

БИООРГАНИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ

УДК 579.66 + 663.18

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ТОРФА ВЕРХОВОГО ТИПА ТВЕРСКОЙ ОБЛАСТИ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСАХАРИДОВ

Лакина Н.В.¹, Долуда В.Ю.¹, Рабинович Г.Ю.², Шкилева И.П.¹, Лакина М.Е.¹, Долуда Е.О.¹

¹ Тверской государственный технический университет, Тверь

² ФГБНУ Всероссийского НИИ милиорированных земель, Тверь

В работе представлены экспериментальные данные по эффективному применению мультиферментных комплексов “Агроцелл” и “Агроксилл” в гидролизе торфа верхового типа с целью получения моносахаридов. Полученные ценные продукты с успехом могут быть использованы в фармацевтической практике и для получения биотоплив. Определен оптимальный интервал температур 50–55°C и pH 4.5–5.5 в процессе ферментативного гидролиза торфяных субстратов.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, моносахариды, целлюлазы, гликозидазы, целлюлоза.

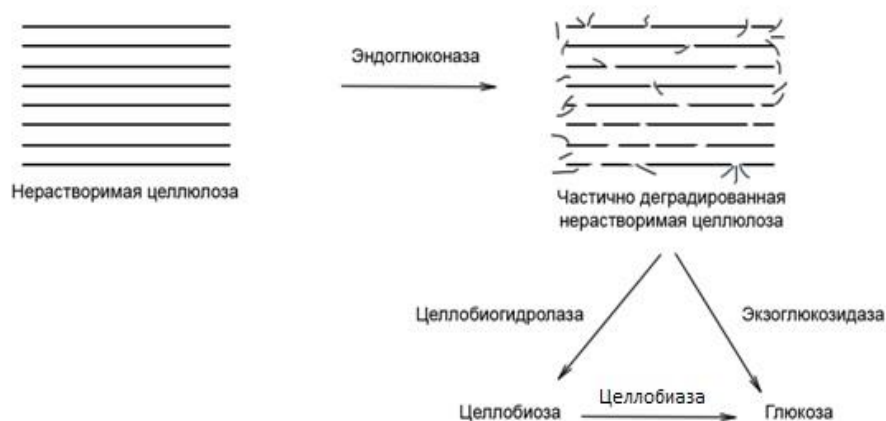
DOI 10.26456/vtchem2019.1.14

В результате изучения свойств и активности ферментов и применение их в процессах биodeградации возобновляемого сырья прослеживается их положительное действие на получение большого количества химически ценных веществ. Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется высокоспецифичными ферментами целлюлазами. Продуктами гидролиза являются обычно редуцирующие сахара, включая глюкозу. Стоимость ферментативного гидролиза низка по сравнению с кислотным или щелочным гидролизом, поскольку ферментный гидролиз обычно протекает в умеренных условиях, что не требует специального оборудования, которое нужно защищать от коррозии [1,2].

Теоретические исследования показывают, что наиболее насыщенным углеводными компонентами (25-50%) является торф верхового типа, ценное возобновляемое сырье [3, 4].

Ферментативная деструкция целлюлозы происходит, как правило, под действием полиферментных систем (комплексов). Целлюлазы могут быть классифицированы различными способами. Но преимущественно используются два способа классификации, которые основаны на особенностях субстрата, и те, которые основаны на

структурных сходствах ферментов. Целлюлазы относятся к классу карбогидраз (*O*-гликозид-гидролаз, КФ 3.2.1) – это широко распространенная группа ферментов, которые гидролизуют гликозидную связь между двумя или более углеводами, или углеводным и неуглеводным компонентом. Традиционно, целлюлазы были разделены на 4 различных класса: в первую группу входят эндоферменты, в частности, эндоглюконаза, которая одновременно гидролизует различные β -1,4-связи между соседними остатками глюкозы в неплотно упакованных областях целлюлозы, образуя разрывы в середине цепи. Это приводит к образованию больших фрагментов со свободными концами. Вторую и третью группы составляют экзоферменты. Четвертую группу образуют ферменты, расщепляющие небольшие фрагменты целлюлозы до глюкозы, например, β -глюкозидаза, или целлобиаза, которая катализирует превращение целлобиозы и целлотриозы в глюкозу образованием двух и трех молекул глюкозы, соответственно [5-7]. Схематично процесс ферментативного гидролиза целлюлозы изображен на рисунке 1.



Р и с . 1 . Схема ферментативного гидролиза целлюлозы

В данной работе проводилось исследование влияния различных целлюлозолитических ферментных комплексов на гидролиз торфа верхового типа, в зависимости от температуры и времени предобработки исходного сырья.

Ферментные препараты

В работе использовали следующие коммерческие ферментные препараты фирмы ООО «Агрофермент» – «Агроксилл» и «Агроцелл», которые обладают универсальным спектром действия. Основные

активности – ксиланаза, глюканаза и целлюлаза, а также вспомогательные активности, такие как протеаза (кислая), липаза и маннаназа.

В работе было использовано 5 образцов ферментных препаратов данной фирмы, их стандартизированные активности представлены в табл. 1.

