

УДК 674.038,630.8

DOI 10.18412/1816-0387-2023-4-75-83

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ ПОЛУФАБРИКАТА ЛИСТВЕННОЙ ДРЕВЕСИНЫ В САХАРА: ПРОВЕДЕНИЕ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПРИ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

© 2023 М.В. Семенова^{1*}, В.Д. Телицин², А.М. Рожкова^{1,2}, Е.Г. Кондратьева¹,
И.А. Шашков¹, А.Д. Сатрутдинов¹, Я.А. Гареева³, В.Г. Мосеев⁴,
А.М. Кряжев³, А.П. Синицын^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН), Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (МГУ),
химический факультет, Москва, Россия

³ ООО «Техсервис», Новодвинск, Россия

⁴ АО «Архангельский ЦБК», Архангельск, Россия

Статья поступила в редакцию 05.12.2022 г., доработана 07.03.2023 г., принята к публикации 09.03.2023 г.

Показана возможность исчерпывающего ферментативного гидролиза полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы (полуфабриката целлюлозно-бумажного производства) при ее сверхвысоких концентрациях в реакционной смеси (до 300 г/л в пересчете на сухое вещество). Для гидролиза использованы российские коммерческие ферментные препараты; наилучшим из них оказался Агроксил Плюс, обладающий высокой активностью целлюлазы и эндоксилазы. С помощью Агроксил Плюс (при его дозировке 20 мг белка/г субстрата) в присутствии вспомогательного ферментного препарата β -глюкозидазы (2 мг белка/г субстрата) при исходной концентрации полубеленой целлюлозы 300 г/л было получено 290 г/л сахаров (в том числе 210 г/л глюкозы, 30 г/л ксилозы). Благодаря методу дробного внесения субстрата удалось в два раза снизить дозировку Агроксил Плюс (10 мг белка/г субстрата при суммарной концентрации полубеленой целлюлозы 300 г/л) с сохранением высокого выхода продуктов гидролиза – 270 г/л сахаров (в том числе 200 г/л глюкозы, 30 г/л ксилозы).

Ключевые слова: полубеленая сульфатная лиственная целлюлоза, ферментативный гидролиз, высокая концентрация субстрата, целлюлазы, *Penicillium verruculosum*.

Семенова М.В. – канд. хим. наук, науч. сотрудник ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: (926) 755-19-78. E-mail: margis@mail.ru

Телицин В.Д. – аспирант химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (909) 912-14-00. E-mail: vadim.telitsin@gmail.com

Рожкова А.М. – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: (910) 464-47-91. E-mail: amrojkova@yahoo.com

Кондратьева Е.Г. – канд. физ.-мат. наук, науч. сотрудник ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: (916) 641-42-84. E-mail: elgenkon@inbox.ru

Шашков И.А. – канд. хим. наук, науч. сотрудник ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: (909) 957-49-99. E-mail: igorshashkov@bk.ru

Сатрутдинов А.Д. – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: (926) 573-96-57. E-mail: sat-aidar@mail.ru

Гареева Я.А. – инженер-химик технологической лаборатории ООО «Техсервис». Тел.: (931) 310-26-86. E-mail: gareeva.yana@mail.ru

Мосеев В.Г. – начальник производства «Целлюлоза» АО «Архангельский ЦБК». Тел.: (931) 411-33-01. E-mail: moseev.vadim@arpm.ru

Кряжев А.М. – д-р техн. наук, зам. генерального директора по развитию производства ООО «Техсервис». Тел.: (905) 280-46-35. E-mail: kryazhev@advplus.com

Синицын А.П. – д-р хим. наук, проф., зав. лабораторией, кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и ФИЦ Биотехнологии РАН. Тел.: (916) 611-48-57. E-mail: apsinityn@gmail.com

Введение

Возобновляемая растительная биомасса, главными компонентами которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин, составляет основную часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии [1]. Биокаталитическая конверсия растительной биомассы позволяет получить C_6 - и C_5 -сахара, которые являются сырьем для их последующей переработки в коммерчески востребованные продукты: спирты (биотопливо), органические кислоты, аминокислоты, диолы, фураны, сложные эфиры, алкены, алканы, акрилаты, полимеры, смолы, кормовые продукты [2].

Получение сахаров из растительной биомассы осуществляется с помощью ферментативного гидролиза под действием комплекса целлюлолитических ферментов, а также гемицеллюлаз (в первую очередь ксиланаз).

