

Р.Ю. Использование мультиэнзимных композиций для гидролиза нетрадиционного целлюлозосодержащего сырья // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 192-198.

8. Макарова, Е. И. Результаты ферментации целлюлозы мискантуса в ацетатном буфере и водной среде / Е.И. Макарова // Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – Т.21. – № 2. – С. 219-225.

9. ГОСТ 10820-75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. – М.: Изд-во стандартов, 1991. – 8 с.

10. Павлов И.Н., Будаева В.В., Сакович Г.В. Термобарическая обработка плодовых оболочек овса в водной среде / Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докладов IV Международной конференции РХО им. Д.И. Менделеева: в 2 т. – г. Москва, 24-25 октября 2012. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева: ИФХЭ им. А.Н.Фрумкина РАН, 2012 г. – Т. 2 – С. 135-137.

11. Химическое обогащение возобновляемого «концентрированного» целлюлозосодержащего сырья [Текст]: отчет о НИР (заключительный): Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН; рук. Сакович Г.В.; исполн.: Будаева В.В., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Обрезкова М.В., Скиба Е.А. и др. – Бийск, 2011. – 78 с. – Библиогр.: с. 77. – № Государственной регистрации 02201250091. Инв. № О-315.

**Павлов Игорь Николаевич**, научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), rawlow-in@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. 8903 958 4140.

**Макарова Екатерина Ивановна**, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), assl@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

**Чибиряев Дмитрий Андреевич**, студент группы БТ-73 Бийского технологического института АлтГТУ им. И.И. Ползунова, практикант-дипломник 2013 года в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), chidim@ngs.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

УДК 577.151:633.13(075.3)

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ИХ ПОДГОТОВКИ

Е.А. Скиба, Т.О. Момот, Н.В. Бычин, В.Н. Золотухин

*В статье приведены результаты исследования зависимости ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов плодовых оболочек овса и мискантуса от способа их подготовки. Показано, что удаление из субстратов продуктов деструкции лигнина (ингибитора) способствует повышению эффективности ферментативного гидролиза.*

*Ключевые слова: мискантус, плодовые оболочки овса, лигноцеллюлозный материал, ферментативный гидролиз, ингибитор, продукты деструкции лигнина.*

### ВВЕДЕНИЕ

Структура лигноцеллюлозной матрицы как древесного, так и недревесного сырья, является очень прочной, поэтому для её успешной ферментативной деструкции требуется предварительная химическая или физико-химическая обработка. В литературе описана предварительная химическая обработка при нормальном давлении раствором серной или соляной кислоты, позволяющая повысить скорость ферментализации не менее, чем в два раза по сравнению с исходным сырьём [1].

В данной работе лигноцеллюлозный материал получен из недревесного целлюлозосодержащего сырья обработкой раствором азотной кислоты.

Азотнокислый способ выбран в силу доступности реагента для нашей промышленной зоны, накопленного опыта использования реагента (включая регенерацию при необходимости), а также возможности получения азотных удобрений на основе отработанного варочного раствора в рамках создания комплексной переработки целлюлозосодержащего сырья.

Из литературы известно, что химиче-

ская обработка растворами кислот разрушает целлюлозную матрицу и приводит к частичному гидролизу гемицеллюлоз. Но в случае обработки сырья азотной кислотой происходит нитрация лигнина и его окисление [2]. Следовательно, возникают два вопроса: во-первых, в субстрате остаётся значительное количество лигнина, будет ли он препятствовать гидролизу? Во-вторых, не будут ли ингибировать ферментализ продукты, образующиеся в результате обработки сырья азотной кислотой? В предварительных опытах лигноцеллюлозные материалы (ЛЦМ), полученные на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН, при ферментализе окрашивали ацетатный буфер, в котором проводился гидролиз, в интенсивный жёлто-коричневый цвет, выход РВ был невысок. Также было показано, что ферментные комплексы адсорбировались на субстрате [3].

