

- змина О.В. Влияние церия на трансформацию гематита и его реакционную способность в восстановительной атмосфере. Сообщение 1 // Катализ в промышленности. 2012. № 5. С. 55—63.
5. Пат. 2458737 РФ. Катализатор дегидрирования изоамиленов / Бусыгин В.М., Гильманов Х.Х., Макаров Г.М. и др. № 2011129122/04; заявл. 13.07.11; опубл. 20.08.12.
 6. Жданова Т.Г., Кузнецова Р.А., Окунева А.С., Логинова Н.К. Раздельное определение соединений калия в железохромкалиевом катализаторе // Промышленность СК. 1986. № 3. С. 5.
 7. А. с. 851293 (СССР) Коэрцитивный спектрометр / Б.В. Буров, Д.К. Нурғалиев, П.Г. Ясонов. 1981.
 8. Kitheri Joseph, Gnanasekaran T. Thermoanalytical study of the reaction of potassium carbonate with ferric oxide // Thermochemica Acta. 1999. Vol. 342. P. 153—160.
 9. Дементьева Е.В. Способ регулирования ферритных фаз в железооксидном катализаторе дегидрирования в условиях промышленного синтеза: дис. ... канд. техн. наук: 05.17.01 / Е.В. Дементьева. — Казань, 2009. — 175 с.
 10. Комиссарова Л.Н. и др. Соединения редкоземельных элементов. Карбонаты, оксалаты, нитраты, титанаты. М.: Наука, 1984. 235 с.

УДК 663.15, 579.66

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ БИОКОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ *TRICHODERMA* И *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

© 2012 г. **А.В. Чекушина**¹,
Г.С. Доценко^{1,2},
А.П. Сеницын^{1,2}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

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

Введение

Большие запасы растительной биомассы (~1 трлн т), а также их возобновляемость делают ее привлекательным сырьем для получения различных видов жидкого топлива и ряда других полезных продуктов. Разнообразие биокатализаторов (ферментов) и их характеристик предоставляет ши-

рокие возможности для эффективной переработки растительного сырья в сахара. Глюкоза, получаемая ферментативным путем из целлюлозы, может быть конвертирована с помощью микроорганизмов в этанол, бутанол, ацетон, органические и аминокислоты, полимеры и многие другие продукты микробного синтеза [1—3].

В настоящее время мутантные или рекомбинантные штаммы грибов рода *Trichoderma* (*T. reesei*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*) играют ведущую роль среди промышленных грибных продуцентов биокатализаторов на основе целлюлаз и гемицеллюлаз [4—7]. Это объясняется, во-первых, их высокой секреторной способностью, а во-вторых — разнообразием продуцируемых ферментов с различной

Чекушина А.В. – аспирант и сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел.: (495) 939-59-66. E-mail: charry_ann@mail.ru

Доценко Г.С. – аспирант химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел. тот же. E-mail: gsdotsenko@gmail.com

Сеницын А.П. – д-р хим. наук, проф., зав. лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, зав. лабораторией биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел. тот же. E-mail: apsinityn@gmail.com

субстратной специфичностью. Поэтому неудивительно, что биокатализаторы (ферментные препараты) целлюлаз на основе грибов *Trichoderma* выпускаются во многих странах ведущими производителями промышленных ферментов, в частности: «Novozymes» (Дания), «Genencor a Danisco Division» (США), «Iogen» (Канада), «PrimAlko» (Финляндия), «Röhm GmbH» (Германия), «EnMex» (Мексика), «Meiji Seika Kaisha Ltd.» и «Shin Nihon Chemical Co.» (Япония) и др. При этом поиск новых продуцентов ферментов, предназначенных для гидролиза растительного сырья, а также увеличение общей активности и сбалансированности по компонентному составу уже известных ферментных комплексов по-прежнему являются актуальными задачами современной биотехнологии.

По последним литературным данным, штаммы грибов рода *Penicillium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Chaetomium* и *Humicola* могут стать достойной альтернативой штаммам рода *Trichoderma*, поскольку по наиболее важным биотехнологическим критериям не уступают, а иногда и превосходят лучшие из известных штаммов *Trichoderma* [8–12].

В данной работе мы провели сравнение активности по отношению к различным субстратам и гидролитической способности по отношению к различным видам целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) коммерческих биокатализаторов, продуцируемых грибами рода *Trichoderma*, и лабораторного биокатализатора, полученного с помощью гриба *P. verruculosum* в качестве продуцента.

