

УДК 664.162.036.4 : 577.15

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗ, ПОЛУЧЕННЫХ ГИДРОТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКОЙ МИСКАНТУСА И ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

© 2013 г. **Е.И. Макарова,**  
**В.В. Будаева, Е.А. Скиба,**  
**Г.В. Сакович**

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

### Введение

Биокатализ привлекает к себе все большее внимание в целях получения низкомолекулярных веществ — реактивов для направленного синтеза [1—10]. Известно, что вид растительного сырья и способ выделения целлюлозы из него определяют физико-химические свойства субстрата, следовательно, обуславливают реакционную способность к ферментативному гидролизу [2—4]. Именно поэтому зависимость ферментации целлюлозных субстратов от характеристик целлюлозы (степени измельчения, кристалличности, полимеризации, наличия нецеллюлозных примесей и т.п.) является предметом многих исследований [3, 5—8, 9].

Например, авторами [6—8] было показано сходство и различие поведения целлюлоз, выделенных из мискантуса и плодовых оболочек овса двумя различными способами (азотнокислым и комбинированным), в условиях ферментативного гидролиза с применением мультиэнзимной композиции (МЭК), состоящей из трех промышленных ферментных препаратов: «Целлолюкс-А», «Брюзайм ВГХ» и «Рапидаза CR». В отличие от химической гидротермобарической обработки любого вида сырья осуществляется безреагентно, поэтому может рассматриваться в качестве самого простого способа

преодоления так называемой «неподатливости» кристаллической целлюлозы к биохимической трансформации [3, 9]. В продолжение ранее проведенных исследований ферментативного гидролиза волокнистых продуктов, полученных гидротермобарической обработкой (ГТБО) со взрывом двух видов ежегодно возобновляемого сырья — российского мискантуса и плодовых оболочек овса в реакторе высокого давления [10], необходимо было исследовать ферментативный гидролиз целлюлоз, полученных облагораживанием волокнистых продуктов, что явилось целью данной работы.

### Экспериментальная часть

В качестве сырья использовали два вида целлюлозосодержащего сырья (ЦСС): выведенный в Институте цитологии и генетики СО РАН российский вид — мискантус сорта Сорановский [11, 12] и реальные отходы переработки овса — плодовые оболочки овса (ПОО) [13].

Для получения волокнистых продуктов было проведено несколько серий гидротермобарической обработки сырья в реакторе высокого давления (РВД) [14, 15] (давление, МПа/продолжительность, с): мискантуса — 1,5/600; 1,5/900; два опыта в одинаковых условиях — 2,5/600; ПОО — два опыта в одинаковых условиях — 1,5/600.

Целлюлозу (Ц) получали следующим образом: навеску влажного волокнистого продукта помещали при перемешивании в 2,0 %-ный раствор NaOH при температуре 55 °С, через 30 мин добавляли перекись водорода (из расчета 10 мл 50 %-ного раствора на 20 г абсолютно сухого вещества — а.с.в.), выдерживали

*Макарова Е.И.* — аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории биоконверсии ИПХЭТ СО РАН. Тел.: (3854) 30-59-85. E-mail: massl@mail.ru, ipcet@mail.ru.

*Будаева В.В.* — канд. хим. наук, доц., зав. той же лабораторией. Тел. тот же. E-mail: budaeva@ipcet.ru, ipcet@mail.ru.

*Скиба Е.А.* — канд. техн. наук, науч. сотр. той же лаборатории того же института. Тел. тот же. E-mail: ipcet@mail.ru, eas08988@mail.ru.

