

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ПОЛУЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ЛИСТВЕННОЙ ДРЕВЕСИНЫ

© 2014 г. Е.В. Новожилов¹,
А.С. Аксенов¹, М.Л. Демидов¹,
Д.Г. Чухчин¹, Г.С. Доценко³,
Д.О. Осипов³, А.П. Синицын^{2,3}

¹ Северный (Арктический) федеральный университет, г. Архангельск

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

Введение

Общеизвестно, что при реализации технологий биорефайнинга в результате ферментативного гидролиза различных целлюлозосодержащих материалов (далее ЦСМ) могут быть получены сахара, которые востребованы не только как конечные целевые продукты, но и как исходное сырье для последующей переработки, например для получения этанола или бутанола (биотоплива), органических кислот, аминокислот и других полезных продуктов.

Методами генетической инженерии были получены новые ферментные препараты с высоким содержанием целлюлаз и ксиланаз для осахаривания ЦСМ [1]. Биокатализаторы, созданные на основе штаммов *P. verruculosum*, являются конкурентоспособными по отношению к широко используемым коммерчес-

ким биокатализаторам на основе штамма *Trichoderma* [2, 3]. Биокатализаторы на основе рекомбинантных ферментных препаратов гриба *P. verruculosum* имеют преимущество по сравнению с известными коммерческими аналогами, поскольку состав новых биокатализаторов более сбалансирован, что позволяет достичь увеличения выхода сахаров.

Не все виды ЦСМ одинаково хорошо подходят для промышленной реализации процесса осахаривания, поскольку для этого необходимо удовлетворение требований высокой реакционной способности (РС) сырья при ферментативном гидролизе и доступности его в больших количествах. Целлюлозно-бумажная промышленность (ЦБП), перерабатывающая в основном древесину хвойных и лиственных пород, имеет большой потенциал для развития технологий биорефайнинга с получением глюкозы и ее последующей переработки. Ранее неоднократно определялась РС при ферментативном гидролизе различных продуктов и отходов ЦБП [4–6]. Однако ферментативный гидролиз полуфабрикатов высокого выхода, к которым относится полуцеллюлоза (ПЦ), изучен недостаточно.

ПЦ с выходом 75–80 % в промышленности получают различными способами варки, применение нашли нейтрально-сульфитный способ и варка с зеленым щелоком [7]. В качестве сырья используют лиственные породы древесины, в России — в основном березу и осину. ПЦ используется для изготовления бумаги для гофрирования, оберточной бумаги, картона. В полуфабрикатах высокого выхода сохраняются

Новожилов Е.В. – д-р техн. наук, проф. заведующий кафедрой биотехнологии и биотехнических систем Северного (Арктического) федерального университета. Тел.: (8182) 21-89-65. E-mail: noev50@gmail.com

Аксенов А.С. – канд. техн. наук, доцент той же кафедры того же университета. Тел.: (8182) 21-61-45. E-mail: axbiotech@mail.ru

Демидов М.Л. – канд. техн. наук, доцент кафедры технологии целлюлозно-бумажного производства того же университета. Тел.: (8182) 21-61-82

Чухчин Д.Г. – канд. техн. наук, доцент кафедры биотехнологии и биотехнических систем того же университета. Тел.: (8182) 21-89-38

Доценко Г.С. – канд. хим. наук, мл. науч. сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел.: (495) 939-59-66. E-mail: gsdotsenko@gmail.com

Осипов Д.О. – канд. хим. наук, науч. сотрудник того же института. E-mail: doosipov@gmail.com

Синицын А.П. – д-р хим. наук, проф. химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел.: (495) 939-59-66. E-mail: apsinitsyn@gmail.com

в большом количестве нецеллюлозные компоненты: гемицеллюлозы и лигнин, которые могут ограничивать доступ биокатализаторов к целлюлозным фибрillам. Показано [8], что имеется существенное различие в действии препаратов целлюлаз на волокна нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы (НСПЦ).