Материалы и методы исследования

Биокатализаторы, называемые далее ферментными препаратами

Среди ферментных препаратов, полученных на основе штаммов *Trichoderma* и обладающих наибольшей гидролитической способностью, были выбраны коммерческие продукты: Cellic CTec1, Cellic CTec2 («Novozymes», Дания), Accelerase 1000, Accelerase 1500, Accelerase XY, Accelerase DUET («Genencor a Danisco Division», США). В качестве альтернативных были использованы лабораторные ферментные препараты, полученные с помощью штаммов *P. verruculosum* B151 и F10 (предоставленных ИБФМ РАН, г. Пушкино Московской обл.), которые представляли собой лиофильно высушенные ультраконцентраты культуральных жидкостей.

Субстраты

В качестве субстратов для определения ферментативной активности препаратов были использованы натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) средней вязкости, глюкуроноксилан из березы (ксилан), п-НФ-β-D-глюкопиранозид (пНФГ), п-НФ-β-D-ксилопиранозид (пНФК) производства фирмы «Sigma» (США); бумага хроматографическая № 1 (ФБ) производства фирмы «Whatman» (Великобритания); целлобиоза фирмы «Merck» (Германия); микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) производства ООО «МК-Центр» (г. Дзержинск Нижегородской обл.), измельченная в лабораторной планетарной шаровой мельнице АГО-2.

Определение ферментативных активностей препаратов

Активности ферментных препаратов по отношению к полисахаридным субстратам (КМЦ, ксилан, МКЦ) рассчитывали по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС), определяемых методом Шомоди-Нельсона [13]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в минуту при концентрации субстрата 5 мг/мл. Активности ферментных препаратов по ФБ определяли стандартным методом [14], используя бумагу хроматографическую № 1 и динитросалициловый метод анализа ВС. Активность по пНФГ и пНФК определяли, измеряя начальную скорость образования п-нитрофенола. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль п-нитрофенола в минуту при концентрации субстрата 1 ммоль/л. Полученные активности относили, в зависимости от агрегатного состояния ферментного препарата, к его массе или объему (общая активность) либо к массе белка ферментного препарата (удельная активность). Концентрацию белка ферментных препаратов определяли по методу Лоури [15], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Растительное целлюлозосодержащее сырье

Для изучения гидролитической способности рассматриваемых ферментных препаратов нами были выбраны следующие виды ЦСС: предобработанные паровым взрывом в кислой среде кукурузные стебли и багасса («DNL», Голландия), измельченная древесина сосны и осины (ОАО «Восточно-Сибирский комбинат биотехнологий», Россия) и МКЦ.

Методика эксперимента

Ферментативный гидролиз ЦСС проводили в термостатируемых при 50 °С микропробирках объемом 2 мл, помещенных в термошейкер (с частотой колебаний 250 мин⁻¹). В микропробирку вносили навеску ЦСС, рассчитанное количество 0,1 М Na-ацетатного буфера (рН = 5,0) и 250 мкл раствора, содержащего необходимое количество ферментного препарата. Общий объем реакционной смеси составлял 1,5 мл, а концентрация субстрата — 100 мг/мл (в пересчете на сухое вещество). Дозировки сравниваемых ферментных препаратов составляли 2, 5 и 10 мг белка на 1 г субстрата. В случае использования ферментного препарата *P. verruculosum* B151 в реакционную смесь также дополнительно вносили содержащий β-глюкозидазу препарат *P. verruculosum* F10 так, чтобы концентрация белка F10 в реакционной среде составляла 0,88 мг на 1 г сухого вещества субстрата (что эквивалентно дополнительному внесению 40 ед β-глюкозидазной активности на 1 г сухого вещества субстрата). Затем через 3, 24 и 48 ч гидролиза из реакционной смеси отбирали пробы (по 150 мкл), центрифугировали (10 000 об/мин, 3 мин) и измеряли содержание восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди-Нельсона [13].

Результаты и их обсуждение

Одним из важных критериев для сравнения эффективности ферментных препаратов, предназначенных для биодegradации ЦСС, выступает их удельная активность по ряду специфических субстратов — растворимых и нерастворимых полисахаридов (МКЦ, КМЦ, ксилан), синтетических субстратов (пНФГ, пНФК) и олигосахаридов (целлобиоза). Значения активности рассматриваемых препаратов определены по начальным скоростям гидролиза соответствующих субстратов и приведены в табл. 1.

Полученные данные позволяют для каждого ферментного препарата характеризовать отдельные компоненты ферментного комплекса, эффективность действия и сбалансированность состава которых в значительной мере определяют эффективность его использования при гидролизе многокомпонентного субстрата, которым является растительная биомасса.

