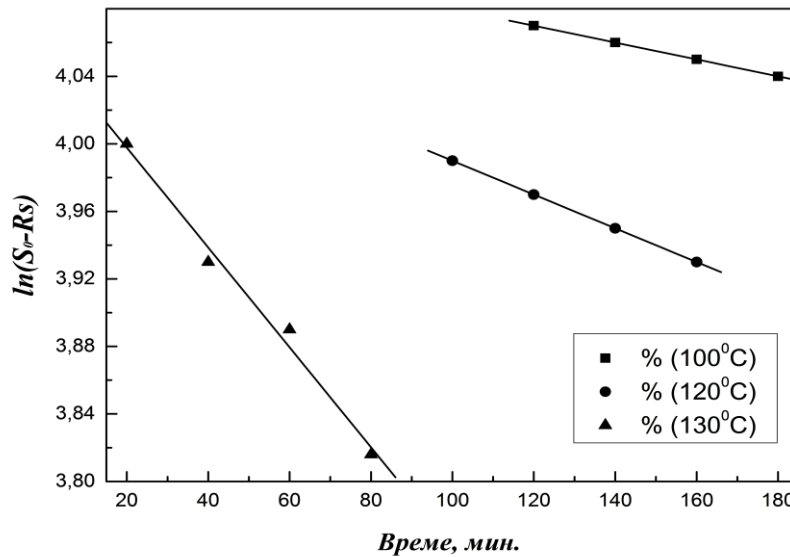
От това следва, че количеството редуциращи захари R_s може да бъде представено като функция на времето съгласно кинетично уравнение от първи порядък:

$$R_s = S_0 (1 - e^{-k_1 t}) \quad (1)$$

,където S_0 е общото количество въглехидрати в биомасата (63 %), което може да се хидролизира до захари и k_1 е скоростната константа на процеса. Уравнение (1) е приложено в логаритмичен вид:

$$\ln(S_0 - R_s) = \ln S_0 - k_1 t \quad (2)$$

От наклона на линейните зависимости представени на *Фиг. 2* може да се определят скоростните константи на хидролиза k_1 .



Фиг. 2. Линейни зависимости на $\ln(S_0-R_s)$ от времето t

Стойностите на получените скоростни константи при различни температури са представени в *Таблица 3*.

Таблица 3. Зависимост на скоростната константа на хидролиза от температурата

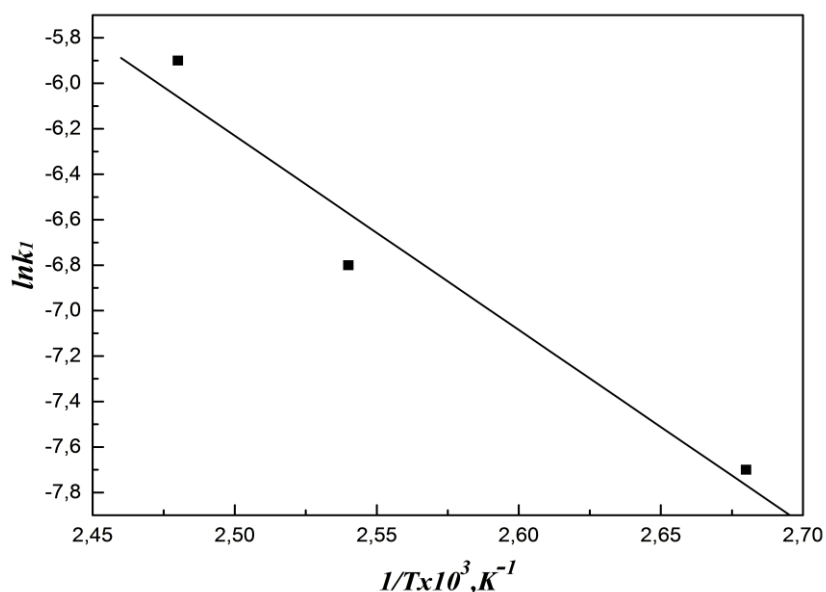
	100°C	120°C	130°C
$k_1 \times 10^3, \text{min}^{-1}$	0.47	1.11	2.70

Вижда се, че повишаването на температурата благоприятства процеса на киселинна хидролиза.

Температурната зависимост на скоростните константи на процеса представена на *Фиг. 3* се описва с уравнението на Арениус (3). То се използва за определяне на активиращата на енергия E и предекспоненциалния множител A .

$$k_1 = A e^{-\frac{E}{RT}} \quad (3)$$

Стойността на активиращата енергия е $E = 71.0 \text{ kJ.mol}^{-1}$, а стойността на предекспоненциалния множител е $\lambda = 3.72 \times 10^6, \text{ min}^{-1}$.



Фиг. 3. Температурна зависимост скоростната константа

Получените резултати показват, че процесът на киселинна хидролиза протича в енергетично еднородна система ($E = \text{const}$) при еднаква достъпност на реагента до хидролизуемите области ($\lambda = \text{const}$). Оттук следва, че кинетиката на изследвания процес може да се отнесе към псевдо хомогенната катализа и се описва с уравнение от първи порядък. Оптималното количество на редуциращи захари след киселинната хидролиза е 17% при температура 130°C и време 80 мин. При тези оптимални условия, твърдият остатък се развлякнява, промива, неутрализира до рН 5 - 6 и впоследствие се подлага на ензимна хидролиза.

2.2. Кинетика на ензимна хидролиза на пауловния след предварителна киселинна обработка

Преди вторият етап от процеса на двустепенната хидролиза на пауловния след предварителното киселинно третиране чрез HPLC е определено количество и вида на отделните редуциращи вещества представени в Таблица 4.

Таблица 4. Количество на разтворените вещества след киселинна хидролиза на пауловния, получени чрез HPLC анализ

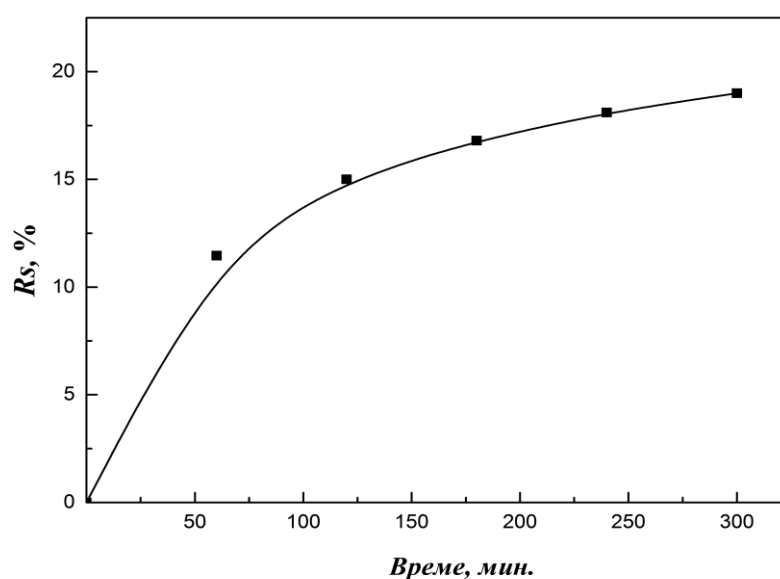
Разтворени вещества, %	Rs, %	Glucose, %	Xylose, %	Galactose, %	Arabinose, %	HMF, %
40.0	18.5	2.4	11.5	2.9	0.7	1.0

Общо разтворените вещества са 40%, като количеството на редуциращите е 18.5%. Установи се, че е най-голям е делът на ксилозата – 11.5%, а количеството на глюкозата е малко над 2%. Има следи от арабиноза и близо 3% галактоза. Наблюдава се и малко количество хидроксиметилфурфурол, който е инхибитор на последващия етап на ензимна хидролиза.

Ензимната хидролиза на получената маса след киселиното третиране се провежда с целулазен ензимен комплекс NS 50013 и NS 50010 при следните условия:

- 10% концентрация на масата;
- целулазен комплекс NS 50013 - 5 % по отношение на масата в комбинация от β - глюкозидазата NS 50010 – 0,5%;
- температура 50°C;
- продължителност на ензимната хидролиза 24 h;
- рН 5.5 - 6.0.

Количеството на редуциращите захари R_s , в %, по отношение на масата, като функция на времето при температура 50°C е представено на *Фиг. 4*.



Фиг. 4. Зависимост на R_s от времето при температура 50°C

Като кинетична променлива е използвана безразмерната величина α :

$$\alpha = \frac{Rs}{Rs_{\max}} \quad (4)$$

, където Rs е количеството редуциращи захари, които са преминали в разтвора в даден момент, а $Rs_{\max} = 25\%$ е максималното количество след 24 часа третиране.

Величината α има смисъл на степен на ензимна хидролиза. Тъй като системата ензим - субстрат е хетерогенна за кинетиката на процеса е приложено експоненциално кинетично уравнение, валидно за процеси, протичащи върху равномерно нееднородни повърхности :

$$v = v_0 e^{-a\alpha} \quad (5)$$

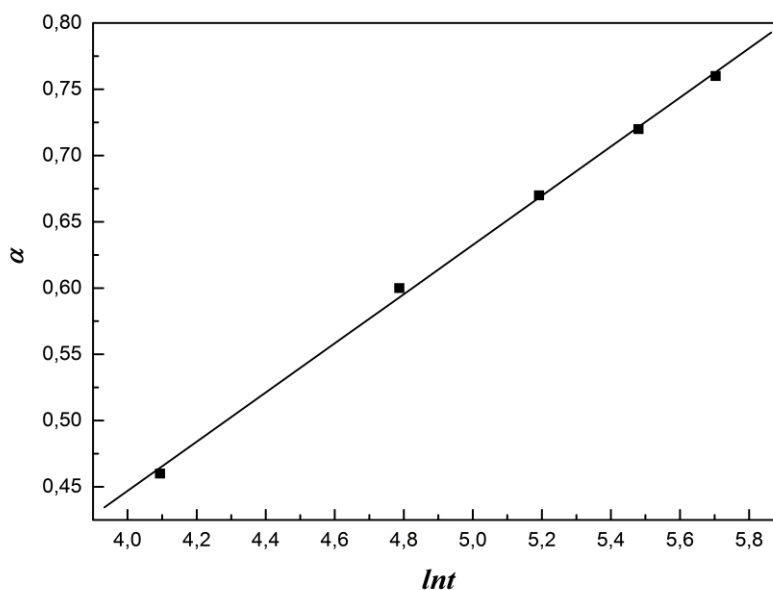
, където $v = da/dt$ е текущата скорост, а v_0 е началната скорост на ензимната хидролиза.

Кинетичната крива се линеализира в координати $\alpha - lnt$ в съответствие с приближената интегрална форма на експоненциално кинетично уравнение (6).

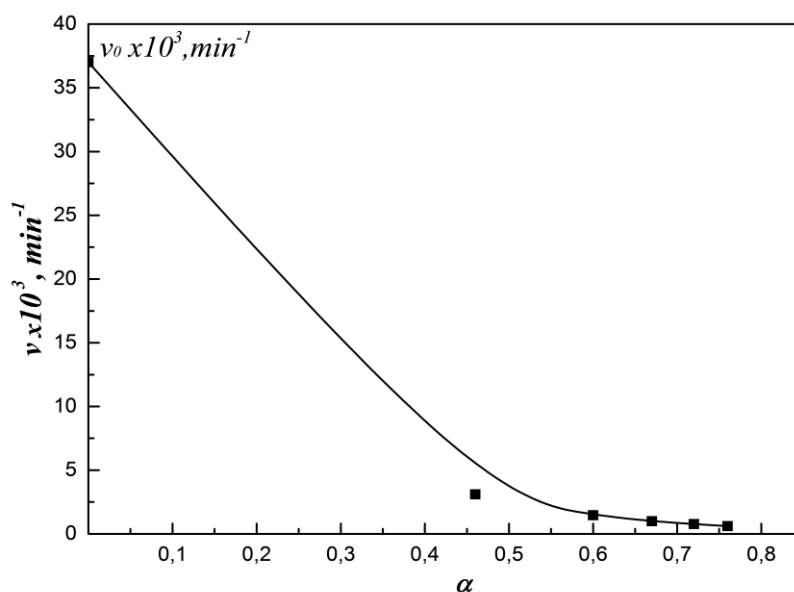
$$\alpha = \frac{1}{a} \ln(v_0 a) + \frac{1}{a} \ln t \quad (6)$$

Получена е линейна зависимост между степента на хидролиза и lnt , която е представена на *Фиг. 5*.

Коефициентът на нееднородност $a = 5.4$ и началната скорост на процеса $v_0 = 3.7 \times 10^{-2}$, min^{-1} са изчислени съгласно уравнение (6). Текущата скорост на ензимна хидролиза при различни стойности на α е изчислена въз основа на уравнение (5) и е представена на *Фиг. 6*.



Фиг. 5. Линейна зависимост на α от $\ln t$ при 50°C



Фиг. 6. Зависимост на текущата скорост v от степента на ензимна хидролиза α

Получените данни на *фиг. 6* показват, че текущата скорост намалява в хода на процеса. Освен това се вижда, че хидролизата протича сравнително бързо в първите 60 минути, когато се достига приблизително 50 % добив на редуциращи захари. След този начален период текущата скорост значително намалява вероятно поради изчерпване на активните центрове на повърхността и стерични затруднения поради присъствието на лигнин.

2.3. Кинетични изследвания на ензимна хидролиза на пауловния след предварителна паро-взривна обработка

Паро-взривната хидролиза е проведена в 2L реактор при следните условия: хидромодул 1:10, начална температура 100°C, крайна температура 190°C, време на задържане при максимална температура 10 мин., време за достигане на максимална температура 60 мин., налягане 12.8 atm.

Ензимната хидролиза е проведена с целулазния продукт на Novozymes – целулазен комплекс NS 50013 - 5% по отношение на масата в комбинация от β-глюкозидазата NS 50010 – 0.5 % при рН_{начално} 5.5 – 6.0, температури 20°C, 30°C, 40°C и 50°C реакционно време от 1 до 24 часа и рН_{крайно} 4.2 – 4.6.

Чрез HPLC анализ е определено количеството на редуциращи вещества след паро-взривната хидролиза на пауловния (Таблица 5.).

Таблица 5. Редуциращи вещества след паро-взривна хидролиза на пауловния определени чрез HPLC

Разтворени вещества,% от изходната суровина	глюкоза, % от изх. суров.	ксилоза, % изх. суров.	фурфурал, % изх. суров.	HMF, % изх. суров.
36.8	1.2	5.0	4.1	1.9

От Таблица 5. се вижда че при паро-взривната предварителна обработка се получават сравнително голямо количество на фурфурал и по-малко от HMF, които са инхибитори за последващата ензимна хидролиза.

Количеството на глюкоза G (%) получено при различни температури и време са представени в Таблица 6.

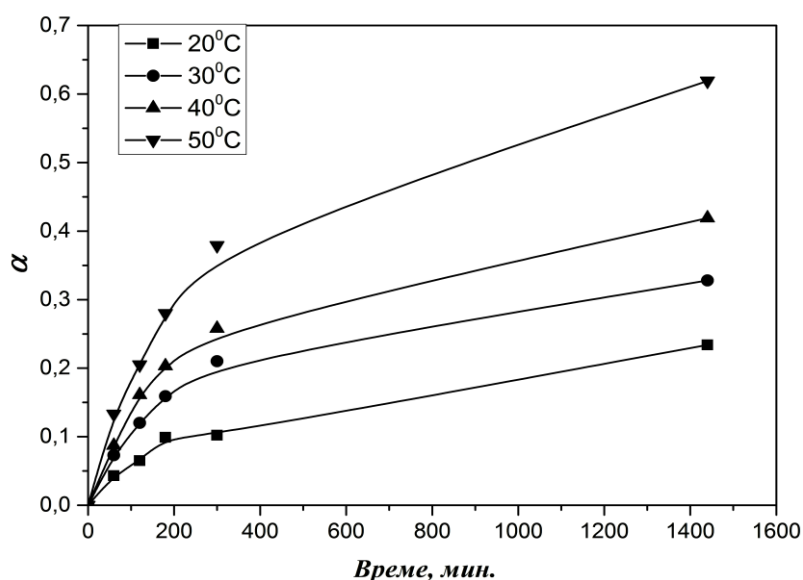
Таблица 6. Зависимост от количеството на глюкоза (G,%) от температурата и времето

Време, мин	G,%			
	T=20°C	T=30°C	T=40°C	T=50°C
60	0.96	1.65	1.96	2.97
120	1.47	2.68	3.61	4.59
180	2.23	3.57	4.55	6.25
300	2.28	4.70	5.76	8.48
1440	5.24	7.34	9.37	13.83

Безразмерната величина α е използвана като кинетична променлива и има смисъл на степен на хидролиза, т.е. конверсията на целулоза до глюкоза. Тя се определя от количеството на глюкоза и се изчислява съответно по уравнение :

$$\alpha = \frac{G}{G_{\max}} \quad (7)$$

, където G (%) е текущото количество на глюкоза, а G_{\max} (%) е максималното количество на глюкоза (22.32%) получено след 48 часа третиране при 50°C. Получените данни се използват за представяне на съответните кинетични криви при различните температури (Фиг. 7). Степента на превръщане се увеличава с времето и с повишаване на температурата.



Фиг. 7. Кинетичните криви на степен на ензимна хидролиза при различни температури

Проверена е приложимостта на различни кинетични уравнения валидни за хетерогенни процеси. Установено е, че процесът на ензимна хидролиза се описва най-добре от експоненциално кинетично уравнение (5), при което се получава най-висок коефициент на корелация ($R^2 = 0.998$). Според модела на равномерно нееднородни повърхности активните центрове на повърхността са разпределени линейно по отношение на тяхната енергия и ентропия.

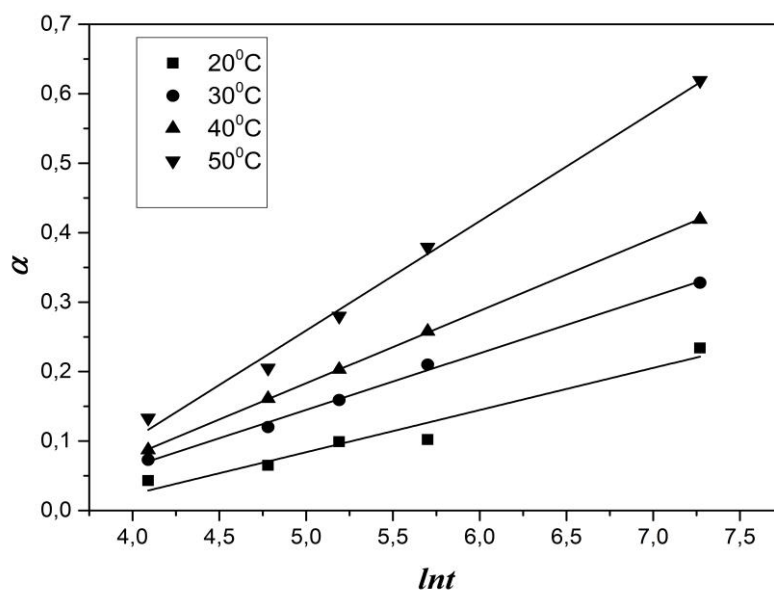
Кинетичният коефициент на нееднородност включва енергетичната и ентропийна нееднородност на системата. В общия случай той зависи от температурата, съгласно следното уравнение:

$$\alpha = \frac{B}{(RT)} - a_0 \quad (8)$$

Константата B описва интервала на енергетична нееднородност на системата, който се определя от наличието на активни центрове с различна енергетична характеристика. Константата a_0 характеризира ентропийната нееднородност на повърхността, което се дължи на промяната на броя на активни центрове по време на процеса, както и тяхната достъпност и пространствена ориентация.

Всички кинетични криви се линеаризирани в координати α и $\ln t$ в съответствие с експоненциалното кинетично уравнение (6).

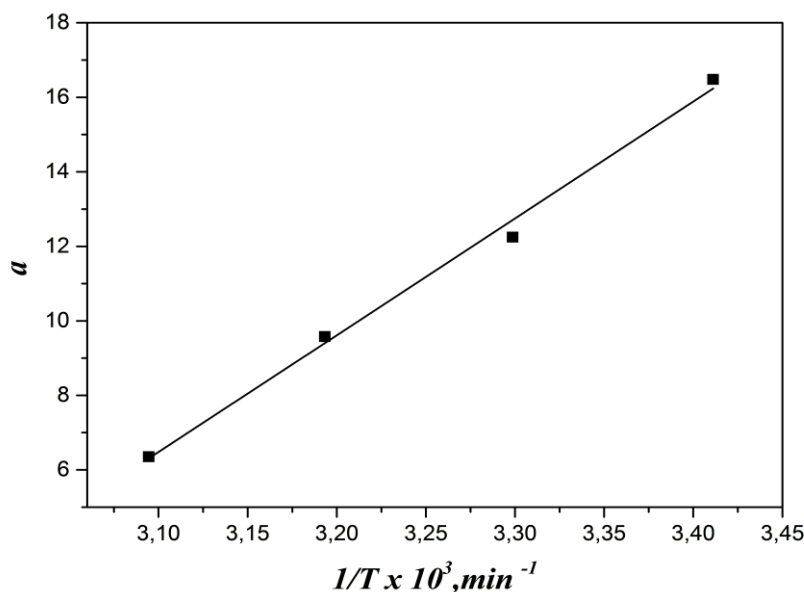
Линеализирането на кинетичните криви е представено на Фиг. 8.