Таблица 1

Стандартизированные активности ферментных препаратов

Название	Продуцент	Целлюлазная активность, ед./г	β -глюканазная активность, ед./г	Ксиланазная активность, ед./г
Агроцелл Р	<i>Penicillium verrucosum</i>	4000	3000	1000
Агроцелл Р1000	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TW – 420 ВКМ F – 3880 D	не менее 4000	3200	1000
Агроцелл	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TW – 420 ВКМ F – 3880 D	1000	200	750
Агроксилл 1000	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TW – 420 ВКМ F – 3880 D	1000	900	не менее 5000
Агроксилл	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TW – 420 ВКМ F – 3880 D	200	200	не менее 5000

Для получения ферментативных гидролизатов использовали верховой торф 30% влажности и 15% степени разложения, торф отбирался с месторождения Васильевский мох, Калининского района, Тверской области. Торф предварительно высушивали при 102 °С в течение 2 ч для доведения до равновесной влажности, подвергали предварительному измельчению и просеиванию до размеров менее 1 мм.

В качестве калибровочных стандартов при определении концентрации сахаров в растворе методом ВЭЖХ использовали D-глюкоза кристаллическая гидратная, D-галактоза, D-мальтоза, D-рамноза, D-ксилоза, D-фруктоза.

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а. производства Реахим. Растворы, использовавшиеся в качестве элюентов для хроматографии, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм производства Millipore (США) и тщательно дегазировали.

Результаты процесса ферментативного гидролиза

Предварительно подготовленные образцы торфа, содержащие лигноцеллюлозу, промывали дистиллированной водой и подвергали гидролизу ферментными комплексами «Агроцелл Р», «Агроцелл Р1000», «Агроцелл», «Агроксилл 1000» и «Агроксилл». Согласно паспортным данным, ферментативные комплексы в своем составе содержат целлюлазу, β -глюканазу и ксиланазу.

С целью выбора оптимальных параметров проведена оценка влияния рН и температуры на концентрацию глюкозы в процессе ферментативного гидролиза предварительно обработанного торфа (7% масс. серной кислотой при 120 °С, гидромодуль 1:10, в течение 90 мин).

Изначально были проведены опыты по исследованию влияния буфера на процесс гидролиза торфа ферментами. Для этих целей были поставлены эксперименты по ферментализу с буфером и с дистиллированной водой. Данные опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2
Изменение концентрации моносахаридов при ферментализе торфа с использованием ферментного комплекса «Агроцелл Р1000»

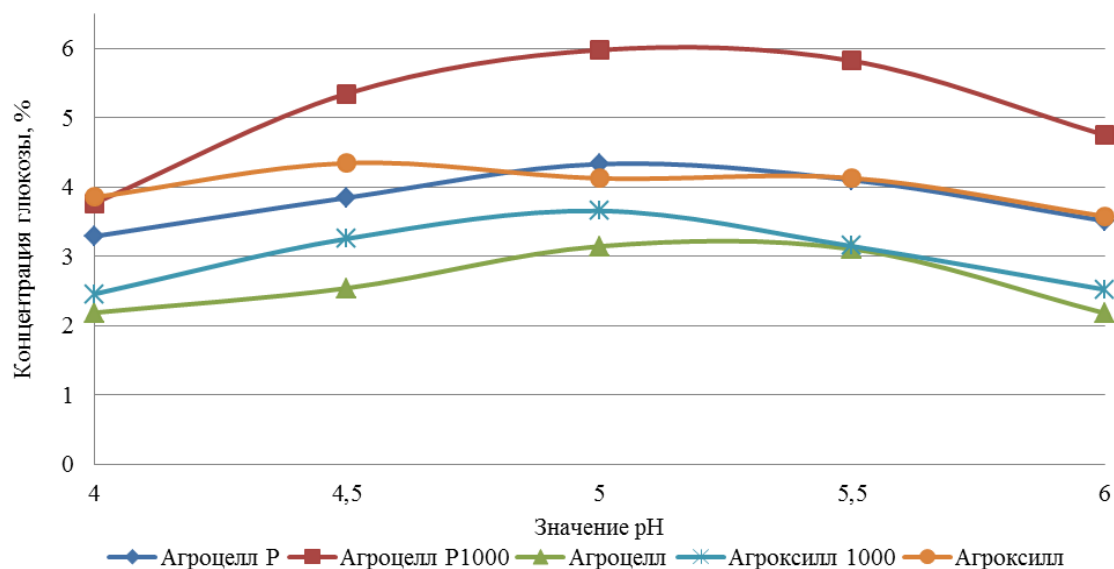
	Концентрация глюкозы, %	Концентрация ксилозы, %
Дистиллированная вода (рН 6.7)	6.89	0.02
Ацетатный буфер (рН 5.0)	7.26	0.03

Данные табл. 2 показывают, что активность ферментов увеличилась при использовании в качестве среды ацетатного буфера (рН 5.0), так как концентрация глюкозы заметно возросла, концентрация ксилозы также увеличилась, но незначительно. Можно сделать вывод, что для дальнейших исследований в качестве растворителя фермента наиболее эффективным является ацетатный буфер.