Активность по ФБ рассматриваемых препаратов, характеризующая их общую активность по отно-

шению к нерастворимой целлюлозе [14], в среднем составляла 0,6—1,2 ед/мг белка, при этом коммерческий препарат Accelerase 1000 характеризовался повышенной (1,7 ед/мг), а Accelerase XY — крайне малой активностью по ФБ.

Активность по МКЦ иллюстрирует способность ферментных препаратов гидролизовать высокоупорядоченные кристаллические зоны целлюлозы (кристаллиты). Отметим, что высокая степень кристалличности является одной из главных причин инертности целлюлозы по отношению к различным типам биологического воздействия, в том числе к ферментативному гидролизу, и разрушение высокоупорядоченных кристаллических зон является необходимым условием успешной ферментативной деградации целлюлозы. На частичное предварительное разрушение кристаллической структуры целлюлозы направлены различные процессы предварительной обработки (предобработки) целлюлозосодержащего сырья при реализации процессов его биоконверсии. В настоящее время считается, что среди целлюлаз способностью гидролизовать кристаллическую целлюлозу обладают в основном целлобиогидролазы, хотя известны также некоторые эндоглюканазы, проявляющие подобную активность [16—18]. Препараты Cellic CTec1 и Cellic CTec2 обладали одинаковой активностью по МКЦ (0,3 ед/мг белка); препараты Accelerase 1500 и Accelerase DUET, а также *P. verruculosum* B151 характеризовались активностью 0,7—0,8 ед/мг белка; при этом Accelerase XY соответствовал низкий уровень активности по МКЦ (0,1 ед/мг белка), а Accelerase 1000 — наиболее высокий (1,2 ед/мг белка) по сравнению с остальными препаратами.

Активность препаратов по КМЦ демонстрирует их способность гидролизовать менее упорядоченные, аморфные зоны целлюлозы [19, 20]. Гидролиз этих областей субстрата осуществляется главным образом эндоглюканазами, которые гидролизуют внутренние β-1,4-глюкозидные связи, удаленные от концов полимерной цепи целлюлозы, с образованием фрагментов цепи полимерного субстрата и целлоолигосахаридов, что сопровождается существенным уменьшением степени полимеризации субстрата и, как следствие, снижением его вязкости (это особенно важно на первых стадиях процесса ферментативной конверсии ЦСС). Уменьшение вязкости реакционной смеси является весьма существенным при промышленной реализации процессов ферментативного гидролиза, поскольку

Таблица 1

Общие и удельные активности биокатализаторов (ферментных препаратов), полученных с помощью грибов рода *Trichoderma* и *Penicillium* в качестве продуцентов (рН = 5,0)

Препарат	Общая активность, ед/мл (<i>Trichoderma</i>) или ед/г (<i>P. verruculosum</i>), по отношению к субстратам							Удельная активность, ед/мг белка, по отношению к субстратам						
	ФБ 50 °С	МКЦ 40 °С	КМЦ 50 °С	пНФГ 40 °С	Целло- биоза 40 °С	Ксилан 50 °С	пНФК 40 °С	ФБ 50 °С	МКЦ 40 °С	КМЦ 50 °С	пНФГ 40 °С	Целло- биоза 40 °С	Ксилан 50 °С	пНФК 40 °С
Accelerase 1000	151	108	1066	310	234	210	<1	1,7	1,2	12,3	3,6	2,7	2,4	<0,01
Accelerase 1500	117	74	1011	363	223	166	<1	1,2	0,8	10,5	3,8	2,3	1,7	<0,01
Accelerase XY	2	3,5	52,5	38	23	6012	22	<0,1	0,1	0,8	0,6	0,4	92,5	0,3
Accelerase DUET	127	94	909	355	253	1610	146	1,1	0,8	7,9	3,1	2,2	14,0	1,3
Cellic CTec1	122	50	1956	506	426	276	<1	0,7	0,3	10,9	2,8	2,4	1,5	<0,01
Cellic CTec2	135	75	3760	1326	960	6796	<1	0,6	0,3	15,6	5,5	4,0	28,2	<0,01
<i>P. verruculosum</i> B151 (#3.147.2)	760	578	15 116	1404	603	25 028	3	0,9	0,7	18,3	1,7	0,7	30,3	<0,01
<i>P. verruculosum</i> F10 (#3.201.2)	147	853	4573	35 263	46 663	620	<1	0,2	1,1	5,9	45,5	60,2	0,8	<0,01

ку повышенная вязкость может приводить к значительному снижению эффективности некоторых производственных стадий (например, вследствие снижения скоростей теплообмена, перемешивания, массообмена и т.д.). Рассматриваемые коммерческие ферментные препараты в среднем характеризовались активностью по КМЦ — 8—12 ед/мг белка, при этом Accelerase XY соответствовал низкий уровень активности (0,8 ед/мг белка), а лабораторному образцу *P. verruculosum* B151 — наиболее высокий (18,3 ед/мг белка) по сравнению с остальными препаратами.