Целью данной работы является исследование зависимости ферментативного гидролиза (ФГ) лигноцеллюлозных материалов из недревесного растительного сырья от способа их подготовки.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья выбраны отходы переработки злаков на примере плодовых оболочек овса (ПОО) и биомасса энергетического растения *Мискантус китайский* (М), выращенная в ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. Их объединяет недревесное происхождение, общедоступность, ежегодная возобновляемость.

Лигноцеллюлозные материалы (ЛЦМ) из ПОО и мискантуса получены обработкой разбавленным раствором азотной кислоты при температуре 90-96 °С на опытном производстве и в лабораторных условиях. Характеристики данных субстратов представлены в таблице 1.

В работе использовались ферментные препараты: «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск) и «Брюзайм ВГХ» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diacic International Inc.», США). Препарат «Целлолюкс-А» позиционируется на рынке как целлюлаза для расщепления некрахмалистых полисахаридов, «Брюзайм ВГХ» как гемицеллюлаза.

Таблица 1 – Характеристика лигноцеллюлозных материалов

Обозначение субстратов	Массовая доля компонента, % на а.с.с.			
	зола	лигнин	целлюлоза по Кюршнеру	пентозаны
ЛЦМ ПОО № 593	8,19	13,78	79,21	9,22
ЛЦМ ПОО № 621	8,68	13,05	80,05	10,0
ЛЦМ М № 592	4,75	10,82	88,55	7,89
ЛЦМ М № 632	3,84	11,83	80,09	8,0

Перемешивание реакционной массы осуществляли на платформе ПЭ-6410М или в инкубаторе «UNIMAX 1010» с частотой перемешивания 150 мин<sup>-1</sup>.

Для ферментации в колбу Эрленмейера емкостью 500 мл помещали навеску субстрата и ацетатный буфер (рН 4,7-4,8). Концентрация субстрата – 33,3 г/л. Мультиэнзимную композицию вносили следующим образом: «Целлолюкс - А» – 0,04 г/г субстрата, «Брюзайм ВГХ» – 0,2 г/г субстрата. Гидролиз проводили при температуре (46±2) °С, в течение 72 ч при постоянном перемешивании. Через каждые 8 ч отбирали пробу суспензии 2 мл для определения концентрации моносахаров в пересчете на глюкозу. Концентрацию моносахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрически на «UNICO UV-2804», с использованием динитросалицилового реактива.

Выход РВ (отношение массы РВ к массе субстрата) рассчитан с учетом коэффициента, связанного с присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза.

Были отработаны следующие варианты ферментативного гидролиза:

А) ЛЦМ ПОО № 593, получен на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН;

Б) ЛЦМ ПОО № 593, промыт водой до полного удаления окраски;

В) ЛЦМ ПОО № 621, получен в лабораторных условиях;

Г) ЛЦМ мискантуса № 592, получен на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН;

Д) ЛЦМ мискантуса № 592, промыт водой до полного удаления окраски;

Е) ЛЦМ мискантуса № 632, получен в лабораторных условиях.

Субстраты ЛЦМ ПОО № 593 и ЛЦМ М № 592 хранились в сухом виде, перед ферментализмом навеску субстрата оставляли на 24 ч в ацетатном буфере для набухания (варианты А и В).

Промывку ЛЦМ ПОО № 593 и ЛЦМ М № 592 (варианты Б и Д) проводили водой на магнитной мешалке до полного обесцвечивания промывной воды. Температура нагрева составила 60 °С.

Образцы ЛЦМ ПОО № 621 и ЛЦМ М № 632 (варианты В и Е) были получены в лабораторных условиях, тщательно отмыты от остатков окрашивающих веществ и сразу переданы на ферментацию.

Окисленный (нитрованный) лигнин получен обработкой 4 %-ной азотной кислотой при температуре 90-95 °С в течение 3 ч щелочного лигнина, выделенного из щёлока после натронной варки мискантуса.

Образцы ЛЦМ до и после промывки, а также окисленный лигнин были проанализированы методами дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), ИК-спектроскопии и растровой электронной микроскопии (РЭМ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ физико-химических характеристик субстратов ЛЦМ ПОО № 593 и ЛЦМ М № 592 до и после промывки показал их идентичность (таблица 1). Сравнение полученных результатов позволяет сделать вывод о близких химических составах ЛЦМ, полученных на опытном производстве и в лабораторных условиях для обоих видов сырья.

