На правах рукописи

ГОЛЯЗИМОВА Ольга Викторовна

МЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ

02.00.21 – химия твердого тела

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН

Научный руководитель:
кандидат химических наук, доцент
Политов Анатолий Александрович

Официальные оппоненты:
доктор химических наук, профессор,
Юхин Юрий Михайлович
Учреждение Российской академии наук Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН

доктор биологических наук, профессор,
Загребельный Станислав Николаевич
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Новосибирский государственный университет»

Ведущая организация:
Учреждение Российской академии наук Институт химии и химической технологии СО РАН (г. Красноярск)

Защита диссертации состоится "20" января 2010 г. в 10^{00} часов
на заседании диссертационного совета Д 003.044.01 в Учреждении Российской академии наук Институте химии твердого тела СО РАН
по адресу: ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск, 630128

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Учреждения Российской академии наук Института химии твердого тела и механохимии СО РАН

Автореферат разослан 18 декабря 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета:
кандидат химических наук Шахтшнейдер Т.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований. Данная работа посвящена изучению процессов механической активации гетерогенной реакции ферментативного гидролиза целлюлозы. Активация твердофазных реагентов и исследование механизма процессов активации является одной из важнейших областей исследования химии твердого тела. Система целлюлоза – водный раствор ферментов является гетерофазной системой, и потому изучение механизма гетерогенной реакции ферментативного гидролиза целлюлозы, также как и изучение механизмов активации этого процесса являются задачей химии твердого тела.

Кроме производства бумаги лигноцеллюлозные материалы используют для получения различных продуктов: эфиров целлюлозы, этанола, глюкозы, ксилозы, фурфурола, многоатомных спиртов и других органических соединений. Древесную и растительную дисперсию с мелким размером частиц используют для изготовления биопластиков, строительных смесей и топливных гранул, кормовых добавок и удобрений. Из растительного сырья также выделяют экстрактивные вещества и используют их для получения биологически-активных добавок и лекарственных препаратов. Интенсификация процессов переработки лигноцеллюлозных материалов является актуальной задачей, так как позволяет использовать возобновляемые ресурсы биомассы максимально эффективно.

Для получения различных органических веществ из биомассы используют каталитические процессы. Ферментативный гидролиз полисахаридов растительного сырья по сравнению с традиционной технологией, основанной на реакции гидролиза в разбавленных растворах минеральных кислот, обладает существенными преимуществами, например, более мягкими условиями протекания реакции и отсутствием побочных химических процессов. Технологии переработки твердых отходов растительного сырья на основе биохимических процессов являются экологически безопасными и позволяют уменьшить количество производственных отходов. Поэтому исследование механизма ферментативного гидролиза твердых целлюлозных субстратов и активация этого процесса является актуальной задачей.

Цель работы – исследование процессов механической активации ферментативного гидролиза целлюлозы и лигноцеллюлозных материалов и изучение механизма этих процессов.

Для достижения поставленной цели **решались следующие задачи:**

– изучение процессов измельчения лигноцеллюлозных материалов;

– исследование влияния предварительной ультразвуковой обработки на процесс ферментативного гидролиза целлюлозы;

– исследование влияния периодической механической обработки лигноцеллюлозных субстратов (соломы пшеницы и кукурузы, лигноцеллюлозы масличной пальмы) на процесс их ферментативного гидролиза.

Научная новизна. Впервые обнаружено, что предварительная ферментативная обработка лигноцеллюлозных материалов уменьшает их прочность при измельчении. Предложен механизм данного процесса.

Впервые обнаружено, что предварительная ультразвуковая (**УЗ**) обработка твердого целлюлозного субстрата в растворе фермента при 0°С в 1,5-2 раза увеличивает скорость последующей ферментативной реакции целлюлозы при 50°С.

Непрерывная обработка ультразвуком системы субстрат – фермент менее эффективна, чем изодозная дискретная обработка. На основании полученных данных предложен механизм процесса ультразвуковой активации ферментативного гидролиза целлюлозы.

Практическая значимость полученных результатов.

С использованием данных, изложенных в диссертации, получено три патента.

Результаты исследования процессов измельчения лигноцеллюлозных материалов могут быть использованы для разработки экологически безопасного способа тонкого измельчения растительного сырья. Данный способ может применяться в процессе производства кормов, извлечения биологически активных веществ из растительного сырья и получения древесной муки и позволяет в 2-4 раза увеличить эффективность измельчения лигноцеллюлозного материала при одинаковых затратах энергии.

Предварительная ультразвуковая обработка позволяет в 2-3 раза увеличить скорость последующей ферментативной реакции и может быть использована как метод активации ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных субстратов.

Периодическая механическая обработка лигноцеллюлозных субстратов позволяет увеличить степень конверсии целлюлозы в растворимые углеводы до 70% и может быть использована для разработки метода получения биоэтанола второго поколения.

На защиту выносятся:

– результаты исследования влияния предварительной ферментативной обработки лигноцеллюлозных материалов на их последующее измельчение и механизм этого влияния.

– результаты исследования влияния предварительной ультразвуковой обработки целлюлозы в растворе фермента при 0°С на ее последующий гидролиз;

– способ дискретной ультразвуковой обработки целлюлозы в растворе фермента при 0°С как метод активации ферментативного гидролиза цел-

люлозы в сравнении с непрерывной обработкой при изодозном воздействии.

Апробация работы. Результаты, изложенные в диссертационной работе, обсуждались на научных семинарах и конференциях: XV Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Россия, Екатеринбург, 2005), Международной конференции «Механохимический синтез и спекание» (Новосибирск, 2006), 12 Всероссийской научной конференции студентов физиков и молодых ученых (Новосибирск, 2006), 4 Всероссийской конференции «Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа» (Томск, 2007), 3 Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2007), Всероссийской конференции лауреатов фонда имени К.И. Замараева «Современные подходы к проблемам физико-химии и катализа» (Новосибирск, 2007), 4 Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2009).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 3 научных статьях, в 3 патентах на изобретение и в 6 работах, опубликованных в сборниках материалов конференций.