Фиг. 8. Линейна зависимост на α и $\ln t$

Изчислените стойности на константите в уравнение (5) са съответно: за интервала на енергетична нееднородност $B = 251 \text{ kJ.mol}^{-1}$ и за интервала на ентропийна нееднородност $a_0 = 88.3$.

Кинетичният коефициент на нееднородност α , който зависи от температурата съгласно уравнение допуска енергитична и ентропийна нееднородност на системата, е определяна и представена на *Фиг. 9*.



Фиг. 9. Температурна зависимост на коефициента на нехомогенност α

Уравнение (5) и уравнение (6) се използва за изчисляване на началната скорост v_0 и текущата скорост v на процеса на хидролиза. Получените стойности са обобщени в *Таблица 7*. Вижда се, че текущата скорост намалява в хода на процеса (с увеличение на α).

Таблица 7. Зависимост на хидролизната скорост v, min^{-1} от α при различни температури

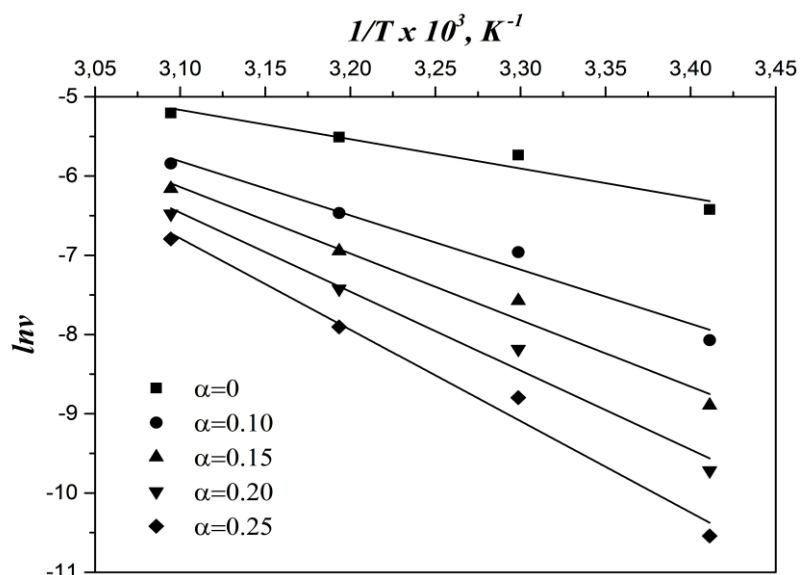
α	$v \times 10^3, \text{min}^{-1}$			
	$T=20^\circ\text{C}$	$T=30^\circ\text{C}$	$T=40^\circ\text{C}$	$T=50^\circ\text{C}$
0	1.85	3.34	4.08	5.35
0.10	0.31	0.85	1.61	2.79
0.15	0.13	0.44	0.99	2.03
0.20	0.05	0.23	0.62	1.47
0.25	0.02	0.12	0.38	1.07

Зависимостта на температурата от скоростта на хидролиза може да се представи с уравнението на Арениус, което може да бъде представено в следният вид:

$$v = Ae^{-E/RT} \quad (9)$$

, където A е предекспоненциалният множител и E е активиращата енергия.

Линейната зависимост от логаритмична форма на уравнение (9) е представена във Фиг. 10.



Фиг. 10. Температурна зависимост на началната и текущата скорост на процеса при $\alpha = const$

Активиращата енергия E и предекспоненциалният множител A са пресметнати при различни стойности на степента на превръщане α и са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Стойност на активиращата енергия E и предекспоненциалният множител A при $\alpha = const$.

α	0.00	0.10	0.15	0.20	0.25
$E, \text{kJ.mol}^{-1}$	26.40	47.80	60.35	73.00	87.96
$\ln A$	4.74	11.90	16.27	20.65	25.93

Стойностите на активиращата енергия и предекспоненциалния множител нарастват в хода на процеса, както се вижда от Таблица 8.

Техните зависимости от степента на хидролиза са линейни, както са и изискванията на модела на нееднородни повърхности, и са описани от уравнения (10) и (11).

$$E = E_0 + B\alpha \quad (10)$$

$$\ln A = \ln A_0 + a_0\alpha \quad (11)$$

, където E_0 и $\ln A_0$ се изчисляват от температурната зависимост на началната скорост v_0 .

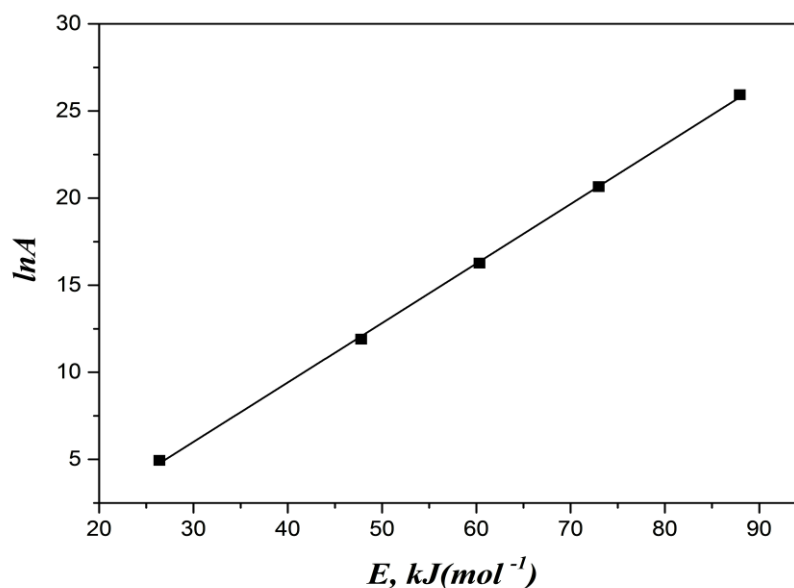
Увеличението на активиращата енергия E в хода на ензимната хидролиза показва забавяне на процеса поради увеличението на енергийните трудности на ензим - целулозната система. Наблюдаваният ефект може да се обясни със структурни промени на целулазния и β -глюкозидазния комплекс и тяхното съответно намаляване на активността при взаимодействие в области трудни за достъп в рамките на клетъчните стени. От друга страна, предекспоненциалният множител се увеличава по време на процеса. Това вероятно се дължи на факта, че ензимната хидролиза на пауловния е сложен двустепенен процес. Предекспоненциалният множител се обяснява не само с образуването на нови активни центрове на целулозната структура но също и от количество на целобилоза и олигозахариди, които се получават в хода на процеса.

Скоростта на процеса се влияе от активиращата енергия и предекспоненциалния множител. Когато тези противодействащи фактори се променят едновременно с увеличение на α , се спазва добре изученият хетерогенен компенсационен ефект, който се отнася за $\ln A$ и E и обединява в една обща линейна зависимост (уравнение 12) и е представен на *Фиг. 11*.

$$\ln A = n + mE \quad (12)$$

, където коефициента $n = \ln A_0 - (a_0/B)E_0$ е връзката с началната характеристика на процеса и коефициентът $m = a_0/B = 0.34 \text{ mol.kJ}^{-1}$ е съотношението между ентропията и енергийно-нехомогенната система.

Създадените енергийни пречки не могат да бъдат напълно компенсирани от положителния ефект от увеличението на предекспоненциалния множител. Следователно, активиращата енергия има решаващо влияние върху намаляване на скоростта като функция на времето.



Фиг. 11. Компенсационен ефект

Проведените кинетични изследвания с пауловния (*P. tomentosa*) показват, че кинетиката на киселинно предварително третиране с разредена сярна киселина се отнася към псевдо-хомогенната катализа и се описва с уравнение от първи порядък.

Ензимна хидролиза с целулазния комплекс NS 50013 в комбинация с β -глюкозидазата NS 50010 независимо от предварителната обработка се описва от експоненциалното кинетично уравнение, протичащо в равномерно нехомогенни повърхности.

Наблюдава се компенсационен ефект между предекспоненциалния множител и активиращата енергия. Активиращата енергия има решаващо влияние върху намаляването на скоростта като функция на времето.

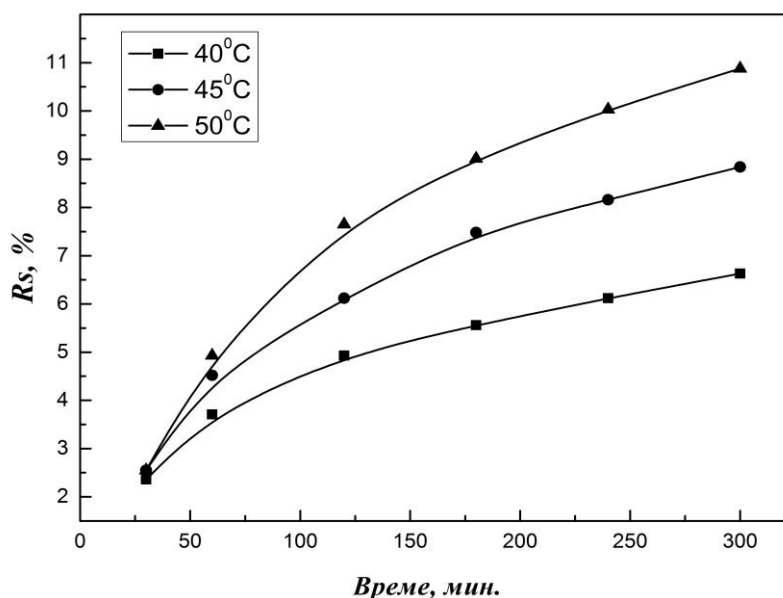
Получените резултати изясняват механизма на протичащите процеси, а изведените кинетични зависимости могат да се използват за контрол и управление на технологичния процес.

3. Кинетични изследвания на ензимна хидролиза на царевични стъбла и пшеничена слама с ензимния комплекс NS 50013 и NS 50010

3.1. Кинетични закономерности на ензимна хидролиза на царевични стъбла след предварително киселинно третиране

Ензимната хидролиза е проведена с целулазния продукт на Novozymes – целулазен комплекс NS 50013 – 2 % по отношение на масата в комбинация от β -глюкозидазата NS 50010 – 0.2 % при рН 4.7, температури 40°C, 45°C и 50°C и реакционно време от 30 до 300 мин. Направен е анализ на междинния остатък след предварителното третиране с киселина и преди ензимната хидролиза на царевични стъбла. Установено е съдържание на целулоза – 60.1%, количество на лигнин – 28.2%, разтворими вещества – 35% и пепел – 4.7%.

Кинетичните криви за изменението на редуциращите захари с времето при опитните температури за целулазния продукт са представени на *Фиг. 12*. Максималното количество $R_{s_{max}}$ определено след 24 часа при температура 50°C е $R_{s_{max}}=12.83\%$.



Фиг. 12. Кинетични криви на редуциращите захари R_s

Като кинетична променлива е използвана безразмерната величина α и определена от уравнение (4).

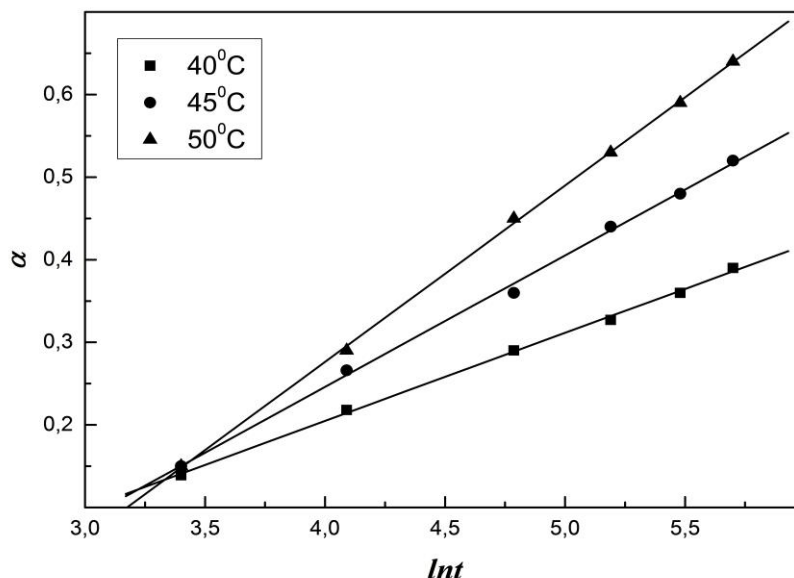
Проверена е приложимостта на различни кинетични уравнения, описващи кинетиката на хетерогенни процеси. Установено е, че с най-голяма точност хидролизата

се описва от експоненциално кинетично уравнение (5), валидно за процеси протичащи върху равномерно нееднородни повърхности.

Всички кинетични криви се линеализират в координати $\alpha - \ln t$ при постоянна температура в съответствие с:

$$\alpha = k + \frac{1}{a} \ln t \quad (13)$$

, където a е кинетичен коефициент на нееднородност, а k е константа за дадена температура и е свързана с началните параметри на процеса. Получените линейни зависимости са представени на *Фиг. 13*.



Фиг. 13. Линейни зависимости α и $\ln t$

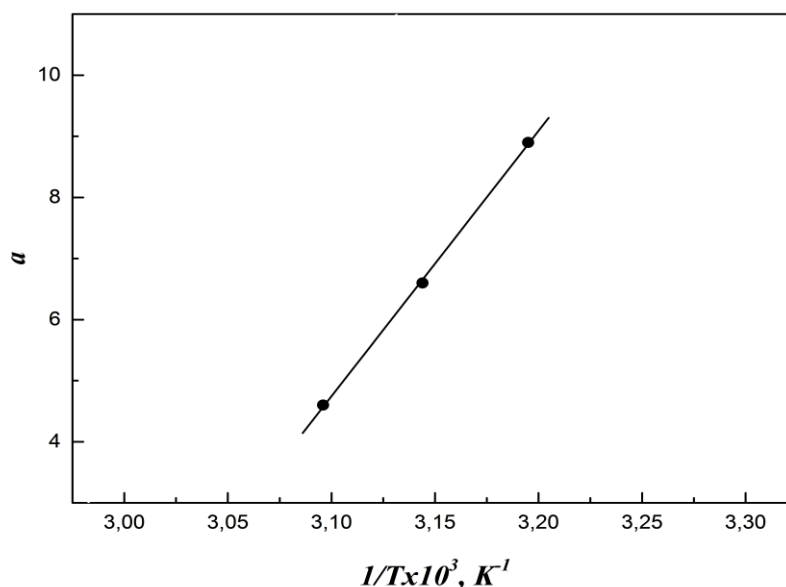
Както се вижда от *Фиг. 13* експоненциалното кинетично уравнение е приложимо само след степен на хидролиза $\alpha = 0.145$ и след време между 15 и 30 мин. от началото на процеса. Това би могло да се обясни със специфичното действие на двата ензима поради адсорбционни или дифузионни затруднения.

От наклона на получените прави (*Фиг. 14*) е определен коефициентът на нееднородност a , който зависи от температурата.

Текущата скорост на процеса при $\alpha = \text{const}$ е изчислена съгласно уравнение (13) за различните температури придобива вида :

$$v = \frac{1}{at} \quad (14)$$

На *Фиг. 14* е представена линейната зависимост на a от $1/T$, която се описва от уравнението (8).



Фиг. 14. Температурна зависимост на коефициента на нееднородност a

Константата B , която е равна на $361 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, представлява интервал на енергетична нееднородност, който отчита активни центрове с различна енергия. Коефициентът a_0 отчита ентропийната нееднородност на системата, която е свързана с броя, разположението и достъпността на активните центрове и е равен на $a_0 = 123$.

Стойностите на текущата скорост и нейната зависимост от нарастване на степента на хидролиза α и от температурата са представени в *Таблица 9*. Текущата скорост намалява с нарастване на степента на хидролиза

Таблица 9. Стойности на текущата скорост на ензимната хидролиза

α	$v \times 10^3, \text{min}^{-1}$			
	30°C	40°C	50°C	60°C
0.125	2.77	4.54	7.97	11.07
0.150	1.70	3.26	6.54	10.46
0.200	0.65	1.70	4.44	8.10
0.250	0.23	0.85	3.05	6.05

Съгласно уравнението на Арениус (9) е проследена температурната зависимост на скоростта. Определени са стойностите на активиращата енергия E и на предекспоненциалния множител A при различни стойности на α .

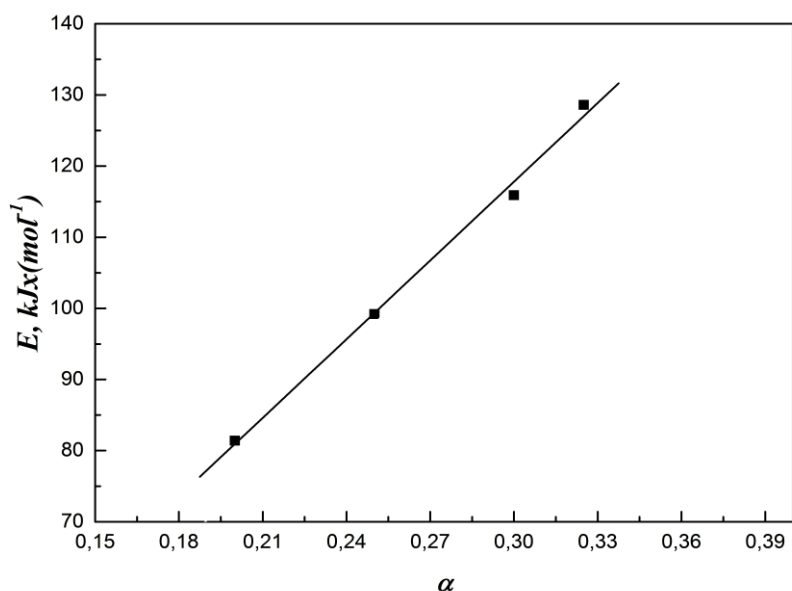
Получените резултати показват, че E и $\ln A$ нарастват в хода на процеса, а техните зависимости се описват със следните уравнения:

$$E = E^* + B\alpha \quad (15)$$

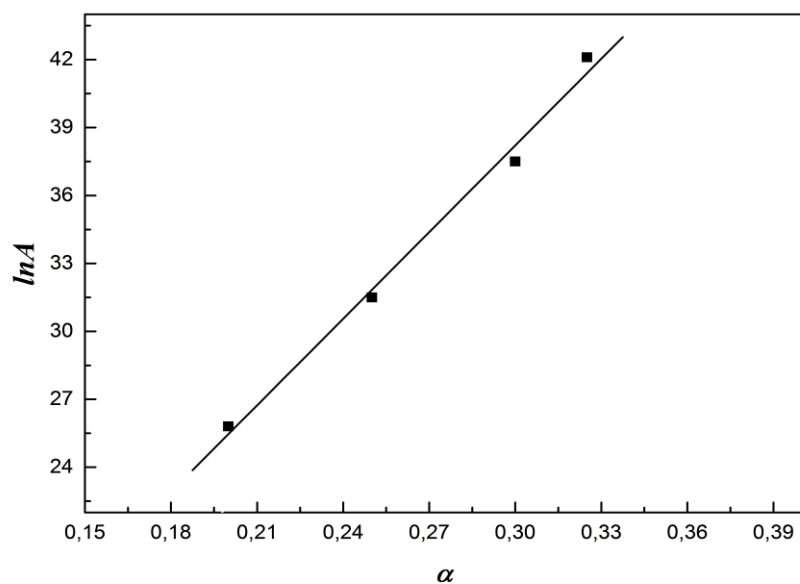
$$\ln A = \ln A^* + a_0\alpha \quad (16)$$

, където E^* и $\ln A^*$ са емпирични константи. Константите B и a_0 по стойност съвпадат с тези определени по уравнение (8).

Получените линейни зависимости са представени на *Фиг. 15* и *Фиг. 16* респективно. Наблюдаваните закономерности се дължат на нееднородния характер на системата ензимен препарат - растителна маса. Изменението на активиращата енергия E в хода на процеса се дължи на нарастване на енергетичните затруднения, които са свързани с изчерпване на най-реактивоспособните центрове на растителната маса.



Фиг. 15. Зависимост на активиращата енергия E от α



Фиг. 16. Зависимост на предекспоненциалния фактор $\ln A$ от α

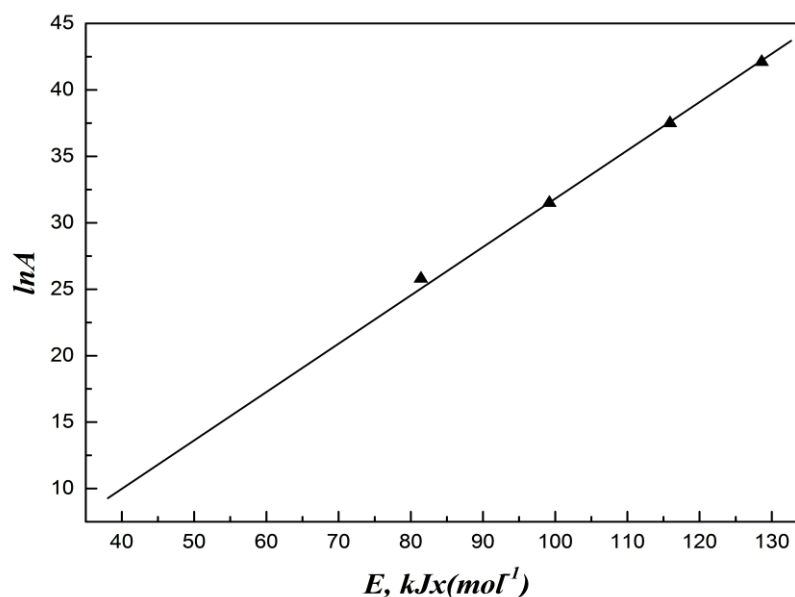
Положителният ефект от ензимното действие е свързан с разрушаване на структурата на растителната маса и до разкриване на нови центрове върху повърхността. Това се изразява в нарастване на предекспоненциалния множител A .