Активность по пНФГ и целлобиозе характеризует способность препаратов конвертировать образующиеся в ходе гидролиза целлобиозу и целлоолигосахариды (растворимые промежуточные продукты) в глюкозу [21, 22]. Это свойство является значимым не только для получения глюкозы как конечного продукта, но и для общего увеличения эффективности процесса ферментативной конверсии ЦСС эндоглюканазами и целлобиогидролазами, поскольку целлоолигосахариды и целлобиоза ингибируют эти ферменты [23, 24]. Глюкоза же оказывает ингибирующее влияние на эндоглюканазы и целлобиогидролазы в значительно меньшей степени, чем целлоолигосахариды, что обеспечивает кооперативное

действие ферментов целлюлазного комплекса и, как следствие, более полную деструкцию ЦСС. В целом значения активностей рассматриваемых препаратов по пНФГ и целлобиозе для каждого из них являлись величинами одного порядка, которые отличались друг от друга незначительно и находились в пределах 2—4 ед/мг белка. При этом Cellic CTec2 характеризовался повышенной активностью по отношению к пНФГ и целлобиозе (5,5 и 4,0 ед/мг белка, соответственно), а Accelerase XY — пониженной (0,6 и 0,4 ед/мг белка, соответственно). Следует также отметить очень высокий уровень активности лабораторного препарата *P. verruculosum* F10 по этим субстратам (45,5 и 60,2 ед/мг белка, соответственно), что неудивительно, поскольку основной составляющей этого препарата является фермент β -глюкозидаза.

Ксилан является основным гемицеллюлозным компонентом клеточной стенки растений и вторым по распространенности природным полисахаридом после целлюлозы. Поэтому ферментные препараты, предназначенные для гидролиза растительного сырья, помимо целлюлаз, содержат также гемицеллюлазы, в основном представленные ксиланазами. Эффективность конверсии растительного сырья ферментными препаратами в значительной степени определяется их способностью гидролизовать

ксилозосодержащие полисахариды, окружающие в качестве «шубы» целлюлозную матрицу и препятствующие действию на нее целлюлолитических ферментов [25, 26]. Рассматриваемые ферментные препараты продемонстрировали разный уровень ксиланазной активности — от 2 ед/мг белка (Accelerase 1000, Accelerase 1500, Cellic CTec1) до 30 ед/мг белка (Cellic CTec2, *P. verruculosum* B151). Следует также отметить очень высокий уровень ксиланазной активности Accelerase XY (92,5 ед/мг белка) — этот препарат является, по существу, ксиланазой.

Активность препаратов по пНФК характеризует их способность конвертировать образующиеся в ходе гидролиза ксилоолигосахариды в ксилозу, что важно для эффективного действия большинства ксиланаз, ингибируемых этими промежуточными продуктами гидролиза ксиланов. Наибольшей активностью по пНФК характеризовались препараты Accelerase DUET (1,3 ед/мг белка) и Accelerase XY (0,3 ед/мг белка), активность же остальных исследуемых препаратов по этому субстрату оказалась незначительной.

Таким образом, в целом значения удельной активности лабораторного препарата *P. verruculosum* B151 по отношению к использованным субстратам, характеризующие эффективность отдельных компонентов полиферментных систем, предназначенных для гидролиза растительного сырья, сравнимы с аналогичными активностями коммерческих препаратов *Trichoderma*.

Однако, как уже было отмечено выше, указанные значения активности были определены нами по начальным скоростям гидролиза соответствующих субстратов, и их сопоставление не является достаточным для сравнения гидролитической активности препаратов, поскольку в ходе длительного гидролиза ЦСС существенное значение приобретают процессы инактивации ферментов, ингибирования их лигнином (за счет непродуктивной адсорбции на нем ферментов), а также ингибирования ферментов продуктами реакции. Поэтому нами были проведены соответствующие испытания исследуемых ферментных препаратов в ходе длительного (исчерпывающего) гидролиза ЦСС. Выбор определенных видов ЦСС для этих целей был обусловлен следующим. Кукуруза и сахарный тростник, стебли которого после извлечения сока называют багассой, являются традиционными энергетическими культурами, которые выращиваются в промышленных