В настоящей работе с применением биокатализаторов, представляющих собой рекомбинантные целлюлолитические ферментные препараты гриба *P. verruculosum*, изучена реакционная способность при ферментативном осахаривании различных видов ПЦ, а также оценено влияние размола и высушивания ПЦ на эффективность ее ферментативного гидролиза мультиферментным целлюлазным комплексом.

Материалы и методы

Образцы ЦСМ. Образец НСПЦ (далее — образец № 1) был отобран из производственного потока предприятия группы «Илим». Сырьем служила смесь березы и осины. Нейтрально-сульфитный варочный раствор представляет собой смесь сульфита натрия и щелочного буфера (карбоната натрия) при соотношении $\text{Na}_2\text{O}/\text{SO}_2$, равном 1,8 : 1. Степень разработки волокна ПЦ характеризовали степенью помола [ГОСТ 14363.4—89], а остаточное содержание лигнина числом каппа, определенным по методике SCAN-C 1:77, для образца № 1 эти показатели составляли: степень помола 14 °ШР, число каппа 106. Образец № 2 был получен после механического размола НСПЦ на промышленной дисковой мельнице МД-31 при концентрации массы 3 % до степени помола 22 °ШР.

Образец № 3 был получен путем лабораторной варки древесины осины с варочным раствором, представлявшим собой зеленый щелок (ЗЩ), получаемый в системе регенерации химикатов сульфат-целлюлозного производства [7]. ЗЩ содержал в своем составе Na_2CO_3 (120—127 г/л в единицах Na_2O) и Na_2S (42—44 г/л в единицах Na_2O), имел сульфидность 35 %, рН 13,2. Варку осиновой щепы проводили в глицериновой бане по следующему режиму: гидромодуль варки 3 : 1, пропитка при 110 °С в течение 15 мин, варка при 170 °С в течение 35 мин, расход зеленого щелока 8 % (по общей титруемой щелочи в единицах Na_2O). После варки ПЦ, сохранившую форму щепы, разделяли на волокна размолом в лабораторной мельнице ЦРА в течение 15 мин в среде горячего отработанного щелока при концентрации около 6 % и промывали водой в лабораторной установке. Массу отжимали вручную до содержания су-

хого вещества 20—25 % и хранили при температуре 4 °С. Полученная ПЦ (образец № 3) при выходе 78 % имела число каппа 110 единиц. Содержание лингнина в образцах ПЦ определяли в лабораторных отливках методом спектроскопии диффузного отражения в ультрафиолетовой области при 280 нм на спектрофотометре UV-3600 (компания Shimadzu) с применением интегрирующей сферы LIST-3100.

Образец № 4 был получен после размола образца № 3 на лабораторной мельнице ЦРА при концентрации массы 6 % до степени помола 70 °ШР. Образец № 5 представлял собой лист бумаги (поверхностная плотность 125 г/м²), полученный из образца № 3 после его размола на мельнице ЦРА при концентрации массы 6 % до степени помола 30 °ШР и изготовлении отливки на лабораторном листоотливном аппарате типа Рапид-Кетен.

Характеристика волокон ПЦ определена на аппарате Fiber Tester (компания Lorentzen & Wettre). Для электронной микроскопии пробы сушили методом лиофильной сушки на установке Labconco (FreeZone 2,5L). Микрофотографии образцов ПЦ получены на электронном микроскопе ZEISS «SIGMA VP». Для улучшения качества снимков образцы покрывали слоем золото-пallадиевой смеси толщиной до 5 нм с помощью напылительной установки Q150T ES (Quorum).

Ферментные препараты. Для определения РС ПЦ были использованы следующие лабораторные ферментные препараты, продуцируемые штаммами микроскопического гриба *P. verruculosum*: препарат B151#3.147.2, содержащий комплекс целлюлаз, и препарат F10#3.201.2, основным компонентом которого (80 %) является β-глюказидаза.