Ензимният комплекс оказва благоприятен ефект върху нарастването на контактната повърхност, тъй като разкриването на нови активни центрове по повърхността води до висока скорост на процеса.

Едновременно нарастване на активизиращата енергия E и на предекспоненциалния множител $\ln A$ с увеличение на степента на протичане на процеса α води до корелация между тях известна като “компенсационен ефект”. Той се описва с уравнение (17) и е представен графично на Фиг. 17.

$$\ln A = n + \left(\frac{a_0}{B} \right) E \quad (17)$$

Благоприятният ефект от ензимното действие е свързан с разрушаване на растителната структура и нарастване на предекспоненциалния множител. Това действие обаче не може да компенсира установените енергетични затруднения в хода на процеса. Следователно определящо влияние върху скоростта, която намалява в хода на процеса има активизиращата енергия.



Фиг. 17. Компенсационен ефект между $\ln A$ и активиращата енергия E

3.2. Кинетичен модел на ензимна хидролиза на пшеничена слама след паровзривна обработка

3.2.1. Температурна зависимост на хидролизния процес

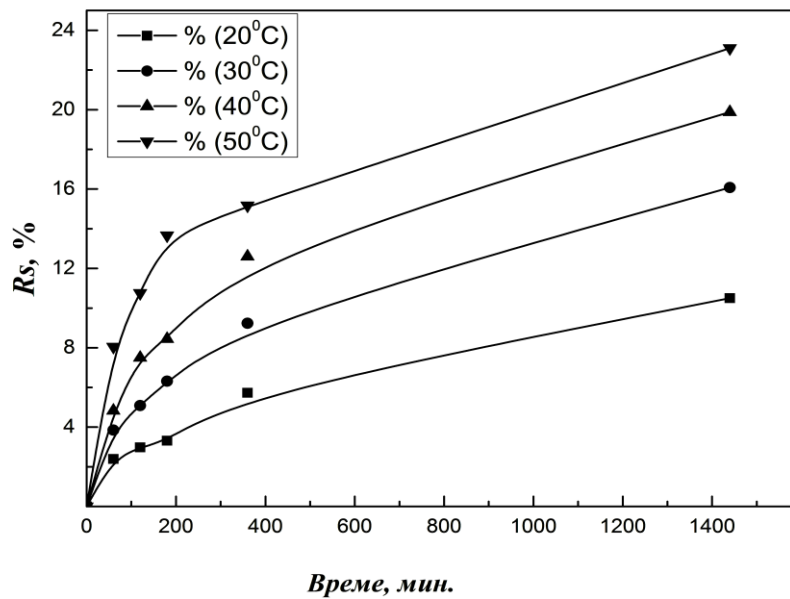
Влиянието на температурата върху ензимната хидролиза е проследено в температурния интервал от 20°C до 50°C при постоянно количество вложен ензим по отношение на масата - 5 % NS 50013 в комбинация с 0.5 % от β -глюкозидазата NS 50010 и реакционно време от 1 до 24 часа. Химичният състав на междинния остатък след паровзривното третиране на пшеничена слама е: количество на целулоза и лигнин са съответно 67.1% и 28.2%, пепелно съдържание – 4.5% и разтворени вещества – 40% от изходната проба.

Въз основа на получените опитни резултати за количеството редуциращи захари R_s след ензимната хидролиза с ензимен комплекс са получени следните кинетични криви при изследваните температури (Фиг. 18).

От получените данни се вижда, че количеството редуциращи захари нараства с времето и се благоприятства от температурата.

Като кинетична променлива в настоящото изследване е използвана безразмерната величина α , която представлява относителното изменение на редуциращите захари и е

изчислена по уравнение (4) при $R_{S_{\max}} = 35\%$, което е максималното количество редуциращи захари получено след 48 часа ензимно третиране.

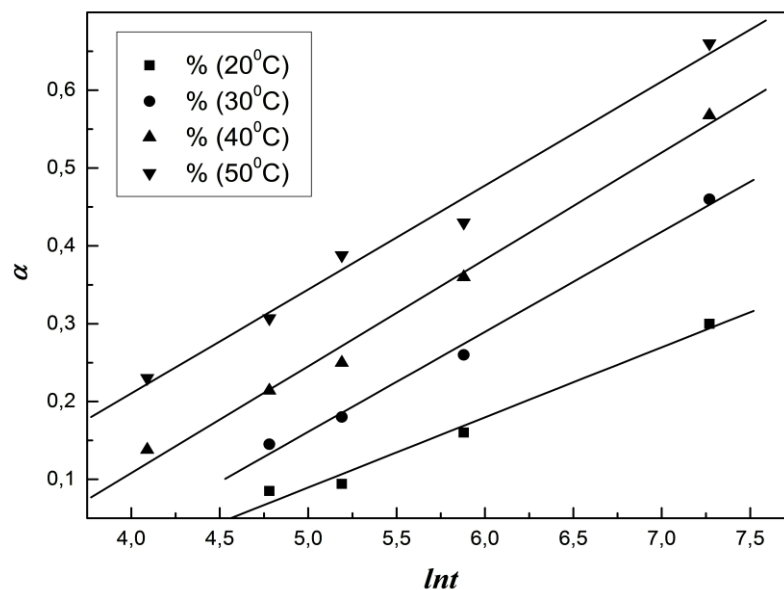


Фиг. 18. Кинетични криви при различни температури и 5 % ензимна концентрация

За описание на кинетиката на процеса е приложено експоненциално кинетично уравнение (5).

Всички кинетични криви се линеализират в координати $\alpha - \ln t$ в съответствие с приближената интегрална форма на експоненциално кинетично уравнение (6).

Получените линейни зависимости са представени на Фиг. 19.



Фиг. 19. Линейна зависимост на кинетичната променлива от $\ln t$

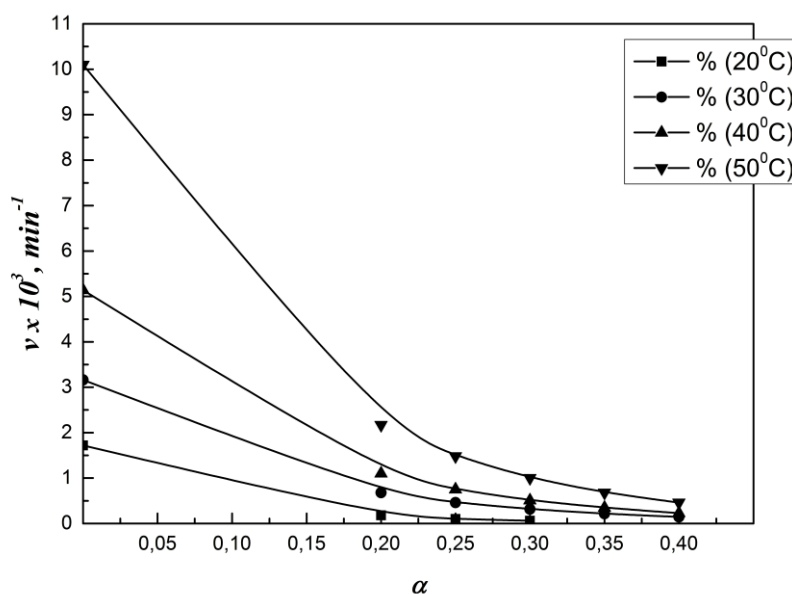
От наклона на получените прави е изчислен коефициентът на нееднородност $a = 7.7$ за температури 30°C , 40°C и 50°C . В случаите, когато коефициентът a не зависи от температурата той отчита само ентропийната нееднородност на системата. Получената линейна зависимост при 20°C не е успоредна на останалите и коефициентът на нееднородност има стойност $a = 11.1$. Резултатите показват, че при тази температура системата не е достатъчно активирана и проявява по-голяма нееднородност, отколкото при по-високите температури.

Въз основа на уравнение (6) са изчислени началните скорости на хидролизния процес, които нарастват с температурата. Техните стойности са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Стойности на началната скорост при различни температури

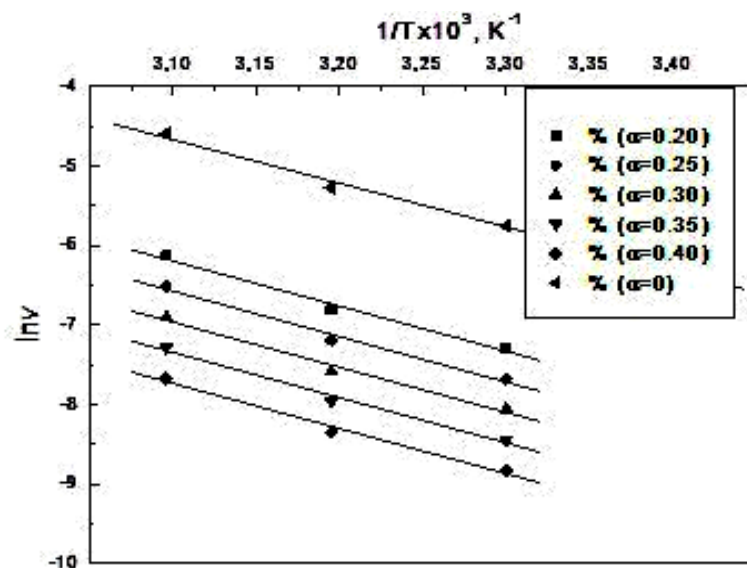
	20°C	30°C	40°C	50°C
$v_0 \times 10^3, \text{min}^{-1}$	1.72	3.16	5.14	11.0

Текущата скорост на ензимна хидролиза при различни стойности на α е изчислена въз основа на уравнение (5) и е представена на Фиг. 20. От фигурата става ясно, че с най-висока скорост процесът протича в началото до около $\alpha = 0.2$, след което хидролизата значително се забавя, най-вероятно поради изчерпване на достъпните активни центрове на повърхността.



Фиг. 20. Текуща скорост на ензимна хидролиза в зависимост от α при различни температури

Температурната зависимост на началната и текуща скорост се описва с уравнението на Арениус (9). Стойностите на активиращата енергия E и на предекспоненциалния множител A са определени при различни стойности на $\alpha=const$ въз основа на логаритмичната форма на уравнението на Арениус (9), представена на *Фиг. 21*.



Фиг. 21. Температурна зависимост на текущата и началната скорост на процеса при $\alpha=const$

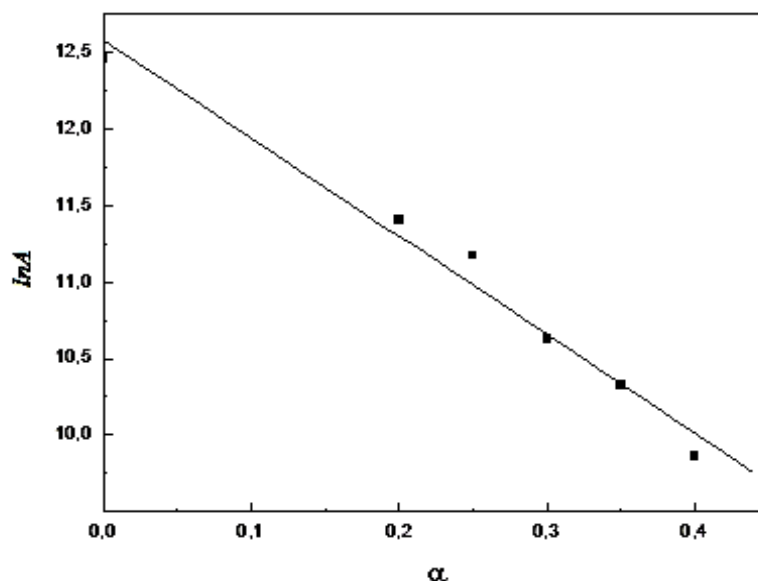
Активиращата енергия, изчислена въз основа на температурната зависимост на началната скорост, има стойност $E_0 = 46 \text{ kJ.mol}^{-1}$ и се отнася за целия температурен интервал. Както се вижда от *Фиг. 21* от температурната зависимост на текущата скорост са изключени стойностите на скоростта при 20°C .

За останалите температури от 30°C до 50°C изчислената активираща енергия, която съвпада с тази изчислена от началната скорост $E = E_0 = 46 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Това показва, че за тези температури системата се отнася като енергетично еднородна. От получените данни може да се направи извод, че при температура 20°C процесът е силно енергетично затруднен, поради което тази температура не е подходяща за провеждане на ензимната хидролиза.

За разлика от активиращата енергия предекспоненциалният множител A намалява с нарастване на степента на хидролиза α . Тази зависимост се описва с уравнение :

$$\ln A = \ln A_0 - a\alpha \tag{18}$$

Получената зависимост е представена на *Фиг. 22*.



Фиг. 22. Зависимост на предекспоненциалния множител от нарастването на α

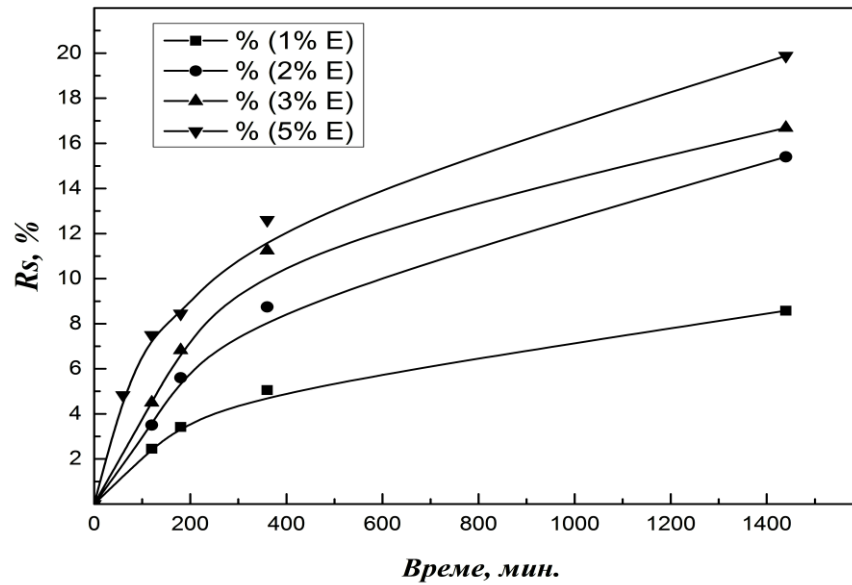
Предекспоненциалният множител A отчита ентропиините фактори на разглежданата система, които са свързани с пространствената ориентация на ензимните молекули и съпътстващите процеси на стерични затруднения. Понижаването на предекспоненциалния множител $\ln A$ в хода на процеса може да се обясни и с намалената достъпност и с изчерпване на активни центрове на повърхността.

Въз основа на получените резултати може да се направи изводът, че определящо значение за понижаване на скоростта в хода на процеса има намалението предекспоненциалния множител, т.е. определящо влияние имат не енергетичните, а комплексните ентропийни фактори.

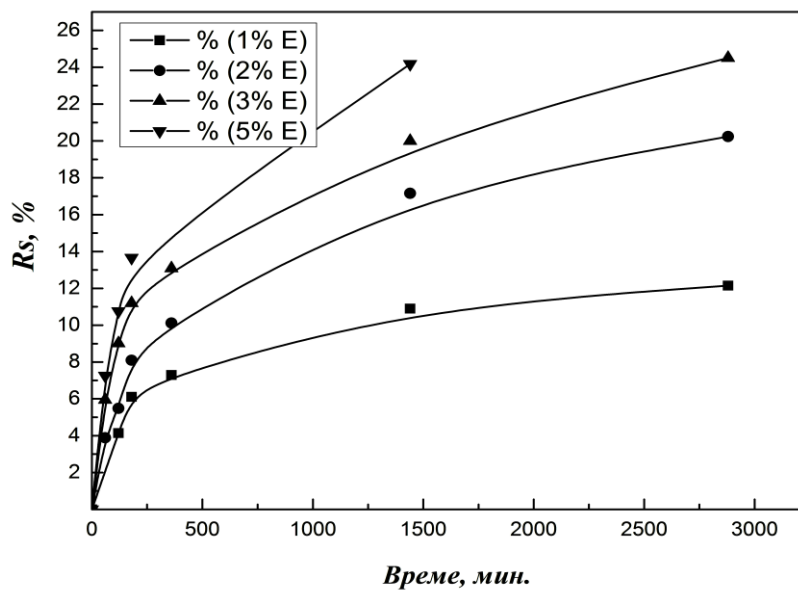
3.2.2. Концентрационна зависимост на хидролизния процес

Влиянието на концентрацията на ензимния комплекс върху кинетиката на хидролизния процес е проследено при 1%, 2%, 3% и 5% количество вложен ензим по отношение на масата. Експериментите са проведени при 40°C и 50°C.

Получените опитни данни за количеството редуциращи захари R_s след ензимната хидролиза в зависимост от времето при температури 40°C и 50°C са представени на *Фиг. 23* и *Фиг. 24*.



Фиг. 23. Кинетични криви на нарастване на редуциращите захари R_s за изследваните количества ензим при температура 40°C

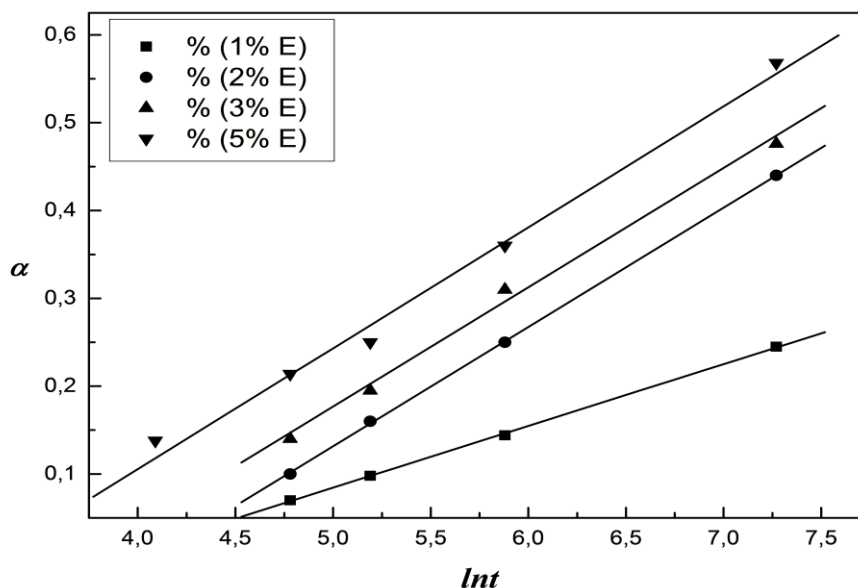


Фиг. 24. Кинетични криви на нарастване на редуциращите захари R_s за изследваните количества ензим при температура 50°C

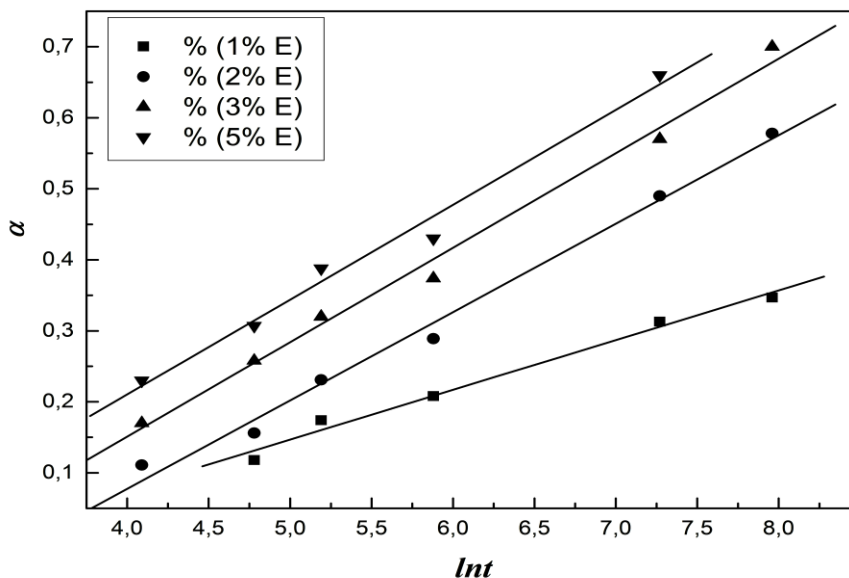
Както се вижда от *Фиг. 23* и *Фиг. 24* количеството на редуциращите захари R_s нараства с увеличение на количеството на вложения ензим, като това увеличение е по-голямо при по-високата температура.

За описание на кинетиката на процеса при кинетична променлива степен на хидролиза α (уравнение 4) е използвано експоненциално кинетично уравнение (5), чиято приложимост вече бе потвърдена.

Всички кинетични криви се линеализират в координати $\alpha - lnt$ при изследваните температури и количества ензим (Фиг. 25 и Фиг. 26).



Фиг. 25. Линейна зависимост на α от lnt за различни количества ензим при температура 40°C



Фиг. 26. Линейна зависимост на α от lnt за различни количества ензим при температура 50°C

Установено е, че кинетичният коефициент на нееднородност има стойност $a = 7.7$ за двете изследвани температури и е еднакъв за ензимни концентрации 2%, 3% и 5%.