Образцы ЛЦМ ПОО характеризуются в 2,0 раза большей зольностью, в 1,3 раза большей массовой долей лигнина и в 1,1 раза большей массовой долей пентозанов. Исходя из химического состава, можно предположить большую реакционную способность к ферментативному гидролизу для образцов ЛЦМ М.

Концентрации РВ в зависимости от продолжительности ФГ, а также их выход по окончании ферментации представлены в таблице 2. Зависимость ферментативного гидролиза ЛЦМ от способа подготовки материала приведена на рисунке 1.

Таблица 2 – Концентрация РВ и их выход по окончании ферментации

Показатель	ЛЦМ ПОО			ЛЦМ М		
	А	Б	В	Г	Д	Е
Концентрация РВ, г/л	19,5	24,8	26,8	13,3	25,2	29,5
Выход РВ, % от массы субстрата	52,7	67,0	72,4	35,9	68,1	79,7

Промывка ЛЦМ от примесных окрашивающих веществ существенно увеличивает эффективность ферментативного гидролиза. У мискантуса выход РВ увеличивается в 1,9 раза (Д против Г), а у ПОО в 1,3 раза (Б против А). До промывки ЛЦМ М ферментируется хуже, чем ПОО (Г против А). После промывки – способности субстратов выравниваются (Б и Д). Ферментализм подготовленных в лабораторных условиях образцов ЛЦМ ПОО и ЛЦМ М (В и Е) демонстрирует максимальную реакционную способность: выходы РВ составили 72,4 % и 79,7 % соответственно, с преимуществом ЛЦМ М. Таким образом, реакционная способность к ферментативному гидролизу ЛЦМ М более зависит от наличия примесных окрашивающих веществ, являющихся ингибиторами ферментализма.

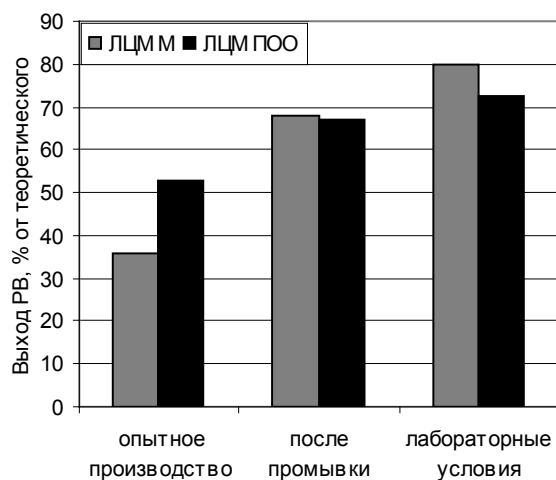
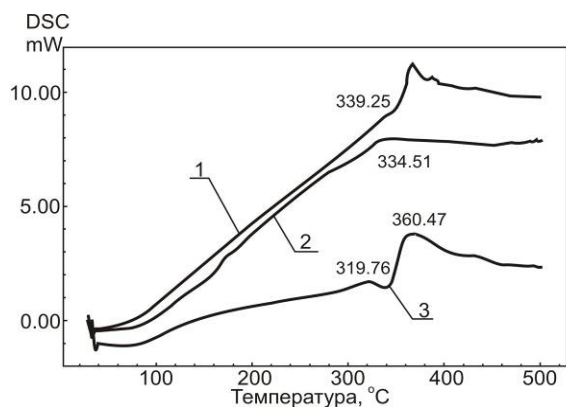


Рисунок 1 – Зависимость ферментативного гидролиза ЛЦМ М и ЛЦМ ПОО от способа подготовки материала

Были сделаны попытки идентификации ингибиторов процесса ферментативного гидролиза. Образцы ЛЦМ ПОО и М были промыты дистиллированной водой, промывные воды, содержащие ингибиторы, собраны и

высушены в нормальных условиях. Примесь ингибиторов составила 0,20 масс. % для ЛЦМ ПОО и 0,15 масс. % – для ЛЦМ М.