*Сакович Г.В.* — д-р. техн. наук, акад. РАН, науч. руководитель ИПХЭТ СО РАН. Тел.: (3854) 30-59-55. E-mail: ipcet@mail.ru, admin@ipcet.ru

Таблица 1

**Наименования субстратов и условия обработки мискантуса (М) и плодовой оболочки овса (ПОО) в реакторе высокого давления**

Обозначение субстрата (МПа/с)	Условия обработки		
	Давление, МПа	Время выдержки, с	Температура, °С
Ц М (1,5/600)	1,5	600	196–197
Ц М (1,5/900)	1,5	900	196–197
Ц М (2,5/600-1)	2,5	600	219–220
Ц М (2,5/600-2)	2,5	600	219–220
Ц ПОО (1,5/600-1)	1,5	600	196–197
Ц ПОО (1,5/600-2)	1,5	600	196–197

Примечание. В наименовании субстрата обозначено: 1 – использована смесь из трех ФП, 2 – использована смесь из двух ФП – «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВГХ».

90 мин, после чего суспензию отфильтровывали и полученную целлюлозу промывали дистиллированной водой. Условия получения волокнистых продуктов и наименования выделенных из них образцов Ц указаны в табл. 1.

Определение основных характеристик субстратов (массовой доли — м.д.)  $\alpha$ -целлюлозы, м.д. остаточного (кислотонерастворимого) лигнина, м.д. золы) проводили по стандартным методикам [16], м.д. пентозанов — по методике [17]. Степень полимеризации (СП) целлюлоз определяли по вязкости растворов в кадоксене на вискозиметре ВПЖ-3 с диаметром капилляра 0,92 мм по методике [18].

Ферментативный гидролиз проводили по методике, подробно изложенной в работах [10, 19]. Использованы ФП в следующей дозировке: 0,004 кг ФП/кг субстрата ФП «Целлолюкс-А», 0,004 л ФП/кг субстрата ФП «Брюзайм ВГХ» и 0,002 л ФП/кг субстрата ФП «Рапидаза СР». ФП «Целлолюкс-А» (производитель ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск), «Брюзайм ВГХ» и «Рапидаза СР» (поставщик — компания «Русфермент», г. Москва). «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВГХ» в соответствии с аналитическими паспортами стандартизованы по целлюлазной и ксиланазной активности, а «Рапидаза СР» обладает высокоэффективным комплексом гемицеллюлазных ферментов и целлобиазной активностью.

Концентрацию РВ в пересчете на глюкозу в гидролизате определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) на UNICO UV-2804 (США); относительная погрешность метода составляет 3,45 %.

В полученном по окончании процесса гидролизате анализировали концентрацию РВ и концентрацию пентоз модифицированным железоорсиновым способом [17] (относительная погрешность составляет 5,00 %).

Выход РВ рассчитан в двух вариантах: на массу субстрата (0,005 кг) и на массу гидролизуемых компонентов (с вычетом нецеллюлозных примесей золы и лигнина). Для обоих случаев выход РВ рассчитан с учетом коэффициента 0,9, обусловленного присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза. Выход кислоты в гидролизате через 72 ч ферментации рассчитан с учетом коэффициента 0,9 от м.д. пентозанов в субстрате.

## Результаты и их обсуждение

Массовые доли основных компонентов Ц—субстратов в пересчете на абсолютно сухое вещество представлены в табл. 2.

Субстраты Ц М, полученные при одинаковом давлении (1,5 МПа) и различной продолжительности выдержки (600 и 900 с), имеют в своем составе гидролизуемые компоненты (целлюлозу и пентозаны) в количестве 93–94 %, СП целлюлозы в них самая высокая из всех субстратов — 710–780. Субстраты Ц М, полученные при данном давлении (1,5 МПа), характеризуются большей м.д. гидролизуемых компонентов в сравнении с образцами Ц М, полученными при большем (2,5 МПа) давлении — 93 против 76–78 % соответственно; СП образцов Ц М (1,5 МПа) в 3,5 раза выше соответствующих значений Ц М