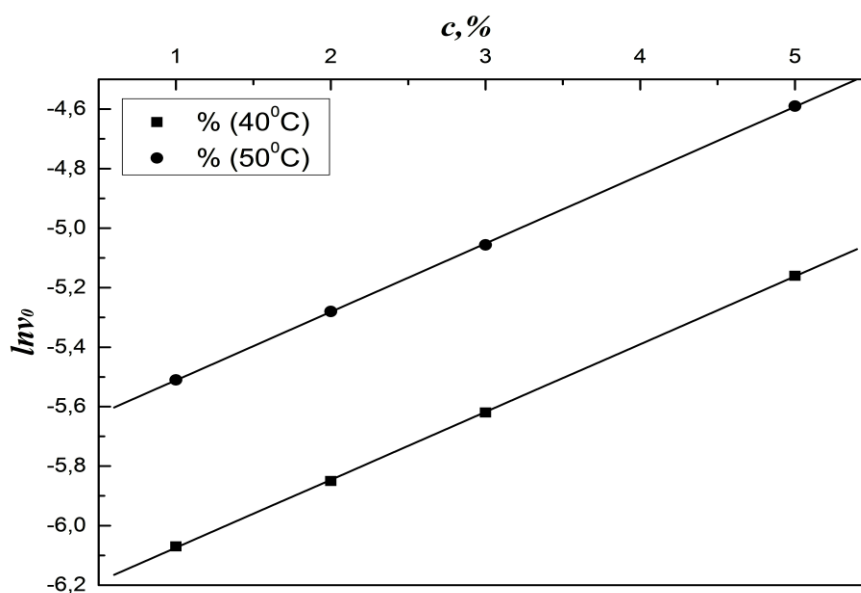
Изключение прави само ензимна концентрация 1%, където $a = 14.2$, което говори за затруднения в хода на процеса, вероятно поради недостатъчно количество ензим.

Изчислени са стойностите на началната скорост на процеса v_0 (уравнение 6), която зависи от температурата и от количеството на ензима (Таблица 11).

Таблица 11. Стойности на началната скорост при различни количества ензим за изследваните температури.

$c_E, \%$	$v_0 \times 10^3, \text{min}^{-1}$	
	$T=40^\circ\text{C}$	$T=50^\circ\text{C}$
1	2.30	4.03
2	2.88	5.07
3	3.62	6.37
5	5.74	10.10

На Фиг. 27 е представена зависимостта на логаритъма на началната скорост от количеството вложен ензим при изследваните температури.



Фиг. 27. Зависимост между $\ln v_0$ и количеството вложен ензим c

Тази зависимост на началната скорост от нарастването на вложеното количество ензим може да се опише със следното уравнение, валидно и за двете изследвани температури:

$$v_0 = ke^{bcE} \quad (19)$$

, където b е коефициент равен на $b = 0.23$, който не зависи от температурата и от количеството ензим, а k има смисъл на привидна скоростна константа. За температура $T=40^{\circ}\text{C}$ $k = 1.83 \times 10^{-3}, \text{ min}^{-1}$, а за $T = 50^{\circ}\text{C}$ $k = 3.2 \times 10^{-3}, \text{ min}^{-1}$.

Изчислената привидна активираща енергия E_c , въз основа на получените скоростни константи (уравнение 20) съвпада с получената по температурната зависимост на скоростта при 5% вложен ензим ($E_c = 46.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

$$k = \lambda e^{-\frac{E_c}{RT}} \quad (20)$$

Предекспоненциалният множител в уравнението на Арениус (20) има стойност $\lambda=8 \times 10^4, \text{ min}^{-1}$.

При заместване на уравнение (20) и уравнение (19) се получава следният израз за текущата скорост на процеса:

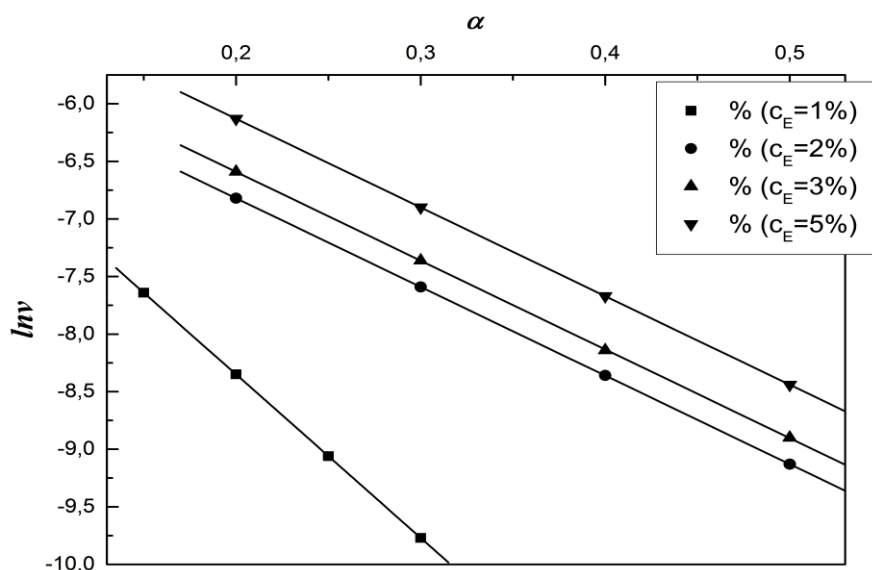
$$v = ke^{(bcE-a\alpha)} \quad (21)$$

Съгласно полученото уравнение (21) са изчислени текущите скорости на хидролиза при различни стойности на степента на хидролиза α и при изследваните количества ензим (Фиг. 28).

Както се вижда от Фиг. 28 текущата скорост нараства с увеличаване на количеството вложен ензим и намалява в хода на процеса.

След заместване на уравнение (20) в уравнение (21) се получава следния обобщен израз за текущата скорост, който отчита влиянието на температурата, степента на хидролиза и количеството на ензима:

$$v = \lambda e^{(bcE-a\alpha)} e^{-\frac{E}{RT}} \quad (22)$$



Фиг. 28. Зависимост на текущата скорост v от степента на хидролиза α при 50°C

Специфично за системата ензим – субстрат е, че се отнася като енергетично еднородна (активиращата енергия не се променя в хода на процеса), предекспоненциалният множител зависи от степента на хидролиза и концентрацията на ензима. Тази зависимост се описва със следния израз (23):

$$A = \lambda e^{(bc_E - a\alpha)} \quad (23)$$

При съпоставяне на уравнения (19) и (20) с уравнение (6) за степента на хидролиза е получена следната зависимост от времето t , концентрацията на ензима c_E и температурата T :

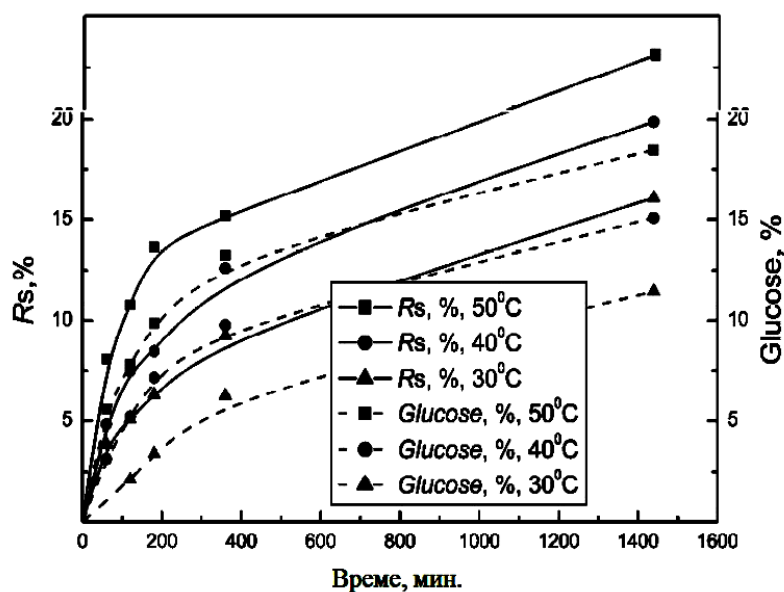
$$\alpha = \frac{1}{a} \ln(\lambda at) + \frac{b}{a} c_E - \frac{E}{aRT} \quad (24)$$

Този израз има и практическо значение, защото би могло чрез неговото прилагане да се предвиди желаната степен на хидролиза, като предварително се изберат температура, време и количество ензим.

3.3. Сравнителен кинетичен анализ на ензимната хидролиза след паро-взривна обработка на пшенична слама

Кинетиката на хидролизния процес е проследено в температурния интервал от 30°C до 50°C при постоянно количество вложен ензим по отношение на масата - 5% NS 50013 в комбинация с 0.5% от β -глюкозидазата NS 50010 и реакционно време от 1 до 24 часа.

Увеличаването на количеството редуциращи захари (R_s ,%) и глюкоза (G ,%) с времето при различни температури са представени на Фиг. 29.



Фиг. 29. Кинетични криви на нарастване на редуциращите захари R_s и G при различни температури

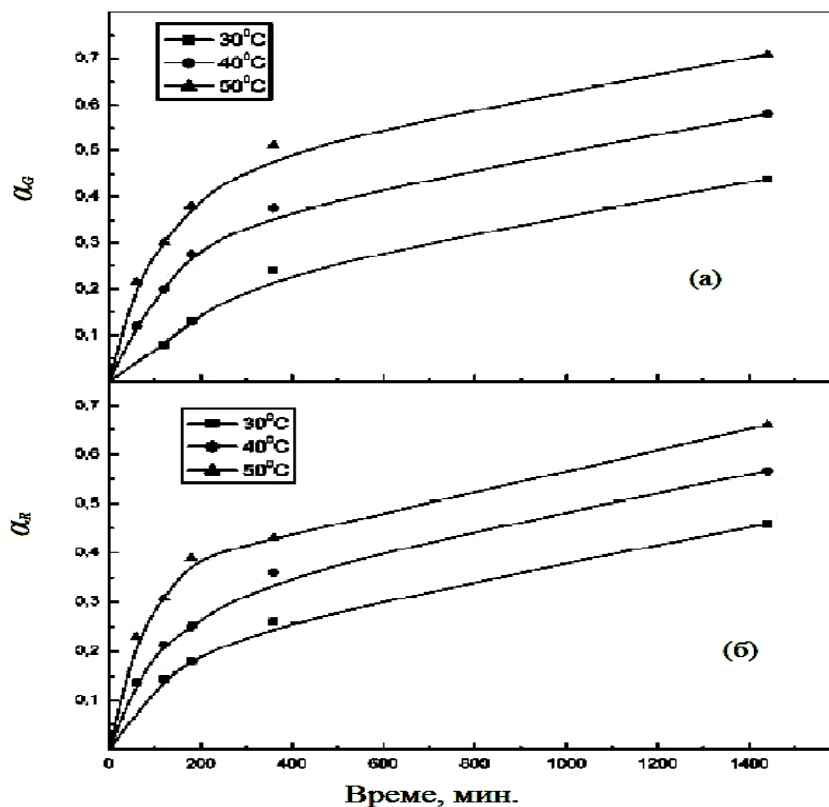
Фиг. 29 показва, че количеството на редуциращите захари (R_s) е по-висока от това на глюкозата (G), независимо от времето и температурата. Например, $R_s = 23.1\%$, докато $G = 18.46\%$ при 24-ия час от експеримента, проведен с температура 50°C (съотношението $R_s/G = 1.25$). Фиг. 29 също така показва, че кинетичните криви, получени за двата продукта имат подобна форма, която, от своя страна, предполага корелация чието изясняване е важно за разбирането на механизма на процес на хидролиза.

Безразмерната величина α_R изчислена от уравнение (4) е използвана като кинетична променлива по отношение на редуциращи захари, а α_G е използвана за глюкозата и изразява относителна промяна в количество глюкоза, съгласно уравнение (7). Максималното количество на редуциращите захари (R_{smax}) е равно на 35%, а

максималното количество на глюкоза (G_{max}) е равно на 26% след 48 часово ензимно третиране.

На *Фиг. 30* са представени кинетичните криви на двете променливи, които се увеличава с нарастване на времето и температура.

И в двата случая, процесът на ензимна хидролиза може да бъде описан от експоненциално кинетично уравнение (5).



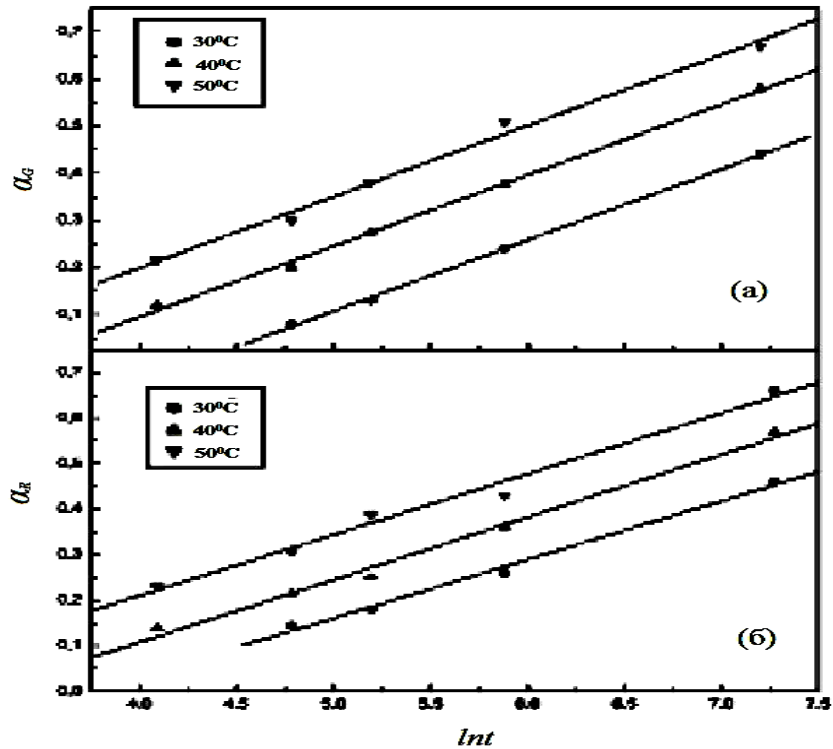
Фиг. 30. Кинетични криви на α_R (а) и α_G (б)

Кинетичният коефициент a на енергийна и ентропийна нехомогенност на системата, е всъщност температурно зависима. Също коефициент е свързан с броя на активните центрове, на тяхната достъпност и пространствена ориентация.

Всички кинетични криви се линеаризират в координати $\alpha - \ln t$, според приблизителната интеграл форма на (6).

Получените линейните зависимости са представени на *Фиг. 31*.

Полученият наклон на кривите позволява оценка на коефициенти на нехомогенност. Установено е, че $a_R = 7.7$, докато $a_G = 6.7$.



Фиг. 31. Линейните зависимости $\alpha_R - \ln t$ (a) и $\alpha_G - \ln t$ (b)

Както се вижда на Фиг. 31, ходът на линейни зависимости е аналогичен, т.е. кинетичните коефициенти α_R и α_G не зависят от температура, следователно отчитат само ентропията на нехомогенността на системата.

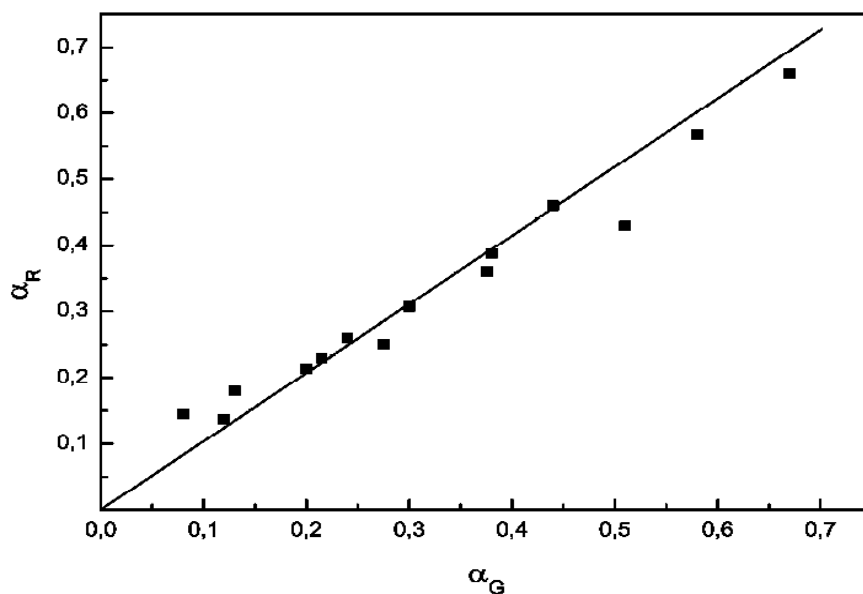
Съпоставянето на интегралните форми и за двете кинетични променливи осигурява корелация между степента на хидролиза α_R и α_G , дефинирана като:

$$\alpha_R = \frac{1}{\alpha_R} \ln \frac{v_{0R} a_R}{v_{0G} a_G} + \frac{a_R}{a_G} \alpha_G \quad (25)$$

е валидна по всяко време на процеса и при всяка разгледана температура. Линейна корелация между α_R и α_G е илюстрирана на Фиг. 32.

Наклонът на линията позволява да се определи съотношение на коефициентите на нехомогенност a_R/a_G , която не зависи от температурата, като α_R и α_G са температурно независими. Линия, минаваща през началото на координатната система, води до следното най-вероятно съотношение (26) :

$$\frac{a_R}{a_G} = \frac{\alpha_G}{\alpha_R} = 0,87 \quad (26)$$



Фиг. 32. Корелация между степените на хидролиза α_R и α_G

Произлязлата връзка може да бъде представена само като съотношението на текущите стойности на R_s и G изчислена според уравнения. (4) и (7). Тогава резултати са:

$$\frac{a_R}{a_G} = \frac{(R_s/35)}{(G/36)} = 0,87 \quad (27)$$

Тогава следва :

$$R_s = 1,2G \quad (28)$$

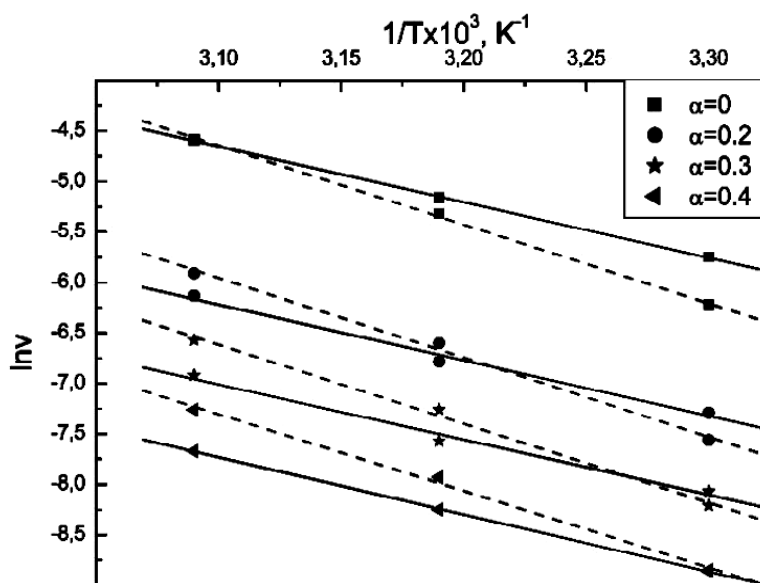
Създадената връзка е просто установена с експерименталните данни за R_s и G , получени по всяко време на процеса, и при всяка температура Фиг. 29. Полученият теоретичният модел, може да се прилага точно при 50°C за кинетичните променливи α_R и α_G , докато някои отклонения се наблюдава при по-ниски температури.

Стойностите на активиране на енергия E_0 и на предекспоненциалния множител A_0 се оценява с помощта на уравнението на Арениус приложено към първоначалната скорост на процеса :

$$v_0 = A_0 e^{-\frac{E_0}{RT}} \quad (29)$$

Съответните линеализирани зависимости са представени на *Фиг. 33*.

Стойността на активиращата енергията, изчислена въз основа на температурната зависимост от първоначалната скорост, определена за редуциращи захари, т.е. $E_{0,R}$ е равна на $46.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, а този на глюкоза, т.е. $E_{0,G}$ е равна на $66.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Предекспоненциалните множители, изчислени за редуциращи захари и глюкоза са съответно: $\ln A_{0,R} = 12.4$ и $\ln A_{0,G} = 19.9$.



Фиг. 33. Температурна зависимост на текущата скорост от $\alpha_R = const$ (—) и $\alpha_G = const$ (-----)

Уравнение (5) се използва за оценка на текущата скорост v на процеса на хидролиза. Получените стойности са обобщени в *Таблица 12*. и показват, че текущата скорост на хидролиза намалява по време на процеса, независимо от използваната кинетична променлива.

