

УДК 577.15;573.6.086.835:633/635

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ ЧАСТИЦ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ РАЗМЕРА

© 2012 г. В. В. Шутова*, А. И. Юсипович**, Е. Ю. Паршина**, Д. О. Захаркин*, В. В. Ревин*

* Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева,
Саранск, 430005, e-mail: vshutova@yandex.ru

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119899, e-mail: sanyavor@gmail.com

Поступила в редакцию 1.07.2011 г.

Исследовали эффективность ферментативного гидролиза полисахаридов древесины, измельченной до образования ультрадисперсных частиц (УДЧ). Установлено, что содержание редуцирующих сахаров (РС) в измельченном сырье и выход их при ферментативном гидролизе полисахаридов зависит от размера УДЧ. Методами лазерной интерференционной микроскопии и динамического рассеяния выявлено, что увеличение времени измельчения субстратов от 20 до 40 мин приводило к появлению в среде частиц от 2 до 200 нм. В ферментативных гидролизатах УДЧ наблюдалось накопление в основном глюкозы и галактозы. Интенсивность измельчения (скорость вращения мельницы) и время существенно влияли на полноту ферментативного гидролиза древесины.

В настоящее время в связи с сокращением запасов ископаемого топлива ставится вопрос о получении альтернативных видов горючего из возобновляемых ресурсов [1, 2]. Наиболее перспективно для производства биоэтанола дешевое древесное целлюлозосодержащее сырье [3, 4]. Однако полисахариды древесины без предварительной обработки не полностью гидролизуются ферментами. В настоящее время в промышленности в основном применяется технология SPORL (Sulfite Pretreatment for Overcoming the Recalcitrance of Lignocellulose), заключающаяся в сульфитной предобработке субстрата [5]. Кроме этого существует ряд перспективных технологий, которые пока не используются в промышленности.

Ультразмельчение — процесс обработки материала на шаровых мельницах и дезинтеграторах, конечным продуктом которого являются частицы субстрата с размерами 10^{-6} – 10^{-9} м. В процессе ультразвукового измельчения происходит разрушение лигноцеллюлозного комплекса древесины, являющегося главным препятствием для ферментов. Разрушение надмолекулярной структуры древесины приводит к увеличению степени гидролиза полисахаридов. Оценить размеры частиц, образующихся при ультразвуковом измельчении, в широком диапазоне (от нескольких нанометров до нескольких микрон) можно при помощи методов динамического светорассеяния и лазерной интерференционной микроскопии [6–10].

Цель работы — установление корреляции между степенью измельчения и эффективностью ферментативного гидролиза полисахаридов дре-

весины, определение размера получающихся при ультразвуковом измельчении частиц, а также влияния ультразвукового измельчения на гидролиз древесины.

МЕТОДИКА

Объектами исследования были осинового опилки, полученные с помощью дисковой циркулярной пилы, и ультрадисперсные древесные частицы (УДЧ).

Измельчение опилок проводили с помощью планетарной шаровой мельницы RetschPM-100 (“Retsch”, Германия). Использовали две скорости вращения рабочего органа мельницы 400 и 600 об/мин. Продолжительность измельчения составляла 20, 25, 30, 35 и 40 мин. Для определения размеров УДЧ их помещали в дистиллированную воду (5%) на 24 ч для отделения крупных частиц.

Оценка размеров частиц была выполнена с использованием лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) и методом динамического светорассеяния (ДС). ЛИМ позволяет количественно с высокой точностью измерять оптическую разность хода (ОРХ), пропорциональную высоте объекта и показателю преломления [9]. Исследования проводились с использованием автоматизированного интерференционного микропрофилометра МИА-1, разработанного во Всероссийском научно-исследовательском институте оптико-физических исследований (Москва, Россия) с длиной волны лазера 650 нм. Погрешность измерения в плоскости составляла около 0.5 мкм, а по высоте погрешность измерения ОРХ \approx 5 нм.