Для промышленной реализации процесса ферментативного получения сахаров необходимо решить ряд проблем, одной из которых является поиск видов растительной биомассы, которые были бы доступны в необходимых количествах и обладали бы высокой реакционной способностью при ферментативном гидролизе [3]. Однако, следует отметить, что в изначальном виде растительная биомасса малоприспособлена для ферментативной деструкции вследствие низкой реакционной способности. Это происходит в первую очередь из-за наличия в составе растительной биомассы лигнина, который является главным защитным средством для растения, препятствующим деструкции полисахаридов ферментами. Помимо этого, на лигнине происходит непродуктивная адсорбция ферментов [4]. Кроме того, факторы, которые способствуют устойчивости растительной биомассы к воздействию ферментов, включают нерастворимость полисахаридов, их высокую кристалличность и степень полимеризации, а также ограниченную площадь поверхности, доступной для атаки ферментов [2].

Низкая реакционная способность растительной биомассы является очень существенным негативным фактором, препятствующим практическому воплощению процессов ферментативного получения моносахаридов. Для увеличения реакционной способности при ферментативном гидролизе необходима предварительная обработка растительной биомассы, основными задачами которой является удаление лигнина, разрушение кристаллической структуры целлюлозных волокон, увеличение пористости и до-

ступной ферментам поверхности [5–10]. Существуют разные методы предобработки, основанные на использовании различных принципов воздействия на растительную биомассу: механические, физические, химические, физико-химические, биологические [11–12]. Следует отметить, что ряд методов, рекомендуемых для предобработки биомассы, применяется в целлюлозно-бумажной промышленности. Одним из них является сульфатная варка — эффективный и экономически приемлемый промышленный метод делигнификации древесины с целью получения технической целлюлозы для изготовления бумаги и картона. Термохимический процесс варки заключается в обработке древесной щепы водным раствором, содержащим гидроксид и сульфид натрия, — при производстве небеленой целлюлозы в процессе варки растворяется до 90–97 % лигнина древесины, т.е. лигнин практически полностью удаляется [13]. Важным преимуществом этого метода предобработки является то, что он реализован в крупном масштабе, неорганические химикаты, используемые для варки, регенерируются, растворенные органические вещества и остаточный лигнин сжигаются для получения энергии, хорошо отлажена система очистки сточных вод. Применение сульфатной варки в качестве метода предобработки растительной биомассы позволит использовать оборудование и системы химической рекуперации, уже хорошо разработанные в целлюлозно-бумажной промышленности, тем самым снижая капитальные затраты на предварительную обработку и обеспечивая дополнительные преимущества для целлюлозных заводов [14].

В настоящее время существуют промышленные ферментные препараты целлюлаз (и гемицеллюлаз), продуцентами которых являются микроскопические грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola*, *Myceliophthora* и др., которые способны эффективно превращать различные виды предобработанной растительной биомассы в моносахариды [15]. В ряде публикаций приведены данные по биоконверсии различных видов древесной технической целлюлозы, а также ее полуфабрикатов и отходов до глюкозы с помощью разных препаратов целлюлаз и гемицеллюлаз [16]. Авторы варьировали дозировку ферментных препаратов, исходную концентрацию нерастворимых целлюлозосодержащих субстратов, условия процесса и получали различную степень конверсии целлюлозного сырья в сахара [17–18]. Преимущества при масштабировании процессов биокаталитической конверсии растительной биомассы дает проведение ферментативного гидролиза субстратов при их высокой концентрации в реакционной смеси (более 150

г/л), что приводит к снижению капитальных затрат, эксплуатационных расходов, потребности в энергии и увеличению концентрации сахаров в реакционной смеси после окончания процесса [19]. При этом, как правило, для достижения приемлемой степени конверсии увеличение концентрации субстрата компенсируется повышением дозировки ферментов, что увеличивает себестоимость получаемых сахаров [20]. Помимо этого, существует ряд факторов, связанных с субстратом, в том числе недостаточно эффективное перемешивание реакционной смеси из-за высокой вязкости среды, ограничения по массо- и теплообмену, ингибирование ферментов компонентами субстрата или сахарами (продуктами). Все это снижает эффективность процесса биокаталитической конверсии. Для нивелирования указанных проблем существует несколько подходов, заключающихся в оптимизации состава ферментного комплекса за счет включения туда гемицеллюлаз (в основном ксиланаз) или пектиназ для деструкции различных компонентов растительной биомассы [21–23], а также в использовании некаталитических белков (сапонины, альбумина) и ПАВов [24–25]. Подходящим способом переработки растительной биомассы с высокой концентрацией в реакционной смеси является режим биокаталитической конверсии с подпиткой субстратом [21–22, 26–27]. Этот режим включает периодическое или непрерывное добавление субстрата, помогает поддерживать его оптимальную концентрацию, снижает вязкость реакционной смеси и способствует интенсификации массо- и теплообмена. Такой подход приводит к высокой эффективности процесса биоконверсии растительного сырья.

Целью данной работы является изучение и оптимизация процесса биокаталитической конверсии полуфабриката целлюлозно-бумажного производства — полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы — с помощью отечественных коммерческих и лабораторных ферментных препаратов. Исследования были направлены на достижение максимального выхода моносахаридов.