Таблица 12. Зависимост на скоростта v , min^{-1} на ензимната на хидролиза от $\alpha_R = \alpha_G = \alpha$ при различни температурни стойности

$\alpha_R = \alpha_G = \alpha$	$v_R \times 10^3, \text{min}^{-1}$			$v_G \times 10^3, \text{min}^{-1}$		
	$T=30^\circ\text{C}$	$T=40^\circ\text{C}$	$T=50^\circ\text{C}$	$T=30^\circ\text{C}$	$T=40^\circ\text{C}$	$T=50^\circ\text{C}$
0	3.16	5.70	10.10	1.99	4.90	10.20
0.2	0.68	1.10	2.17	0.53	1.37	2.68
0.3	0.32	0.51	1.00	0.27	0.70	1.37
0.4	0.14	0.23	0.27	0.13	0.36	0.70

Процесът на хидролиза е свързан с образуването на глюкоза. Получените експериментални резултати показват, че това образуване е възпрепятствано енергично в началото на процеса. По-ниските начални скорости на хидролизата (*Таблица 10.*) подкрепят това заключение. Също така е важно да се отбележи, че степените на хидролиза α_R и α_G , са равни при 50°C, което показва, че първоначалните характеристики при тази температура не зависят от използваната кинетична променлива

За разлика от активиращата енергия стойността на предекспоненциалния множител A намалява с увеличаване на степента на хидролиза, както за редуциращи захари така и за глюкозата. Тази зависимост може да се опише с уравнение:

$$\ln A = \ln A_0 - a_0 \alpha \quad (30)$$

Данните, получени съгласно уравнение (30), са представени в *Таблица 13.*

Таблица 13. Зависимост на $\ln A_R$ и $\ln A_G$ от α

α	$\ln A_R$	$\ln A_G$
0	12.4	19.9
0.2	10.86	18.56
0.4	10.09	17.89
0.5	9.32	17.22

Предекспоненциалният множител е свързан с брой на активните центрове на разглежданата система, за тяхната достъпност и пространствена ориентация. Като цяло това представлява ентропията на нееднородност на пшенична слама – ензимна система.

Скоростта на процеса се влияе и от двете - активиращата енергия и предекспоненциалния множител.

Когато тези противодействащи фактори се сменят едновременно и еднопосочно в хода на процеса, ефектът на компенсация, известен в хетерогенната кинетика, се наблюдава и описана от израза:

$$\Delta \ln A = m \Delta E \quad (31)$$

Този ефект се изразява като пропорционалност между смяната на произведенията в логаритъм на предекспоненциалния множител и в активиращата енергия. Коефициентът на пропорционалност m е свързан с така наречената изокинетична температура T^* , при която скоростта остава постоянна и се дължи на пълна компенсация на действие – противодействие на E и $\ln A$:

$$m = \frac{1}{RT^*} \quad (32)$$

По време на ензимната хидролиза, сродните изследвани кинетични променливи α_R (4) и α_G (7), разликата в активиращата енергия $\Delta E = E_G - E_R$ остава постоянна.

Въпреки това логаритми на предекспоненциалния множител са се променили, тъй като тя се определя от степен на хидролиза, съгласно уравнение (30). Съща стойност на степента на хидролиза $\alpha_G = \alpha_R = \alpha$, $\ln A = \ln A_G - \ln A_R$ проследява получения израз :

$$\Delta \ln A = \Delta \ln A_0 - \Delta a\alpha \quad (33)$$

, където $\Delta \ln A = \ln A_{0,G} - \ln A_{0,R}$ и $\Delta a = a_G - a_R$ представляват промените в коефициентите на нехомогенност.

Заместването в уравнение (31) и уравнение (33), може да се получи форма на компенсационен ефект, в която коефициент на пропорционалност m включва степента на хидролиза и коефициентите на нехомогенност :

$$m = \frac{(\Delta \ln A_0 - \Delta a\alpha)}{\Delta E} \quad (34)$$

Решението на (32) и (34) води до :

$$T^* = \frac{\Delta E}{(\Delta \ln A_0 - \Delta a\alpha)R} \quad (35)$$

За системата тук съгласно проучването на изокинетичната температура T^* може да се изчисли чрез последващото емпирично уравнение:

$$T^* = \frac{20 \times 10^3}{(7.5 + \alpha)R} \quad (36)$$

, където $\Delta E = 20 \times 10^3 \text{ kJ}(\text{mol})^{-1}$, $\ln A_0 = 7,5$ и $\Delta a = -1$.

Изокинетичните температури T^* , изчислени от уравнение (36) при различни стойности на степента на хидролиза, са представени в Таблица 14. Важно наблюдение е, че теоретично получените стойности на T^* практически съвпадат с експериментално получените, представени на Фиг. 28.

Таблица 14. Изокинетичните температури T^* при различна степен на хидролиза α сравнени с началната скорост на глюкоза v_G и редуциращи захари v_R

α	T°, K	Сравнение на скоростите v_G, mol^{-1} и v_R, mol^{-1}	Определящи фактори $v_G,$ mol^{-1}
0	320.7	$v_{0,G} < v_{0,R}$ и $T < T^*$	Активираща енергия $E_G > E_R$
0.2	312.4	$v_G > v_R$ и $T > T^*$ $v_G < v_R$ и $T < T^*$	Предекспоненциален множител $\ln A_G > \ln A_R$ Активираща енергия $E_G > E_R$
0.4	304.5	$v_G > v_R$ и $T > T^*$	Предекспоненциален множител $\ln A_G > \ln A_R$

В началото на процеса, когато $\alpha_R = \alpha_G = 0$, $T^* = 47.7^\circ\text{C}$. При температури под 47.7°C , началната скорост на редуциращи захари е по-висока от тази, намерена за глюкоза ($v_{0,R} > v_{0,G}$). Ефектът на активиращата енергия е установен над тази температурна стойност. Стойността на T^* намалява по време на процеса, т.е. с увеличаване на степента на хидролиза. Например, T^* равна на 31.5°C и $v_G = v_R$, когато $\alpha_R = \alpha_G = 0.4$. При температури по-високи от 31.5°C , ефектът на предекспоненциалния множител става доминиращ, което води до по-висока скорост на образуване на глюкоза, т.е. $v_G > v_R$.

Изследваната кинетика на ензимната хидролиза с целулазен комплекс NS 50013 и NS 50010 на царевични стебла след киселинно третиране и на пшеничена слама след паровзривно третиране показва приложимостта на експоненциалното кинетично уравнение по отношение както към редуциращите захари така и спрямо глюкозата.

Установено е едновременно нарастване на активиращата енергия и на предекспоненциалния множител в хода на хидролизата на царевичните стъбла. Скоростта на процеса намалява поради определящото влияние на енергетичните затруднения.

Наблюдава се линейна корелация между двете кинетични променливи (R_s и G) при пшеничената слама. Намерена е форма на компенсационен ефект между активиращата енергия и предекспоненциалния множител при пшеничената слама. Определена е изокинетична температура, над която предекспоненциалният множител може да стане преобладаващ фактор, което да доведе до по-голямо образуване на глюкоза.

4. Кинетични изследвания на ензимна хидролиза на царевични стъбла и пшеничена слама с ензимния комплекс NS 22086 и NS 22118

4.1. Кинетични изследвания на царевични стъбла и пшеничена слама след предварително високотемпературно третиране

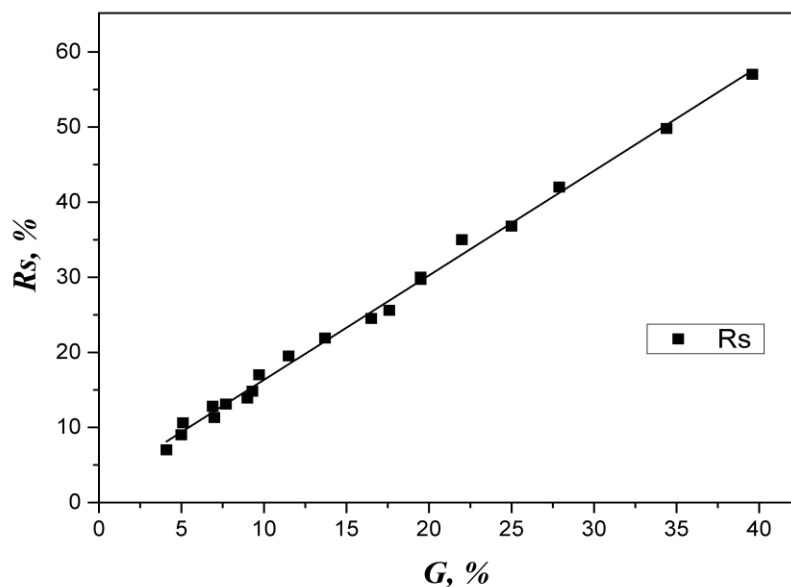
4.1.1. Температурна зависимост на ензимната хидролиза

Влиянието на температурата върху ензимната хидролиза е проследено в температурния интервал от 20°C до 60°C при постоянно количество вложен ензим по отношение на масата.: 5% високо активен целулазен комплекс NS 22086 в комбинация с 0.5% β -глюкозидазата NS 22118. Химичният състав на междинния остатък е:

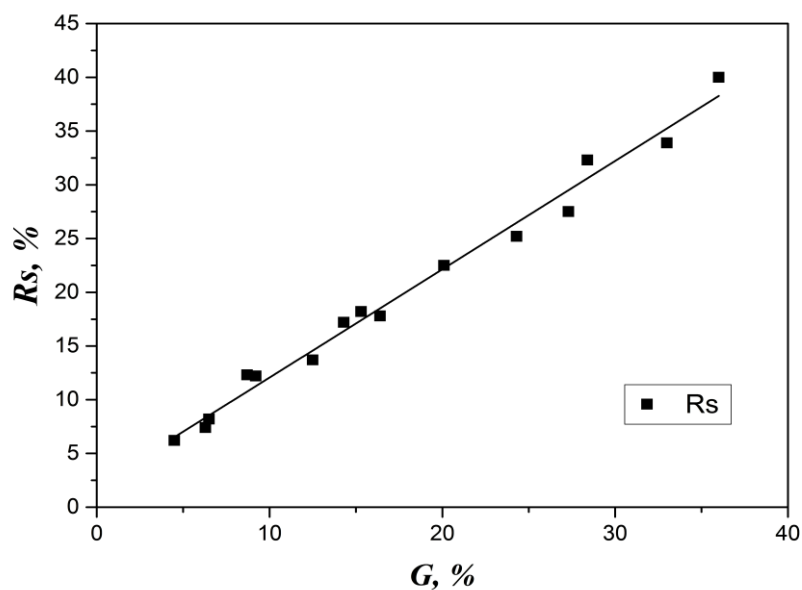
➤ за царевични стъбла: съдържание на целулоза – 60.1%, съдържание на лигнин – 28.6%, водоразтворими вещества – 38% и пепел – 4.9%.

➤ за пшеничена слама: съдържание на целулоза – 67.1%, съдържание на лигнин – 28.2%, водоразтворими вещества – 40% и пепел – 4.5%.

Корелационната зависимост на получените количества глюкоза G и редуциращите захари R_s на двете анализирани суровини е показана на *Фиг. 34.* и *Фиг. 35.*



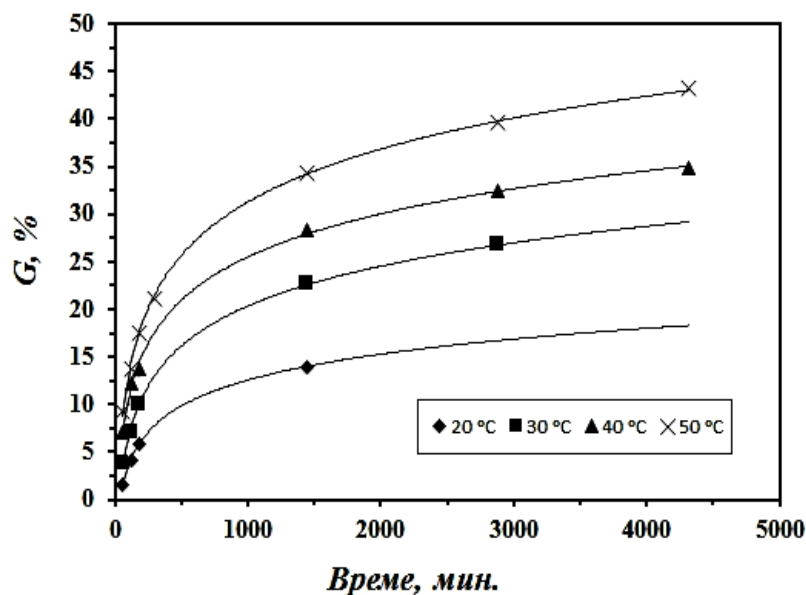
Фиг. 34. Корелационна зависимост между количество глюкоза G и редуциращите захари R_s на царевични стъбла



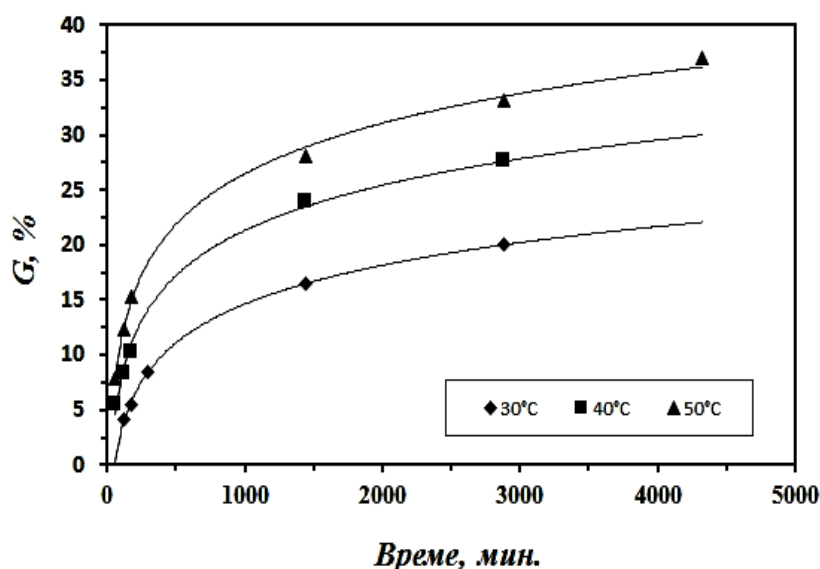
Фиг. 35. Корелационна зависимост между количество глюкоза G и редуциращите захари R_s на пшеничена слама

Благодарение на линейната зависимост между глюкоза и редуциращи захари, при наличието на единия параметър лесно може да се изчисли стойността на другия.

Въз основа на получените опитни резултати за количеството глюкоза G , след ензимната хидролиза, са получени следните кинетични криви при изследваните температури (Фиг. 36 и Фиг. 37).



Фиг. 36. Зависимост на количеството глюкоза от времето за царевични стъбла



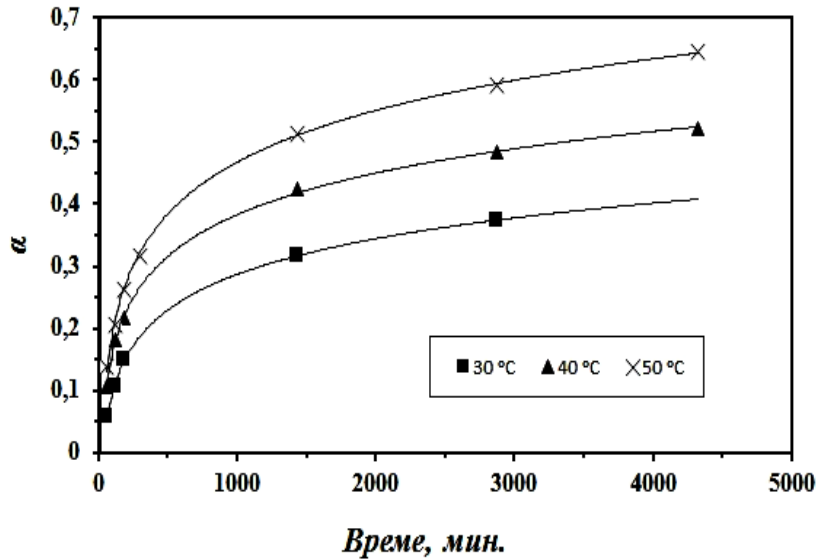
Фиг. 37. Зависимост на количеството глюкоза от времето за пшеничена слама

От получените данни се вижда, че количеството глюкоза нараства с времето и се благоприятства от температурата.

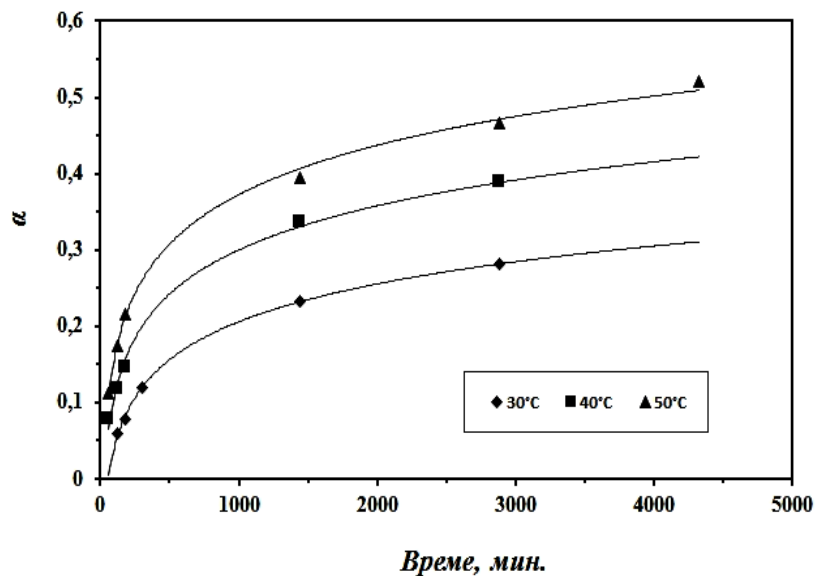
Температурата от 60°C е неблагоприятна за ензимна хидролиза, поради инактивация на ензимния продукт.

Като кинетична променлива е използвана безразмерната величина α изчислена от уравнение (7). Максималното количество глюкоза за царевични стъбла е $G_{\max} = 69.9\%$, а за пшеничената слама $G_{\max} = 71.1\%$.

Въз основа на получените данни за изменение на α с течение на времето t , при различните температури T са построени кинетични криви, представени на Фиг. 38. и Фиг. 39.



Фиг. 38. Кинетични криви на нарастване на степента на хидролиза α в хода на процеса при изследваните температури на царевични стъбла



Фиг. 39. Кинетични криви на нарастване на степента на хидролиза α в хода на процеса при изследваните температури на пшеничена слама

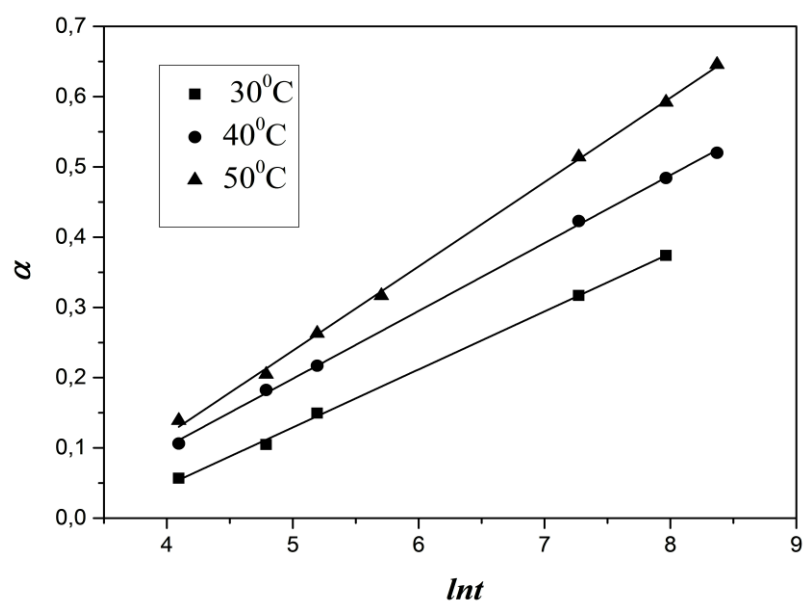
Установена е приложимостта на експоненциалното кинетично уравнение (5), описващо кинетиката на хетерогенни химични процеси (с коефициент на статистическо съвпадение: $R^2=0.998 - 0,996$ за изследвания температурен интервал).

Кинетичният коефициент на нееднородност a отчита влиянието както на енергетичните, така и на ентропийните фактори върху скоростта на процеса. В общия случай той зависи от температурата съгласно уравнение (8).

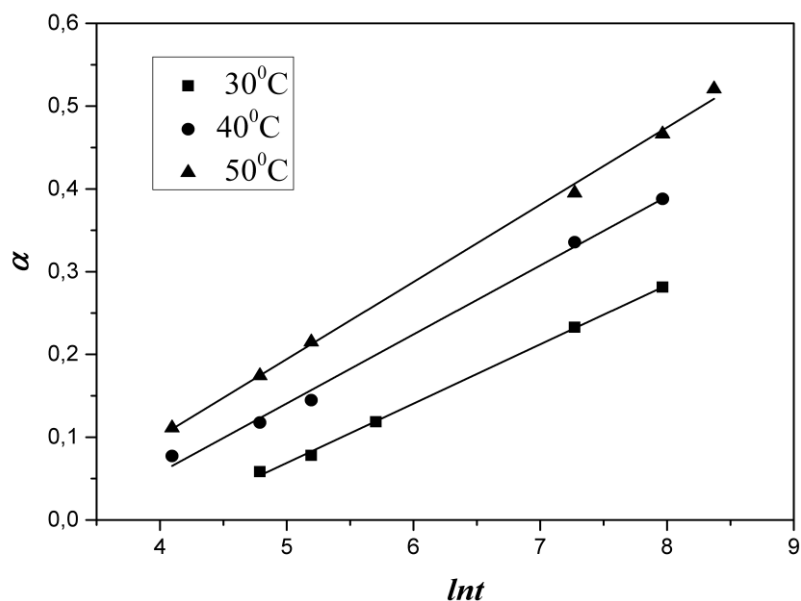
Константата B описва интервала на енергетична нееднородност, който отчита наличието на активни центрове с различна енергетична стойност. Константата a_0 характеризира ентропийната нееднородност на повърхността, която се дължи на променящия се в хода на процеса брой на активните центрове, както и различната им достъпност.