Личный вклад соискателя заключается в проведении механической обработки образцов целлюлозы и лигноцеллюлозных материалов в мельницах и в ультразвуковой установке, проведении химической обработки образцов лигноцеллюлозных материалов, определении их гранулометрического состава, определении химического состава образцов растительного сырья, сорбционной емкости образцов целлюлозы и определении продуктов реакции ферментативного гидролиза целлюлозы. Съемка спектров люминесценции от частиц лигноцеллюлозных материалов и фотографий частиц растительного сырья в люминесцентном свете была проведена при непосредственном участии автора. Автором была проведена подготовка обработанных образцов для их исследования методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. Обсуждение результатов исследования и написание научных статей проведено совместно с соавторами и научным руководителем. Отдельные эксперименты были проведены д.х.н. Рябчиковой Е.И. (электронная микроскопия, НПО «Вектор»), к.х.н. Королевым К.Г. (высокоэффективная жидкостная хроматография – **ВЭЖХ**), д.ф.-м.н. Просановым И.Ю. (ИК-спектроскопия).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 201 наименование. Работа изложена на 164 страницах, включая 85 рисунков и 18 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность исследований, сформулированы цель и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены положения, вынесенные на защиту.

В первой главе представлен обзор литературных данных. Глава содержит 2 параграфа. В первом параграфе рассмотрено строение целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина – основных компонентов растительного сырья. Во втором параграфе приведены литературные данные о ферментах, катализирующих гидролиз целлюлозы, механизме этого процесса, а также данные, касающиеся способов активации процесса гидролиза целлюлозы, в том числе механической активации реагентов: целлюлозных субстратов и ферментов.

Реакция ферментативного гидролиза целлюлозы состоит из нескольких стадий: диффузии молекул ферментов к поверхности нерастворимого в воде субстрата, специфической сорбции ферментов и образования фермент-субстратного комплекса, реакции гидролиза и диффузии продуктов реакции в раствор.

Лимитирующая стадия всего процесса – диффузия реагентов и продуктов реакции. Поэтому скорость реакции может быть увеличена с помощью предварительной механической обработки твердого целлюлозного субстрата в мельницах или специальных активаторах, в результате которой происходит измельчение, аморфизация и разупорядочение лигноцеллюлозных материалов, или ускорением массопереноса путем механического воздействия на реагенты во время протекания химической реакции.

В результате измельчения лигноцеллюлозных материалов происходит увеличение удельной поверхности субстрата и разупорядочение его структуры, а, следовательно, увеличение площади поверхности субстрата, доступного для молекул фермента. Однако эффективность процесса измельчения различных материалов, как правило, невелика. При механическом воздействии на материалы основная часть подведенной энергии выделяется в виде тепла, а на разрушение материала затрачивается только несколько процентов от дозы подведенной механической энергии [1]. Увеличение дозы подведенной энергии приводит к затратам, увеличение мощности дозы приводит к нагреванию лигноцеллюлозных субстратов, что может способствовать протеканию нежелательных химических реакций различных органических соединений. В таких условиях, например, подвергаются окислению и гидролизу биологически активные вещества, происходит конденсация и окисление лигнинов и т. д. Поэтому

интенсификация процесса измельчения лигноцеллюлозных материалов является важной задачей.

Увеличение скорости ферментативного гидролиза целлюлозы за счет ускорения процессов массопереноса при механическом воздействии на реагенты можно осуществить в узком интервале интенсивности и дозы подводимой энергии, так как при интенсивном механическом воздействии ферменты денатурируют. При обработке реагентов в мельнице для параметров механического воздействия на вещество характерна широкая дисперсия, поэтому условия обработки трудно контролировать. Для активации ферментативного гидролиза целлюлозы во время протекания химической реакции могут быть использованы ультразвуковые активаторы или бисерная мельница, в которых обработку реагентов проводят в водной среде, поэтому разброс значений параметров механического воздействия намного меньше. Известно, что при ультразвуковом воздействии в узком диапазоне акустической мощности скорость ферментативных реакций увеличивается [2]. Но механизм данного процесса исследован недостаточно, поэтому изучение механизма процесса активации ферментативного гидролиза ультразвуком также является актуальной задачей.

Вторая глава содержит описание использованных материалов, методов и методик экспериментов. Свойства целлюлозы и лигноцеллюлозных субстратов были охарактеризованы с помощью различных физико-химических методов. Распределение по размеру частиц образцов лигноцеллюлозы и морфологию частиц определяли методом оптической и люминесцентной микроскопии и методом лазерной дифракции. Удельную поверхность целлюлозы и лигноцеллюлозных субстратов определяли методами воздухопроницаемости, низкотемпературной адсорбции газов и методом сорбции красителя метиленового синего из водного раствора. Степень упорядоченности структуры целлюлозных субстратов определяли методом дифракции рентгеновских лучей и ИК-спектроскопии. Для изучения изменения состава лигноцеллюлозных материалов использовали химические методы и методы термического анализа. Концентрацию восстанавливающих углеводов, образующихся в процессе ферментативного гидролиза целлюлозы, определяли методами спектрофотометрии и методом ВЭЖХ.

Третья глава посвящена изучению процессов предварительной механической активации ферментативного гидролиза целлюлозы. Глава содержит два параграфа, в которых изложены результаты исследования процессов измельчения лигноцеллюлозных материалов и влияния предварительной механической обработки на процесс гидролиза целлюлозы.

Обработка древесной и растительной дисперсии раствором целлюлозолитических ферментов приводит к уменьшению прочности лигноцеллюлозных материалов при их последующем измельчении. На рис. 1 пред-

ставлен гранулометрический состав образцов растительной дисперсии после обработки раствором фермента, высушивания и измельчения в дискретной мельнице АПФ-4. Механическая обработка в этой мельнице в течение 2 минут моделирует измельчение в проточной мельнице типа ВЦМ, ВЦМ-10 или ВЦМ-20 с производительностью на растительном сырье 50-100 кг в час.

