

УДК 547.9:582.284.5

## МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© *О.В. Голяимова<sup>1,2</sup>, А.А. Политов<sup>1,2\*</sup>, О.И. Ломовский<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, ул. Кутателадзе,  
18, Новосибирск, 630128 (Россия) E-mail: politov@solid.nsc.ru*

<sup>2</sup>*Научно-образовательный центр «Молекулярный дизайн и экологически  
безопасные технологии» при Новосибирском государственном университете  
E-mail: o.golyazimova@gmail.com*

Исследован процесс активации ферментативного гидролиза целлюлозы, с помощью периодического механического измельчения субстрата, которое осуществляли по мере уменьшения скорости ферментативной реакции. Обработка приводит к увеличению реакционной способности целлюлозы за счет уменьшения кристалличности целлюлозы и увеличения поверхности целлюлозы, доступной для молекул белка.

Предложенный метод активации процесса ферментативной конверсии лигноцеллюлозы позволяет достичь 90% конверсии углеводной части различного растительного сырья.

*Ключевые слова:* ферментативный гидролиз, интенсификация, лигноцеллюлоза, солома пшеницы, солома кукурузы, механическая обработка.

*Работа выполнена при финансировании по международному проекту МНТЦ (грант №3235), а также по программе МО № 2.2.2.2/340.*

### **Введение**

Конверсия лигноцеллюлозы в растворимые углеводы является частью процесса получения биоэтанола из растительного сырья [1–3], поэтому изучению механизма ферментативного гидролиза целлюлозы посвящено большое количество исследований. При изучении процесса ферментативной конверсии полисахаридов растительного сырья показано, что лигноцеллюлоза очень устойчива к действию ферментов и степень ферментативной конверсии не превышает 10–15%. Ферментативному гидролизу целлюлозы препятствуют сопутствующие целлюлозе биополимеры: лигнины, гемицеллюлозы, пектины, а также кристалличность целлюлозы, так как не все целлюлазные ферменты способны катализировать гидролиз кристаллической целлюлозы [4]. Поэтому для увеличения реакционной способности субстрата используют различные методы предварительной обработки. Эти методы направлены на удаление лигнинов и гемицеллюлоз из растительного сырья с помощью различных химических реагентов или лигнолитических ферментов и на разрушение кристаллической структуры целлюлозы физическим воздействием [5–13]. Наиболее эффективными методами предварительной обработки являются химические методы, но обработка проводится при высокой температуре и может привести к деградации сахаров и образованию побочных продуктов, которые ингибируют сбраживание углеводов [14]. Тем не менее после применения предварительной обработки наблюдается уменьшение скорости ферментативного процесса, в результате термической инактивации ферментов, сорбции молекул белка лигнинами, ингибирования реакции продуктами ферментативной реакции, а также в результате увеличения степени кристалличности целлюлозы в процессе гидролиза. Поэтому было предложено применять механическую обработку непосредственно в процессе гидролиза [15]. При этом аморфизация

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

кристаллической целлюлозы и ферментативный гидролиз происходят одновременно, что способствует увеличению скорости процесса, но существует большая вероятность того, что молекулы белка в процессе обработки подвергаются денатурации.

Цель данной работы – исследование процесса активации ферментативного гидролиза целлюлозы с помощью периодического механического измельчения субстрата, которое осуществляли по мере уменьшения скорости ферментативной реакции. Технической целью работы является достижение 90% степени конверсии целлюлозы и лигноцеллюлозы.

### **Материалы и методы**

Эксперименты проводили на целлюлозе «Ватман №1» и соломе кукурузы.

Для гидролиза был использован ферментный комплекс «Целлолюкс-А» с целлюлазной активностью 2000 ед/г (ПО «Сиббиофарм», Бердск).

Измельчение целлюлозного субстрата проводили в шаровой мельнице Srex 8, в шаровой мельнице АПФ-4 (ИХТТМ СО РАН, Новосибирск).