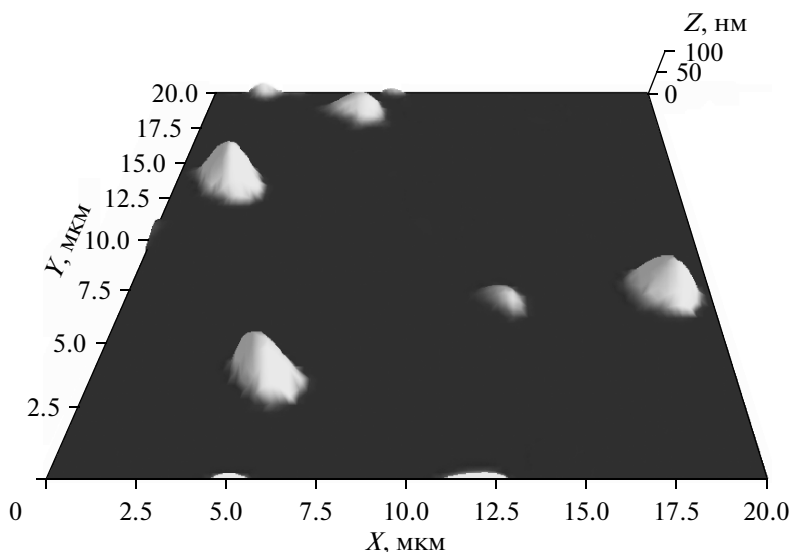


Рис. 1. Изображение УДЧ в супернатанте. Время ультраизмельчения 20 мин, скорость вращения 600 об/мин. Максимальное значение высоты частицы соответствует ее диаметру.

Величина ОРХ (Φ) связана с высотой (z) следующим соотношением:

$$\Phi = (n - n_0)z, \quad (1)$$

где n и n_0 – показатели преломления частицы и раствора (для воды $n_0 = 1.333$) соответственно. Используя высокую точность измерения ОРХ, можно оценить диаметр частиц по формуле 1. Если предположить, что частицы являются однородными сферическими, то максимальная толщина (максимальное значение ОРХ) соответствует диаметру частиц [11]. Для расчета толщины частиц их показатель преломления принимался равным показателю преломления целлюлозы (1.468) [12]. Таким образом, метод ЛИМ позволяет оценивать размеры частиц высотой менее 5 нм (точность измерения прибора), что для частиц целлюлозы составляет 37 нм (см. формулу 1). Типичное изображение частиц в супернатанте, полученное при помощи лазерной интерференционной микроскопии, представлено на рис. 1.

В опыте 2 мкл супернатанта, взятого из средней части пробирки, помещали на зеркальную поверхность предметного стекла, накрывали покровным стеклом и помещали в микроскоп. В каждой пробе оценивалось не менее 80 объектов. Для обработки изображений использовалась основанная на базе ImageJ, бесплатная для некоммерческого использования программа FIJI (<http://fiji.sc/>).

При использовании динамического светорассеяния для оценки размеров частиц 1.5 мл супернатанта, разбавленного в 5 раз, заливали в кювету и помещали в прибор Zetasizer Nano (“Malvern”, England).

Количество легкогидролизуемых сахаров в опилках определяли по методу [13], редуцирующих сахаров (РС) – по реакции с пикриновой кислотой, целлюлозы – по методу [13].

Для гидролиза УДЧ использовали ферментный препарат “Ламинекс ВГ” (“Genencor International BVBA”, Бельгия; активность эндоцеллюлазы – 4700 Е/мл, активность ксиланазы – 1500 Е/мл, активность β -глюканазы – 3100 Е/мл). В качестве субстрата для определения активности эндоцеллюлазы использовали 1%-ную натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) в 0.05 М ацетатном буфере, рН 4.5 с 0.1 М NaCl. К 1 мл субстрата добавляли 1 мл культуральной жидкости, инкубировали 30 мин при 50°C и определяли РС по реакции с пикриновой кислотой. За единицу активности принимали количество фермента, при действии которого на Na-КМЦ образовывался 1 мг глюкозы за 1 ч при 50°C.