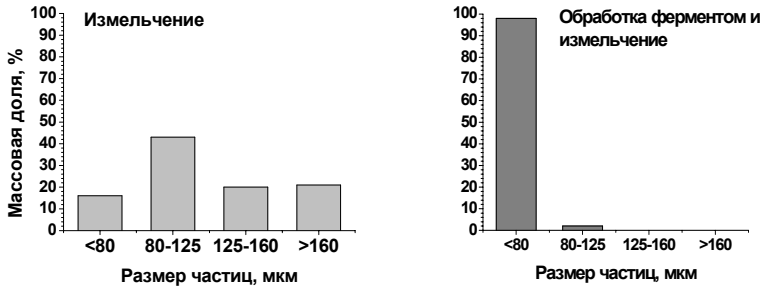

Рис. 1. Гранулометрический состав образцов соломы кукурузы после сушки и измельчения (*слева*) в мельнице АПФ-4 (2 мин);
после обработки раствором фермента, сушки и измельчения (*справа)*

Механизм влияния ферментативной обработки на прочность лигноцеллюлозных материалов при измельчении заключается в следующем. Специфическое строение растительной клеточной стенки, состоящей из каркаса целлюлозных волокон в матрице лигнинов, гемицеллюлоз и пектиновых веществ, обеспечивает устойчивость растительных материалов к механическому разрушению. В процессе обработки древесной и растительной дисперсии раствором целлюлозолитических ферментов при 50°С в течение 20-24 часов осуществляется реакция гидролиза целлюлозы. Степень превращения полисахаридов в растворимые сахара без предварительной активации лигноцеллюлозы и без перемешивания не превышает 3-5%. Гидролиз гликозидных связей целлюлозы приводит к изменению структуры лигноцеллюлозной матрицы и уменьшению механической прочности лигноцеллюлозных материалов. Поэтому частицы древесной и растительной дисперсии легче разрушаются при последующей механической обработке.

Уменьшения механической прочности лигноцеллюлозных материалов можно достичь не только с помощью ферментативного гидролиза целлюлозы. Кислотный или щелочной гидролиз одного из компонентов растительного сырья также приводит к уменьшению прочности лигноцеллюлозных материалов при измельчении, рис. 2, что подтверждает предложенный механизм.

Обработка лигноцеллюлозного сырья 2% раствором HCl и промывание лигноцеллюлозы приводит к гидролизу гемицеллюлозы и частичному гидролизу целлюлозы в аморфных участках. Обработка 2% раствором Na_2CO_3 и промывание лигноцеллюлозы приводит к щелочному гидролизу гемицеллюлоз и к удалению части лигнинов.

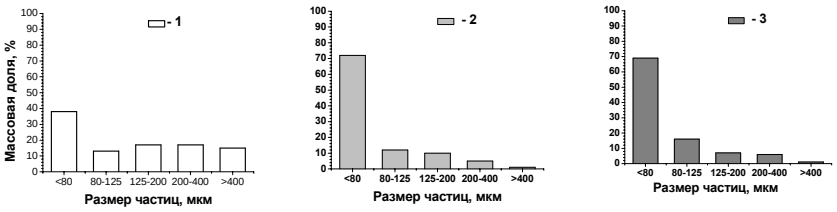

Рис. 2. Гранулометрический состав образцов древесной дисперсии: 1 – после измельчения (Fritsch pulverisette 5), 2 – после обработки раствором HCl, промывания, сушки и измельчения, 3 – после обработки раствором Na_2CO_3, промывания, сушки и измельчения

Исследовано влияние химической обработки на степень кристалличности целлюлозы в образцах растительного сырья. Степень кристалличности целлюлозы определяли методом дифракции рентгеновских лучей и методом ИК-спектроскопии, табл. 1.

Таблица 1

Индекс кристалличности целлюлозы в различных образцах древесной дисперсии, определенный разными методами

Образец	**Индекс Сегала, %**	**Индекс О'Коннора и Нельсона**
Целлюлюлоза (Daw chemical, США)	72 ± 3	0,59 ± 0,08
Опилки исходные	45 ± 1	0,37 ± 0,05
Опилки, после измельчения (1 ч)	34 ± 1	0,43 ± 0,06
Опилки, после измельчения (4 ч)	8,5 ± 0,3	0,39 ± 0,05
Опилки, обработанные раствором ферментов	52 ± 2	0,41 ± 0,06
Опилки, после кислотного гидролиза	63 ± 2	0,53 ± 0,07

Величину индекса кристалличности целлюлозы ($I_{Kp,}$ %) рассчитывали по формуле, предложенной Сегалом [3]: $I_{Kp} = \frac{I_{002} - I_a}{I_{002}} \cdot 100$ % где I_{002} и I_a – расстояние от базовой линии до вершины пика около $2\theta = 22^\circ$ и около $2\theta = 19^\circ$ на дифрактограммах целлюлозы, а также по формуле О'Коннора и Нельсона [4], как отношение интенсивности деформационных С–Н колебаний (1372 см$^{-1}$) к интенсивности валентных С–Н колебаний (2900 см$^{-1}$) в ИК-спектрах образцов растительного сырья.

Обработка древесной дисперсии раствором фермента и 2% раствором соляной кислоты приводит к увеличению индекса кристалличности целлюлозы. Гидролиз гликозидных связей целлюлозы осуществляется в более доступных для молекул белка аморфных участках фибрилл целлюлозы, что приводит к изменению надмолекулярной структуры целлюлозы, разрыву отдельных волокон и уменьшению прочности лигноцеллюлозных материалов.