**Ферментативный гидролиз целлюлозы.** Гидролиз целлюлозы проводили при температуре 50 °С, при рН 4,7 (ацетатный буфер) и постоянном перемешивании реакционной среды со скоростью 400 об/мин. Отношение массы навески субстрата к массе раствора составляло 1: 20. По мере уменьшения скорости гидролиза, субстрат отделяли от раствора фермента центрифугированием, высушивали, измельчали и снова добавляли ферменты.

Концентрацию углеводов в продуктах гидролиза определяли спектрофотометрическим методом по интенсивности поглощения 0,06% раствора гексацианоферрата калия после реакции восстановления Fe(III) продуктами гидролиза в щелочной среде. Для этого 1 мл гидролизата смешивали с 3 мл раствора гексацианоферрата калия, смесь выдерживали в течение 10 минут на кипящей водяной бане. Интенсивность поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-56, концентрацию углеводов рассчитывали по калибровочному графику, в качестве стандарта для построения калибровочного графика использовали раствор глюкозы с известной концентрацией.

**Определение индекса кристалличности.** Съемка рентгенограмм проводилась на дифрактометре ДРОН-3М, излучение Cu K $\alpha$  1,54 Å, в диапазоне углов  $2\theta = 5-50^\circ$ .

Изменение структуры лигноцеллюлозы характеризовали индексом кристалличности (ИК) по следующей формуле [16]:

$$ИК = \frac{I_{002} - I_a}{I_{002}} \cdot 100\%,$$

где  $I_{002}$  и  $I_a$  – расстояние от базовой линии до вершины пика около  $2\theta = 22^\circ$  и, около  $2\theta = 19^\circ$ .

### **Результаты и обсуждение**

**Гидролиз целлюлозы «Ватман №1».** Степень конверсии целлюлозы фильтровальной бумаги составила в условиях, приведенных в разделе «материалы и методы» 30% (рис. 1). Уменьшение скорости ферментативной конверсии может происходить в результате действия различных факторов: ингибирования реакции продуктами гидролиза (целлобиоза ингибирует действие целлюлазных ферментов), термической инактивации ферментов, а также инактивации в результате перемешивания. Добавление ферментов в реакционную среду маленькими порциями через каждые 4 ч не увеличивает степень конверсии целлюлозы.

По видимому, быстрому гидролизу подвергается аморфная часть субстрата. Большая часть оставшейся целлюлозы, имеющая высокую степень кристалличности практически не подвергается гидролизу.

Для увеличения реакционной способности, субстрат подвергали механической активации (рис. 2).

После того, как скорость процесса уменьшалась, субстрат извлекали из реакционной среды, промывали, высушивали и измельчали. Затем добавляли свежий раствор фермента. Применение метода механической активации субстрата позволяет увеличить скорость конверсии целлюлозы и достичь 90% степени конверсии.

**Ферментативный гидролиз соломы кукурузы.** Растительное сырье является более сложным по химическому составу и строению субстратом по сравнению с фильтровальной бумагой. Степень конверсии исходной соломы пшеницы составляет не более 15% (рис. 3).

При измельчении происходит уменьшение кристалличности целлюлозы, как показано на дифрактограммах (рис. 5, табл.). Механическая обработка увеличивает реакционную способность целлюлозного субстрата. С помощью механической активации степень гидролиза углеводов соломы кукурузы была увеличена до 40%. Однако аморфная целлюлоза быстро расходуется, оставшаяся целлюлоза имеет высокую степень кристалличности (рис. 5, дифрактограмма 2) и скорость ферментативной реакции снова уменьшается.

Ферментативной конверсии целлюлозы растительного сырья препятствуют лигнины, которые вместе с целлюлозой и гемицеллюлозами образуют лигно-целлюлозный комплекс. Разветвленная сетка лигнина окружает волокна целлюлозы, затрудняет доступ молекулам ферментов к поверхности целлюлозы и уменьшает активность ферментов в результате необратимой сорбции молекул белка на лигнинах. При механическом измельчении активация гидролиза осуществляется благодаря уменьшению кристалличности целлюлозы и увеличению доступности целлюлозного субстрата для молекул белка, так как при измельчении появляется новая поверхность субстрата. С помощью периодической механической активации степень гидролиза соломы кукурузы была увеличена до 90% (рис. 4).