Материалы и методы исследований

Материалы

Исследования проводили с промышленным образцом полубеленой сульфатной целлюлозы, произведенной в АО «Архангельский ЦБК» (Новодвинск), с исходной влажностью 87 %. Пробу высушивали при 60 °С до значения влажности 5,6 %. В таком образце массовая доля целлюлозы составила 80 %, пентозанов — 10 %, лигнина — 3,6 %, экстрактивных ве-

ществ — 0,4 % и золы — 0,2 %. В пересчете на сухое вещество доля целлюлозы составила 85 %, пентозанов — 11 %. Анализ состава образца полубеленой целлюлозы проводили в лаборатории ООО «Техсервис» по ГОСТ 16932–93 «Целлюлоза. Определение содержания сухого вещества»; ГОСТ 6840–78 «Метод определения содержания альфа-целлюлозы»; ГОСТ 10820–75 «Метод определения массовой доли пентозанов»; ГОСТ 11960–79 «Метод определения содержания лигнина»; ГОСТ 6841–77 «Метод определения содержания смол и жиров»; ГОСТ 18461–93 «Метод определения содержания золы».

Сырьем для выработки образца полубеленой целлюлозы служили лиственные породы древесины: смесь березы и осины в примерном соотношении 50 : 50. Отбелка полубеленой сульфатной целлюлозы была проведена по схеме с применением обработки диоксидом хлора и щелочной экстракции с пероксидом водорода (До-Щ₁П).

В работе использовали коммерческие препараты Агроцелл Плюс, Агроксил Премиум, Агроксил Плюс, произведенные на основе различных штаммов микроскопического гриба *Penicillium verruculosum* на предприятии ООО «Агрофермент». Кроме того, задействовали лабораторные ферментные препараты, полученные с помощью штамма-продуцента *P. verruculosum* B537 (целлюлазы, ксиланазы) и штамма-продуцента *P. verruculosum* F10 (целлобиазы, β-глюкозидазы). Штаммы *P. verruculosum* выращивали в качалочных колбах Эрленмейера емкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава, %: KH_2PO_4 — 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; глюкоза — 1,0; дрожжевой экстракт — 1,0; пшеничные отруби — 1,0; микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) — 40,0. После культивирования в течение 144 ч на качалке при 220 об/мин и 30 °С культуральную жидкость (КЖ) отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10700 g. Препараты B537 и F10 были получены путем лиофильного высушивания КЖ, продуцируемой штаммами *P. verruculosum* B1-537 (ΔniaD) и *P. verruculosum* F10 на лиофильной сушке Benchtop 6K ES (SP Scientific/Virtis, США).

Определение активностей ферментных препаратов

За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активности по отношению к полисахаридным субстратам — натриевой соли карбоксиметилцел-

люлозы, МКЦ, ксилану бука (концентрация 5 г/л в реакционной смеси) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров при pH 5,0 и 50 °C методом Шомоди-Нельсона [28].

Активности по отношению к *n*-нитрофенил-β-D-глюкозиду (0,9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола при pH 5,0 и 50 °C [28].

Содержание белка в ферментных препаратах определяли методом Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Электрофорез в 12 %-ном полиакриламидном геле с Na-додецилсульфатом проводили на приборе MiniProtein (Bio-Rad, США) согласно руководству к прибору. Содержание индивидуальных белков в ферментных препаратах оценивалось методом денситометрии.

Ферментативный гидролиз

Ферментативный гидролиз полубеленой целлюлозы проводили при различной дозировке препаратов Агроцелл Плюс, Агроксил Премиум, Агроксил Плюс, B537 по белку (5—20 мг белка/г сухого вещества субстрата). В реакционную смесь вносили дополнительно 10 % препарата F10 (1 мг белка/г субстрата). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100—300 г/л в пересчете на сухое вещество.

Гидролиз проводили в течение 2—4 сут в пластиковых баночках объемом 50 мл (объем реакционной смеси 20 мл) в термостатируемом шейкере Biosan TS-100 (Biosan, Латвия). Во всех случаях процесс гидролиза осуществляли в присутствии 0,1 г/л антибиотика ампициллина (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) в 0,1 М натрий-ацетатном буфере pH 5,0 при 50 °C.

В ходе процесса отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию восстанавливающих сахаров (методом Шомоди-Нельсона) и качественный и количественный состав моносахаридов с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 (Agilent, США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм; 4,0 × 250 мм); в качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10—100 мкл.