масштабах в Бразилии, США, а также в Юго-Восточной Азии для производства биотоплива второго поколения (целлюлозного биоэтанола). Древесина хвойных и лиственных пород, представленных в нашем исследовании сосной и осиной, является основным крупнотоннажным отходом лесосечного производства, а также широкого круга деревообрабатывающих производств различного профиля, характерных для России, Европы и Канады. Выбранные субстраты отличались по составу, в том числе по содержанию целлюлозы и гемицеллюлоз (ксиланов), а также по содержанию лигнина. Содержание ксиланов уменьшалось в ряду: кукурузные стебли, багасса, древесина осины, древесина сосны. МКЦ мы использовали в качестве модельного субстрата, который не содержит гемицеллюлоз и лигнина, что позволяет оценить эффективность действия целлюлазных ферментных препаратов в «идеализированных» условиях.

Важной характеристикой целлюлолитических ферментных препаратов для их промышленного применения является зависимость выхода продуктов длительного гидролиза (ВС или глюкозы) от используемой дозировки препарата (чаще всего ее выражают в мг белка ферментного препарата, приходящегося на 1 г сухого вещества субстрата). Такая зависимость получила название «дозной зависимости», которая показывает, какое количество белка ферментного препарата должно приходиться на единицу массы сухого вещества субстрата для получения требуемой концентрации ВС (или глюкозы) по завершении процесса гидролиза. Дозная зависимость определяет экономическую эффективность применения того или иного ферментного препарата, поскольку выгоднее использовать тот из них, который обеспечивает больший выход продуктов гидролиза при равной дозе. Кроме этого, данные, полученные по результатам дозной зависимости, позволяют оценить предельную степень конверсии определенного вида ЦСС и показывают максимально достижимый выход продуктов гидролиза, который при последующем возрастании дозировки ферментного препарата существенно не увеличивается.

Нами были получены дозные зависимости исследуемых ферментных препаратов для выбранных видов ЦСС при дозировке 2, 5, 10 мг белка препарата на 1 г сухого ЦСС. Поскольку препарат *P. verruculosum* B151 обладал пониженной β -глюкозидазной активностью (см. табл. 1), в этих эксперимен-

Таблица 2

Выходы восстанавливающих сахаров в результате гидролиза* ЦСС биокатализаторами (ферментными препаратами), полученными с помощью грибов рода *Trichoderma* и *Penicillium*

Препарат	Выходы ВС, мг/мл, при концентрациях, мг белка препарата на 1 г сухого вещества субстрата														
	Предобработанные паровым взрывом						Измельченная древесина						МКЦ		
	Кукурузные стебли			Багасса			Сосна			Осина					
	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10	2	5	10
Accelerase 1000	37,8	38,0	38,5	19,6	25,8	40,0	22,4	25,3	30,6	21,5	34,3	41,3	26,0	52,2	76,8
Accelerase 1500	33,9	36,5	38,9	17,6	24,4	34,6	19,9	24,5	29,1	19,3	35,2	40,9	27,0	50,6	77,3
Accelerase XY	18,2	18,3	18,3	18,7	19,5	32,8	3,6	4,9	8,6	11,8	13,9	17,3	2,9	4,8	5,8
Accelerase DUET	34,3	34,8	36,9	20,3	31,7	43,0	20,4	24,5	29,5	25,9	41,5	49,6	25,3	53,5	75,6
Cellic CTec1	23,3	26,3	26,3	12,0	21,8	32,0	12,1	14,7	22,6	9,2	18,9	23,0	16,2	30,2	60,8
Cellic CTec2	48,8	53,2	54,4	28,5	37,0	50,5	24,5	29,2	31,6	27,6	40,7	48,4	35,5	73,7	84,4
<i>P. verruculosum</i> B151 + F10	48,1	51,0	52,2	32,2	34,5	48,6	27,3	29,0	32,4	29,8	44,9	52,3	32,5	58,0	75,1

* Условия проведения гидролиза: температура – 50 °С; pH – 5,0; время – 48 ч; концентрация ЦСС – 100 мг/мл по сухому веществу

тах был использован комбинированный препарат *P. verruculosum* B151 + *P. verruculosum* F10, полученный посредством добавления β-глюкозидазного препарата F10 к препарату B151 в таких количествах, чтобы концентрация белка F10 в реакционной среде составляла 0,88 мг на 1 г сухого вещества ЦСС (что эквивалентно дополнительному внесению 40 ед β-глюкозидазной активности на 1 г сухого вещества ЦСС), независимо от дозировки белка препарата *P. verruculosum* B151 (2, 5, 10 мг белка препарата на 1 г сухого вещества субстрата). Полученные результаты длительного (исчерпывающего) гидролиза ЦСС для различных дозировок ферментных препаратов в виде выходов ВС приведены в табл. 2.