Обработку ферментным препаратом “Ламинекс ВГ” (“Genencor International BVBA”, Бельгия) проводили в колбах емкостью 100 мл с 30 мл ацетатного буфера (рН 5.0) и 3% УДЧ. В колбы добавляли ферментный препарат в объеме, соответствующем 200 ед./г субстрата (по Na-КМЦ) и помещали на 24 ч в шейкер-термостат при 50°C. Пробы для анализа отбирали по 5 мл, центрифугировали 10 мин, образцы супернатанта после подготовки проб анализировали методом ВЭЖХ. Методика подготовки проб заключалась в удалении растворимых белков при нагревании образца, осветлении раствора 10%-ным ацетатом свинца и фильтрации полученного осадка на фильтре с пораи 0.45 мкм и центрифугировании при 10000 g до исчезновения опалесценции. Режим анализа на хроматографе Shimadzu LC-20A (“Shimadzu”,

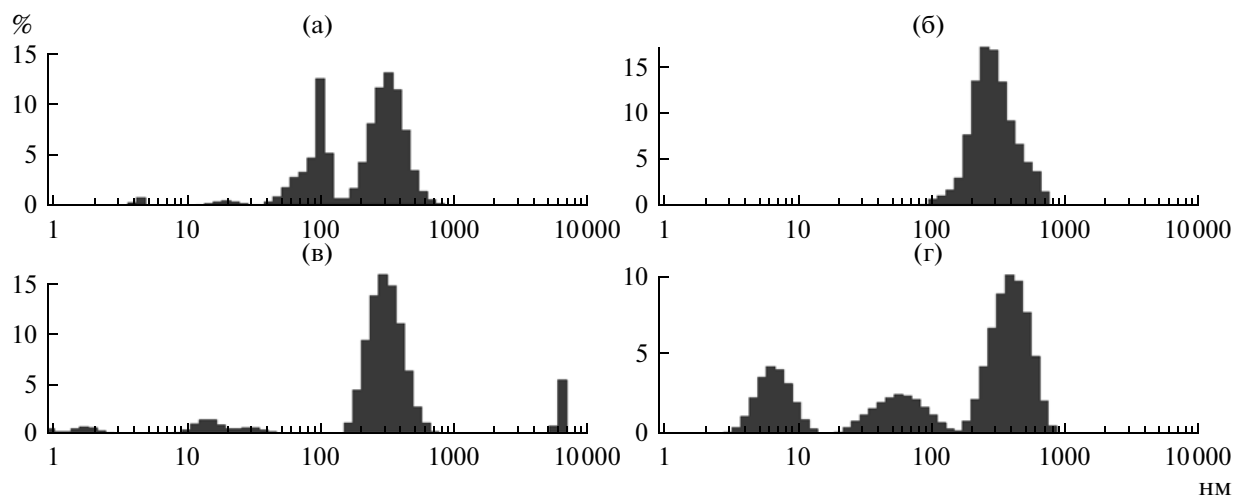


Рис. 2. Распределение размеров УДЧ (диаметр), полученное с помощью динамического светорассеяния, при разной длительности (мин) и скорости вращения (об/мин) при ультразвукомельчении:

а – 20 мин, 400 об/мин; б – 20 мин, 600 об/мин; в – 40 мин, 400 об/мин; г – 40 мин, 600 об/мин.

Япония) с бинарным градиентным насосом высокого давления LC-20AB с одинарной предколонкой Supelguard Pb: подвижная фаза – деионизированная вода 1 мл/мин, колонка Supelcogel Pb 300 × 7.8 (Supelco, США), термостатирование 80°C [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Механическую обработку древесины осины проводили при скорости вращения 400 и 600 об/мин в течение 20–40 мин.