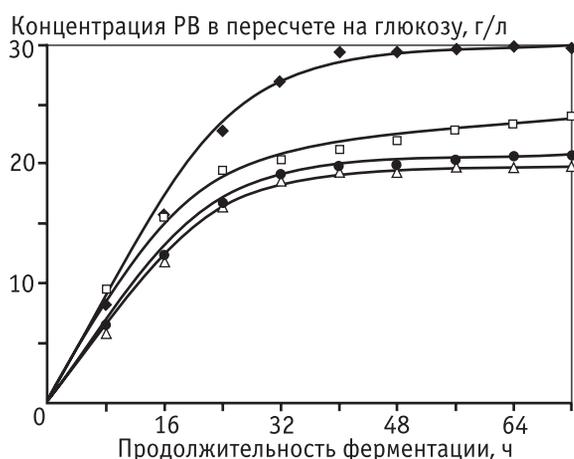
Таблица 2

## Массовые доли основных компонентов Ц – субстратов

Обозначение субстрата (МПа/с)	Массовая доля компонента, %				Степень полимеризации
	$\alpha$ -Целлюлоза	Кислотонерастворимый лигнин	Зола	Пентозаны	
Ц М (1,5/600)	88,9	4,4	2,4	4,0	780
Ц М (1,5/900)	89,6	3,0	0,9	3,6	710
Ц М (2,5/600-1)	74,9	3,9	1,9	0,7	240
Ц М (2,5/600-2)	77,5	4,0	1,9	0,7	180
Ц ПОО (1,5/600-1)	87,3	6,2	4,8	3,5	590
Ц ПОО (1,5/600-2)	87,1	5,1	3,5	3,3	550

(2,5 МПа): 710—780 против 180—240. Сравнение компонентных составов субстратов из мискантуса и ПОО, полученных при одинаковых условиях (1,5/600), показало близкие значения суммы м.д. гидролизуемых компонентов — 93 и 90—91 % соответственно, а также различные степени полимеризации Ц М и Ц ПОО всего в 1,3 раза: 710—780 против 550—590.

Результаты исследования ферментативного гидролиза в виде зависимостей концентрации РВ в гидролизате от продолжительности ферментации Ц М представлены на рис. 1. Наибольшую начальную скорость гидролиза демонстрирует образец Ц М (1,5/600): концентрация РВ через 24 ч гидролиза составляет 25 г/л, а уже через 48 ч достигает максимального значения 30 г/л и стабилизируется. Значительно меньшей реакционной способностью обла-

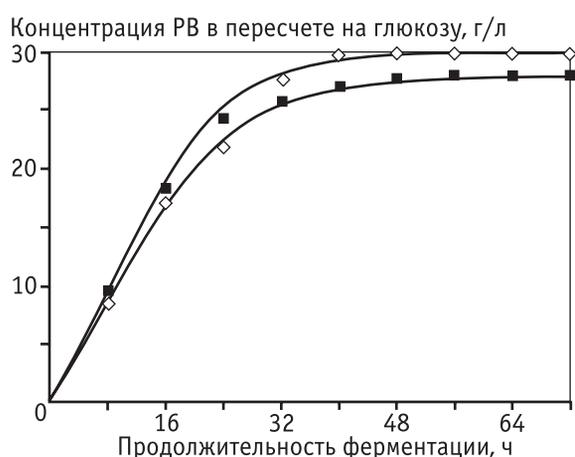


**Рис. 1.** Зависимость концентрации РВ в пересчете на глюкозу от продолжительности ферментации целлюлозы мискантуса (Ц М), полученных при различных условиях: ◆ – Ц М (1,5/600); □ – Ц М (1,5/900); △ – Ц М (2,5/600-1); ● – Ц М (2,5/600-2)

дает субстрат Ц М (1,5/900): конечная концентрация РВ в 1,25 раза меньше, чем при гидролизе образца Ц М (1,5/600) (24 г/л и 30 г/л соответственно), несмотря на одинаковую сумму гидролизуемых компонентов в обоих субстратах и меньшую м.д. негидролизуемых компонентов лигнина и золы в субстрате Ц М (1,5/900). Практически одинаковой и самой низкой скоростью гидролиза обладают субстраты Ц М (2,5/600-1) и Ц М (2,5/600-2): концентрация РВ через 72 ч гидролиза достигает лишь 19,5—21,0 г/л, что свидетельствует о близком химическом составе данных образцов (см. табл. 2). Следует отметить, что использование двух ФП для Ц М (2,5/600-2) вместо трех ФП для Ц М (2,5/600-1) не привело ни к снижению начальной скорости ферментативного гидролиза, ни к уменьшению конечной концентрации РВ.