Активности ферментных препаратов по отношению к полисахаридным субстратам: карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), глюкуроноксилану березы (ксилан), микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) — рассчитывали по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС), определяемых методом Шомоди — Нельсона [9]. За единицу активности принимали такое количество ферmenta, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в минуту при концентрации субстрата 5 г/л. Активности ферментных препаратов по фильтровальной бумаге (ФБ) определяли по методу Ghose [10], используя бумагу хроматографическую № 1 производства фирмы Whatman (Англия) и динитросалициловый метод анализа ВС. Активность по *n*-НФ-β-D-глюкопиранозиду (*n*-НФГ) определяли, измеряя начальную скорость образования *n*-нитрофенола. За единицу актив-

Таблица 1
Общие и удельные активности ферментных препаратов *P. verruculosum* B151 и *P. verruculosum* F10

Препарат	ФБ	МКЦ	КМЦ	<i>n</i> -НФГ	Целлобиоза	Ксилан
	50 °C, рН 5,0	40 °C, рН 5,0	50 °C, рН 5,0	40 °C, рН 5,0	40 °C, рН 5,0	50 °C, рН 5,0
Общие активности препаратов, ед./г препарата						
B151#3.147.2	760	578	15116	1404	603	25028
F10 #3.201.2	147	853	4573	35263	46663	620
Удельные активности препаратов, ед./мг белка						
B151 #3.147.2	0,92	0,7	18,3	1,70	0,73	30,3
F10 #3.201.2	0,19	1,1	5,9	45,5	60,2	0,8

ности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола в минуту при концентрации субстрата 1 мМ. Целлобиазную активность определяли, измеряя начальную скорость гидролиза целлобиозы, концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [9] с использованием набора «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкмоль целлобиозы (или образования 2 мкмоль глюкозы) за 1 мин при концентрации субстрата 2 мМ. Общие и удельные активности использованных ферментных препаратов приведены в табл. 1. Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта ферментный препарат *P. verruculosum* с известным содержанием белка (содержание белка составляло 899 мг/г) [11].

Определение РС. Ферментативный гидролиз ПЦ проводили в терmostатируемых при 50 °C ячейках вместимостью 50 мл, помещенных на качалку (250 колебаний/мин). В ячейку вносили навеску субстрата, рассчитанное количество 0,1 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0) и 1 мл раствора, содержащего необходимое количество ферментного препарата. Общий объем реакционной смеси составлял 20 мл. Концентрация ПЦ в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество). Дозировка ферментного препарата *P. verruculosum* B151 составляла 10 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата. Совместно с препаратом *P. verruculosum* B151 в реакционную среду добавляли содержащий β-глюказидазу препарат *P. verruculosum* F10 из расчета 40 единиц целлобиазной активности на

1 г сухого вещества субстрата. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы (по 0,5 мл), центрифугировали (10 тыс. об/мин, 3 мин) и измеряли содержание ВС методом Шомоди — Нельсона и глюкозы глюкозооксидазно-пероксидазным методом [9].

За критерий РС ПЦ при ферментативном гидролизе принимали ее предельную степень конверсии по отношению к абсолютно сухому веществу субстрата (а.с.в.), а также выход глюкозы от ПЦ и от абсолютно сухой древесины (а.с.д.) как исходного сырья, выраженные в процентах.

Результаты и их обсуждение

РС при ферментативном гидролизе зависит от степени кристалличности целлюлозы, величины доступной ферментам поверхности и наличия нецеллюлозных компонентов [12, 13]. Ранее отмечалась перспективность использования механохимических методов при подготовке лигноцеллюлозной биомассы к ферментативному гидролизу [14]. Цель дополнительного размола заключается в измельчении исходного сырья, частичной деструкции и уменьшении степени полимеризации целлюлозы. Это приводит к улучшению действия биокатализаторов, сокращает длительность ферментативной обработки. Несмотря на большое разнообразие методов механической деструкции, позволяющих в отдельных случаях получать частицы материала в диапазоне от нескольких миллиметров до нескольких нанометров, многие из них неприменимы в условиях производства вследствие неоправданно высоких энергозатрат. Существенное улучшение биокатализа лигноцеллюлозной биомассы достигается также при частичном или полном удалении лигнина, который является физическим барьером, ограничивающим каталитическое действие целлюлаз и гемицеллюлаз [15, 16].