В соответствии с полученными ранее данными (см. табл. 1), препарат Accelerase 1000 обладал наибольшими среди исследованных биокатализаторов активностями по ФБ и МКЦ, а также относительно высокими активностями по КМЦ и пНФГ. Препарат Accelerase 1500 в целом характеризовался пониженными по сравнению с препаратом Accelerase 1000 значениями активностей по всем этим субстратам. Величины ксиланазной и β-ксилозидазной активностей препарата Accelerase DUET существенно превышали значения соответствующих активностей препарата Accelerase 1500. Несмотря на выяв-

ленные различия активностей препаратов Accelerase 1000, Accelerase 1500 и Accelerase DUET, полученные экспериментальные данные по осахариванию ЦСС свидетельствуют о том, что эти ферментные препараты обладали примерно одинаковой эффективностью гидролиза предобработанных кукурузных стеблей, предобработанной багассы, измельченной древесины сосны и осины по выходу ВС. Эффективность действия этих биокатализаторов может быть принята в нашем сравнении за «средний уровень». Следует отметить, что Accelerase DUET был более эффективен, чем Accelerase 1000 и Accelerase 1500, для гидролиза предобработанной багассы и измельченной древесины осины при максимальной дозировке ферментных препаратов (10 мг белка препарата на 1 г сухого вещества субстрата). Accelerase XY, представляющий собой, по существу, ксиланазу, оказался наименее эффективным среди исследуемых препаратов для гидролиза предобработанных кукурузных стеблей, измельченной древесины сосны, осины и МКЦ, однако проявил себя конкурентоспособным при гидролизе предобработанной багассы.

Препаратам Cellic CTec1 и Cellic CTec2 соответствовали примерно равные значения активностей по ФБ и МКЦ, которые оказались меньше, чем соот-

ветствующие значения для препаратов Accelerase 1000, Accelerase 1500 и Accelerase DUET. При этом Cellic CTec2 характеризовался увеличенными по сравнению с Cellic CTec1, а также Accelerase 1000, Accelerase 1500 и Accelerase DUET активностями по отношению к КМЦ, пНФГ и целлобиозе. Помимо этого, Cellic CTec2 обладал также высокой ксиланазной активностью. Такое выгодное отличие Cellic CTec2 от Cellic CTec1 и других исследуемых коммерческих препаратов, выявленное в сопоставлении их активностей по начальным скоростям гидролиза, проявлялось и в длительном гидролизе ЦСС. Cellic CTec2 оказался наиболее эффективным для гидролиза предобработанных кукурузных стеблей, предобработанной багассы, измельченной древесины сосны и МКЦ. При гидролизе предобработанных кукурузных стеблей, например, препарат Cellic CTec2 в концентрации 2 мг белка препарата на 1 г сухого вещества субстрата обеспечивал больший выход ВС, чем все остальные коммерческие биокатализаторы в концентрации 10 мг белка препарата на 1 г сухого вещества субстрата. Cellic CTec2, однако, оказался немного менее эффективным, чем препарат Accelerase DUET при гидролизе измельченной древесины осины. Суммарная эффективность препарата Cellic CTec1 в длительном гидролизе ЦСС оказалась ниже эффективностей препаратов Accelerase 1000, Accelerase 1500 и Accelerase DUET, несмотря на сопоставимые величины основных активностей, соответствующих этим препаратам (см. табл. 1). Таким образом, среди исследуемых коммерческих препаратов Cellic CTec2 является наиболее эффективным для гидролиза ЦСС.

Согласно данным, приведенным в табл. 1, лабораторный препарат *P. verruculosum* B151 обладал увеличенными по сравнению с коммерческим биокатализатором Cellic CTec2 активностями по ФБ, МКЦ, КМЦ и ксилану. При этом β -глюкозидазная активность *P. verruculosum* B151 понижена, поэтому в экспериментах по гидролизу был использован комбинированный препарат *P. verruculosum* B151 + *P. verruculosum* F10, полученный посредством добавления β -глюкозидазного препарата F10 к препарату B151. Он превзошел по эффективности Cellic CTec2 при длительном гидролизе измельченной древесины сосны и осины; при гидролизе предобработанных кукурузных стеблей и багассы эффективность B151 + F10 оказалась немного ниже эффективности Cellic CTec2, но тем не менее выше эффективности остальных исследуемых коммерческих препаратов.