Результаты исследования ферментативного гидролиза в виде зависимостей концентрации РВ в гидролизате от продолжительности ферментации Ц ПОО представлены на рис. 2.

Аналогично образцу Ц М (1,5/600) субстрат Ц ПОО (1,5/600-1) характеризуется высокой реакционной способностью к ферментации, которая выражается высокими концентрациями РВ в начальный период процесса: 10 г/л за 8 ч, 18 г/л за 16 ч, 25 г/л за 24 ч — и выходом на плато через 40 ч — 30 г/л. Следует подчеркнуть, что СП этих целлюлоз различаются незначительно: 590 и 780 для Ц ПОО и Ц М соответственно. Субстраты Ц ПОО (1,5/600-1) и Ц ПОО (1,5/600-2) характеризуются одинаковыми значениями м.д. целлюлозы и пентозанов, но при этом использование трех ФП в первом случае способствует увеличению скорости ферментации на протяжении всего процесса; разница в значениях концентраций РВ, полученных через 24 ч (25,0 и 22,5 г/л), сохраняется до окончания гидролиза.



**Рис. 2.** Зависимость концентрации РВ в пересчете на глюкозу от продолжительности ферментации Ц ПОО, полученных при различных условиях  
 ◇ – Ц ПОО (1,5/600-1); ■ – Ц ПОО (1,5/600-2)

Конечные концентрации РВ и пентозанов, выходы РВ в пересчете на массу субстрата (0,005 кг а.с.в.) и на массу только гидролизуемых компонентов, а также выход пентоз от содержания пентозанов в субстрате приведены в табл. 3 (м.д. основных компонентов Ц см. в табл. 2). Из табл. 2 и 3 следует, что из всех субстратов наибольшей реакционной способностью к ферментации характеризуются образцы Ц М (1,5/600) и Ц ПОО (1,5/600-1) с выходами РВ 80,9 и 80,7 % (от массы субстрата) и 86,8 и 90,7 % (от массы гидролизуемых компонентов) соответственно, при этом вклад пентоз в РВ незначителен (2,7–3,8 %), хотя выход пентоз от содержания пентозанов в субстрате составляет 55–87 %. Другими словами, ферментализ данных субстратов гарантирует получение гидролизатов, в составе редуцирующих ве-

Таблица 3

### Характеристики гидролизатов после ферментализа всех субстратов

Наименование субстрата	Конечная концентрация РВ, г/л	Концентрация пентоз, г/л	Выход, %		
			РВ от массы субстрата	РВ от массы гидролизуемых компонентов	Пентоз от содержания пентозанов в субстрате
Ц М (1,5/600)	29,97	0,82	80,9	86,8	55,4
Ц М (1,5/900)	23,75	0,51	64,1	66,7	38,3
Ц М (2,5/600-1)	19,50	0,17	52,7	55,9	65,6
Ц М (2,5/600-2)	21,00	0,12	56,7	60,3	46,3
Ц ПОО (1,5/600-1)	29,89	1,13	80,7	90,7	87,2
Ц ПОО (1,5/600-2)	28,00	0,79	75,6	82,7	64,6

Примечание. В наименовании субстрата обозначено: 1 – использована смесь из трех ФП, 2 – использована смесь из двух ФП – «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВГХ».

ществ которых преимущественно глюкоза. Следует отметить, что в данном случае МЭК одинаково положительно катализирует гидролиз как целлюлоз, так и гемицеллюлоз.