В производстве ПЦ уже применяются различные приемы механохимической обработки исходного древесного сырья. Это такие операции, как измельчение сырья, поступающего в виде бревен, до размеров технологической щепы; варка с нейтрально-сульфитным варочным раствором или с ЗЩ (стадия делигнификации); размол сваренной щепы в горячем состоянии для получения волокнистой массы (полумассный размол); размол волокнистой массы при обычной температуре с дальнейшим изготовлением бумаги и картона.

Для изучения РС нами был отобран образец НСПЦ № 1 из производственного потока предприя-

тия группы «Илим». Нейтрально-сульфитная варка проходит в среде, близкой к нейтральной ($\text{pH} 6\text{--}8$), что обеспечивает снижение деструкции полисахаридного комплекса, представленного целлюлозой и гемицеллюлозами, главным образом ксиланом, и сохраняет высокий выход ПЦ. В процессе варки удаляется около половины лигнина, содержащегося в исходном сырье [7]. В присутствии сульфита натрия идет сульфирование лигнина с присоединением объемных сульфогрупп, частично происходит сульфирование углеводов с образованием углевод-сульфоновых кислот. Выход НСПЦ при варке по режиму КЦБК составляет примерно 77 % от абсолютно сухой древесины (а.с.д.).

Фотография волокна НСПЦ (образец № 1) представлена на рис. 1. Видно, что поверхность волокна разработана слабо, фибрillирование практически отсутствует. Согласно экспериментальным данным, РС этого образца НСПЦ оказалась средней — 31 %, при этом глюкоза составляла только 74 % от ВС (табл. 2). Наличие ксиланазной активности в составе ферментного комплекса привело к относительно высокой ферментативной деструкции ксилана и образованию в качестве продуктов его гидролиза ксилоолигосахаридов и ксилозы.

Далее нами было оценено, как размол суспензии волокнистой массы, широко применяемый в ЦБП,

влияет на ферментативный гидролиз НСПЦ. Образец № 2, размолотый в условиях производства, имел степень помола 22 °ШР. Как видно на рис. 1, механическое воздействие в процессе размола приводит к увеличению количества микродефектов, частично разрушению наружных слоев клеточных стенок волокон. Внешнее фибрillирование сопровождается частичным отслаиванием отдельных фибрill, после чего доступными становятся фибрillы вторичной стенки, что увеличивает площадь поверхности, открытой для биокатализа.

Ранее нами было показано [5], что размол беленой хвойной сульфатной целлюлозы до 28 °ШР привел к увеличению РС на 12 %. Промышленный размол НСПЦ также привел к улучшению ферментативного гидролиза (ФГ) на 13 %, однако образец № 2 по-прежнему характеризовался средним значением РС, равным 35 %, при сохранении доли глюкозы 74 % от ВС (см. табл. 2).

ПЦ на российских предприятиях получают по нейтрально-сульфитному способу варки. Согласно литературным данным, практический интерес представляет также способ варки ПЦ с использованием ЗЩ [17–20]. Основными преимуществами этого метода являются снижение затрат на приготовление варочного раствора, существенное упрощение регенерации отработанного щелока. Нами была проведена опытная варка древесины осины с использованием ЗЩ (получен образец ПЦ № 3). Выход ПЦ составлял $78,0 \pm 0,2$ % от абсолютно сухой древесины (а.с.д.), число каппа равнялось 110 ± 2 , что практически полностью соответствует аналогичным показателям НСПЦ. Был показано, что при варке с ЗЩ в ПЦ сохраняется почти 100 % целлюлозы и около 75 % ксилана от их содержания в древесине [18, 21]. На фотографии об-

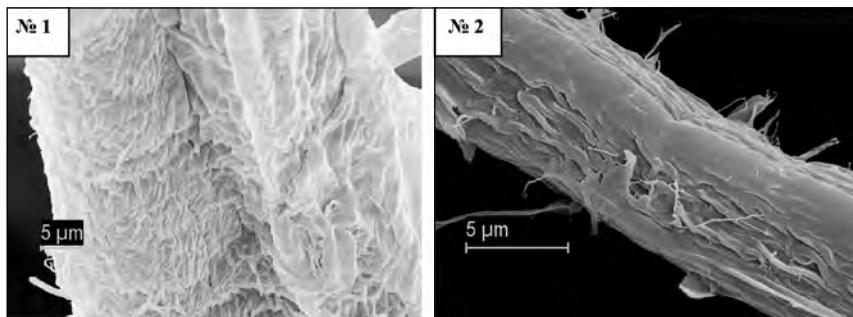


Рис. 1. Волокна НСПЦ: образец № 1 (до размола) и образец № 2 (после размола до степени помола 22 °ШР)