Размер УДЧ измеряли методом динамического светорассеяния, который позволяет оценивать наличие частиц в растворе в широком диапазоне – от нескольких нанометров до микрометров (рис. 2). Установлено, что в растворах присутствуют УДЧ различных размеров от 2 до 1100 нм. Показано, что при увеличении времени измельчения в среде появляются более мелкие частицы (рис. 2). Измельчение в течение одинаковых промежутков времени, но с большей скоростью приводило к уменьшению полидисперсности частиц.

Таблица 1. Измеренные методом ЛИМ средние размеры диаметра частиц

Параметр измельчения	Среднее, нм	Мода*, нм	Стандартное отклонение
20 мин 400 об/мин	206.1 ± 23.0	75.6	451.5
20 мин 600 об/мин	311.9 ± 53.2	75.6	781.3
40 мин 400 об/мин	103.6 ± 16.0	41.7	239.0
40 мин 600 об/мин	91.4 ± 12.4	40.4	275.7

* Размер наиболее часто встречающихся в растворе частиц.

Метод динамического светорассеяния позволил получить информацию о присутствии в растворе частиц различного размера. Для оценки распределения частиц по размерам использовался метод ЛИМ. При измерении УДЧ методом ЛИМ было обнаружено, что в супернатанте находятся частицы от ~30 нм до более 1 мкм, при этом показано, что наибольшее число частиц в супернатанте составляли частицы размером менее 100 нм (рис. 3). На гистограммах (рис. 3) они показаны как самый высокий пик распределения по размерам и соответствуют моде (наиболее часто встречаемому значению размера).

Установлено, что увеличение времени обработки приводило к уменьшению размера наиболее часто встречаемых частиц примерно в 2 раза. Средние, наиболее часто встречаемые (мода) значения, а также стандартные отклонения диаметра частиц при различных режимах измельчения приведены в табл. 1. Чем больше среднее отличается от моды, тем более неоднородные по размерам частицы находятся в супернатанте. Таким образом, судя по увеличению стандартного отклонения, характеризующего разброс размеров измеренных частиц, можно предположить, что увеличение скорости вращения мельницы приводит к некоторому увеличению дисперсности системы (см. табл. 1).

Таким образом, с помощью двух методов было показано, что с увеличением скорости и длительности ультразвукомельчения происходило уменьшение среднего размера частиц (появление частиц более мелкого размера), при этом увеличение скорости приводило к некоторому увеличению дисперсности частиц в супернатанте.

Для выявления доступности компонентов УДЧ для ферментов проводили ферментативный гид-