Сравнение результатов гидролиза образцов Ц М, полученных в разных условиях, показывает, что Ц, полученные при меньшем давлении (1,5/600), обладают в 1,4–1,5 раза большей реакционной способностью, чем Ц, полученные при большем давлении (2,5/600-1, 2,5/600-2): конечные концентрации РВ в гидролизате составляют 30,0 и 19,5–21,0 г/л соответственно. Следует подчеркнуть, что более реакционноспособный субстрат Ц (1,5/600) характеризуется высоким значением СП – 780 против 180–240. Данный факт дополняет общие представления о влиянии СП на реакционную способность к ферментализу целлюлозы и подтверждает, что корреляция между скоростью ферментативного гидролиза и СП отсутствует, таким образом, СП целлюлозы не является решающим фактором ферментализа, что согласуется с классическими трудами [2], но не совпадает с результатами исследований биокаталитического гидролиза образцов целлюлоз с различными СП в статье [9].

На примере субстрата Ц М отмечено, что увеличение времени выдержки сырья в РВД приводит к снижению выхода РВ при ферментализе, что можно объяснить потерей гидролизуемых компонентов при более продолжительной выдержке в реакторе – нативных гемицеллюлоз и легкогидролизуемой части целлюлозы, продукты гидролиза которых при последующей промывке и облагораживании удаляются из твердой фазы – будущего субстрата.

Полученные результаты, как и ранее представ-

ленные [10], показали, что повышение давления и увеличение продолжительности обработки мискантуса в РВД приводит к снижению реакционной способности к ферментативному гидролизу полученных таким образом целлюлозных субстратов.

Близкая реакционная способность целлюлоз из различных видов сырья, полученных ГТБО при одинаковых условиях, может быть обусловлена физическим воздействием на лигноцеллюлозную матрицу, после удаления части лигнина и гемицеллюлоз из которой доступность целлюлозы к ферментализу не зависит от вида сырья. Ранее нами было показано, что субстраты Ц, полученные как азотнокислым способом, так и комбинированным способом из различных видов сырья, характеризуются различной реакционной способностью — лучшей в случае ПОО [6, 8].

## Заключение

Установлено, что гидротермобарическая обработка двух видов недревесного сырья — мискантуса и плодовых оболочек овса — в устройствах типа РВД без катализаторов с последующим облагораживанием полученных волокнистых продуктов приводит к получению целлюлоз с высокой реакционной способностью к ферментации. Показано, что гидролиз как субстрата Ц М (1,5/600), так и Ц ПОО (1,5/600-1) обеспечивает максимальный выход редуцирующих веществ — 80,9—80,7 % (от массы субстрата) и 86,8—90,7 % (от массы гидролизуемых компонентов), что свидетельствует об универсальности примененного способа предварительной обработки недревесного сырья для успешного ферментализа. Установлено, что повышение давления и увеличение продолжительности обработки мискантуса в РВД приводит к снижению реакционной способности к ферментализу полученных целлюлоз. Глюкозные гидролизаты, получаемые описанным в работе способом, являются доброкачественным сырьем для биосинтеза не только топливных спиртов, но и широкого круга продуктов микробиологического синтеза: аминокислот, органических кислот, гель-пленки бактериальной целлюлозы, белково-витаминных концентратов и т.д.

*Работа выполнена в рамках проекта фундаментальных исследований № 5 «Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья в различных средах в реакторах под давлением» Программы 3 Президиума РАН.*