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что между индексами кристалличности целлюлозы, определенными разными методами, нет соответствия. Например, по данным ИК-спектроскопии индекс кристалличности целлюлозы в опилках после измельчения больше индекса кристалличности целлюлозы в исходных опилках. Методом дифракции рентгеновских лучей показано, что при механической обработке образцов происходит разупорядочение кристаллической структуры целлюлозы. Метод определения степени кристалличности целлюлозы по соотношению интенсивностей полос на ИК-спектрах был предложен [3] для расчета индекса кристалличности чистой целлюлозы. В спектрах образцов растительного сырья полосы, которые используют для расчета индекса кристалличности целлюлозы, перекрываются полосами других компонентов древесины. Поэтому метод ИК-спектроскопии не может быть использован для определения индекса кристалличности целлюлозы в образцах растительного сырья.

Во втором параграфе третьей главы приведены данные по исследованию влияния предварительной механической обработки на ферментативный гидролиз целлюлозы.

Проведению ферментативного гидролиза до глубоких степеней превращения целлюлозы препятствует ее фибриллярная структура и кристалличность. Степень превращения целлюлозы в фильтровальной бумаге не превышает 15-20 %, рис. 3 (*график 1*). При механической обработке целлюлозы активация гидролиза осуществляется благодаря разупорядочению кристаллической структуры целлюлозы и увеличению площади поверхности целлюлозного субстрата, доступного для молекул белка, рис. 3 (*график 2*).

Но уже через несколько часов протекания химической реакции процесс снова замедляется. Уменьшение скорости гидролиза предварительно активированного субстрата связано с расходованием разупорядоченных участков в процессе гидролиза целлюлозы, упорядочением обработанной целлюлозы при смачивании ее водой и тем, что образующиеся промежуточные продукты реакции – олигосахара препятствуют сорбции молекул ферментов у поверхности субстрата. При уменьшении скорости ферментативной реакции целлюлозный субстрат извлекали из реакционной среды, промывали от продуктов реакции, высушивали, измельчали и добавляли раствор фермента. На рис. 3 (*справа*) показано, что повторная

механическая обработка лигноцеллюлозных субстратов приводит к увеличению степени конверсии целлюлозы в растворимые сахара.

Следовательно, для интенсификации процесса ферментативного гидролиза целесообразно проводить механическую активацию реагентов в процессе химической реакции.

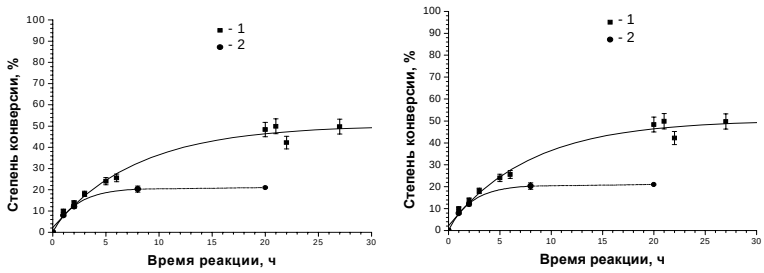

Рис. 3. Конверсия целлюлозы (фильтровальная бумага)
1 – исходный субстрат;
2 – субстрат, после измельчения (*слева*). Влияние дискретной механической обработки на ферментативный гидролиз целлюлозы (*справа*)

<u>Четвертая глава</u> диссертации посвящена изучению процессов механической активации ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов при воздействии на реагенты в процессе гидролиза.

Для того чтобы проводить реакцию ферментативного гидролиза одновременно с механической обработкой, необходимо контролировать удельную мощность механического воздействия, так как при интенсивном механическом воздействии ферменты денатурируют. Увеличение скорости реакции возможно благодаря тому, что одновременно с химической реакцией осуществляется активация целлюлозного субстрата, а также вследствие ускорения процессов массопереноса. Но, как правило, провести реакцию ферментативного гидролиза целлюлозы в мельнице не удается, так как механическая обработка в режимах, при которых происходит активация субстрата, приводит к денатурации ферментов.

Контролировать интенсивность и дозу подведенной энергии можно при механической обработке целлюлозы и раствора фермента в ультразвуковых установках или в бисерных мельницах.

В данной главе показано, что скорость ферментативной реакции может быть увеличена с помощью воздействия ультразвука или обработкой реагентов в бисерной мельнице, рис. 4.

Благодаря перемешиванию реагентов с мелющими телами в реакционной среде происходят различные процессы, влияющие на скорость гетерогенной реакции гидролиза. В результате непрерывного расслоения и измельчения целлюлозного субстрата при механической

обработке увеличивается площадь поверхности целлюлозного субстрата, доступного для молекул фермента. При этом также происходит удаление

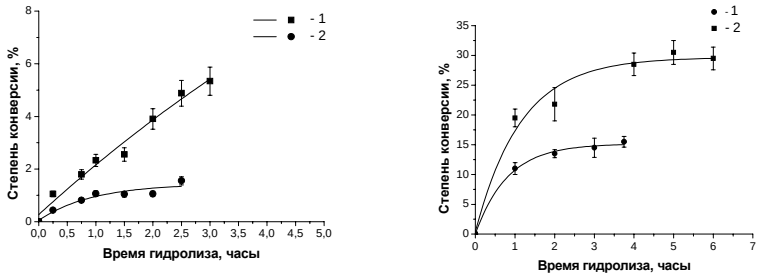

Рис. 4. Ферментативный гидролиз сульфатной целлюлозы под действием ультразвука (*слева)*: 1 – без обработки, 2 – с ультразвуковой обработкой; гидролиз сульфатной целлюлозы в бисерной мельнице; (*справа*): 1 – простое перемешивание, 2 – перемешивание со стеклянными шарами

с поверхности субстрата продуктов реакции гидролиза, моносахаридов и малорастворимых олигосахаридов, которые препятствуют подводу воды и катализатора. Но интенсивная механическая обработка реагентов при перемешивании с мелющими телами приводит к постепенной денатурации ферментов и к уменьшению их каталитической активности.