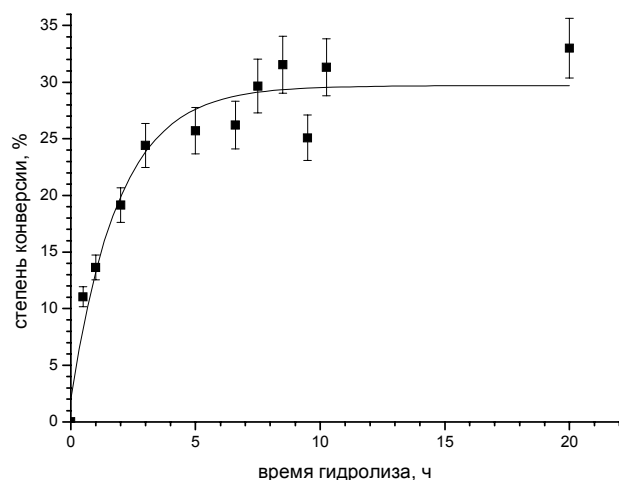


Рис. 1. Конверсия исходной целлюлозы «Ватман №1»

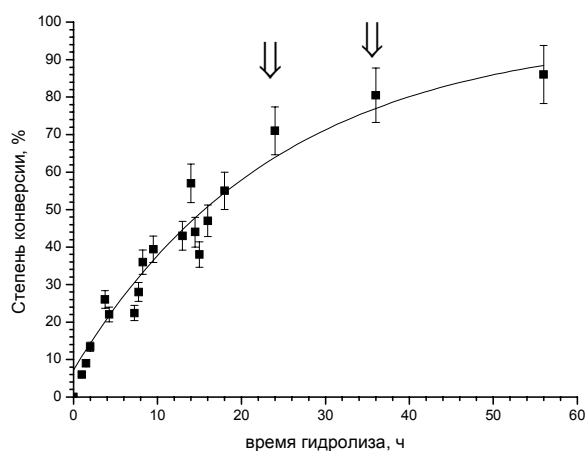


Рис. 2. Кинетика конверсии целлюлозы «Ватман №1» с применением механической обработки (момент обработки указан стрелкой)

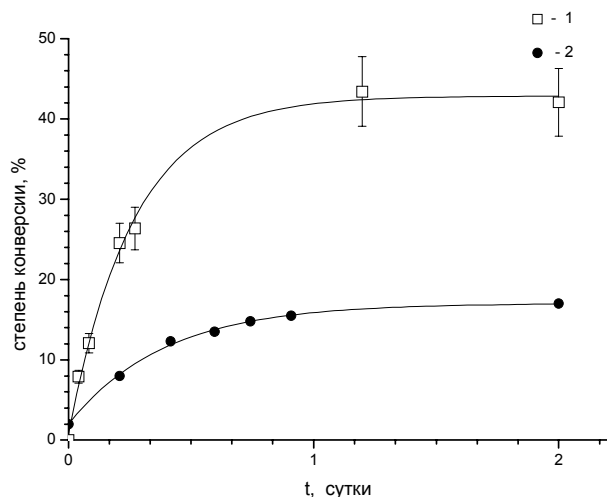


Рис. 3. Конверсия соломы кукурузы в растворимые углеводы: 1 – исходной соломы; 2 – соломы после механической обработки