Отметим также, что возрастание глубины гидролиза предобработанных кукурузных стеблей (после 48 ч) с увеличением дозировки наиболее эффективных ферментных препаратов (Cellic CTec2 и B151 + F10) оказалось весьма несущественным, что свидетельствует о достижении предельной степени ферментативной конверсии этого субстрата и о его высокой реакционной способности (и высокой эффективности процесса предварительной обработки этого вида ЦСС). Предобработанная багасса и измельченная древесина осины характеризовались большим приростом выхода ВС, чем измельченная древесина сосны, при увеличении дозировки ферментных препаратов, что объясняется повышенным содержанием лигнина в древесине сосны по сравнению с другими рассматриваемыми субстратами.

Максимальные величины прироста ВС, которые также позволяют характеризовать и сравнивать эффективности исследуемых ферментных препаратов, удобно проанализировать по результатам осахаривания модельного субстрата МКЦ. Как и следовало ожидать, глубина гидролиза МКЦ с помощью всех ферментных препаратов, кроме Accelerase XY, оказалась значительно выше обеспечиваемой ими наибольшей глубины гидролиза различных видов ЦСС. При этом максимальное возрастание выхода ВС, приходящееся на единицу массы затраченного ферментного препарата, соответствовало Cellic CTec2 и *P. verruculosum* B151 + F10, продемонстрировавшим наибольшую эффективность при гидролизе различных видов ЦСС.

Заключение

Эффективность действия биокатализатора (ферментного препарата), осуществляющего конверсию растительного сырья, является его важнейшей характеристикой и определяет целесообразность его применения в биотехнологии и получаемую при этом экономическую выгоду. Эта характеристика, в свою очередь, обобщает такие важные свойства препарата, как удельные активности по ряду специфических субстратов и предельные степени конверсии растительного сырья в ходе длительного гидролиза.

Проведенное нами по данным критериям сравнительное исследование коммерческих биокатализаторов (ферментных препаратов) *Trichoderma*, производимых ведущими биотехнологическими компаниями «Novozymes» (Cellic CTec1, Cellic CTec2)

и «Genencor a Danisco Division» (Accelerase 1000, Accelerase 1500, Accelerase XY, Accelerase DUET), а также лабораторного биокатализатора *P. verruculosum* свидетельствует о том, что он не уступает коммерческим препаратам *Trichoderma* или превосходит их по гидролитической активности в процессах осахаривания различных видов целлюлозосодержащего сырья. Это позволяет утверждать, что биокатализаторы (ферментные препараты), полученные на основе штаммов-продуцентов *P. verruculosum*, являются конкурентоспособными при масштабировании биотехнологических процессов биоконверсии возобновляемого растительного сырья.

Данная работа была выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2009–2013 гг.) и ГК № 16.522.12.2003 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.»

Литература

1. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Temp-ler R., Tschaplinski T. The path forward for biofuels and biomaterials // *Science*. 2006. Vol. 311. P. 484–489.
2. Jorgensen H., Kristensen J.B., Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2007. Vol. 1. P. 119–134.
3. Sims R.E.H., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M. An overview of second generation biofuel technologies // *Bioresour. Technol.* 2010. Vol. 101. P. 1570–1580.
4. Merino S.T., Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007. Vol. 108. P. 95–120.
5. Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009. Vol. 20. P. 372–380.
6. Nieves R.A., Ehrman C.I., Adney W.S., Elander R.T., Himmel M.E. Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1998. Vol. 14. P. 301–304.
7. Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A., Schmoll M., Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina* // *Biotechnol. Biofuels*. 2009. Vol. 2. P. 19–33.
8. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunev O.N., Solov'e-va I.V., Bubnova T.V., Kondrat'eva E.G., Synitsyn A.P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma fungi* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. Vol. 41. P. 182–184.
9. Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillon A.J., Ramos L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates // *Bioresour. Technol.* 2008. Vol. 99. P. 1417–1424.
10. Ikeda Y., Hayashi H., Okuda N., Park E.Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticum* // *Biotechnol. Prog.* 2007. Vol. 23. P. 333–338.
11. Fujii T., Fang X., Inoue H., Murakami K., Sawayama S. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticum* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials // *Biotechnol. Biofuels*. 2009. Vol. 2. P. 24–32.
12. Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev O.N., Burlingame R., Emalfarb M., Baez M., Synitsyn A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. Vol. 97. P. 1028–1038.
13. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 30–37.
14. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // *Pure Appl. Chem.* 1987. Vol. 59. P. 257–268.
15. Справочник биохимика / Досон Р. и др. М.: Мир, 1991. 544 с.
16. Clarke A.J. Biodegradation of cellulose. *Enzymology and biotechnology*. Lancaster: Technomic Publishing Company Inc., 1997. 272 p.
17. Teeri T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases // *Trends Biotechnol.* 1997. Vol. 15. P. 160–167.
18. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия // Биоконверсия целлюлозы: микробиология и биохимия. Итоги науки и техники. Сер.: Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 11. С. 8–149.
19. Woods T.M., McCrae S.I., Bhat K.M. The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose // *Biochem. J.* 1989. Vol. 260. P. 37–43.
20. Garcia E., Johnston D.B., Whitaker J.R., Shoemaker S.P. Assessment of endo-1,4-β-D-glucanase activity by a rapid colorimetric assay using disodium 2,2'-bicinchoninate // *J. Food Biochem.* 1993. Vol. 17. P. 135–145.