Результаты и их обсуждение

Ферментативный гидролиз полисахаридов растительной биомассы происходит под действием комплекса целлюлолитических ферментов, в состав которого входят экзо-1,4-β-глюканазы (целлобиогид-

ролазы, КФ 3.2.1.91), эндо-1,4-β-глюканазы (эндо-глюканазы, КФ 3.2.1.4) и β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.74). Целлобиогидролазы катализируют деструкцию кристаллических участков целлюлозы последовательно, по процессивному механизму, отщепляя целлобиозу от концов полисахаридной цепи. Эндоглюканазы катализируют гидролиз аморфных участков целлюлозы, расщепляя по неупорядоченному механизму внутренние 1,4-β-глюкозидные связи, снижая тем самым степень полимеризации субстрата и создавая новые сайты для действия целлобиогидролаз. β-Глюкозидазы гидролизуют целлобиозу и целлолигосахариды до конечного продукта — глюкозы. Кроме того, в гидролизе полисахаридов растительной биомассы участвуют эндо-1,4-β-ксилазы (ксилазы, КФ 3.2.1.8) и другие гемицеллюлазы [2].

Активность и состав используемых ферментных препаратов

В качестве основных (целлюлолитических) препаратов для гидролиза полубеленой целлюлозы были использованы коммерческие продукты Агроцелл Плюс, Агроксил Премиум, Агроксил Плюс, а также лабораторный препарат B537, в качестве вспомогательного (β-глюкозидазного) — ФП F10.

Для указанных выше ферментных препаратов были измерены активности по отношению к ряду субстратов (удельная активность препаратов приведена в табл. 1). Агроцелл Плюс обладал высокой активностью по отношению к карбоксиметилцеллюлозе (эндоглюканазная активность), у Агроксил Премиум и B537 эта активность была ниже, у Агроксил Плюс и F10 — существенно ниже.

Удельная активность по отношению к МКЦ (целлобиогидролазная активность) была максимальна у препаратов B537 и Агроцелл Плюс, несколько ниже — у Агроксил Плюс и Агроксил Премиум. Препарат F10 имел минимальную активность по отношению к МКЦ.

Препарат F10 обладал максимальной активностью по отношению к *n*-нитрофенил-β-D-глюкозиду (β-глюкозидазная/целлобиазная активность), у других препаратов эта активность была существенно меньше.

Агроксил Плюс имел максимальную удельную ксиланазную активность, несколько ниже (в порядке убывания) она была у Агроксил Премиум и B537. Агроцелл Плюс и F10 имели низкую ксиланазную активность.

На рис. 1 представлены данные электрофореза для используемых в работе ферментных препаратов,

в табл. 2 — содержание индивидуальных ферментов, входящих в состав этих препаратов. Агроцелл Плюс характеризовался высоким содержанием эндоглюканазы 1, а также имел в своем составе эндоглюканазу 2 и целлобиогидролазу 1. Агроксил Плюс имел высокое содержание ксиланазы и несколько меньшее — эндоглюканазы 2 и целлобиогидролазы 1;

Агроксил Премиум — высокое содержание ксиланазы и эндоглюканазы 2; B537 — высокое содержание целлобиогидролаз 1 и 2, а также некоторое количество эндоглюканазы 2. Все перечисленные ферментные препараты имели низкое содержание β -глюкозидазы (целлобиазы), которая, однако, имелась в большом количестве у препарата F10. Именно поэтому данный

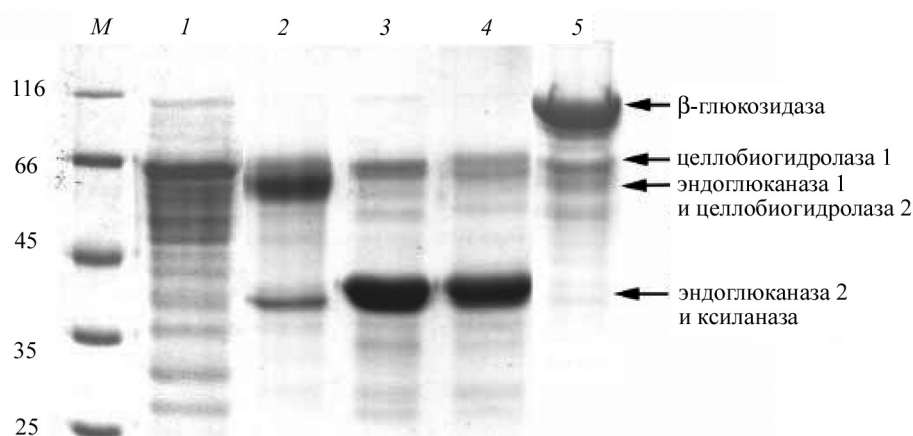


Рис. 1. Электрофорез используемых ферментных препаратов с указанием основных ферментов: 1 – B537, 2 – Агроцелл Плюс, 3 – Агроксил Премиум, 4 – Агроксил Плюс, 5 – F10. М-маркеры, указаны молекулярные массы стандартных белков, кДа

Таблица 1

Содержание белка и удельная активность по отношению к различным субстратам в ферментных препаратах