За изследване на ензимната хидролиза на целулозната повърхност е приложимо експоненциалното кинетично уравнение в неговата приближена интегрална форма (6).

Линейна зависимост между степента на хидролиза α и логаритъма на времето t , за двата вида суровини са представени на *Фиг. 40* и *Фиг. 41* за целия температурен интервал.



Фиг. 40. Линеализиране на кинетичните криви в координата $\alpha - lnt$ на царевични стъбла



Фиг. 41. Линеализиране на кинетичните криви в координата $\alpha - lnt$ на пшеничена слама

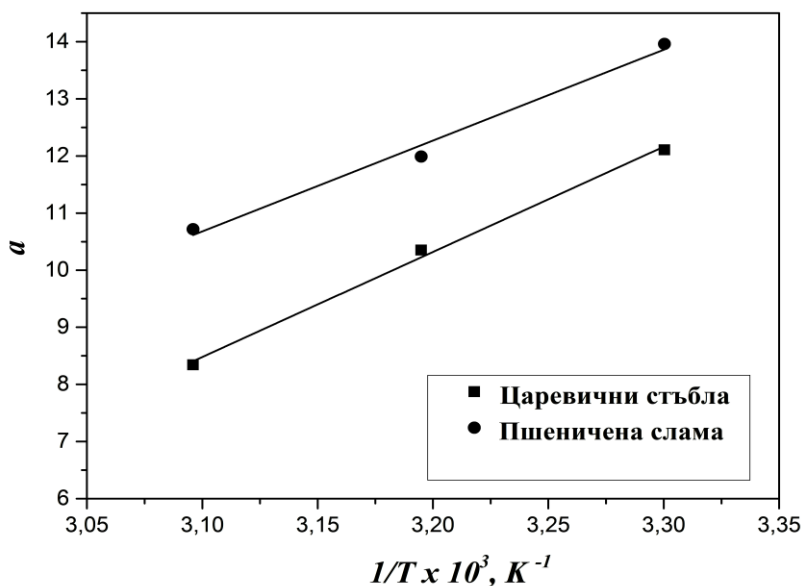
От наклона и отреза на получените прави (уравнение 6) е определен кинетичният коефициент на нееднородност a , който зависи от температурата и предполага енергетична и ентропийна нееднородност на повърхността и началната скорост v_0 . Стойностите на коефициента a и началната скорост v_0 при различните температури са представени в Таблица 15.

Таблица 15. Стойности за a и v_0 , при различни температури, за двете изследвани суровини

	30 °C		40 °C		50 °C	
	П.слама	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла
a	13.96	12.1	12.0	10.45	10.72	8.34
$v_0 \times 10^3, \text{min}^{-1}$	1.25	2.65	3.03	5.09	5.03	5.92

Както се вижда от Таблица 15, коефициентът на нееднородност a има по-големи стойности при пшеничената слама, в сравнение с царевичните стъбла. Това показва, че пшеничената сламата е по-нееднородна в енергетично и ентропийно отношение, което води до по-ниски стойности на началните скорости.

От представените данни става ясно, че коефициентът на нееднородност a зависи от температурата. На Фиг. 42 е показана линейната зависимост на коефициента a от реципрочната стойност на температурата T , съгласно уравнение (6).



Фиг. 42. Линейна зависимост между коефициента на нееднородност a и температурата T на царевични стъбла

От наклона и отреза на получените прави са изчислени стойностите на интервала на енергетична нееднородност B и този на ентропийна нееднородност a_0 : за царевичните стъбла – $B = 152.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ и $a_0 = 48.5$, за сламата - $B = 131.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$ и $a_0 = 34.4$.

Въз основа на получените стойности на коефициента на нееднородност a са изчислени текущите скорости на ензимния процес v (Таблица 16.), при определена степен на хидролиза $\alpha = const$ за опитните температури, съгласно израза (5).

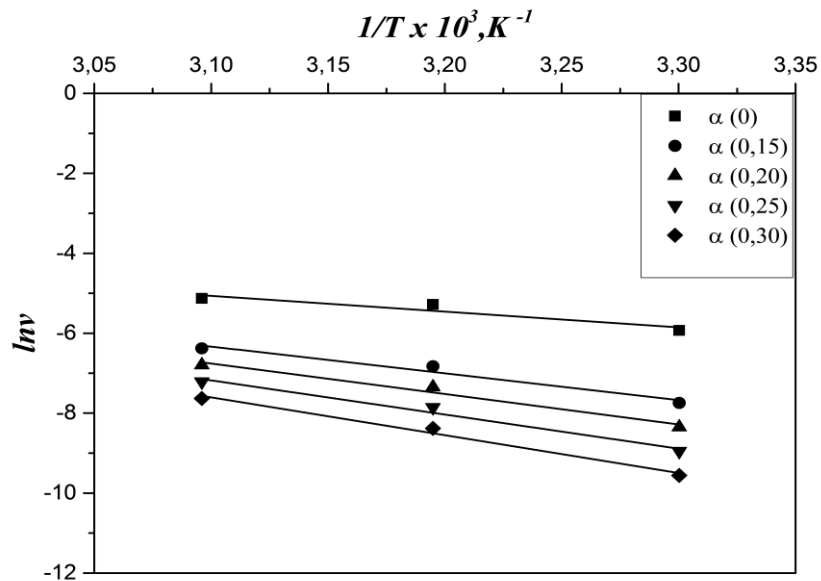
Таблица 16. Зависимост между скоростта v, min^{-1} и степента на хидролиза α

α	$v \times 10^3, \text{min}^{-1}$					
	30°C		40°C		50°C	
	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	П.слама
0	2.65	1.25	5.09	3.03	5.92	5.03
0.15	0.43	0.15	1.08	0.50	1.70	1.01
0.20	0.24	0.07	0.64	0.27	1.11	0.59
0.25	0.13	0.04	0.38	0.15	0.73	0.34
0.30	0.07	0.02	0.23	0.08	0.48	0.20

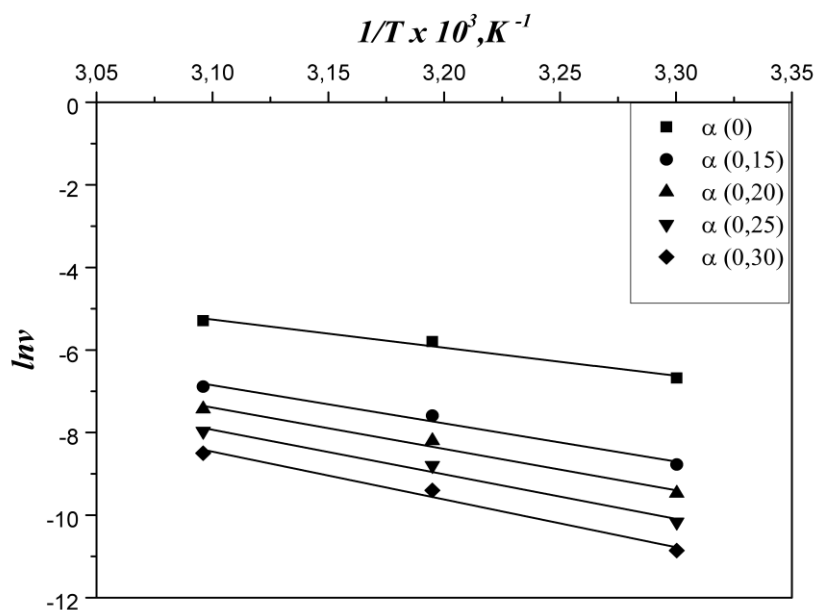
От получените стойности за скоростта на процеса следва, че с нарастване на степента на хидролиза скоростта намалява независимо от температурата, съгласно уравнение (14).

При сравнение на получените данни за двете суровини се вижда, че хидролизният процес протича с по-ниска скорост при сламата, което потвърждава извода за влиянието на коефициента на нееднородност a . Изследвана е температурната зависимост на началната и текуща скорост, съгласно уравнението на Арениус.

На Фиг. 43 и Фиг. 44 са представени линейните зависимости на текущите скорости v от реципрочната стойност на температурата T , при различна степен на хидролиза, за двете суровини.

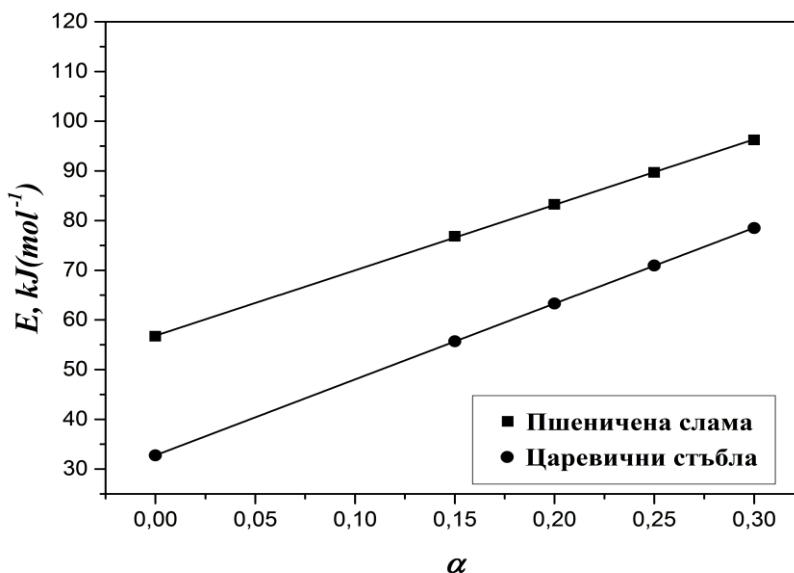


Фиг. 43. Зависимост между текущата скорост v , min^{-1} и $1/T$ на царевични стъбла

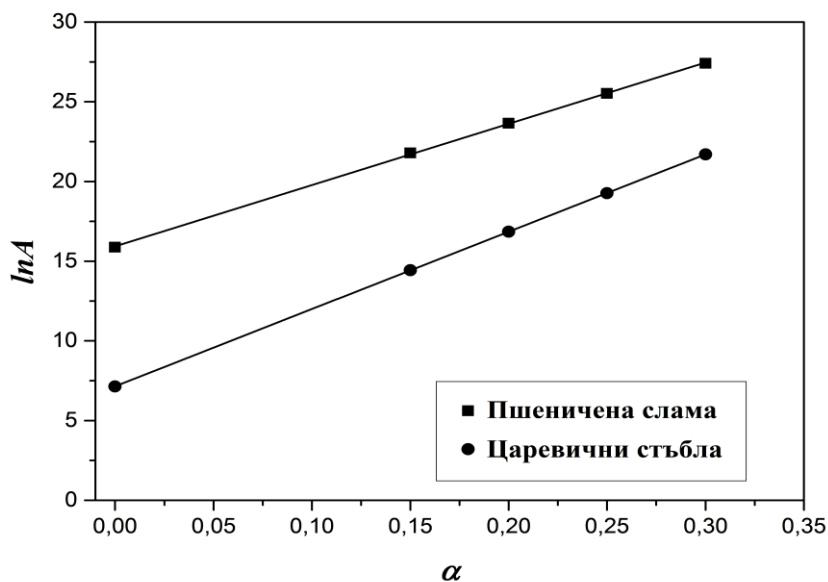


Фиг. 44. Зависимост между текущата скорост v , min^{-1} и $1/T$ на пшеничена слама

Въз основа на уравнението на Арениус са изчислени стойностите на активиращата енергия E и на предекспоненциалния множител A при различни степени на хидролиза $\alpha = const$. Получените стойности са представени на Фиг. 45 и Фиг. 46.



Фиг. 45. Линейна зависимост между степен на хидролиза и активиращата енергия



Фиг. 46. Линейна зависимост между степен на хидролиза α и предекспоненциалния множител $\ln A$

Както се вижда от Фиг. 45 и Фиг. 46 активиращата енергия E и предекспоненциалният множител $\ln A$ нарастват в хода на процеса. Техните зависимости

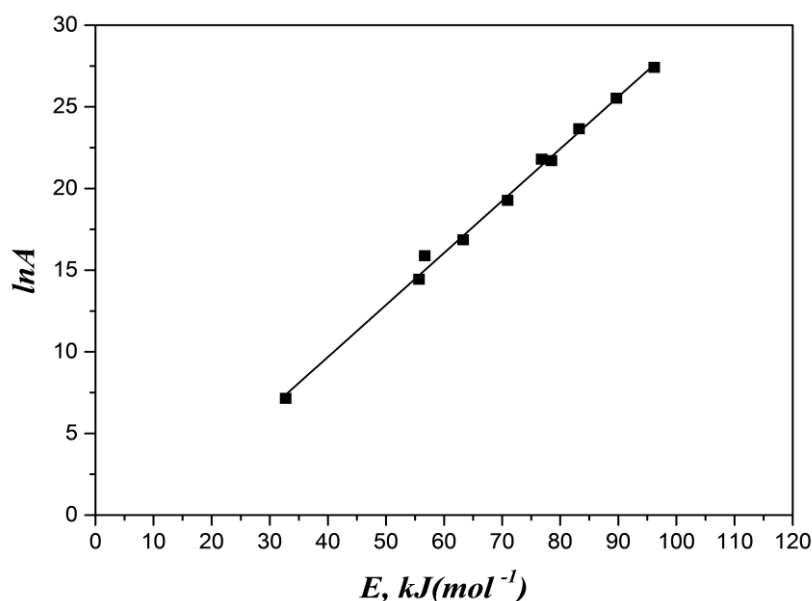
от степента на хидролиза α са линейни, както това изисква моделът за нееднородните повърхности и се описват от уравнения (5) и (6).

Константите на енергетичната и ентропийна нееднородност B и a_0 имат стойности, които съвпадат с определените от температурната зависимост коефициенти на нееднородност a .

От *фиг. 45* и *фиг. 46* се вижда, че стойностите както на активиращата енергия E , така и на предекспоненциалния множител $\ln A$ са по-високи при използване на слама, което отново доказва, че в енергетично отношение сламата е по-неблагоприятен субстрат за ензимна хидролиза.

Нарастването на активиращата енергия E в хода на хидролизата показва, че процесът се забавя поради увеличаване на енергетичните затруднения, свързани с намалената активност на реакционните центрове на системата ензим – целулоза, в резултат на тяхното взаимодействие. От друга страна, предекспоненциалният множител A също нараства в хода на процеса, по-съществено при използването на слама. Това вероятно се дължи на факта, че ензимната хидролиза на тези суровини е комплексен двустадийен процес. Предекспоненциалният множител отчита не само формираните активни центрове върху целулозната повърхност, но също така и общото количество целобиоза и олигозахариди, което нараства в хода на процеса.

Тези два конкуриращи се ефекта намират своята реализация в наблюденияя компенсационен ефект, който свързва $\ln A$ и E в една обща линейна зависимост, представена на *Фиг. 47*.



Фиг. 47. Компенсационен ефект между активиращата енергия E и $\ln A$

Компенсационният ефект, представен на фигурата, се описва с уравнение:

$$\ln A = \ln A_0 - \frac{a_0}{B} E_0 + \frac{a_0}{B} E \quad (37)$$

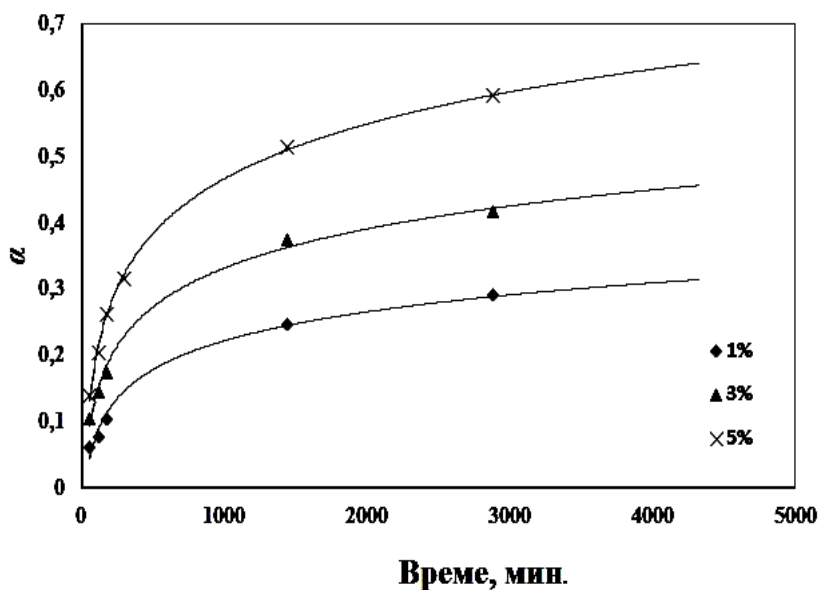
, където наклонът на получената права (Фиг. 47) представлява отношението a_0/B , което е 0.31 mol.kJ^{-1} .

Наблюдаваният общ компенсационен ефект показва, че върху скоростта оказват влияние едновременно както енергетичните, така и ентропийните фактори, независимо от вида на използваните суровини. Въпреки това скоростта на процеса намалява, което показва, че определящо влияние имат енергетичните затруднения, които не могат напълно да бъдат компенсирани.

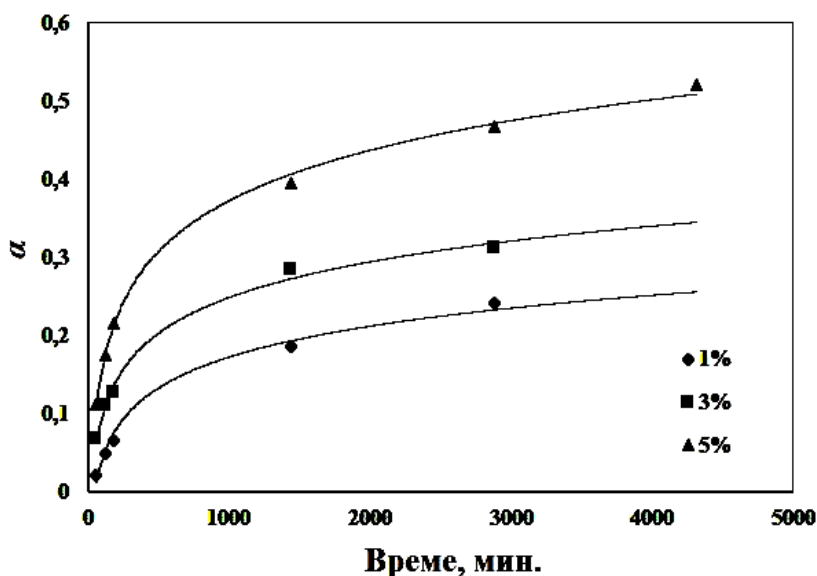
4.1.2. Концентрационна зависимост на ензимния процес

Влиянието на концентрацията върху ензимната хидролиза е проследено при температура 50°C и различно количество на вложеният ензим - 1 до 5%.

Въз основа на получените данни за изменение на α с течение на времето t , при различните температури T са построени кинетични криви за двете суровини, представени на Фиг. 48 и Фиг. 49.



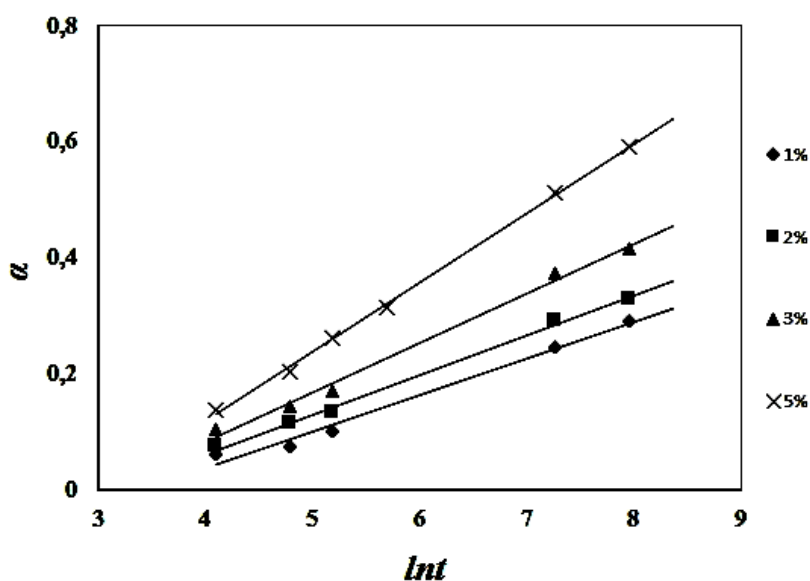
Фиг. 48. Кинетични криви на нарастване на степента на хидролиза α в хода на процеса при изследваните на царевични събла



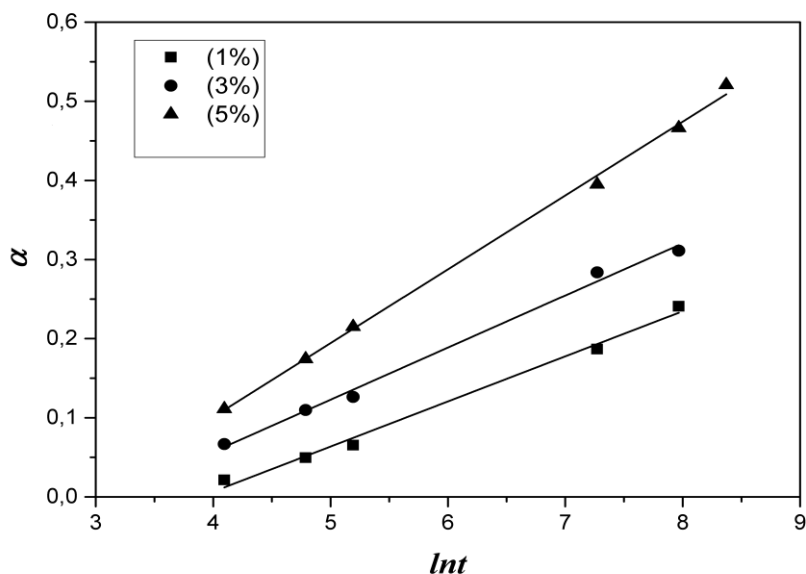
Фиг. 49. Кинетични криви на нарастване на степента на хидролиза α в хода на процеса при изследваните концентрации на пшеничена слама

От Фиг. 48 и Фиг. 49 се вижда, че степента на хидролиза се благоприятства от нарастването на концентрацията на ензима, значително в по-голяма степен при използването на царевични стъбла.