Таблица 2

Реакционная способность образцов ПЦ при гидролизе препаратами *P. verruculosum* B151 и *P. verruculosum* F10

Номер образца	Вид полуцеллюлозы	Выход ПЦ, % от а.с.д.	Выход ВС, % от ПЦ	Выход глюкозы, % от ПЦ	Выход глюкозы, % от а.с.д.
1	Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза исходная	77	31	23	18
2	Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза размолотая	77	35	26	20
3	Полуцеллюлоза после варки с ЗЩ (исходная)	78	53	47	37
4	Полуцеллюлоза после варки с ЗЩ (размолотая)	78	56	49	38
5	Отливки бумаги из ПЦ после варки с ЗЩ	78	31	29	23

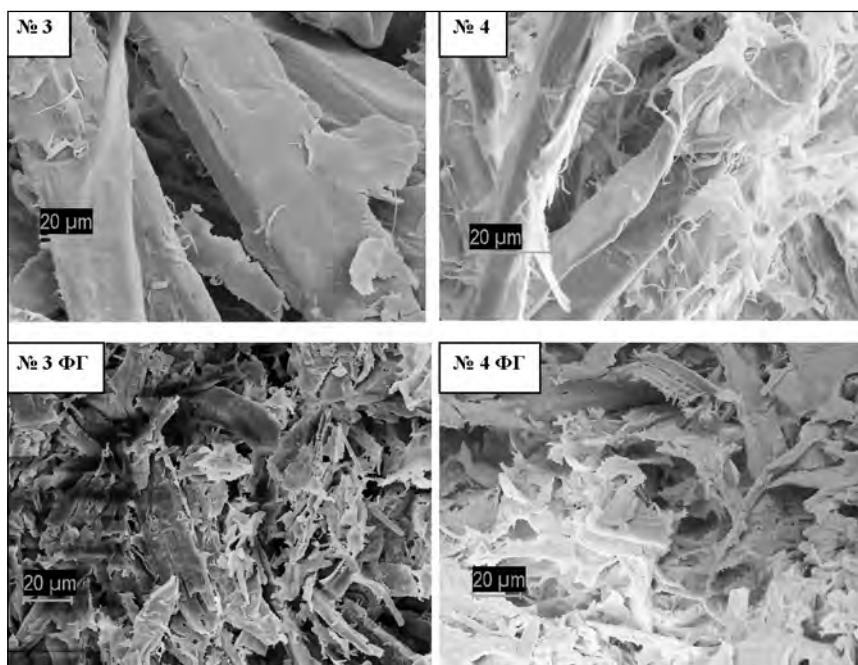


Рис. 2. Волокна ПЦ, полученной варкой с ЗЩ: до размоля (образец № 3); после размоля (образец № 4); после ферментативного гидролиза (ФГ) образцов № 3 и № 4

разца № 3 (рис. 2) волокна ПЦ, как и в случае НСПЦ, сохраняют форму и целостность наружных слоев, почти не содержат фибрill.

НСПЦ и ПЦ после варки с ЗЩ имеют практически равный выход и одинаковое содержание лигнина по числу каппа. Содержание ксилана (пентозанов) в этих ПЦ также существенно не различается и составляет 17,8–19,4 % [18, 21]. Поэтому неожиданным оказалось, что ПЦ после варки с ЗЩ обладает высокой РС, равной 53 % (что выражается в глубоком ферментативном гидролизе целлюлозы и образовании большого количества глюкозы, см. табл. 2). Полученный результат значительно превышает не только РС НСПЦ, но и РС образцов беленой сульфатной целлюлозы, не содержащих лигнина [5].