Ферментный препарат	Содержание белка, мг/г	Активность к субстрату, ед./мг белка			
		МКЦ	Карбоксиметил-целлюлоза	Ксилан	<i>n</i> -нитрофенил- β -D-глюкозид
Агроцелл Плюс	71 $\pm$ 3	0,76 $\pm$ 0,07	48 $\pm$ 4	9,2 $\pm$ 0,8	0,73 $\pm$ 0,04
Агроксил Премиум	92 $\pm$ 4	0,53 $\pm$ 0,04	19 $\pm$ 2	34 $\pm$ 3	0,58 $\pm$ 0,03
Агроксил Плюс	90 $\pm$ 4	0,66 $\pm$ 0,06	5,2 $\pm$ 0,4	66 $\pm$ 6	0,76 $\pm$ 0,04
B537	950 $\pm$ 30	0,86 $\pm$ 0,08	13 $\pm$ 1	20 $\pm$ 2	1,8 $\pm$ 0,1
F10	660 $\pm$ 20	0,40 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,2	61 $\pm$ 3

Таблица 2

Содержание индивидуальных ферментов в используемых препаратах

Фермент	Содержание ферментов, %				
	Агроцелл Плюс	Агроксил Премиум	Агроксил Плюс	B537	F10
β -Глюкозидаза	1,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,2	75 $\pm$ 7
Целлобиогидролаза 1	15 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2	39 $\pm$ 3	15 $\pm$ 1
Целлобиогидролаза 2	8 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2	3,0 $\pm$ 0,2
Эндоглюканаза 1	32 $\pm$ 3	0	0	0	0
Эндоглюканаза 2	18 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	2,0 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,2
Ксиланаза	0	32 $\pm$ 2	40 $\pm$ 4	0	0

препарат был выбран в качестве вспомогательного при осуществлении ферментативного гидролиза полубеленой целлюлозы — при всех применявшихся в работе дозировках основных ферментных препаратов в реакционную смесь вносили 10 % вспомогательного препарата F10 (для дозировки использовали нагрузку по белку ферментного препарата в расчете на 1 г сухого вещества субстрата).

В целом данные, приведенные в табл. 1 и 2, хорошо коррелируют: ферментные препараты, имеющие в своем составе значительное содержание эндоглюканаз, продемонстрировали высокую удельную активность по отношению к карбоксиметилцеллюлозе; значительное содержание целлюлогидролаз — высокую активность по МКЦ; значительное содержание ксиланазы — высокую ксиланазную активность; высокое содержание β -глюкозидазы — высокую активность по отношению к *n*-нитрофенил- β -D-глюкозиду.

Ферментативный гидролиз полубеленой целлюлозы

Ранее [29] нами было показано, что полубеленая целлюлоза обладает хорошей реакционной способностью к ферментативному гидролизу. При использовании B537 в качестве основного ферментного препарата, F10 — в качестве вспомогательного, при дозировке 10 мг белка/г субстрата и исходной концентрации субстрата 100 г/л выход восстанавливающих сахаров через 48 ч гидролиза составил 58 г/л, глюкозы — 55 г/л (помимо глюкозы, в качестве продуктов наблюдали небольшое количество ксилозы).

По нашим наблюдениям, морфологическое состояние полубеленой целлюлозы позволяет при осуществлении процесса ее биокаталитической конверсии использовать концентрацию субстрата в реакционной смеси существенно больше, чем 100 г/л. Для создания более высоких концентраций субстрата промышленная влажная полубеленая целлюлоза была высушена при 60 °C до величины остаточной влажности менее 1 %. При этом сушка не повлияла на реакционную способность субстрата: предварительный эксперимент показал одинаковый выход продуктов ферментативного гидролиза влажной и высушенной целлюлозы (100 г сухого вещества субстрата/л) в присутствии ферментного препарата B537 (10 мг белка/г субстрата).

Ферментативный гидролиз полубеленой целлюлозы проводили при ее исходной концентрации в реакционной смеси 100, 150, 200, 250 или 300 г сухого вещества субстрата/л. Дозировка основных ферментных препаратов в реакционной смеси составила

5, 10 или 20 мг белка/г субстрата, во всех случаях к основным препаратам добавляли вспомогательный препарат F10 (использовали его в дозировке по белку 10 % от дозировки основного ферментного препарата). Процесс гидролиза осуществляли не более 4 сут. Каждые сутки оценивали состояние реакционной смеси и по возможности отбирали аликвоты, в которых в качестве продуктов гидролиза анализировали восстанавливающие сахара и моносахариды — глюкозу и ксилозу. Как правило, резкое снижение вязкости реакционной смеси наступало при степени конверсии субстрата 60—70 %. Полагали, что еще через 24 ч гидролиза конверсия субстрата приближалась к максимальному значению — в табл. 3 представлены результаты определения концентрации продуктов в данный промежуток времени.