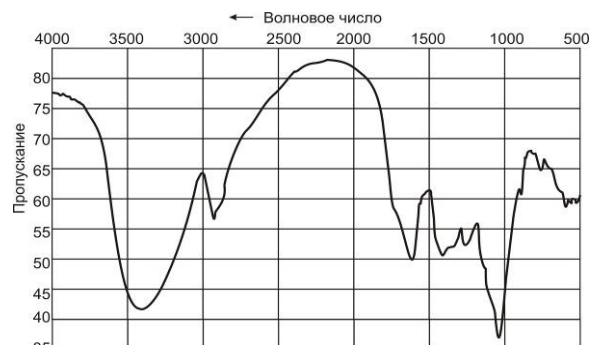


1 – ЛЦМ до промывки; 2 – выделенный ингибитор; 3 – ЛЦМ после промывки  
Рисунок 2. Результаты анализа ДСК образцов ЛЦМ ПОО до и после промывки, а также выделенного ингибитора

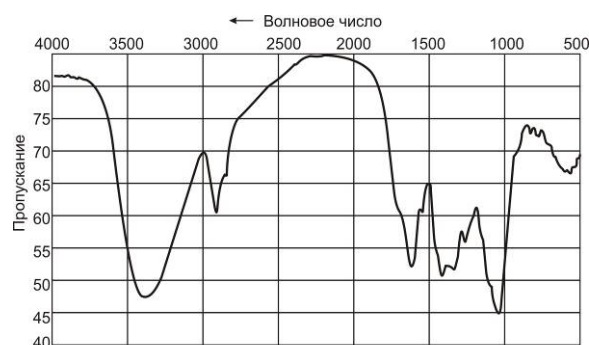
Анализируя представленные на рисунке 2 данные ДСК, можно сделать вывод, что промывка не меняет картину качественно. Однако количественно после промывки все пики разложения стали более чёткими и выраженными, что свидетельствует о повышении степени чистоты ЛЦМ. Кривая разложения ингибиторов, вымытых из ЛЦМ ПОО, имеет пик разложения 335 °С на уровне первого пика разложения ЛЦМ ПОО до промывки (339 °С). Для мискантуса наблюдается аналогичная картина (ДСК не приводится).

На рисунке 3 а, б представлены ИК-спектры ингибиторов. Химическая природа искомого соединений сложна, но можно сказать, что эти вещества близкого состава (например, у обоих зафиксированы колебания в районе 1626 см<sup>-1</sup>, указывающие на наличие ароматических колец в составе ингибиторов, то есть на наличие продуктов разложения лигнина). Качественно ИК-спектры ингибиторов, выделенных из ЛЦМ, сопоставимы с окисленным (нитрованным) лигнином (рисунок 3в), таким образом, можно предположить, что продукты деструкции лигнина являются основной составной частью ингибиторов.

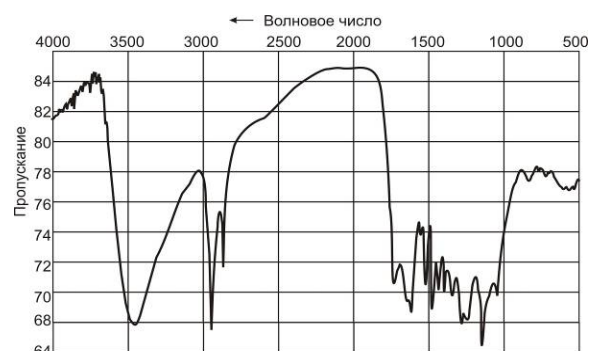
Несмотря на ограниченную растворимость в воде, продукты деструкции лигнина можно удалить многократной промывкой водой образцов ЛЦМ. Следует отметить, что фракция лигнина в структуре матрицы ЛЦМ не оказывает отрицательного влияния на реакционную способность ЛЦМ к ферментации.