Получените кинетични криви се линеализират в координати $\alpha - \ln t$ (Фиг. 50 и Фиг. 51) и се описват с уравнение (6).



Фиг. 50. Зависимост между степента на хидролиза α и времето t на царевични стъбла



Фиг. 51. Зависимост между степента на хидролиза α и времето t на пшеничена слама

От наклона и отреза на получените прави са изчислени стойностите за коефициента a и началните скорости v_0 за двете суровини, а стойностите им са представени в Таблица 17.

Таблица 17. Стойности за a и v_0 при различни концентрации на ензимния продукт

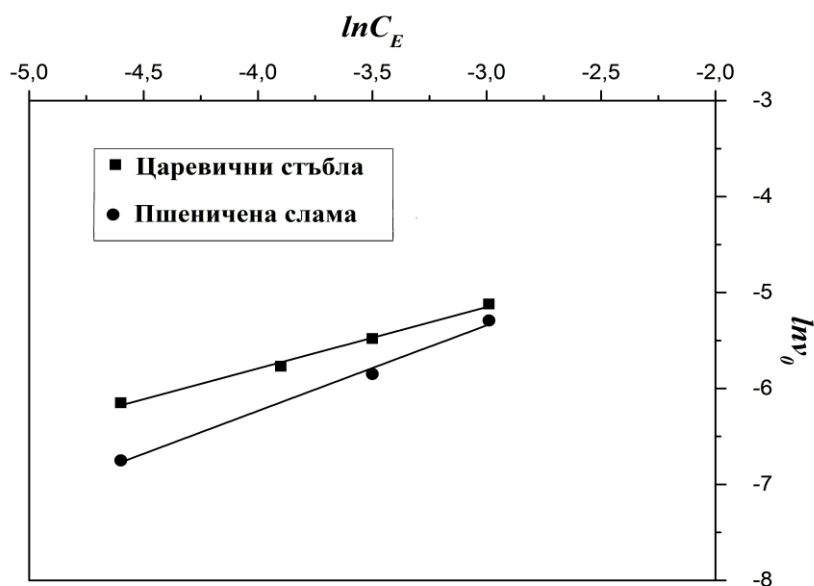
	1%		3%		5%	
	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	П.слама
a	15.87	17.54	11.75	15.17	8.39	10.72
$v_0 \times 10^3, \text{min}^{-1}$	2.13	1.17	4.19	2.87	5.96	5.03

Става ясно, че количеството вложен ензим увеличава коефициента на нееднородност a и респективно понижава началната скорост v_0 в по-голяма степен при използване на пшеничена слама.

Влиянието на количеството ензим върху началната скорост v_0 се описва с уравнение :

$$v_0 = k \cdot c_E^n \quad (38)$$

, където k е скоростна константа, а n е порядък по отношение на ензимната концентрация. Валидността на уравнение (38) в логаритмичен вид е илюстрирано на Фиг. 52.



Фиг. III.52. Линейна зависимост на началната скорост v_0 и концентрацията на вложеният ензим C_E

От отреза на получените прави са изчислени стойностите на скоростната константа $k = 4.10^{-2} (gE/gcell)^{-0.6}.min^{-1}$ за царевичните стъбла и $k = 7.10^{-2} (gE/gcell)^{-0.9}.min^{-1}$ за пшеничената слама, а от наклоните е определен порядъкът на реакциите n със стойности 0.6 за царевичните стъбла и 0.9 за пшеничената слама. Както се вижда от Фиг. 52 при концентрации на ензима над 5% ($0,05gE/gpulp$) видът на суровината не оказва влияние върху скоростта, което означава, че е нецелесъобразно използването на по-високи концентрации, съгласно указанията на производителя.

Въз основа на уравнение (37) са изчислени стойностите a_0 при различните концентрации и температура $50^{\circ}C$. Получените данни са представени в Таблица 18. Вижда се, че стойностите за коефициента на ентропийна нееднородност не се различават съществено за двете суровини.

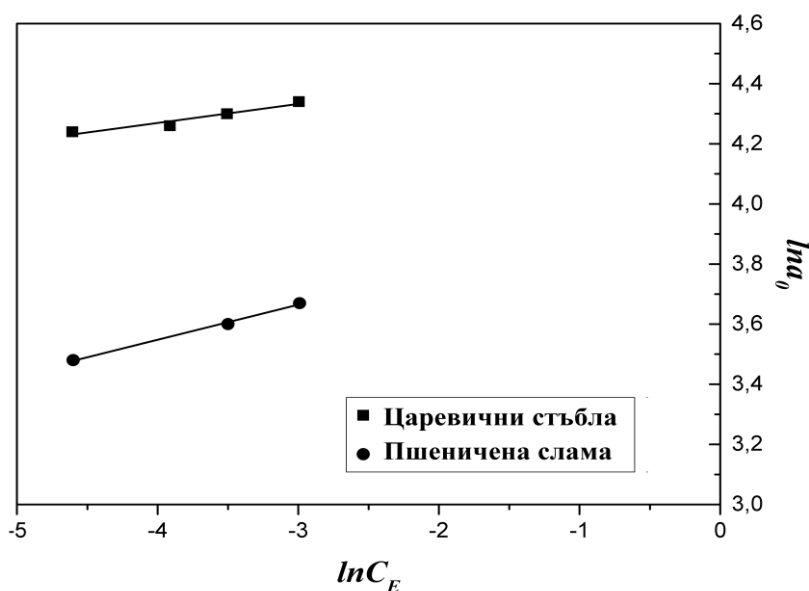
Таблица 18. Стойности за a_0 при различни ензимни концентрации

	1%		2%		3%		5%	
	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	Цар.стъбла	П.слама	Цар.стъбла	П.слама	
a_0	42.26	40.47	43.02	44.99	43.15	47.24	44.45	

Зависимостта на коефициента на ентропийна нееднородност a_0 от концентрацията на ензима за двата вида суровина, се описва с уравнение (39).

$$a_0 = a_0' \cdot C_E^b \quad (39)$$

, където a_0' представлява коефициент на ентропийна нееднородност, който не зависи от концентрацията на ензима, а b е степенен показател. Уравнение (39) в логаритмичен вид, представено на *Фиг. 53*, позволява да се изчислят стойностите на двата коефициента: $a_0' = 92.0$ и $b = 0.063$ за царевичните стъбла и $a_0' = 55.4$, $b = 0.117$ за слама. Това показва, че концентрацията на ензима влияе в по-голяма степен при сламата.



Фиг. 53. Линейна зависимост на a_0 и ензимната концентрация C_E

Разходът на ензим влияе на предекспоненциалния множител съгласно уравнение:

$$\ln A = \ln A_0 + a_E c_E^b \alpha \quad (40)$$

Въз основа на зависимостта на началната скорост и тази на коефициента на ентропийна нееднородност от количеството ензим е изведено уравнение (40), описващо влиянието на степента на хидролиза α , концентрацията на ензима C_E и температурата T върху скоростта на ензимна хидролиза. Оказва се, че влиянието на концентрацията на

ензима се отразява на предекспоненциалния множител, а не на енергетичната нееднородност на системата (уравнение 41).

$$v = k C_E^n e^{a_0 C_E^b} e^{-\frac{B\alpha}{RT}} \quad (41)$$

В крайна сметка става ясно, че с увеличаване степента на хидролиза α скоростта v намалява. Колкото по-висока е концентрацията на ензимния продукт, толкова по-голяма е скоростта на процеса. Въпреки това скоростта на ензимна хидролиза на двете суровини като цяло намалява в хода на процеса, което означава, че по-силно влияние оказват енергетичните фактори.

Кинетичните изследвания върху кинетиката на ензимна хидролиза с високо активния целулазен комплекс NS 22086 и β -глюкозидазата NS 22118 на царевични стъбла и пшеничена слама показват, че процесът се описва най-адекватно от експоненциално кинетично уравнение.

Преобладаващо невлакнестата структурата на използваните едногодишни растения вероятно е определяща за приложимостта на установения кинетичен механизъм.

Установено е, че активиращата енергия нараства в хода на процеса, поради конформационни изменения в ензимната молекула и понижената активност на ензима, свързана със затруднената достъпност до целулозните активни центрове. Предекспоненциалният множител също нараства в хода на процеса, вероятно поради комплексното действие на двата ензимни продукта – целулазен комплекс, трансформиращ целулозата предимно до олигозахариди и целобиоза и β -глюкозидазата, превръщаща целобиозата в глюкоза.

Изследвани са концентрационните зависимости на ензимния продукт и са установени границите на ефективно действие по отношение на използваните суровини. С нарастване на разхода на ензим намаляват различията в стойностите на кинетичните параметри за пшеничена слама и царевични стъбла.

В резултат на проведените анализи се установява, че сламата е относително по-неблагоприятна суровина за ензимна хидролиза. Наблюдаваните по-високи стойности както на предекспоненциалния множител, така и на активиращата енергия при сламата могат да се обяснят с морфологични особености и химичен състав. Установеният компенсационен ефект между предекспоненциалния множител и активиращата енергия показва, че механизмът на хидролизния процес е общ за двете суровини.

5. Кинетика на ензимна хидролиза с високо активен целулазен комплекс NS 22086 и β -глюкозидазата NS 22118 на избелена широколистна целулоза и паровзривно обработена дървесина

5.1. Кинетика на ензимно действие върху избелена широколистна целулоза

5.1.1. Температурна зависимост на хидролизния процес

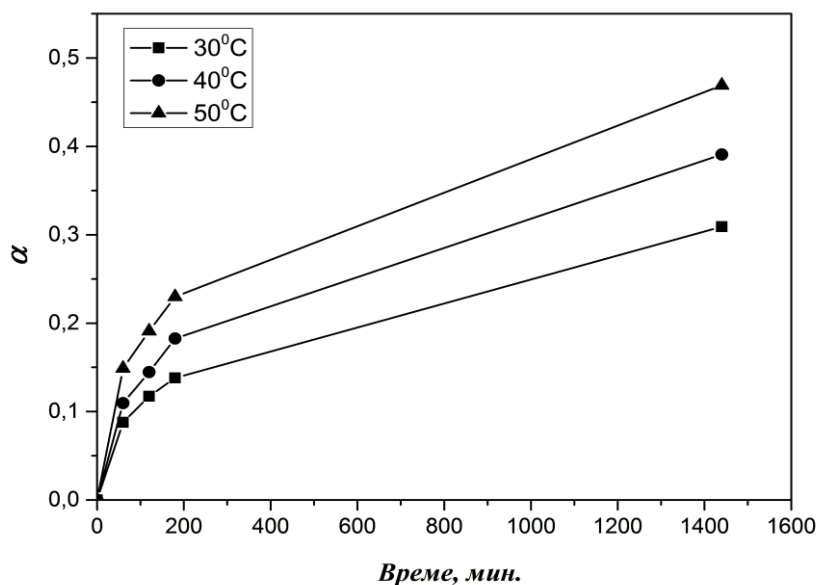
Влиянието на температурата върху ензимната хидролиза на избелена широколистна целулоза предоставена от „Свилоцел ЕАД“ е проследено в температурния интервал от 30°C до 50°C при постоянно количество на вложен ензим по отношение на масата - 5% високоактивен целулазен комплекс NS 22086 в комбинация с 0.5% β -глюкозидазата NS 22118

Количеството глюкоза, получено при различните температури и времето на хидролизния процес, е представено в *Таблица 19*.

Таблица 19. Количество глюкоза G , получено при различни температури и време на реакция

Време, min	G, %		
	$T=30^{\circ}C$	$T=40^{\circ}C$	$T=50^{\circ}C$
60	7.63	9.52	12.94
120	10.20	12.58	16.63
180	12.00	15.90	20.00
1440	26.90	34.00	40.80
2880	33.10	42.28	49.20

Максималното теоретично количество на глюкоза е $G_{max} = 87\%$. Безразмерната величина α е използвана като кинетична променлива (уравнение 7). Степента на хидролиза се увеличава с нарастване температурата и времето (*Фиг. 54*).



Фиг. 54. Кинетичните криви на степента на хидролиза при различни температури

Проверена е приложимостта на различни кинетични модели, описващи кинетиката на хетерогенни химични процеси. Установено бе, че механизмът на ензимно действие се описва най-добре от модифицираното топохимичното уравнение на Праут-Томпкинс :

$$\frac{\alpha}{1-\alpha} = (kt)^\chi \quad (42)$$

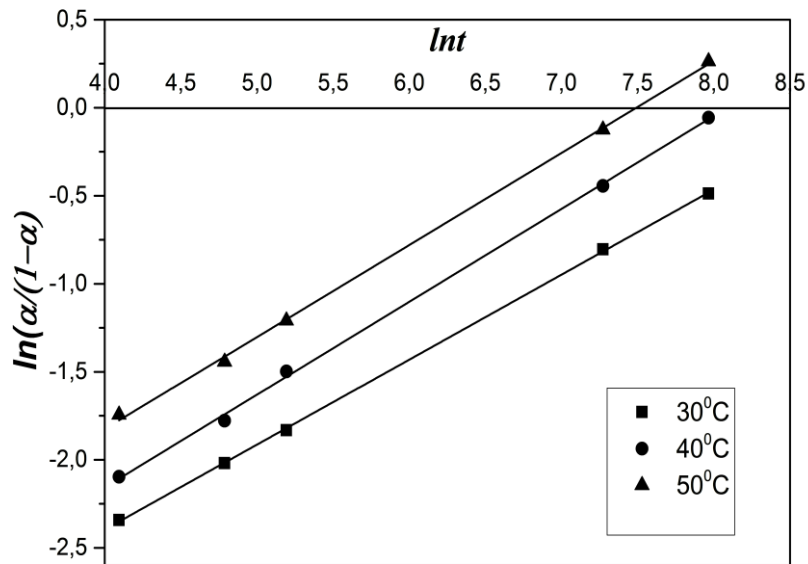
, където k е привидната скоростна константа, χ е степенен показател и t е времето.

Приложимостта на топохимичен кинетичен механизъм при ензимната хидролиза с високо активен ензимен комплекс на избелена широколистна целулоза е показател за зонно протичане на процеса, при което се разкриват нови активни центрове в хода на процеса. Топохимичният механизъм вероятно се дължи на структурните особености на дървесната целулоза. Избелената широколистна целулоза се състои основно от влакна докато в пшеничената слама и царевичните стъбла преобладават невлакнестите структури.

Всички кинетични криви се линеализират в координати $\ln(\alpha/(1-\alpha))$ от $\ln t$, в съответствие с логаритмичната форма на топохимичното уравнение :

$$\ln \frac{\alpha}{1-\alpha} = \chi \ln k + \chi \ln t \quad (43)$$

Линейните зависимости са представени на *Фиг. 55*. Изчислена е стойността на привидната скоростна константа k , която зависи от температурата в съответствие с уравнението на Арениус. От получените зависимости бе определен степенният показател, който има стойност $\chi = 0.5$ и не зависи от температурата.



Фиг. 55. Линеализирана форма на топохимичното уравнение на Праут - Томкинс при различни температури

За определяне на текущата скорост на процеса на ензимна хидролиза се прилага модифицираната форма на уравнението на Праут-Томпкинс :

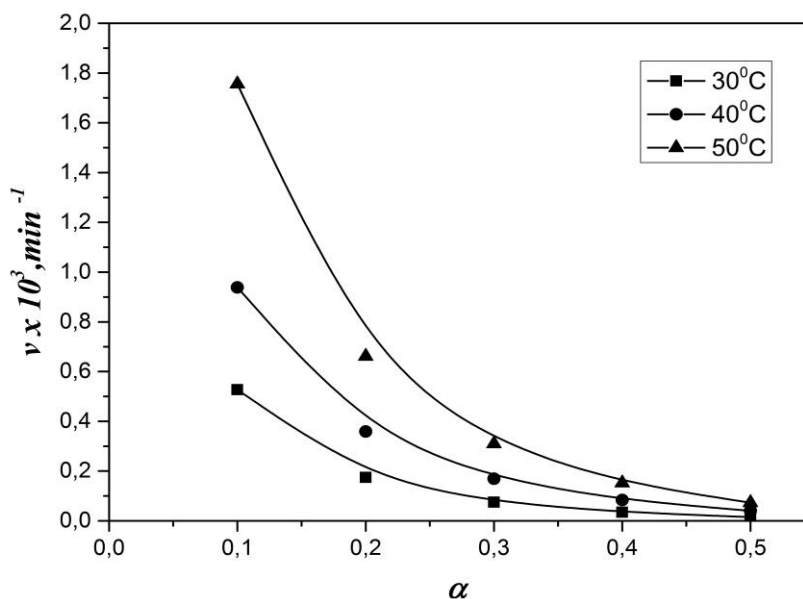
$$v = \chi k \alpha^{\frac{\chi-1}{\chi}} (1-\alpha)^{\frac{\chi+1}{\chi}} \quad (44)$$

Този израз показва зависимостта на текущата скорост $v = (da/dt)$, min^{-1} от количеството на остатъчния в системата субстрат $(1-\alpha)$, както и от количеството на получения продукт α . Факторът $(1-\alpha)^{\frac{\chi+1}{\chi}}$ намалява с увеличаването на α . Факторът $\alpha^{\frac{\chi-1}{\chi}}$ също намалява с нарастването на α , защото експонентът е отрицателен ($\chi < 1$). Този фактор отчита инхибиращото действие на глюкозата върху ензима целулаза, особено в края на хидролизния процес, когато скоростта значително се забавя.

Когато стойността на степенният показател е $\chi = 0.5$, логаритмичната форма на топохимичното уравнение придобива следния вид:

$$v = k \frac{(1-\alpha)^3}{2\alpha} \quad (45)$$

От този израз са изчислени текущите скорости при различните α и температури. Зависимостта на скоростта v , min^{-1} като функция от α при различните температури, е представена на Фиг. 56.



Фиг. 56. Зависимост на скоростта v , min^{-1} като функция от α при различните температури в хода на ензимната хидролиза

От получените резултати се вижда, че скоростта на процеса е най- висока до $\alpha < 0,2$, след което намалява значително. Това вероятно се дължи на дифузионни затруднения и на ефекта на инхибиране на ензима от получената глюкоза в последния стадий на процеса.

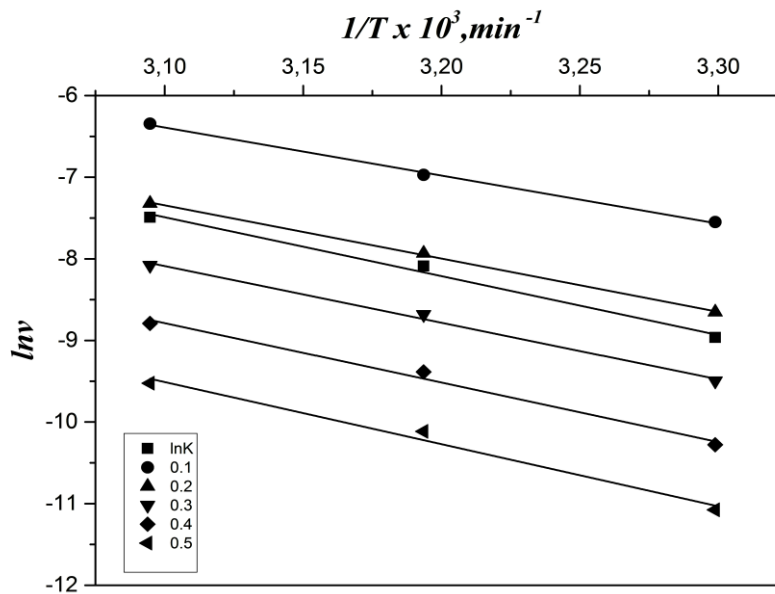
Привидната скоростна константа k зависи от температурата съгласно уравнението на Арениус.

Температурната зависимост на хидролизния процент е също е в съответствие с уравнение Арениус.

Въз основа на линейната връзка между $\ln \lambda$ и $1/T$ (Фиг. 57) са изчислени стойностите на активиращата енергия $E = 47,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ и предекспоненциалния множител $\ln \lambda = 10,05$ при различни стойности на α .

Въз основа на линейната връзка между $\ln v$ и $1/T$ (Фиг. 57) са изчислени стойностите на активиращата енергия E и предекспоненциалния множител A при $\alpha = \text{const}$.