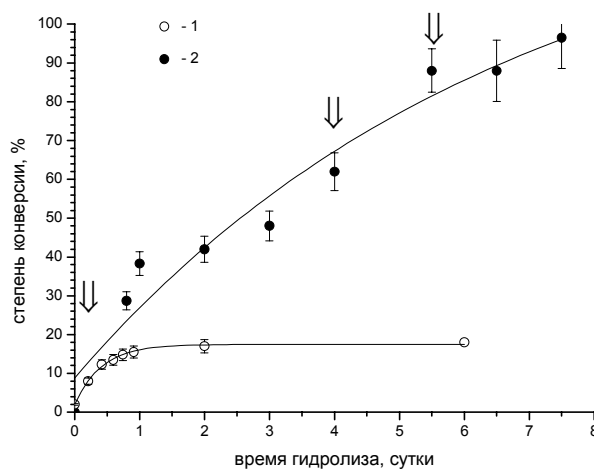


Рис. 4. Кинетика ферментативной конверсии соломы кукурузы в растворимые углеводы: 1 – гидролиз исходной соломы; 2 – гидролиз с применением механической обработки (момент обработки указан стрелками)

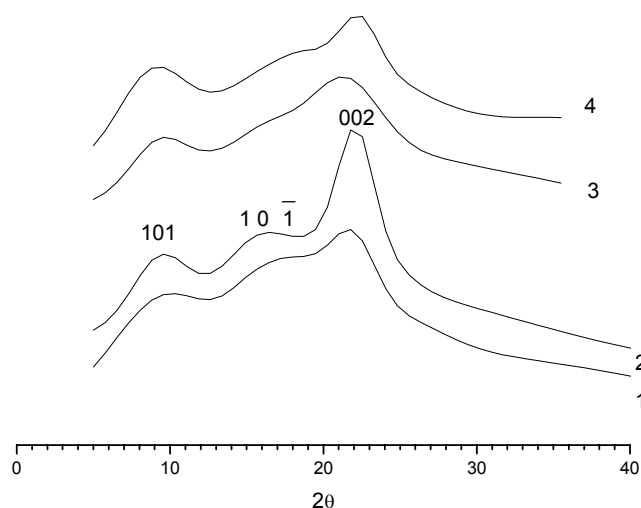


Рис. 5. РФА целлюлозы соломы кукурузы:

1 – после первичной механической активации;  
 2 – после активации и ферментативного гидролиза;  
 3 – после активации, ферментативного гидролиза и повторной активации; 4 – после повторной активации и ферментативного гидролиза

### Влияние механической обработки и ферментативного гидролиза на кристалличность целлюлозы

Обработка	Степень кристалличности, %
Измельчение	17
Гидролиз (62% конверсии углеводов)	48
Повторное измельчение	15
Гидролиз (88% конверсии углеводов)	25
Третье измельчение	13
Гидролиз (95% конверсии углеводов)	17

**Изменение степени кристалличности целлюлозы соломы кукурузы после механической обработки субстрата и после ферментативного гидролиза.** Целлюлоза в растительном сырье представляет собой кристаллическую модификацию I. На рисунке 5 представлены рентгенограммы целлюлозы соломы кукурузы. Пик на рентгенограмме в области углов  $2\theta$  22° соответствует группе рефлексов от кристаллографических плоскостей 002, 200, 102,  $\bar{2}01$ ,  $\bar{1}02$ . Пик в области углов  $2\theta$  15° соответствует интерференции от плоскостей 101,  $10\bar{1}$ . Изменение степени кристалличности при различных операциях обработки приведено в таблице. В процессе конверсии соломы кукурузы происходит увеличение степени кристалличности целлюлозы, т.е. ферменты в данном случае катализируют гидролиз целлюлозы в аморфных участках. Вероятно, это является основной причиной уменьшения скорости гидролиза и низкой степени конверсии. В результате механической активации происходит уменьшение кристалличности соломы. Таким образом, периодическая механическая обработка является эффективным методом активации процесса ферментативной конверсии.

### Заключение

Низкая скорость конверсии лигноцеллюлозы уменьшает рентабельность производства и препятствует его промышленному внедрению. Несмотря на многочисленные исследования в этой области и существование различных способов предварительной обработки субстрата, проблема повышения степени конверсии целлюлозы в растворимые сахара остается актуальной, так как многие из способов невозможно применять в промышленных масштабах вследствие токсичности реагентов, появления побочных продуктов или высокой стоимости такой обработки.