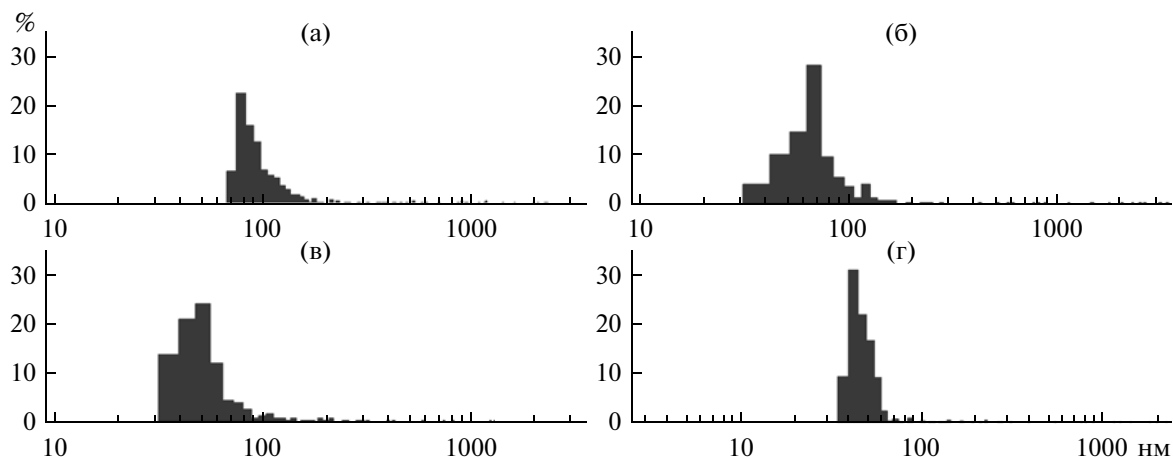


Рис. 3. Распределение УДЧ по размерам в пробах, измеренных методом лазерной интерференционной микроскопии при разной длительности (мин) и скорости вращения (об/мин) при ультразвукомельчении: а – 20 мин, 400 об/мин; б – 20 мин, 600 об/мин; в – 40 мин, 400 об/мин; г – 40 мин, 600 об/мин.

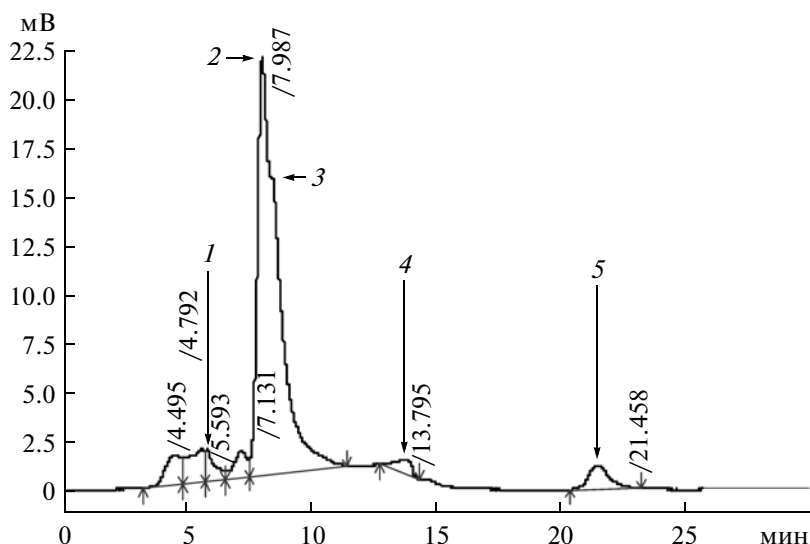


Рис. 4. Хроматограмма ферментативного гидролизата УДЧ, измельченных при 600 об/мин в течение 40 мин. 1 – галактосодержащий дисахарид, 2 – глюкоза, 3 – галактоза, 4 – ксилоза, 5 – арабиноза.

ролиз полисахаридов препаратом “Ламинекс”. После осахаривания в течение 24 ч определяли концентрацию редуцирующих сахаров (РС) методом ВЭЖХ.

В ходе исследования было показано (рис. 4, 5 и табл. 2), что глубина ферментативного гидролиза УДЧ зависит как от скорости вращения мельницы, так и от времени предобработки. После гидролиза УДЧ в среде накапливались, в основном, глюкоза и галактоза (табл. 2). При использовании УДЧ, полученных при 600 об/мин в течение 40 мин, обнаружены максимальные количества глюкозы и галактозы – 9.58 и 6.43 мг/мл соответственно (рис. 5). При этом режиме в среде были обнаружены также галактозосодержащий дисаха-

рид, арабиноза и ксилоза и ряд других моно- и дисахаридов (менее 1 мг/мл), суммарная концентрация редуцирующих сахаров составила 18.75 мг/мл (табл. 2).

При меньшей скорости вращения мельницы (400 об/мин) содержание глюкозы в среде зависело от времени предобработки (рис. 5): при 20 мин оно составляло 1.92 мг/мл и при 40 мин – 3.73 мг/мл, галактозы 1.47 и 1.90 мг/мл соответственно. Аналогичная динамика накопления моносахаридов обнаружена при получении УДЧ при 600 об/мин: концентрация глюкозы составила 6.11 мг/мл, галактозы – 4.05 мг/мл при 20-минутном измельчении и 9.58 и 6.43 мг/мл при 40 минутном соответственно (табл. 2).