Ускорение биокаталитической деструкции полисахаридов ПЦ и повышение эффективности ферментативного гидролиза можно объяснить рядом причин. ЗЩ создает более щелочную среду, чем варочный раствор при нейтрально-сульфитной варке, что приводит

к большему набуханию волокон ПЦ. Об этом, в частности, свидетельствует то обстоятельство, что после варки с ЗЩ средняя ширина волокон ПЦ была на 4–6 % больше по сравнению со средней шириной волокон НСПЦ [22]. Развитие микрокапиллярной структуры улучшает диффузию ферментов к субстрату внутри клеточных стенок волокон. Кроме того, при варке с ЗЩ делигнификация древесины проходит по другому механизму, близкому к механизму сульфатной варки. Это исключает образование лигносульфонатов, объемные сульфогруппы которых могут пространственно затруднять процесс биокатализа, ограничивая контакт ферментов с субстратом.

При изготовлении бумаги степень помола массы обычно ограничивают интервалом 18–30 °ШР, только для специальных видов бумаги размол ведут до 60–70 °ШР. Так как перед нами стояла задача подготовить волокна ПЦ к ферментативному гидролизу, образец № 3 был подвергнут сильному размолу на лабораторной мельнице ЦРА до степени помола 70 °ШР, таким образом был получен образец № 4. Влияние размоля на характеристики волокон ПЦ показано в табл. 3. Как видно из полученных данных, имеют место укорочение волокон ПЦ, снижение толщины клеточных стенок и увеличение доли мелочи (волокон длиной менее 0,2 мм). Появление дополнительных дефектов в структуре волокон открывает новые доступные положения для биокатализа.

Воздействие на структуру ПЦ при ее сильном размole гораздо более выражено (см. рис. 2), чем при слабом размole НСПЦ (см. рис. 1). Процесс деструкции не ограничивался только фибрillированием, происходило также значительное разрушение наружных слоев клеточных стенок, удаление отдельных фрагментов, раскрытие внутренней структуры волокон.

Таблица 3

Структурно-морфологические характеристики волокон ПЦ до и после размоля

Проба ПЦ	Средневзвешенная длина, мм	Средняя ширина, мкм	Массовая доля мелочи, %	Общее число изломов на волокно	Число больших изломов на волокно
Образец № 3 (исходная ПЦ до размоля)	1,02	32,3	1,1	0,54	0,14
Образец № 4 (ПЦ после размоля)	0,88	31,8	2,2	0,56	0,16

Кроме того, при размоле ПЦ происходило частичное удаление лигнина [22]. В результате доступность полисахаридного комплекса ПЦ для последующей биокаталитической деструкции целлюлазами и ксиланазами резко увеличилась. Эффективность ферментативного гидролиза возрастила настолько, что для размолового образца № 4 процесс практически заканчивался за 24 ч, при этом достигался уровень РС 56 % (рис. 3). Исходный образец ПЦ № 3 за это время гидролизовался только частично, для завершения ферментативного гидролиза требовалось увеличение продолжительности в два раза, до 48 ч.

Предельная степень конверсии по ВС образца № 4 по сравнению с образцом № 3 оказалась выше на 6 % (см. табл. 2). На фото остатки двух видов ПЦ после ферментативного гидролиза выглядят одинаково (см. рис. 2, № 3 ФГ и № 4 ФГ). Образцы частично сохраняют волокнистую структуру, но сами волокна сильно разрушены как в поперечном, так и в продольном направлении, наблюдается расслоение клеточных стенок, присутствуют в значительном количестве обрывки волокон.

Биокатализаторы на основе рекомбинантного гриба *P. verruculosum* за счет сбалансированного состава ферментного комплекса позволяют при небольших дозировках достигать высокого выхода сахаров — основная часть целлюлозы, содержащейся в ПЦ, была гидролизована ферментами. Высокое содержание остаточного лигнина в ПЦ, 14,1–15,4 % [17], в отличие от небеленой сульфатной целлюлозы, не ограничивает эффективный ферментативный гидролиз полисахаридов. Ксилан, в значительном количестве присутствующий в ПЦ, также не мешает деструкции целлюлозы, так как сам гидролизуется входящими в состав ферментного комплекса ксиланазами.