Наиболее активным был Агроксил Плюс: при дозировке 20 мг белка/г субстрата в его присутствии после 3—4 суток наблюдался исчерпывающий гидролиз полубеленой целлюлозы с высокой концентрацией 200, 250 и 300 г/л с получением 210, 250 и 290 г/л сахаров (168, 200 и 210 г/л глюкозы), соответственно, а субстрат с концентрацией 100—150 г/л был успешно прогидролизован до моносахаридов всего за 2 сут. При дозировке этого же препарата 10 мг белка/г субстрата успешным был гидролиз полубеленой целлюлозы в диапазоне концентраций 100—150 г/л: после 3 сут гидролиза выход сахаров составил 108 и 166 г/л, глюкозы — 89 и 130 г/л, соответственно. Попутно в реакционной смеси накапливалась ксилоза в количестве 10 % от исходной концентрации субстрата.

Менее активным был Агроксил Премиум: максимальная концентрация полубеленой целлюлозы, при которой наблюдался исчерпывающий гидролиз, составляла 250 г/л при дозировке препарата 20 мг белка/г субстрата, выход сахаров и глюкозы после 4 сут составил 240 и 192 г/л, соответственно. Для Агроксил Премиум также характерно накопление ксилозы в ходе гидролиза (10 % от исходной концентрации субстрата).

Агроцелл Плюс и B537 показали сходные результаты: при дозировке 20 мг белка/г субстрата оба препарата за 3—4 сут успешно гидролизуют полубеленую целлюлозу с концентрацией не более 150 г/л. Для обоих ферментных препаратов также характерно меньшее количество накапливаемой ксилозы по сравнению с Агроксил Премиум и Агроксил Плюс.

Таким образом, был выявлен наиболее активный к полубеленой целлюлозе ферментный препарат — Агроксил Плюс, который при дозировке 20 мг белка/г субстрата за 4 сут обеспечивал исчерпывающий ги-

Таблица 3

Результаты гидролиза полуцеллюлозы в присутствии ряда ферментных препаратов в разных дозировках при разной исходной концентрации субстрата (температура – 50 °С, pH – 5,0)

Ферментный препарат	Доза препарата, мг белка/г субстрата	Концентрация субстрата, г сухого вещества/л	Время гидролиза, сут	Концентрация продукта, г/л		
				восстанавливающие сахара	глюкоза	ксилоза
Агроцелл Плюс	5	100	4	63±3	48±2	4,1±0,2
	10	100	4	86±4	67±3	5,2±0,2
		150	4	109±5	93±5	8,3±0,4
	20	100	3	98±5	85±4	6,2±0,3
		150	4	152±8	122±6	12,1±0,6
		200	4	166±8	136±7	13,0±0,6
Агроксил Премиум	5	100	4	69±3	58±3	9,1±0,4
	10	100	4	102±5	84±4	10,2±0,5
		150	4	135±7	107±5	15,3±0,7
	20	100	2	105±5	86±4	10,0±0,5
		150	2	153±8	125±6	15,1±0,7
		200	4	213±11	166±8	20±1
		250	4	240±12	192±9	25±1
Агроксил Плюс	5	100	3	90±5	69±3	9,2±0,4
		150	4	125±6	99±5	15,3±0,7
	10	100	3	107±5	89±4	10,1±0,5
		150	3	160±8	130±7	15,0±0,8
		200	4	161±8	121±6	20±1
	20	100	2	107±5	89±4	10,1±0,5
		150	2	160±8	132±7	15,2±0,7
		200	3	210±10	168±8	20±1
		250	4	250±12	200±10	25±1
		300	4	290±14	210±11	30±2
B537	5	100	4	61±3	46±2	3,3±0,2
	10	100	4	96±5	85±4	7,2±0,4
		150	4	104±5	90±5	9,1±0,5
	20	100	3	99±5	86±4	8,0±0,4
		150	4	149±7	124±6	12,1±0,6
		200	4	163±8	133±6	14,2±0,7

гидролиз субстрата при его исходной концентрации в реакционной смеси 300 г/л (концентрация препарата в реакционной смеси составляла 6 мг белка/мл реакционной смеси).

Преимущество Агроксил Плюс перед другими препаратами, по-видимому, связано с наличием у него высокой активности эндоксилазы. В литературе описано положительное влияние вспомогательных ферментов (гемицеллюлаз) на степень конверсии суб-

стратов, и в том числе на выход глюкозы. Так, добавление в реакционную смесь ксиланазы привело к интенсификации ферментативного гидролиза багассы под действием коммерческого препарата Cellic Ctec2 на 50 % [21]. Авторами описывается получение 158 г/л сахаров из 200 г/л багассы в присутствии оптимальной ферментной смеси.

В работе [20] описан эффективный гидролиз кукурузных початков с высокой концентрацией субстрата.