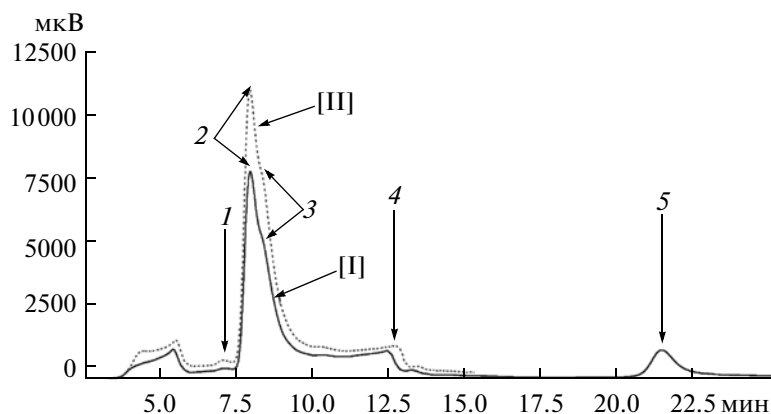


Рис. 5. Сравнение хроматограмм ферментативных гидролизатов УДЧ, измельченных при 400 об/мин в течение 20 [I] и 40 [II] мин.

1 – галактосодержащий дисахарид, 2 – глюкоза, 3 – галактоза, 4 – ксилоза, 5 – арабиноза.

Концентрация РС после ферментативной обработки УДЧ, полученных при 600 об/мин, была значительно выше, по сравнению с УДЧ, полученными при 400 об/мин. И так, интенсивность вращения мельницы и длительность измельчения существенно влияли на последующий ферментативный гидролиз древесины.

Большая концентрация РС свидетельствовала о большей полноте и интенсивности гидролиза, а также и об увеличении доступности целлюлозы для гидролаз. Лигноцеллюлозный комплекс препятствует проникновению ферментов и затрудняет гидролиз целлюлозы и других полисахаридов [15]. Однако при ультраизмельчении происходит резкое увеличение площади поверхности частиц древесины и в результате этого повышение степени гидролиза.

Было исследовано содержание РС в исходных опилках и УДЧ (табл. 3). Как известно, в необработанной древесине редуцирующие сахара присутствуют в очень малых концентрациях. Содержание РС в УДЧ оказалось значительно выше, чем в грубоизмельченных опилках, что свидетельствует о разрушении полисахаридных цепей с образованием низкомолекулярных сахаров.

В каждой целлюлазе имеется два домена: сорбционный, или целлюлозосвязывающий, и каталитический домен, осуществляющий реакцию гидролиза. Сначала образуется комплекс целлюлозосвязывающего домена и молекулы целлюлозы, затем вступает в действие каталитический домен, при этом фермент как бы “перетекает” через ряд непрочных комплексов, в конце чего образуется конечный продукт реакции [16]. Совершенно очевидно, что рыхлая надмолекулярная структура будет гораздо легче поддаваться гидролизу, чем плотноупакованный лигноцеллюлозный комплекс. Более того, уменьшение размера гидролизуемых частиц также увеличит скорость ферментативной реакции из-за появления более коротких участков молекул целлюлозы. Это можно оценить по изменению степени конверсии полисахаридов. Степень конверсии полисахаридов древесины, k_k – отношение массы образовавшихся РС к сумме массы целлюлозы и легкогидролизуемых полисахаридов, можно определить из уравнения:

$$k_k = \frac{m_{pc} V_c}{m_{ц} + m_{лгп}}, \quad (2)$$

где m_{pc} – количество РС в 1 мл гидролизата, мг/мл; V_c – объем гидролизата, мл; $m_{ц}$ – масса