Ультразвуковая активация реакции гидролиза также может быть обусловлена несколькими причинами: разупорядочением целлюлозного субстрата, ускорением процессов сорбции молекул белка и удалением продуктов реакции с поверхности целлюлозного субстрата.

В результате обработки раствора фермента ультразвуком возможны процессы денатурации белковых молекул, поэтому необходимо контролировать мощность ультразвукового воздействия. Удельная акустическая мощность ультразвукового реактора была измерена методом химической дозиметрии [5], методика определения изложена во 2 главе диссертации.

При исследовании механизма влияния ультразвука на скорость ферментативной реакции показан эффект предварительной активации процесса гидролиза, рис. 5. Ультразвуковая обработка целлюлозы в растворе фермента, которую проводили при температуре реакционной среды 0°С, увеличивает скорость последующей ферментативной реакции при 50°С.

Так как температурный диапазон, в котором действует фермент, составляет 30-70°С, во время обработки реакция гидролиза не протекает.

Ускорение ферментативной реакции в результате предварительной ультразвуковой обработки системы фермент – субстрат может быть связано

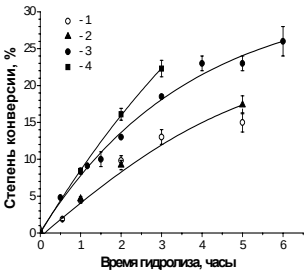

Рис. 5. Кинетика ферментативного гидролиза

сульфатной целлюлозы:
1 – без обработки,
2 – после 30 минут ультразвуковой обработки субстрата;
3 – после 30 минут обработки целлюлозы в растворе фермента ультразвуком при 0°С;
4 – ступенчатая обработка ультразвуком (обработка целлюлозы в растворе фермента, при 0°С через каждый час)

с разрыхлением целлюлозы под действием ультразвука и увеличением доступной для молекул белка поверхности целлюлозы, что облегчает последующую диффузию при 50°С.

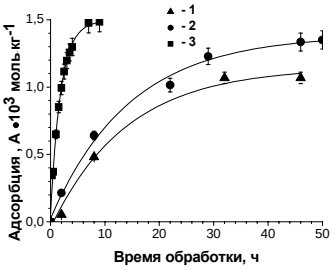

Рис. 6. Кинетика сорбции красителя исходной целлюлозой (1), целлюлозой, в течение 30 минут обработанной ультразвуком (2), кинетика сорбции красителя целлюлозой в поле ультразвуковых волн (3)

Кроме того, ультразвуковая обработка целлюлозы в растворе фермента способствует прониканию фермента в целлюлозную матрицу за счет звукокапиллярного эффекта, то есть влияет на процессы диффузии и сорбции молекул белка.

Для определения процессов, в результате которых осуществляется активация реакции гидролиза, было исследовано влияние ультразвука на целлюлозный субстрат. Для этого определяли скорость ферментативного гидролиза сульфатной целлюлозы, обработанной ультразвуком при 0°С без добавления ферментов, рис. 5, *график 2*. После такой обработки целлюлозы не происходит увеличения скорости реакции, следовательно, не происходит существенного увеличения площади поверхности целлюлозы.

Для изучения механизма предварительной ультразвуковой активации ферментативного процесса определяли изменение сорбционной емкости обработанной целлюлозы методом адсорбции красителя метиленового синего, рис. 6.

Сорбционная емкость целлюлозы после обработки ультразвуком увеличивается незначительно, на 20%, по сравнению с сорбционной емкостью исходного субстрата.

Скорость сорбции молекул красителя в поле ультразвуковых волн увеличилась в 10 раз по сравнению с сорбцией красителя на целлюлозе без ультразвукового воздействия.

В результате обработки целлюлозы ультразвуком в течение 30 минут не происходит существенного разрыхления и увеличения площади поверхности целлюлозного субстрата.

Активация процесса в результате предварительной УЗ-обработки системы фермент – субстрат осуществляется, главным образом, за счет влияния на величину сорбции молекул ферментов.

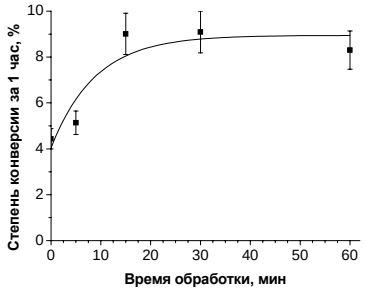

Рис. 7. Зависимость скорости конверсии от продолжительности предварительной УЗ-обработки целлюлозы в растворе фермента при 0ºС

Исследована зависимость скорости конверсии целлюлозы от времени предварительной активации субстрата в растворе фермента при 0ºС. Эффект активации наблюдали при обработке системы в течение 15 минут и меньше, рис. 7. Более продолжительная обработка не приводила к дальнейшему увеличению скорости процесса. Это можно объяснить тем, что вся поверхность субстрата, доступная для молекул белка, покрыта молекулами ферментов, и более продолжительная ультразвуковая обработка не влияет на скорость последующей ферментативной реакции, так как разупорядочения целлюлозного субстрата в процессе обработки не происходит.

Также показано, что дискретная УЗ-обработка системы фермент – субстрат при 0°С более эффективна, чем непрерывная обработка при одинаковом времени воздействия ультразвуком, рис. 5 (*график 4*).

Этот эффект может быть вызван несколькими причинами. Во-первых, гидролиз гликозидных связей, который проводили между стадиями УЗ-обработки, уменьшает устойчивость структуры целлюлозы к механическому воздействию и приводит к большему разупорядочению структуры целлюлозы при дискретной активации, чем при непрерывном воздействии.

Во-вторых, как показано на рис. 7, увеличение продолжительности предварительной обработки с 15 минут до 30-ти не приводит к увеличению скорости реакции гидролиза, так как, возможно, в результате обра-

ботки в течение 10-15 минут вся поверхность целлюлозы покрыта ферментами, или в процессе ультразвуковой обработки происходит уменьшение активности ферментов.