## Литература

1. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Хьюнг Ч.Т. Особенности ферментативного гидролиза касторового масла // Катализ в промышленности. 2013. № 2. С. 61—65.
2. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
3. Jordan D.B., Bowman M.J., Braker J.D., Dien B.S., Hector R.E., Lee C.C., Mertens J.A., Wagschal K. Plant cell walls to ethanol // Biochem. J. 2012. 442. P. 241—252. doi:10.1042/BJ20111922.
4. Ioelovich M., Morag E. Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis // Bioresources. 2011. № 6. P. 2818—2835.
5. Makoto Yoshida, Yuan Liu and et al. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of Miscanthus sinensis to monosaccharides // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. Vol. 72. P. 805—810.
6. Сакович Г.В., Будаева В.В., Скиба Е.А., Макарова Е.И., Павлов И.Н., Кортусов А.Н., Золотухин В.Н. Опыт масштабирования ферментативного гидролиза технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса // Ползуновский вестник. 2012. № 4. С. 173—176.
7. Скиба Е.А., Будаева В.В., Павлов И.Н., Макарова Е.И., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Получение ферментативных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и их спиртовое брожение // Биотехнология. 2012. № 6. С. 42—52.
8. Макарова Е.И. Реакционная способность к ферментации технических целлюлоз / Технология и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 5-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 24—26 мая 2012 г., г. Бийск. В 2-х ч. Ч. I. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. С. 287—292.
9. Hu Z., Ragauskas A.J. Hydrothermal pretreatment of switchgrass // Ind. Eng. Chem. Res. 2011. V. 50. P. 4225—4230.
10. Будаева В.В., Макарова Е.И., Скиба Е.А., Сакович Г.В. Ферментативный гидролиз продуктов гидротермобарической обработки мискантуса и плодовых оболочек овса // Катализ в промышленности. 2013. № 3. С. 60—66.
11. Мискантус сорта Сорановский. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. — № 8854628 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.gossort.com/reestr/new sort.html>
12. Шумный В.К., Колчанов Н.А., Сакович Г.В., Пармон В.Н., Вепрев С.Г., Нечипоренко Н.Н., Горячковс-

- кая Т.Н., Брянская А.В., Будаева В.В., Железнов А.В., Железнова Н.Б., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Розанов А.С., Сорокина К.Н., Слынько Н.М., Яковлев В.А., Пельтек С.Е. Поиск возобновляемых источников целлюлозы для многоцелевого использования // Вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 569–578.
13. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Гидротермобарический способ получения целлюлозы из отходов злаков // Ползуновский вестник. 2011. № 4-1. С. 236–239.
14. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Предобработка мискантуса китайского в условиях гидротермобарического взрыва в нейтральной среде // Ползуновский вестник. 2010. № 4–1. С. 209–214.
15. Пат. 2472808 Россия, С 1. Способ получения целлюлозы (варианты) и устройство для его осуществления / Будаева В.В., Цуканов С.Н., Сакович Г.В. № 2011134207/05, заявлено 15.08.2011; опубл. 20.01.2013, Бюл. № 2. 10 с.
16. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с.
17. ГОСТ 10820–75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. — М.: Изд-во стандартов, 1991. 8 с.
18. ГОСТ 25438–82. Целлюлоза для химической переработки. Методы определения характеристической вязкости. Издание официальное. — М.: Издательство стандартов, 1982. 20 с.
19. Макарова Е.И. Результаты ферментации целлюлозы мискантуса в ацетатном буфере и водной среде // Химия в интересах устойчивого развития. 2013. № 2. С. 219–225.

УДК 602.3 : 633/635

## ЭНДОГЛЮКАНАЗА IV *TRICHODERMA REESEI* – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОСОСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ

© 2013 г. О.В. Проскурина<sup>1</sup>,  
О.Г. Короткова<sup>2</sup>,  
А.М. Рожкова<sup>2</sup>, В.Ю. Матыс<sup>3</sup>,  
А.В. Кошелев<sup>3</sup>, О.Н. Окунев<sup>3</sup>,  
В.А. Немашкалов<sup>3</sup>,  
О.А. Сеницына<sup>1</sup>, В.В. Ревин<sup>4</sup>,  
А.П. Сеницын<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН», г. Москва

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН», г. Пущино

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск

### Введение

Одним из актуальных направлений развития биотехнологии на сегодняшний день является использование непищевой растительной биомассы в

качестве сырья для получения различных полезных продуктов. Входящие в состав растительной биомассы полисахариды (целлюлоза и гемицеллюлозы)