Таблица 2. Зависимость концентрации редуцирующих сахаров, мг/мл в ферментных гидролизатах УДЧ от времени ультраизмельчения

Время измельчения, мин	Скорость вращения мельницы, об/мин					
	400			600		
	глюкоза	галактоза	суммарный выход сахаров	глюкоза	галактоза	суммарный выход сахаров
20	1.92 ± 0.04	1.47 ± 0.01	3.92 ± 0.15	6.11 ± 0.16	4.05 ± 0.21	11.53 ± 0.21
40	3.73 ± 0.07	1.90 ± 0.05	6.21 ± 0.13	9.58 ± 0.28	6.43 ± 0.24	18.75 ± 0.39

целлюлозы в навеске древесины, мг; $m_{\text{лгп}}$ — масса легкогидролизуемых полисахаридов в навеске древесины, мг.

Мы установили, что содержание целлюлозы в УДЧ осины составляло 37.5%, а легкогидролизуемых полисахаридов — 34%. Степень конверсии в случае измельчения образцов при 40 мин и 600 об/мин составила 87.5%, что практически равно выходу сахаров при кислотном гидролизе [3]. При ферментной обработке образцов, полученных при 20 мин и 600 об/мин, выход РС составил только 53.8% общего числа полисахаридов древесины.

Из рис. 3 видно, что увеличение длительности измельчения, как и его интенсивности приводят к увеличению доли более мелких частиц в УДЧ. Размер частиц, в свою очередь, коррелирует с эффективностью гидролиза древесины: чем меньше размер УДЧ, тем эффективнее гидролиз. Методом динамического светорассеяния нами показано, что при режимах измельчения 40 мин и 600 об/мин обнаруживаются частицы размером 2–11 нм, которые обеспечивали максимальный выход РС по сравнению со всеми имеющимися пробами. Однако в образцах, полученных при обработке при 400 об/мин в течение 40 мин было зафиксировано небольшое количество частиц диаметром 2–7 нм, но это не привело к увеличению выхода РС при ферментативном гидролизе.

Установлено, что содержание РС в измельченной древесине и выход сахаров при ферментативном гидролизе полисахаридов зависел от размера УДЧ. Максимальные значения выявлены при размере УДЧ 10–20, 100–110 и 800 нм. Увеличение времени обработки субстратов при измельчении от 20 до 40 мин привело к появлению в среде частиц от 2 до 200 нм.

Предполагается, что в зависимости от длительности и скорости измельчения опилок наноразмерные частицы в водной среде могут агрегировать, что меняет выход РС при последующем ферментативном гидролизе. Это доказывается тем, что образец, в котором зафиксированы самые мелкие частицы, не дал максимального образования сахаров при гидролизе.

В ферментативных гидролизатах УДЧ наблюдалось накопление в основном глюкозы и галактозы. Кроме того, детектировались в следовых количествах лактоза, арабиноза и ксилоза, а также ряд других моно- и дисахаридов в концентрациях менее 1 мг/мл.

Показано, что как интенсивность, так и время измельчения (скорость вращения мельницы) существенно влияют на последующий ферментативный гидролиз древесины. Максимальная концентрация РС обнаружена после ферментативной обработки УДЧ при 600 об/мин в течение 40 мин: максимальный выход сахаров составил 19 мг/мл

Таблица 3. Количество редуцирующих сахаров в исходном сырье

Продолжительность ультразвукового измельчения, мин	Скорость вращения мельницы, об/мин	Концентрация РС, мг/г субстрата
Грубоизмельченные опилки	—	1.50 ± 0.08
20	400	1.68 ± 0.08
	600	2.75 ± 0.12
40	400	2.27 ± 0.11
	600	4.70 ± 0.19

гидролизата, а степень конверсии полисахаридов древесины достигала 87.5%.