Тогда проведение ультразвуковой активации в дискретном режиме более эффективно потому, что во время стадии гидролиза между 15-ти минутными обработками в результате гидролиза гликозидных связей происходит образование новой поверхности субстрата.

Другой механизм ступенчатой активации связан с конформационной активностью ферментов. Влияние ультразвука на химические процессы связано с кавитацией. Этот процесс сопровождается интенсивными ударными волнами, локальным повышением давления до сотен атмосфер и возникновением потоков жидкости с большим градиентом скоростей. Эти явления увеличивают скорость ферментативных процессов, так как способствуют изменению конфигурации белковых глобул, а, следовательно, ускоряют процессы распознавания молекулами ферментов адсорбционных центров целлюлозного субстрата и сорбции молекул белка. Однако изменение конформации макромолекул под действием ультразвука приводит также и к постепенному уменьшению активности ферментов. Разрыв связей, стабилизирующих конформацию нативной молекулы, может привести к разрушению адсорбционного или каталитического центра фермента, что повлияет на сорбционную и каталитическую способность ферментов. Если ультразвуковую обработку проводить дискретно, с определенной скважностью, то в промежутках между обработкой ультразвуком молекула фермента благодаря релаксации может снова принять нативную конформацию. Следовательно, дискретная ультразвуковая обработка будет более эффективна для активации ферментативных процессов, чем непрерывная обработка.

В пятой главе приведены данные исследования влияния механической обработки на ферментативный гидролиз целлюлозы в лигноцеллюлозных материалах.

Глава содержит два параграфа, в которых изложены результаты исследования влияния механической активации на ферментативный гидролиз целлюлозы в соломе пшеницы, соломе кукурузы и лигноцеллюлозе масличной пальмы *Elaeis guineensis.*

Показано, что предварительная химическая обработка разных по морфологии лигноцеллюлозных материалов приводит к уменьшению их прочности при измельчении.

Методом люминесцентной спектроскопии показано, что при измельчении лигноцеллюлозных материалов разрушение частиц осуществляется сначала по границе между разными тканями, затем между клетками одной ткани. Образующиеся частицы преимущественно состоят из клеток, принадлежащих к одному типу ткани.

На рис. 8 (*слева*) представлена фотография частицы лигноцеллюлозы в люминесцентном свете. Фотографии измельченных образцов лигноцеллюлозных материалов в люминесцентном свете были выполнены на микроскопе-спектрофотометре МСФУ-6 производства ЛОМО. Люминесценция возбуждалась полосой излучения с длиной волны 366 нм, выделяемой из спектра ртутной лампы ДРШ-250 с помощью светофильтра УФС-2.

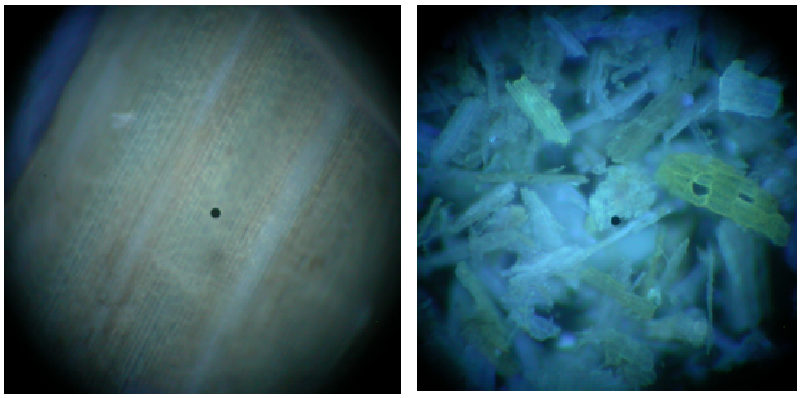

Рис. 8. Крупная частица соломы (*слева*),
солома после измельчения (*справа)* в люминесцентном свете,
увеличение ×100, размер зонда 30 мкм

Частица неоднородна, она имеет участки, для которых характерны разные спектры люминесценции, а, следовательно, и разный химический состав.

Эти участки содержат клетки, принадлежащие к разным тканям растения. Ткани различаются химическим составом и строением, а, следовательно, и механическими свойствами. Поэтому при механической деформации лигноцеллюлозных частиц они будут разрушаться, в первую очередь, по областям между разными тканями.

Клеточные стенки в разных тканях имеют разный химический состав, так как лигнифицированы в разной степени и содержат разные фракции лигнинов. Поэтому ткани, имеющие разный химический состав, будут иметь различные спектры люминесценции.

При разрушении частиц лигноцеллюлозного материала мелкие частицы имеют разные спектры люминесценции, рис. 8 (*справа*) и рис. 9. Разрушение частиц лигноцеллюлозных материалов осуществляется в первую очередь по границе между разными тканями, так что образующиеся частицы состоят, главным образом, из клеток одной ткани. Затем частицы разрушаются по областям между клетками одной ткани.

Целлюлоза и гемицеллюлозы не поглощают свет в области 366 нм и, следовательно, не люминесцируют, в отличие от лигнинов и других

полифенолов, которые содержат целый ряд сопряженных систем: бензольные кольца, сопряженные с двойными связями или с кетогруппами и др.