Выход глюкозы от сухой массы исходного сырья (осины) составил 37–38 % (см. табл. 2). По данным В.И. Шаркова с соавторами [23], при полном кислот-

ном гидролизе древесины осины *Populus tremula* из целлюлозы образуется 46,4 % глюкозы, а с учетом гидролиза глюкоманнана всего образуется 48,1 % глюкозы. Таким образом, при ферментативном гидролизе ПЦ после варки с ЗЩ степень конверсии полисахаридов до глюкозы составляет примерно 76–78 %. Такой результат был достигнут нами при расходе ферментов 9,8 единиц FPU/г. В работе [18] аналогичная степень осахаривания ПЦ была получена только при расходе ферментов 40 единиц FPU/г субстрата.

Образец ПЦ № 5, также испытанный как субстрат для ферментативного гидролиза, представлял собой отливку бумаги поверхностной плотностью 125 г/м². Для этого ПЦ (образец № 3) размололи до степени помола 30 °ШР на лабораторном оборудовании, изготавлили влажный лист бумаги (отливку), который далее высушили при температуре около 100 °С до содержания влаги 4–6 %. Очевидно, что высушивание размоловых волокон ПЦ отрицательно влияет на ферментативный гидролиз полисахаридов, РС образца № 5 уменьшилась до 31 % (см. табл. 2), хотя доля глюкозы в составе ВС была достаточно высокой (93 %). При высушивании волокон происходят необратимые изменения их структуры. Физическая природа происходящих при сушке превращений связана с уплотнением клеточных стенок волокон, сжатием внутреннего канала и пор, переходом трубчатой формы волокон в ленточную [24]. Все указанные изменения снижают доступность полисахаридного комплекса к ферментативному гидролизу. Они более выражены для волокон сульфатной и сульфитной целлюлозы, в меньшей степени проявляются у волокон ПЦ, которые содержат много нецеллюлозных компонентов и меньше деформируются при сушке. Следует отметить, что ПЦ после варки с ЗЩ даже после высушивания гидролизовалась ферментами примерно в той же степени, что и влажная НСПЦ, не подвергавшаяся сушке, что указывает на принципиальные отличия в структуре и свойствах волокон двух видов ПЦ.

Выводы

- Ферментные препараты на основе гриба *Penicillium verruculosum* являются эффективными биокатализаторами гидролиза полуцеллюлозы из древесины лиственных пород.

- Действующая в целлюлозно-бумажной промышленности технология обеспечивает эффективную подготовку полуцеллюлозы из лиственных пород древесины для биокатализа: разрушение древесины до волокон с раскрытием их структуры, час-

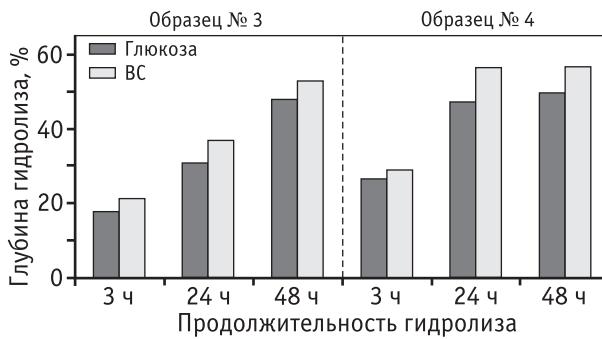


Рис. 3. Глубина ферментативного гидролиза ПЦ после варки с ЗЩ (% от массы исходного субстрата по а.с.в.)

тичную делигнификацию, сохранение целлюлозы и основной части ксилана.

3. Выявлены преимущества лиственной полуцеллюлозы, полученной варкой с зеленым щелоком, как субстрата для ферментативного осахаривания: дешевое исходное сырье, высокая реакционная способность полуцеллюлозы по отношению к ферментативному гидролизу целлюлазными ферментными препаратами, высокий выход восстанавливающих сахаров и глюкозы.