Таким образом, ультразвуковое измельчение можно использовать для повышения степени гидролиза полисахаридов древесины, а в дальнейшем правильная комбинация нескольких методов предобработки древесины приведет к развитию технологии перспективного топлива — биоэтанола, путем сбраживания полученного гидролизата дрожжами.

Авторы выражают благодарность сотрудникам МГУ им. Ломоносова, профессору Максимову Г.В. и чл.-корр. РАН Гудилину Е.А. за возможность проведения и обсуждения результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sedlacek D.* // Renewable Fuel Accociations. 2002. № 2. P. 19–28.
2. *Карпов С.А.* // Химия и технология топлив и масел. 2008. № 1. С. 3–5.
3. *Badger P.C.* // Trends in New Crops and New Uses. 2002. № 11. P. 17–21.
4. *Хвалин И.В.* // Строительные и дорожные машины. 2006. № 11. С. 18–19.
5. *Zhu J.Y., Zhu W., Obryan P., Dien B.S., Tian S., Gleisner R., Pan X.J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. № 5. P. 1355–1365.
6. *Farinas J., Verkman A.S.* // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 3511–3522.
7. *Вишняков Г.Н., Закарян К.С., Левин Г.Г., Стрелецкая Е.А.* // Измерительная техника. 1999. Т. 1. С. 46–49.
8. *Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaja T.* // Eur. Biophys. J. 2004. V. 33. P. 700–705.
9. *Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Brysgalova N.Y., Brazhe A.R., Brazhe N.A., Lomakin A.G., Levin G.G., Maksimov G.V.* // J. Appl. Phys. 2009. V. 105. 102037.

10. Rappaz B., Barbul A., Hoffmann A., Boss D., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P.J., Marquet P. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2009. V. 42. P. 228–232.
11. Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А., Ерохова Л.А., Браже Н.А., Лазарев Г.Л., Максимов Г.В. // *Квант. электроника.* 2006. Т. 36. С. 874–878.
12. Kasarova S.N., Sultanova N.G., Ivanov C.D., Nikolov I.D. // *Optical Materials.* 2007. V. 29. P. 1481–1490.
13. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Шутова В.В., Самуилов В.Д. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2004. Т. 40. № 1. С. 57–61.
14. Lough W.J., Wainer I.W. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice.* London, Tokyo: Blackie Acad. & Prof., 2004. 282 с.
15. Lau M.J., Lau M.W., Gunawan C., Dale B.E. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 162. № 7. P. 1847–1857.
16. Рабинович М.Л., Мельник М.С. // *Успехи биологической химии.* 2000. Т. 40. С. 205–266.

Effect of Particle Size on the Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides from Ultrafine Lignocellulose Particles

V. V. Shutova^a, A. I. Yusipovich^b, E. Yu. Parshina^b, D. O. Zakharkin^a, and V. V. Revina^a

^a *Ogarev State University, Mordovia, Saransk, 430005 Russia*

e-mail: vshutova@yandex.ru

^b *Moscow State University, Moscow, 119899 Russia*

e-mail: sanyavor@gmail.com

Received July 1, 2011

Abstract—The efficiency of the enzymatic hydrolysis of wood polysaccharides ground into ultrafine particles (UFPs) has been investigated. The content of reducing sugars (RS's) in powdered raw materials and the yield of sugars during enzymatic hydrolysis have been shown to depend on the particle size. Laser interference microscopy and dynamic light scattering studies have shown that increasing the grinding time from 20 to 40 min resulted in the formation of particles ranging from 2 to 200 nm in size. Enzymatic hydrolyzates of UFPs mostly contained glucose and galactose. The grinding intensity (mill rotation rate) and time had a significant effect on the extent of the enzymatic hydrolysis of wood.

Сдано в набор 27.12.2011 г.	Подписано к печати 13.03.2012 г.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈	
Цифровая печать	Усл. печ. л. 12.0	Усл. кр.-отт. 1.4 тыс.	Уч.-изд. л. 12.0
	Тираж 114 экз.		Зак. 155

Учредители: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
 Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6