а



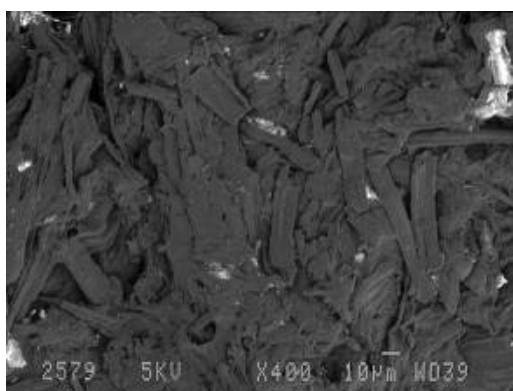
б



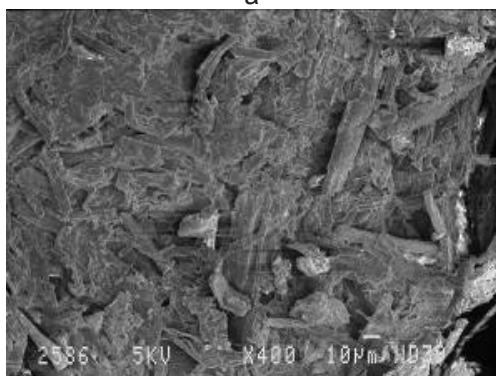
в

Рисунок 3 – ИК-спектры ингибиторов:  
а – ЛЦМ ПОО; б – ЛЦМ М;  
в – окисленного (нитрованного) лигнина.

Результаты РЭМ ЛЦМ, представленные на рисунке 4, позволяют сделать интересное предположение о характере распределения продуктов реакции деструкции (ингибиторов) на поверхности ЛЦМ: эти продукты скрепляют целлюлозные волокна, цементируют и связывают их, и, следовательно, можно предположить, что блокируют комплементарные якорным центрам ферментов трёхмерные участки субстрата (рисунок 4а).



а



б

Рисунок 4 – Фото РЭМ образцов ЛЦМ М:  
а – до промывки; б – после промывки

После промывки ЛЦМ на поверхности субстратов хорошо заметны микротрещины, поверхность становится более развитой и доступной для образования фермент-субстратных комплексов (рисунок 4б). Таким образом, действие ингибиторов двояко: это и отравление активных центров фермента продуктами деструкции лигнина и экранирование трёхмерных структур субстрата комплементарных якорным центрам ферментов.

Факт несовпадения выходов РВ промытых ЛЦМ, полученных в производственных и лабораторных условиях, связан не с разными условиями получения ЛЦМ, а с несвоевременной промывкой продукта. Можно предположить, что в процессе хранения непромытого ЛЦМ медленно протекают реакции окисления с дополнительным образованием соединений с ингибирующими ферментацию свойствами. Поэтому использование свежеподготовленных образцов ЛЦМ показало более высокую эффективность ферментативного гидролиза. Следовательно, стадия промывки является ключевой в процессе подготовки субстрата к ферментативному гидролизу.

### ВЫВОДЫ

Исследован ферментативный гидролиз  
ПОЛЗУНОВСКИЙ ВЕСТНИК № 3, 2013

ЛЦМ ПОО и ЛЦМ М в зависимости от способа подготовки субстрата. Установлено, что продукты деструкции лигнина в количестве 0,15-0,2 масс. % в ЛЦМ могут ингибировать ферментативный гидролиз.

Промывка ЛЦМ водой существенно увеличивает эффективность ферментативного гидролиза: у ПОО в 1,3 раза, у М – в 1,9 раза. Максимальная эффективность ферментативного гидролиза достигается при использовании свежеподготовленного, тщательно промытого субстрата и составляет 72,4 % для ЛЦМ ПОО и 79,7 % для ЛЦМ М.

При попытке идентификации выделенных из ЛЦМ ингибиторов установлено сходство их кривых ДСК и ИК-спектров с результатами ДСК и ИК-спектроскопии окисленного (нитрованного) лигнина.