Периодическая механическая обработка субстрата является безопасным и эффективным методом увеличения реакционной способности лигноцеллюлозы. По мере уменьшения скорости гидролиза субстрат извлекают из реакционной среды, высушивают, измельчают и снова подвергают гидролизу. Обработка приводит к увеличению реакционной способности целлюлозы за счет уменьшения кристалличности целлюлозы и увеличения поверхности целлюлозы, доступной для молекул белка.

Очевидно, что при используемых операциях высушивания субстрата и измельчения происходит денатурация ферментов. Но уменьшение ферментативной активности в процессе гидролиза имеет место независимо от воздействия, вследствие процессов термической денатурации и механической инактивации при пере-

мешивании, а также непродуктивной сорбции молекул белка лигнином. Поэтому целесообразно периодически добавлять ферменты в реакционную среду. В нашем случае добавление ферментов в реакционную среду проводят после измельчения субстрата.

Предложенный метод активации процесса ферментативной конверсии лигноцеллюлозы позволяет достичь 90% конверсии углеводной части различного растительного сырья.

Исследование изменения кристаллической структуры в процессе конверсии лигноцеллюлозы соломы кукурузы показало, что в процессе ферментативного гидролиза соломы происходит увеличение степени кристалличности оставшейся части целлюлозного субстрата, т.е. гидролизу подвергаются преимущественно аморфные участки целлюлозы, поэтому механическая активация субстрата, которая приводит к аморфизации целлюлозы, является эффективным способом увеличения реакционной способности целлюлозы.

### **Список литературы**

1. Nigam J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* // *Journal of Biotechnology*. 2001. №87. С. 17–27.
2. Galbe M., Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. №59. С. 618–628.
3. Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol // *Journal of Biotechnology*. 1997. №56. С. 1–24.
4. Mansfield Sh.D., Mooney C., Saddler J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis // *Biotechnol. Prog.* 1999. №15. С. 804–816.
5. Silverstein R.A., Chen Ye, Sharma-Shivappa R.R., Boyette M.D., Osborne J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks // *Bioresource Technology*. 2007. №98. С. 3000–3011.
6. Umikalsom Md S., Ariff A. B., Karim M. I. A. Saccharification of pretreated oil palm empty fruit bunch fiber using cellulase of *Chaetomium globosum* // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46. P. 3359–3364.
7. Saha B.C., Cotta M.A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw // *Biotechnol. Prog.* 2006. №22. С. 449–453.
8. Ohgren K., Bura R., Saddler J., Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover // *Bioresource Technology*. 2007. №98. С. 2503–2510.
9. Perez J., Munoz-Dorado J., Rubia T., MartiNez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview // *Int Microbiol.* 2002. №5. С. 53–63.
10. Badal C. Saha Hemicellulose bioconversion // *Ind Microbiol Biotechnol.* 2003. №30. С. 279–291.
11. Knappert D., Grethlein H., Converse A. Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis // *Biotechnology and bioengineering*. 1980. №22. С. 1449–1463.
12. Синицын А.П., Леонова И.Л., Наджеми Б., Клёсов А.А. Сравнительный анализ реакционной способности целлюлозосодержащего сырья по отношению к ферментативному гидролизу // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1986. Т. 22. №4. С. 517–525.
13. Perez J., Munoz-Dorado J., Rubia T., MartiNez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview // *Int Microbiol.* 2002. №5. С. 53–63.
14. Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., Wu Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol // *Biotechnol. Prog.* 2005. №21. С. 816–822.
15. Nalson M.J., Kelsey R.G. Shafizaden F. Enhancement of enzymatic hydrolysis by simultaneous attrition of cellulosic Substrates // *Biotechnology and bioengineering*. 1982. №24. С. 293–304.
16. Трипп В.У. Определение кристалличности: Целлюлоза и ее производные / Под ред. Н. Байкльза, Л. Сегала. М., 1974. Т. 1. 214 с.

*Поступило в редакцию 14 января 2009 г.*

*После переработки 12 февраля 2009 г.*