При этом для достижения приемлемой степени конверсии увеличение концентрации субстрата компенсировалось повышением дозировки ферментного препарата, что увеличивало себестоимость получаемых сахаров. Так, для высвобождения 200 г/л глюкозы из 45 % по сухому веществу кукурузных початков понадобилось 20 мг белка/г целлюлозы препарата Cellic Ctec2 (при содержании целлюлозы в сухом субстрате 37 %).

Для уменьшения количества затраченного ферментного препарата был проведен гидролиз полубеленой целлюлозы с дробным внесением субстрата в реакционную смесь. В начале туда вводили 100 г сухого вещества/л полубеленой целлюлозы, а концентрация Агроксил Плюс составляла 3 мг белка/мл или 30 мг белка/г субстрата. После достижения степени конверсии субстрата не менее 95 % в реакционную смесь вносили вторую порцию субстрата (также 100 г/л), а затем после достижения степени конверсии субстрата не менее 85 % — третью (100 г/л). Далее процесс биоконверсии продолжали до достижения исчерпывающего гидролиза субстрата. Таким образом, суммарная концентрация полубеленой целлюлозы в реакционной смеси составила 300 г/л, а концентрация ферментного препарата — 3 мг белка/мл реакционной смеси или 10 мг белка/г субстрата.

Первая порция полубеленой целлюлозы полностью была конвертирована в сахара за первые сутки гидролиза: концентрация восстанавливающих сахаров составила 107 г/л, глюкозы — 87 г/л (рис. 2). При



Рис. 2. Концентрация ксилозы (I), глюкозы (II) и восстанавливающих сахаров (III) после исчерпывающего гидролиза полубеленой целлюлозы в присутствии Агроксил Плюс при дозированном внесении субстрата (1–3). Суммарная концентрация полубеленой целлюлозы – 300 г сухого вещества/л, концентрация ферментного препарата – 3 мг белка/мл или 10 мг белка/г субстрата. Условия гидролиза: pH – 5,0; температура – 50 °C

повторном внесении субстрата процесс его конверсии также завершился примерно за сутки, концентрация сахаров и глюкозы составила 194 и 123 г/л, соответственно. Гидролиз третьей порции полубеленой целлюлозы протекал медленнее и занял 4 сут, финальная концентрация сахаров и глюкозы была 270 и 200 г/л, соответственно.

Широко описанное дробное внесение субстрата позволяет при желании сократить время гидролиза или количество затраченного фермента. Например, в результате гидролиза предобработанной багассы с периодической подпиткой (9 % + 9 %) при высокой дозировке Cellic Ctec2 (25 мг/г целлюлозы) 84,5 % целлюлозы конвертировалось в глюкозу за 24 ч [27]. Авторы [22, 26], напротив, используя низкую дозировку препарата Cellic Ctec2 (3–10 FPU/г), эффективно провели гидролиз багассы с начальной концентрацией субстрата 10–12 % и периодической подпиткой 6–8 % (общая загрузка багассы составляла 30 %) с получением глюкозы 130–180 г/л после 5–7 сут.

В настоящей работе дробное внесение полубеленой целлюлозы (10 % + 10 % + 10 %) позволило в два раза снизить количество затраченного ферментного препарата практически без потери в выходе продуктов (восстанавливающих сахаров и глюкозы) — 270 и 200 г/л. Общее время гидролиза составило 6 сут.

Заключение

В работе использовалась полубеленая сульфатная листовая целлюлоза — субстрат, обладающий высокой реакционной способностью, который был получен в результате хорошо отлаженной (промышленной) процедуры предобработки растительной биомассы. Оптимальным для ее гидролиза оказался коммерческий ферментный препарат Агроксил Плюс, обладавший сбалансированным по составу комплексом целлюлаз и эндоксилазы (при «усилении» состава ферментного комплекса β-глюкозидазой). При относительно невысоких концентрациях в реакционной смеси (100–150 г/л) субстрат полностью конвертировался в сахара со 100 %-ном выходом за 2 суток (доля глюкозы в составе сахаров составляла около 80 %). При исходной концентрации субстрата 300 г/л было получено 290 г/л сахаров (210 г/л глюкозы, 30 г/л ксилозы). При дробном внесении субстрата при суммарной концентрации полубеленой целлюлозы 300 г/л выход сахаров составил 270 г/л (200 г/л глюкозы, 30 г/л ксилозы), при этом удалось в два раза снизить дозировку ферментного препарата.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования с использованием научного оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Литература