Активиращата енергия остава постоянна в хода на ензимната хидролиза. Фактът, че активиращата енергия не зависи от степента на протичане на процеса α , показва, че системата ензим - субстрат е енергетично еднородна. Енергията съвпада по стойност с изчислената по зависимостта на скоростната константа k .

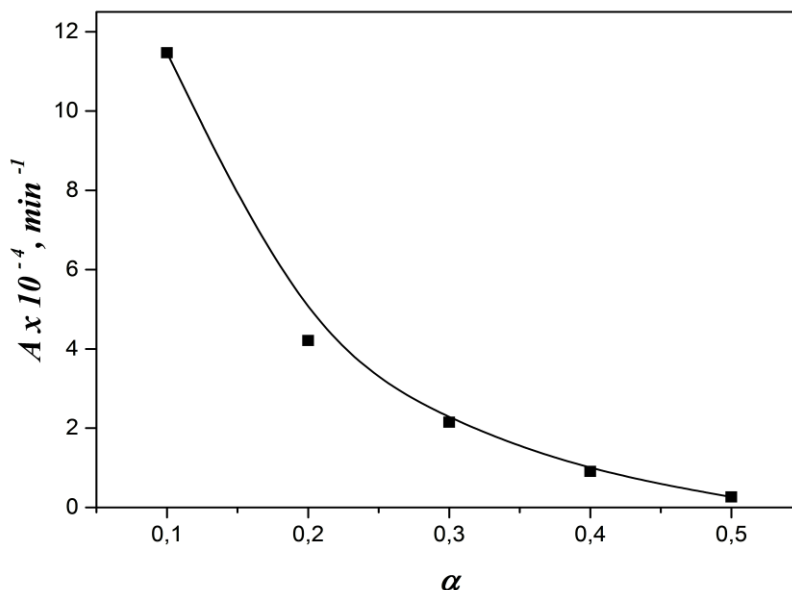


Фиг. 57. Температурна зависимост на текущата скорост v и скоростната константа k при $\alpha = const$ на процеса

За разлика от активиращата енергия, предекспоненциалният множител A намалява с увеличаването на степента на хидролиза α (Фиг. 58), съгласно уравнението :

$$A = \lambda \frac{(1 - \alpha)^3}{2\alpha} \quad (46)$$

Предекспоненциалният множител A може да бъде свързан с размерите и достъпността на реакционната повърхност, която се оформя въз основа на ензим-целулозния комплекс, който непрекъснато се променя в хода на процеса.



Фиг. 58. Зависимост на предекспоненциалния множител A , min^{-1} от α

След заместване в уравнение (42) и включване на температурната зависимост и привидната скоростната константа в уравнението на Арениус се получава:

$$\alpha = \frac{1}{1 + (A \cdot e^{-E/RT} \cdot t)^\chi} \quad (47)$$

Активиращата енергия E зависи единствено от природата на суровината. При относително постоянни условия за хидролиза, E на практика е константа. Същото важи и за коефициента χ в уравнението на Праут-Томкинс. Предекспоненциалният множител A включва ефекта на всички фактори на процеса. Уравнение 46 може да се използва за симулиране и контрол на ензимните процеси.

5.2. Кинетични модели на ензимна хидролиза с високоактивен целулазен комплекс NS 22086 и β -глюкозидазата NS 22118 на различни дървесни видове след паро-взривна обработка

5.2.1. Температурна зависимост на ензимната хидролиза

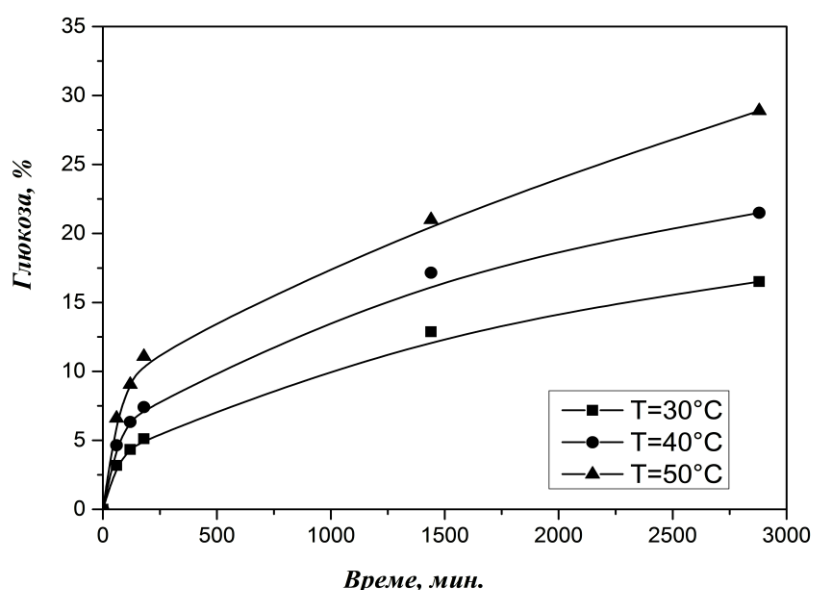
Проведени са кинетични изследвания на няколко различни дървесни вида: Пауловния (*Paulownia tomentosa*), Топола (*Populus alba*) и Върба (*Salix viminalis rubra*).

Паро-взривната хидролиза е проведена в 2L реактор при следните условия: хидромодул 1:10, начална температура 100°C, крайна температура 200°C, време на задържане при максимална температура 10 мин., време за достигане на максимална температура 60 мин., налягане 13.2 atm.

Влиянието на температурата върху ензимната хидролиза на дървесните видове е проследено в температурния интервал от 30°C до 50°C при постоянно количество на вложен ензим по отношение на масата - 5% високо активен целулазен комплекс NS 22086 в комбинация с 0.5% β -глюкозидазата NS 22118.

Установен е еднакъв механизъм на действие на ензима при всичките дървесни вида.

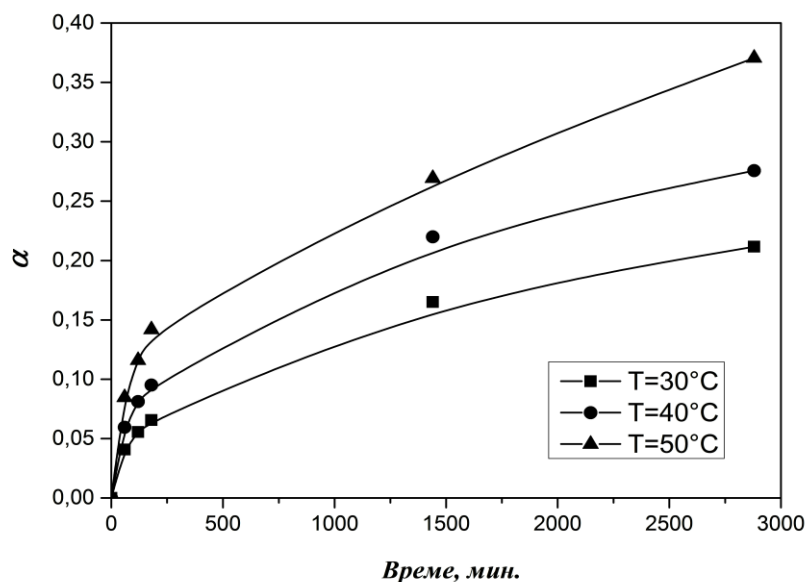
Количеството глюкоза (G,%), получена при различните температури и времена на ензимна хидролиза, са представени на Фиг. 59. Кинетичните криви са идентични, затова са представени кривите само на една от изследваните дървесини - тези на тополата.



Фиг. 59. Кинетичните криви на количеството глюкоза при различни температури на топола

Безразмерна величина α се използва като кинетичната променлива (уравнение 7), G_{\max} е теоретично изчисленото максимално количество глюкоза.

На *Фиг. 60* са представени кинетичните криви и степента на превръщане на целулозата в глюкоза.

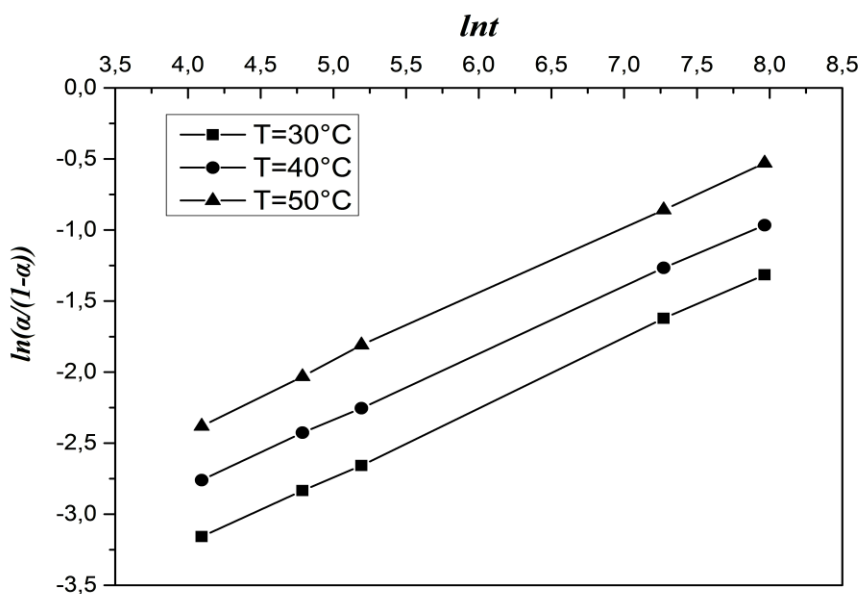


Фиг. 60. Кинетичните криви на степента на ензимна хидролиза при различни температури на топола

Проверени са различни кинетични уравнения на дифузия, топохимични и други хетерогенни каталитични уравнения, които да опишат процеса на конверсия на целулозата до глюкоза. Установено е, че процесът се описва най-добре чрез модифицираното топохимично уравнение на Праут-Томпкинс (42).

Всички кинетични криви са линеаризирани в координати $\ln(\alpha/(1-\alpha))$ и $\ln t$ в съответствие с логаритмична форма на уравнение (43). Линейните зависимости са представени на *Фиг. 61*.

Изчислена е стойността на привидната скоростна константа k , която зависи от температурата в съответствие с уравнението на Арениус. Определена е стойността на активиращата енергия $E = 65.25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ и на предекспоненциалния множител $\ln \lambda = 20.37$. Степенният показател χ е 0.48 и не зависи от температурата.



Фиг. 61. Линеализирана форма на модифицираното уравнение на Праут - Томпкинс при различни температури на топола

За сравнение в Таблица 20. са представени стойностите на скоростната константа k и на степения показател χ за Топола, Върба, Пауловния и избелена целулоза.

Таблица 20. Кинетични параметри на ензимна хидролиза на дървесни видове и избелена сулфатна целулоза

кинетични параметри дървесен вид	$k \cdot 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$			χ
	30°C	40°C	50°C	
Топола „ <i>Populus alba</i> “	0.02	0.06	0.15	0.48
Върба „ <i>Salix viminalis rubra</i> “	-	-	0.15	0.58
Пауловния „ <i>P. tomentosa</i> “	-	-	0.44	0.61
избелена сулфатна целулоза	0.14	0.31	0.56	0.5

При топохимичната кинетика стойностите на степения показател χ от 0.5 до 1 показват, че ензимната хидролиза е дифузионно ограничена.

Проведените кинетични изследвания на ензимна хидролиза с високоактивния целулазен комплекс NS 22086 и β -глюкозидазата NS 22118 на избелена широколистна целулоза и паро-взривно обработена дървесина се описват най-точно от модифицираното топохимичното уравнение на Праут-Томпкинс (42).

Влакнестата структура на дървесната биомаса вероятно е определяща за приложимостта на установения топохимичен кинетичен механизъм.

Установено е, че активиращата енергия остава постоянна във времето, от което може да се съди, че системата целулоза – ензим е еднородна в енергетично отношение.

Съгласно установения топохимичен кинетичен модел скоростта на ензимната хидролиза зависи както от количеството на останалия субстрат, така и от инхибиращия ефект на образуваните се продукти. Степенният показател χ не зависи от температурата и неговата стойност показва, че ензимната хидролиза е ограничена от дифузията.

Получените резултати показват, че наличието на лигнин в дървесния влакнест материал не оказват влияние върху особеностите на кинетичния модел.

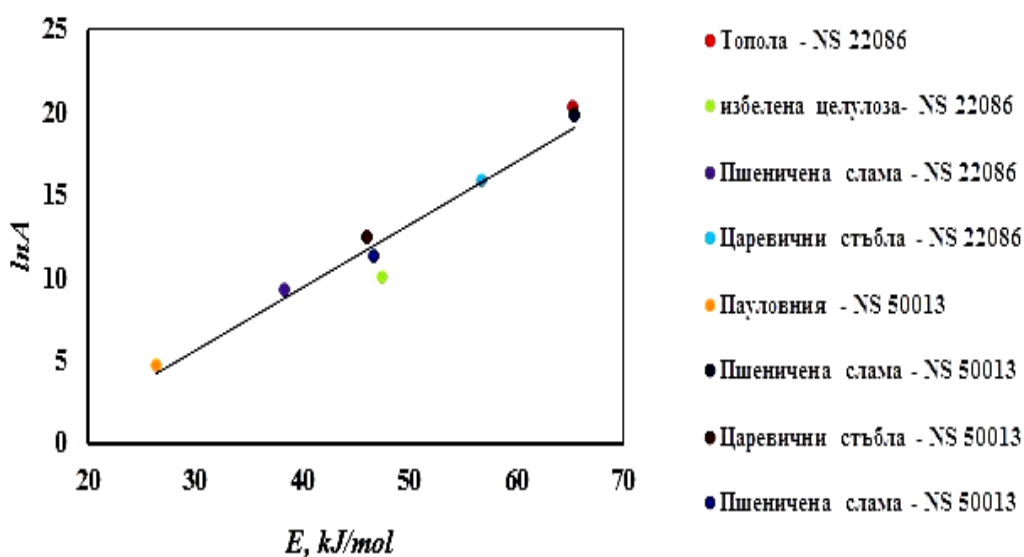
Получена е температурно-временна зависимост, която може да се използва за контрол и управление на технологичния процес.

6. Общ компенсационен ефект между предекспоненциален множител и активиращата енергия

Установен е общ компенсационен ефект между предекспоненциалния множител $\ln\lambda$ и активиращата енергия E (Фиг. 62), при който коефициент на корелация е $R^2=0.9497$

Общият компенсационен ефект се описва с уравнение (48), което за конкретния случай има видът:

$$\ln\lambda = a + 0,3 \cdot E \quad (48)$$



Фиг. 62. Общ компенсационен ефект на изследваните целулозни материали

Тази ефект не зависи от използваната кинетична променлива (R_s и G). Зависимостта е обща за всички изследвани величини. Полученият компенсационен ефект не зависи от вида и активността на използвания ензим. Зависимостта е обща и не зависи от установения кинетичен модел - топохимичен или моделът на нееднородните повърхности. Следователно съществува общ фактор, който влияе едновременно и еднопосочно на предекспоненциалния множител и на активиращата енергия в началото на процеса. Такъв общ фактор може да бъде структурата на изследваните целулозни материали, чието взаимодействие с ензимните комплекси се подчинява на обща закономерност.

ИЗВОДИ

В резултат от проведените изследвания могат да се направят следните изводи:

1. Проведените кинетични изследвания върху ензимна хидролиза на Пауловния (*P. tomentosa*) с целулазния комплекс NS 50013 в комбинация с β -глюкозидазата NS 50010 показват, че този процес се описва от експоненциалното кинетично уравнение приложимо за равномерно нееднородни повърхности и се влияе от вида на предварителната обработка.

- Установено е, че кинетиката на предварително проведено третиране с разредена сярна киселина се отнася към псевдо-хомогенната катализа и се описва с уравнение от първи порядък.

2. Установено е, че кинетика на ензимната хидролиза на царевични стебла и пшеничена слама най-адекватно се описва от експоненциалното кинетично уравнение и за двете кинетични променливи – глюкоза (G) и редуциращи захари (Rs).

- Предварителното третиране (киселинно, паро-взривно или високотемпературно), както и активността на ензимния комплекс не влияят на установения кинетичен механизъм.

- Предполага се, че определящо влияние върху приложимостта на кинетичния модел за нееднородни повърхности има преобладаващото количество на невлакнести структури в използваните едногодишни растения.

3. Едновременно нарастване на активизиращата енергия и на пред-експоненциалния множител в хода на ензимната хидролиза се установява при всички кинетични изследвания с пауловния и царевични стебла. Тази закономерност се наблюдава и при ензимното третиране на пшеничената слама с високоактивния целулазен комплекс NS 22086 и β -глюкозидазата NS 22118.

- Активизиращата енергия нараства в хода на процеса поради конформационни изменения в ензимната молекула и понижената активност на ензима, свързана със затруднената достъпност до целулозните активни центрове. Предекспоненциалният множител също нараства в хода на процеса, вероятно поради комплексното действие на двата ензимни продукта – целулазен комплекс, трансформиращ целулозата предимно до олигозахариди и целобиоза и β -глюкозидазата, превръщаща целобиозата в глюкоза.

- Скоростта на процеса намалява поради определящото влияние на енергетичните затруднения.

4. В резултат на проведените анализи се установява, че сламата е относително по-неблагоприятна суровина за ензимна хидролиза в сравнение с царевичните стъбла. Наблюдаваните по-високи стойности както на предекспоненциалния множител, така и на активиращата енергия при сламата могат да се обяснят с морфологични особености и химичен състав. Активиращата енергията при хидролизата на слама с по-ниско активния целулазен комплекс NS 50013 в комбинация с β -глюкозидазата NS 50010 не се променя в хода на процеса, като в този случай предекспоненциалният множител е отговорен за намаляването на скоростта на процеса.

5. Получени са концентрационни зависимости и за двата ензимни продукта и са установени границите на ефективно действие по отношение на използваните суровини - пшеничена слама и царевични стъбла. С нарастване на разхода на ензим намаляват различията в стойностите на кинетичните параметри за пшеничената слама и царевични стъбла.

6. Установен е компенсационен ефект между предекспоненциалния множител и активиращата енергия при царевичните стъбла, пшеничената слама и пауловнията.

- Определена е изокинетична температура, над която предекспоненциалният множител при пшеничената слама може да стане преобладаващ фактор, което да доведе до по-голямо количество на глюкоза. Установена е линейна корелация между кинетични променливи R_s и G при пшеничената слама.

7. Модифицираното топохимичното уравнение на Праут - Томпкинс описва най-точно хидролизата с високоактивен целулазен комплекс NS 22086 и β -глюкозидазата NS 22118 на паро-взривно обработена дървесина и на избелена широколистна целулоза.

- Приложимостта на топохимичен кинетичен механизъм е показател за зонно протичане на процеса, при което се разкриват нови активни центрове.

- Влакнестата структурата на дървесната биомаса е определяща за приложимостта на установеният топохимичен кинетичен механизъм.

- Установено е, че активиращата енергия остава постоянна във времето, от което може да се съди, че системата целулоза – ензим е еднородна в енергетично отношение.

- Съгласно установения кинетичен модел скоростта на ензимната хидролиза зависи както от количеството на непрореагиралия субстрат, така и от инхибиращото действие на образуващите се продукти. Степенният показател χ не зависи от температурата и неговата стойност показва, че скоростта на ензимната хидролиза е дифузирано ограничена.

- Установено е, че наличието на лигнин в дървесния влакнест материал не оказва влияние върху степения показател и характера на кинетичния модел.

8. Изведен е общ компенсационен ефект между предекспоненциалния множител и активиращата енергия в началото на процеса, който не зависи от използваната кинетична променлива (R_s или G) и е валиден за всички изследвани суровини.

- Върху тази обща корелация не влияе видът и активността на използвания ензим, както и от методът на предварителната обработка на суровината. Зависимостта не зависи и от вида на кинетичния модел (топохимичен или модела на нееднородните повърхности).

- Структурата на изследваните целулозни материали вероятно е общия фактор, който оказва влияние едновременно и еднопосочно на предекспоненциалния множител и на активиращата енергия в началото на процеса.

9. Изведени са температурно-временни зависимости на базата на кинетичните изследвания, които могат да се използват за контрол и управление на процеса на ензимна хидролиза.

Списък на научните публикации по темата на дисертацията

Публикации в списания с IF

1. G. Radeva, I. Valchev, S. Petrin, E. Valcheva, P. Tsekova, Comparative Kinetic Analysis of Enzyme Hydrolysis of Steam-Exploded Wheat Straw, Cellulose Chem. Technol., 46 (1-2), 61-67 (2012).
2. S. Petrin, N. Yavorov, P. Tzvetkov, I. Valchev, G. Radeva, Kinetic aspects of enzyme hydrolysis of cellulose fiber material, Bulgarian Chemical Communications, Vol. 47, Special issue A, 2015, 30-33.

Публикации в пълен текст на международни конференции

1. G. Radeva, I. Valchev, S. Petrin, Kinetic dependencies of two-stage dilute acid and enzyme hydrolysis of Paulownia tomentosa, Journal of Chemistry and Chemical Engineering, Vol 5, No11, 985-989, 2011.

Доклади на международни конференции с пълен текст

1. Valchev, S. Petrin, Comparative kinetic investigation of cellulase hydrolysis of hydrothermal treated wheat straw and maize stalks, Proceeding of 21st European Biomass Conference and Exhibition, Copenhagen, Denmark, 3 – 7 June, 2013, 1547 -1551.