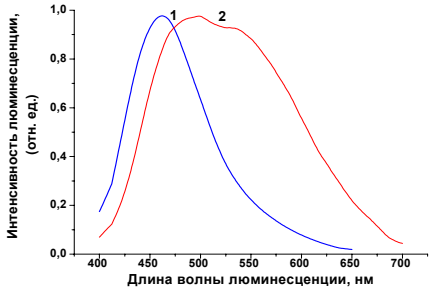

Рис. 9. Спектры люминесценции измельченной лигноцеллюлозы:
1 – голубые частицы,
2 – желто-зеленые частицы

Методом термического анализа было показано, что при измельчении лигноцеллюлозных материалов осуществляется фрагментация частиц

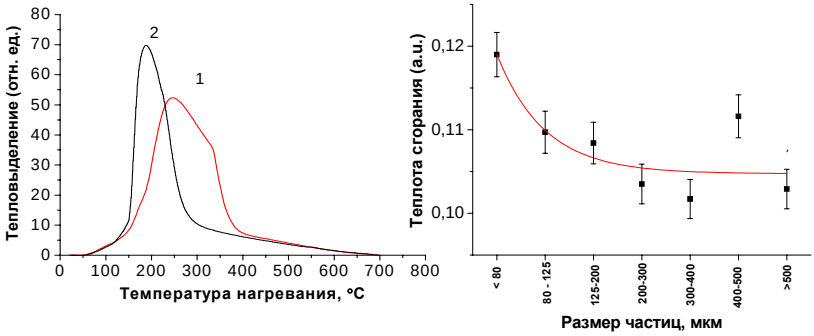

Рис. 10. Кинетика тепловыделения при сжигании разных фракций лигноцеллюлозы пальмовых отходов (*слева*):
1 – фракция с размером частиц меньше 80 мкм,
2 – фракция с размером частиц больше 500 мкм,
и интегральная теплота сгорания разных фракций лигноцеллюлозы (*справа*)

лигноцеллюлозы на частицы с меньшим размером, содержащие преимущественно лигнин или целлюлозу.

На рис. 10 представлена кинетика тепловыделения при сжигании крупной и мелкой фракции лигноцеллюлозного сырья, а также зависимость теплоты сгорания от дисперсности материала.

Целлюлоза и лигнин имеют разные температурные интервалы термического разложения и разную удельную теплоту сгорания. Целлюлоза окисляется при более низкой температуре, чем лигнин. Лигнин по сравнению с полисахаридами отличается большей устойчивостью к термической деструкции и большей удельной теплотой сгорания, что связано с арома-

тической структурой и с повышением термостойкости лигнина в ходе пиролиза вследствие протекания реакций конденсации с образованием новых С–С связей и образованием конденсированных структур. Поэтому кинетические кривые окисления фракций, имеющих разный химический состав, будут иметь разный наклон и разный температурный интервал.

Из полученных данных следует, что, крупная фракция начинает окисляться при более низких температурах, чем мелкая фракция, и ее удельная теплота сгорания меньше, следовательно, крупная фракция содержит больше целлюлозы, а мелкая фракция – больше лигнина.

Изменение структуры клеточных стенок в результате механического воздействия было исследовано на образцах соломы кукурузы с помощью электронного просвечивающего микроскопа, рис. 11**.** При механическом воздействии клеточные стенки подвергаются разрушению. На каждом снимке приведен масштаб, соответствующий стороне квадрата.

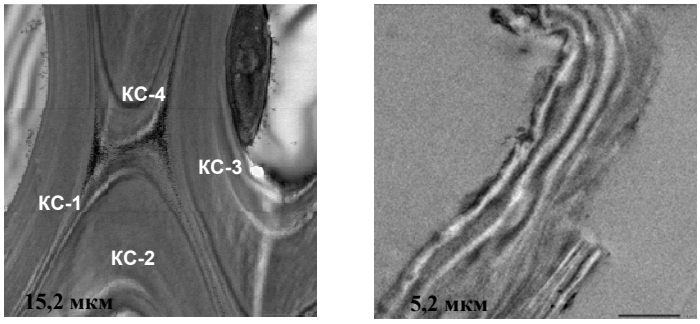

Рис. 11. Срезы препаратов соломы кукурузы: образец до механической обработки (*слева*), образец, подвергнутый интенсивной механической обработке (*справа)*,
КС – клеточная стенка

5,2 мкм

Препараты фиксированы осмиевой кислотой. Клеточная стенка состоит из нескольких слоев. В результате механического воздействия происходит расщепление клеточной стенки вдоль слоев.

Таким образом, было показано, что при обработке материала разрушение осуществляется сначала по границе между разными тканями, затем между клетками одной ткани, и, наконец, разрушению повергаются клеточные стенки.

При механической обработке субстратов активация гидролиза осуществляется благодаря уменьшению кристалличности целлюлозы, разрушению лигноуглеводного комплекса и увеличению доступности целлюлозного субстрата для молекул белка, так как при измельчении появляется новая поверхность субстрата.

Поэтому механическая обработка целлюлозных субстратов приводит к увеличению степени превращения целлюлозы в растворимые сахара, рис. 12.

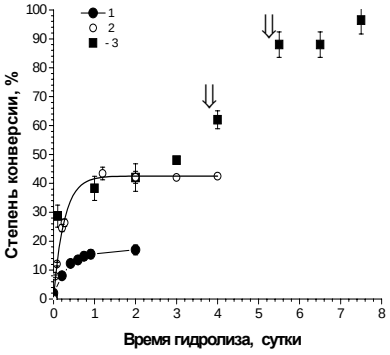

Рис. 12. Конверсия соломы кукурузы в растворимые углеводы:
1 – исходной соломы;
2 – соломы после механической обработки,
3 – гидролиз с применением механической обработки (*момент обработки указан стрелками*)

Так же как и при гидролизе модельного субстрата, целлюлозы, уменьшение скорости гидролиза предварительно активированного субстрата связано с преимущественным гидролизом целлюлозы в разупорядоченных участках субстрата, упорядочением обработанной целлюлозы при смачивании ее водой и ингибированием процесса гидролиза продуктами реакции. Повторная механическая обработка лигноцеллюлозных субстратов приводит к увеличению степени конверсии целлюлозы в растворимые сахара.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что ферментативная обработка лигноцеллюлозных материалов облегчает ее последующее измельчение. Гидролиз полисахаридов растительного сырья на 3-5% приводит к увеличению массовой доли фракции с размером частиц меньше 80 мкм в 2-4 раза.