1. Гусаков А.В., Синицын А.П. Деполимеризация природных биополимеров. Ферментативный гидролиз целлюлозы // Химия биомассы: биотоплива и биопластики / под ред. С.Д. Варфоломеева. М.: Научный мир, 2017. С. 65—99.
2. Синицын А.П., Синицына О.А. // Успехи биологической химии. 2021. Т. 61. С. 347—414. DOI: 10.1134/S0006297921140121.
3. Aksenov A.S., Tyshkunova I.V., Poshina D.N., Guryanova A.A., Chukhchin D.G., Sinelnikov I.G., Terentyev K.Y., Skorik Y.A., Novozhilov E.V., Sinitsyn A.P. // Catalysts. 2020. Vol. 10, № 5. P. 536. DOI: 10.3390/catal10050536.
4. 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., Константинова С.А., Синицын А.П. // Вестник Московского государственного университета леса — Лесной вестник. 2012. № 8 (91). С. 129—134.
5. Sun Q., Foston M., Meng X., Sawada D., Pingali S.V., O'Neill H.M., Li H., Wyman Ch.E., Langan P., Ragauskas A.J., Kumar R. // Biotechnol. Biofuels. 2014. Vol. 7. Article number 150. P. 1—14. DOI: 10.1186/s13068-014-0150-6.
6. Yang B., Dai Z., Ding S.-Y., Wyman C.E. // Biofuels. 2011. Vol. 2, № 4. P. 421—449. DOI: 10.4155/bfs.11.116.
7. Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. // Ind. Eng. Chem. Res. 2009. Vol. 48. P. 3713—3729. DOI: 10.1021/ie801542g.
8. Karimi K., Taherzadeh M.J. // Bioresour. Technol. 2016. Vol. 200. P. 1008—1018. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.022.
9. Liguori R., Ventorino V., Pepe O., Faraco V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. Vol. 100, № 2. P. 597—611. DOI: 10.1007/s00253-015-7125-9.
10. Dibyajyoti Halder, Mihir Kumar Purkait // Process Biochem. 2020. Vol. 89. P. 110—133. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.10.001.
11. Yu-Cai He, Cui-Luan Ma, Bin Yang. Pretreatment process and its synergistic effects on enzymatic digestion of lignocellulosic material // Fungal cellulolytic enzymes. Microbial production and application / Ed. by Xu Fang, Yinbo Qu. Springer. 2018. P. 1—25. DOI: 10.1007/978-981-13-0749-2_1.
12. Alvira P., Tomáspejó E., Ballesteros M., Negro M.J. // Bioresour. Technol. 2010. Vol. 101, № 13. P. 4851—4861. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
13. Новожилов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкунуова И.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15, № 5. С. 78—83. DOI: 10.18412/1816-0387-2015-5-78-83.
14. Van Heiningen A. // Pulp and Paper Canada. 2006. Vol. 107, № 6. P. 38—43.
15. Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56, № 6. С. 551—560. DOI: 10.31857/S0555109920060161.
16. Морозова В.В., Семенова М.В., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Новожилов Е.В., Синицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 3. С. 397—400.
17. Jin Y., Jameel H., Chang H., Phillips R. // J. Wood Chem. Technol. 2010. Vol. 30. P. 86—104. DOI: 10.1080/02773810903578360.
18. Buzala K., Przybysz P., Rosicka-Kaczmarek J., Kalinowska H. // Cellulose. 2015. Vol. 22, № 1. P. 663—674. DOI: 10.1007/s10570-014-0522-x.
19. Du J., Cao Y., Liu G., Zhao J., Li X., Qu Y. // Bioresour. Technol. 2017. Vol. 229. P. 88—95. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.01.011.
20. Kadhum H.J., Rajendran K., Murthy G.S. // Bioresour. Technol. 2017. Vol. 244. P. 108—116. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.047.
21. Nwamba M.C., Song G., Sun F., Mukasekuru M.R., Ren H., Zhang Q., Cao T., Wang H., Sun H., Hong J. // Bioresour. Technol. 2021. Vol. 338. Article 125505. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125505.
22. Mukasekuru M.R., Kaneza P., Sun H., Sun F., He J., Zheng P. // Ind. Crops Products. 2020. Vol. 146. Article 112156. doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112156.
23. Семенова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сатрутдинов А.Д., Синицына О.А., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55, № 6. С. 586—593. DOI: 10.1134/S0555109919050118.
24. Ying W., Zhu J., Xu Y., Zhang J. // Bioresour. Technol. 2021. Vol. 340. Article 125624. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125624.
25. Wei W., Wu S. // Bioresour. Technol. 2017. Vol. 245. P. 289—295. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.133.
26. Gao Y., Xu J., Yuan Z., Zhang Y., Liu Y., Liang C. // Bioresour. Technol. 2014. Vol. 167. P. 41—45. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.034.
27. Baral P., Pundir A., Kumar V., Kurmi A.K., Agrawal D. // Food Bioproducts Processing. 2020. Vol. 124. P. 72—81. DOI: 10.1016/j.fbp.2020.08.005.
28. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 148.
29. Семенова М.В., Гусаков А.В., Телицин В.Д., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., М. Рожкова А.М., Синицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 4. С. 366—373. DOI: 10.31857/S0555109922040146.