21. Hösel W., Conn E.E. The aglycone specificity of plant β -glucosidases // Trends Biochem. Sci. 1982. Vol. 7, № 6. P. 219–221.
22. Conn E.E. β -Glucosidases in plants: substrate specificity // β -Glucosidases: Biochemistry and molecular biology / Ed. A. Esen; ACS Symposium Series, 533. Washington: American chemical society, 1993. P. 15–26.
23. Schülein M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens* // J. Biotechnol. 1997. Vol. 57. P. 71–81.
24. Tuohy M.G., Walsh D.J., Murray P.G., Claeysens M., Cuf-
fe M.M., Savage A.V., Coughlan M.P. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii* // Biochim. Biophys. Acta. 2002. Vol. 1596. P. 366–380.
25. Polizeli M.L., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzy H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 67. P. 577–591.
26. Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 56. P. 326–338.

Статьи, опубликованные в журнале «Катализ в промышленности» в 2012 г.

Катализ в химической и нефтехимической промышленности

- | | |
|---|--|
| <p>Кошель Г.Н., Смирнова Е.В., Курганова Е.А., Румянцева Ю.Б., Плахтинский В.В., Кошель С.Г. Жидкофазное окисление изопропилбензола в присутствии <i>n</i>-гидроксифталимида № 1</p> <p>Маникандан Д., Мангаларайя Р.В., Анантакумар С., Сивакумар Т. Синтез металлсодержащих монтмориллонитных катализаторов для реакций селективного дегидрирования № 1</p> <p>Яковлева Е.Ю., Белоцерковская В.Ю. Газохроматографическое определение компонентов реакции каталитического окислительного карбонилирования бензола в бензойную кислоту № 2</p> <p>Иванов Д.П., Пириютко Л.В. Гидроксилирование фенола закисью азота № 3</p> <p>Трегер Ю.А., Розанов В.Н., Соколова С.В., Мурашева О.П. Получение этилена и пропилена из природного газа через промежуточный синтез хлористого метила и последующий его каталитический пиролиз № 3</p> <p>Колтунов К.Ю., Соболев В.И. Селективное газофазное окисление этанола молекулярным кислородом на оксидных и золотых катализаторах № 3</p> | <p>Морозов Ю.В., Насыров И.Ш., Захаров В.П., Мингалеев В.З., Захарова Е.М. Синтез полиизопрена на модифицированных в турбулентных потоках титановых катализаторах № 3</p> <p>Сафин Д.Х., Гильмуллин Р.Р., Гильманов Х.Х. Дезактивирующее действие диоксида углерода на железооксидный катализатор в процессе дегидрирования метилбутенов № 5</p> <p>Шарифуллин Р.Р., Сафина Л.Р., Биктимерова А.С., Габдулхакова Н.С., Сафин Д.Х. Некоторые физико-химические характеристики полиэфиров, полученных с применением диметаллоцианидных катализаторов № 5</p> <p>Андреев Д.В., Грибовский А.Г., Макашкин Л.Л., Адонин Н.Ю., Приходько С.А., Пай З.П., Пармон В.Н. Синтез иминодиуксусной кислоты в микроканальном реакторе № 5</p> <p>Меньщиков В.А., Семенов И.П. Разработка процесса получения этилацетата дегидрированием этанола ... № 5</p> <p>Тарасов А.Л., Кустов Л.М. Парциальное окисление метана в синтез-газ на катализаторах на основе ячеистых металлических носителей № 6</p> |
|---|--|