2. Разрушение частиц лигноцеллюлозных материалов осуществляется в первую очередь по границе между разными тканями, так что образующиеся частицы состоят, главным образом, из клеток одной ткани. Затем частицы разрушаются по областям между клетками одной ткани, и, наконец, разрушению подвергаются клеточные стенки.

3. Механизм влияния ферментативной обработки лигноцеллюлозных материалов на их прочность при измельчении заключается в том, что при обработке лигноцеллюлозных материалов целлюлозолитическими ферментами происходит гидролиз целлюлозы, при этом реакция гидролиза имеет топохимический характер, то есть аморфные участки целлюлозы реагируют

быстрее, чем кристаллические, что приводит к изменению надмолекулярной структуры целлюлозы, разрыву отдельных волокон и уменьшению прочности лигноцеллюлозных материалов.

4. Показано, что предварительная ультразвуковая обработка целлюлозы в растворе фермента при температуре 0ºС приводит к активации последующего процесса гидролиза при 50ºС. В результате ультразвуковой обработки целлюлозного субстрата (35 кГц, 0,5 Вт/см^3) его сорбционные свойства изменяются незначительно. Ультразвуковая активация процесса гидролиза при обработке целлюлозы в растворе фермента осуществляется в результате влияния на сорбционные свойства субстрата за счет звукокапиллярного эффекта.

5. Показано, что при изодозных обработках ультразвуком непрерывное воздействие менее эффективно, чем дискретное. Одним из механизмов является изменение конформации фермента под действием градиента давления в растворе и как следствие, изменение его активности.

6. Предварительное измельчение лигноцеллюлозных субстратов, таких как солома кукурузы и отходы масличной пальмы, и механохимическая обработка в процессе ферментативного гидролиза содержащихся в них углеводов позволяет увеличить степень превращения полисахаридов в растворимые сахара до 70% и выше.

Список цитированной литературы

[1]. Аввакумов Е.Г. Механические методы активации химических процессов. – Новосибирск: Наука, 1986. – 305 с.

[2]. Kardos N. Sonochemistry of carbohydrate compounds / N. Kardos, J.-L.Luche // Carbohydrate research. – 2001. – V. 332. – P. 115-131.

[3]. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-Ray difractometer / L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin, C.M. Conrad // Text. Res. J. – 1959. – V. 29. – N 10. – P. 786-794.

[4]. Nalson, M.L. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in cellulose I and II / M.L. Nalson, R.T. O'Konnor // Journal of Applied polymer science. – 1964. – V. 8. – P. 1325-1341.

[5]. Маргулис М.А. Основы звукохимии (химические реакции в акустических полях): Учеб.-пособие для хим. и хим.-технол. спец. вузов.– М., Высш. шк., 1984. – 272 с.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Голязимова О.В. Интенсификация процесса измельчения опилок / О.В. Голязимова, А.А. Политов // Химия в интересах устойчивого развития. – 2008. – Т. 16. - № 5. – С. 598-592.

2. Голязимова О.В. Увеличение эффективности измельчения лигноцеллюлозного растительного сырья с помощью химической обработки / О.В. Голязимова, А.А. Политов, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2009. – № 2. – С. 53-57.

3. Голязимова О.В. Механическая активация ферментативного гидролиза лигноцеллюлозы / О.В. Голязимова, А.А. Политов, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2009. – № 2. – С. 59-63.

4. Способ получения древесной муки: пат. 2318655 Рос. Федерация / Политов А.А., Ломовский О.И., Бершак О.В. – № 2006123183; опубл. 29.06.06.

5. The method of producing bioethanol from lignocellulose: Patent WO/2009/005390 A1 / Lomovsky O.I., Korolev K.G., Politov A.A., Bershak O.V., Lomovskaya T.F. – 08.01.2009.

6. The method of pretreatment of the cellulose-containing biomass to produce water-soluble carbohydrates: Patent WO/2009/005389 A1 / Politov A.A., Bershak O.V., Lomovsky O.I., Korolev K.G. – 08.02. 2009.

7. Бершак О.В. Влияние ультразвука на ферментативный гидролиз целлюлозы / О.В. Бершак, А.А. Политов // Тез. докл. XLIV Международной Научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, 2006. – С. 12.

8. Bershak O.V. Development of a new efficient and ecologically friendly method for obtaining biologically active substances / O.V. Bershak, A.A. Politov // International Conference on Mechanochemistry and Mechanical Alloyng. – Novosibirsk, 2006. – P. 254.

9. Бершак О.В. Влияние предварительного ультразвукового воздействия на ферментативный гидролиз целлюлозы / О.В. Бершак, А.А Политов.// Тез. Докл. Двенадцатой Всероссийской научной конференции студентов физиков и молодых ученых. – Новосибирск, 2006. – С. 519.

10. Бершак О.В. Влияние изменения надмолекулярной структуры целлюлозосодержащих материалов на их прочность / О.В. Бершак, А.А. Политов, О.И. Ломовский // Тез. докл. III Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул, 2007. – С. 176-179.

11. Голязимова О.В. Изучение механо-ферментативного гидролиза целлюлозы / О.В. Голязимова, А.А. Политов // Тез. докл. IV Всероссийской

конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул – 2009. – С. 51-53.

12. Политов А.А. Сверхтонкое измельчение растительного сырья / А.А. Политов, О.В. Голязимова, О.И. Ломовский // Тез. докл. IV Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» – Барнаул, 2009. – С. 200-201.

Изд. Лиц. ИД № 04060 от 20.02.2001

Подписано к печати и в свет 14.12.2009
Формат 60×84/16. Бумага № 1. Гарнитура “Times New Roman”.

Печать оперативная. Печ. л. 1,3. Уч.-изд. л. 1,1. Тираж 120. Заказ № 198.
Учреждение Российской академии наук
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
Просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090