4. Размол полуцеллюлозы из осины после варки с зеленым щелоком дополнительно улучшает ее способность к биокаталитическому воздействию, значительно увеличивая скорость гидролиза ферментами и сокращая в два раза продолжительность процесса до максимальной конверсии субстрата. Высушивание полуцеллюлозы при изготовлении бумаги отрицательно влияет на ее способность к осахариванию и снижает реакционную способность в 1,6 раза.

5. Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза характеризуется средней реакционной способностью по отношению к гидролизу целлюлазным комплексом. Реакционная способность этого вида полуцеллюлозы лимитируется ограниченной степенью набухания волокна и особенностями состава остаточного лигнина.

6. Применение зеленого щелока для получения полуцеллюлозы в сочетании с ее последующим ферментативным гидролизом с получением глюкозы и ксилозы является новым перспективным подходом биорефайнинга древесины лиственных пород.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 14-04-98825).

Литература

1. Проскурина О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А., Синицына О.А., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2013. № 5. С. 65—73.
2. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2012. № 6. С. 68—76.
3. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Биотехнология. 2013. № 3. С. 69—80.
4. Власенко Е.Ю., Кастельянос О., Синицын А.П. // Прикладная биохимия и микробиология. 1993. Т. 29. № 6. С. 834—843.
5. Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Осипов Д.О., Синицына О.А., Короткова О.Г., Степанов В.И., Новожилов Е.В., Ачильдиев Е.Р., Синицын А.П. // Лесной весник МГУЛ. 2012. № 8. С. 129—135.
6. Морозова В.В., Семёнова М.В., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Новожилов Е.В., Синицын А.П. // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 397—400.
7. Технология целлюлозно-бумажного производства. В 3 т. Т. 1. Сыре и производство полуфабрикатов. Ч. 2. Производство полуфабрикатов / Г.Л. Аким, Г.Б. Белодубровский, А.В. Буров [и др]. СПб.: Политехника, 2003. 633 с.
8. Пошина Д.Н., Новожилов Е.В. // Сбор. научн. трудов АГТУ «Наука — Северному региону». Архангельск, Изд-во АГТУ. 2009. Вып. 78. С. 132—136.
9. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНИТИ. 1990. Т. 25. С. 30—37.
10. Ghose T.K. Measurement of Cellulase Activities // Pure Appl. Chem. 1987. Vol. 59. P. 257—268.
11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 461.
12. Gupta R., Lee Y.Y. // Biotechnol. Bioeng. 2009. № 102. P. 1570—1581.
13. Merino S.T., Cherry J. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2007. № 108. P. 95—120.
14. Разумовский С.Д., Подмастерьев В.В., Зеленецкий А.Н. // Катализ в промышленности. 2010. № 5. С. 53—57.
15. Berlin A., Balakshin M., Gilkes N., Kadla J., Maximenko V., Kubo S., Saddler J. // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 125. P. 198—209.
16. Pareek N., T Gillgren T., Leif J.J. // Bioresource Technology. 2013. Vol. 148. P. 70—77.
17. Демидов М.Л., Гурьев А.В. // ИВУЗ «Лесной журнал». 2012. № 5. С. 134—142.
18. Jin Y., Jameel H., Chang H., Phillips R. // Journal of wood chemistry and technology. 2010. Vol. 30. P. 86—104.
19. Wu S., Chang H., Jameel H., Philips R. // Journal of wood chemistry and technology. 2010. Vol. 30. P. 205—218.
20. Wu S., Chang H., Jameel H., Philips R. // Journal of wood chemistry and technology. 2012. Vol. 32. P. 317—327.
21. Суханова Г.П., Новожилов Е.В., Богомолов Б.Д. // Химия древесины. 1988. № 2. С. 62—65.
22. Демидов М.Л. Разработка ресурсосберегающего способа получения полуфабриката для тарного картона. Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Архангельск. 2013. 20 с.
23. Шарков В.И., Куйбина Н.И., Соловьева Ю.П. Количественный анализ растительного сырья. М.: Лесная промышленность, 1976. 72 с.
24. Фляте Д.М. Технология бумаги: Учеб. для вузов. М., 1988. 440 с.