*Работа выполнена при поддержке совместного интеграционного проекта № 11 фундаментальных исследований ИПХЭТ СО РАН и ИХ Коми НЦ УрО РАН «Химическая, механохимическая и ферментативная деструкция целлюлозосодержащего сырья для получения ценных продуктов»*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry // Bioenerg. Res. – 2012. – № 5. – P. 1043-1066.
2. Никитин Н.И. Химия древесины и целлюлозы. – Изд-во АН СССР, М.-Л., 1962, С. 457-458.
3. Момот Т.О., Скиба Е.А. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного материала в ацетатном буфере и в водной среде / Химия биологически активных веществ: межвузовский сборник научных трудов Всеросс. школы-конф. молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием. – Саратов: Изд-во «КУБиК», 2012. – С. 253-254

**Скиба Екатерина Анатольевна**, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), eas08988@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

**Момот Татьяна Олеговна**, студент Бийского технологического института АлтГТУ им. И.И. Ползунова, практикант-дипломник 2013 года в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

**Бычин Николай Валерьевич**, старший научный сотрудник лаборатории № 4 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

**Золотухин Владимир Николаевич**, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-14-73.

УДК 661.728.862/863

## СВОЙСТВА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗ ИЗ ХЛОПКА И ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

А.А. Якушева

*Установлено, что свойства нитратов целлюлоз, синтезированных в одинаковых условиях из хлопковой целлюлозы и технической целлюлозы плодовых оболочек овса, а именно: массовая доля азота, вязкость, растворимость в спиртоэфире и массовая доля золы – характеризуются близкими значениями. Методом растровой электронной микроскопии обнаружено принципиальное различие структуры и размеров волокон, как целлюлоз, так и нитратов целлюлозы, полученных из них. Показано, что в процессе нитрования волокна нитратов целлюлозы из обоих источников приобретают объем. Методами инфракрасной спектроскопии и термогравиметрического анализа установлено структурное сходство и чистота синтезированных эфиров из обоих источников.*

*Ключевые слова: хлопок, плодовые оболочки овса, техническая целлюлоза, нитрование, стабилизация, растровая электронная микроскопия, инфракрасная спектроскопия, термогравиметрический анализ*

### ВВЕДЕНИЕ

Среди замещенных целлюлозы особую нишу занимают ее нитраты, практическое применение которых чрезвычайно широко. В процессе изготовления эфиров целлюлозы обычно контролируют степень этерификации или массовую долю (м.д.) азота, химическую стойкость, вязкость растворов и растворимость в различных растворителях [1].

Известно, что морфологическая и надмолекулярная структура хлопковой и древесной целлюлоз, также как и многие физико-химические параметры, приобретенные в процессе их производства (особенно на операциях варки, отбелики и сушки), определяют как скорость производственных процессов (нитрования, стабилизации, промывок), так и качество получаемых нитратов [2].

В настоящее время из-за практического отсутствия сырьевой базы для изготовления нитратов целлюлозы (НЦ) ведется активный поиск альтернативных источников – льна [3].

В ИПХЭТ СО РАН проводятся исследования по получению НЦ из нетрадиционных источников: российского мискантуса [4] и плодовых оболочек овса (ПОО) [5].

Целью данной работы являлось сравне-

ние свойств синтезированных в одинаковых условиях образцов НЦ из хлопка и ПОО. Для исследования использовались хлопковая целлюлоза (БХК, г. Бийск) и техническая целлюлоза (ТЦ), полученная из ПОО азотнокислым способом на опытно-промышленной установке в 2012 году (ИПХЭТ СО РАН).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы НЦ получали обработкой целлюлоз водной серно-азотной смесью с м.д. воды 14 %. Навеску предварительно высушенной до влажности не более 3,5 % целлюлозы нитровали в одинаковых условиях (состав кислотной смеси, температура, продолжительность) при непрерывном перемешивании. Модуль нитрования хлопковой целлюлозы (ХЦ) составлял 1:50, ТЦ ПОО – 1:25. Промытые до нейтральной реакции НЦ стабилизировали при повышенной температуре последовательной обработкой в воде, в 0,03 %-ном растворе соды, затем снова в воде при постоянном перемешивании. Образцы НЦ из ТЦ ПОО протирали через медное сито с размером ячеек 1 мм. После сушки образцов НЦ определяли выход и основные характеристики: м.д. азота (ферросульфатным методом, который основан