Оценка влияния рН проводилась при температуре 50 °С и объеме ацетатного буфера 150 мл, дозировке фермента 0.5 г на 5 г субстрата в течение 24 ч (рис. 2).

Зависимость ферментативной активности используемых ферментов от рН носила характер куполообразной кривой с максимумом при рН 5.0–5.5. Разрушение целлюлозного сырья ферментами прослеживалось при подкислении среды вплоть до рН 4.

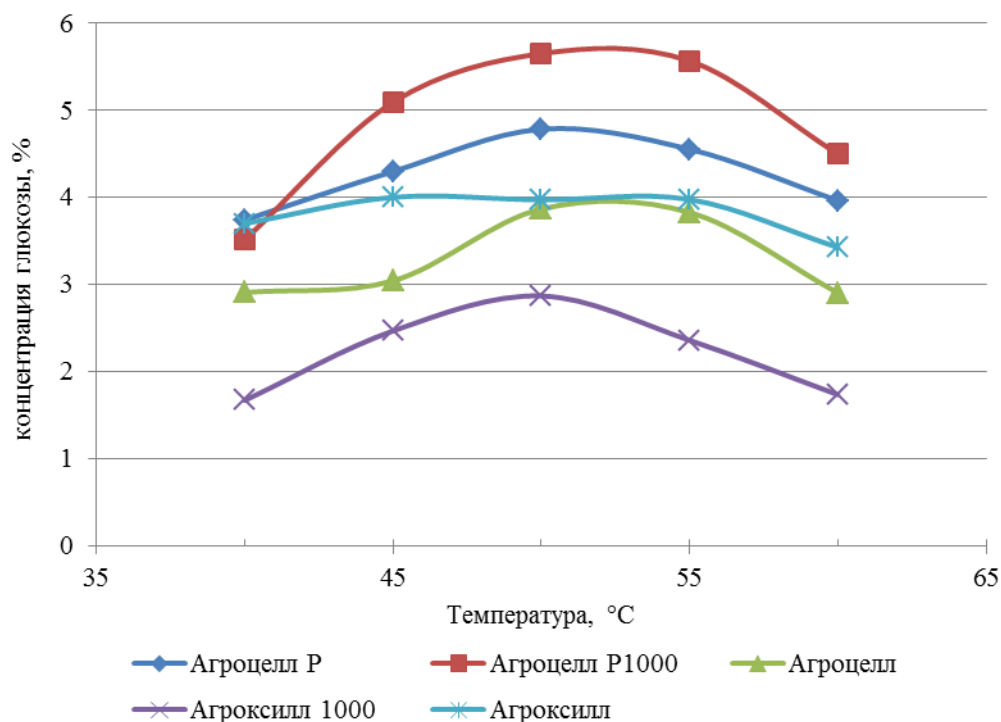
Ближе к нейтральной среде активность резко снижалась. Скорость ферментации нативных образцов торфа с рН 5.0 превышала таковую при рН 6 в 1.26 раза. Наилучшие результаты показал ферментативный препарат Агроцелл Р1000 с максимальным выходом глюкозы равным 5.98% при рН 5.0 (рис. 2).



Р и с . 2 . Зависимость количественного выхода глюкозы от значения рН при ферментативном гидролизе торфа в присутствии мультиферментных систем

Влияние температуры на активность ферментов по отношению к предварительно обработанному торфу изучалось в течение 24 ч при гидромодуле 1:30, дозировке ферментного препарата 0.5 г на 5 г субстрата, в диапазоне температур 40.0-60.0±2 120 °С (рис. 3).

Полученные данные показывают, что оптимальным является диапазон температур от 50 до 55°С. При повышении температуры до 60°С скорость разложения торфяного субстрата снижалась в 1.25 раза. Наибольшая концентрация глюкозы наблюдалась в процессе ферментализации при температуре 50°С в присутствии препарата “Агроцелл Р1000”.



Р и с . 3. Зависимость скорости образования глюкозы от температуры, при ферментативном гидролизе торфа в присутствии мультиферментных систем

Представленный в работе метод ферментативного гидролиза предварительно предобработанного целлюлозолигнинового сырья (торф верхового типа), позволяет получить гидролизат с высоким содержанием конечного продукта D-глюкозы. Полученный гидролизный раствор, после соответствующей нейтрализации, может быть использован для получения биоэтанола и бактериальных сред в микробном синтезе продуктов, применяемых в животноводстве. Применяя последовательно процессы диализа и кристаллизации, может быть получена кристаллическая D-глюкоза, широко применяемая в фармацевтической практике.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-08-00158.

Список литературы

1. Second-generation bioethanol from industrial wood waste of South American species. Article 4, V. 4, Issue 3, Summer 2017. P. 654–667
2. Гаврилова А.С., Манаенков О.В., Филатова А.Е. // Вестник Тверского Государственного Технического Университета. 2015. № 1(27). С. 60–66.

3. Круговорот возобновляемого сырья: биодизель из микроводорослей, биоразлагаемая полимерная упаковка, электроэнергия из органических отходов. //Глобальные технологические тренды. №5. 2014.
4. Клесов А. А., Григораш С. Ю. // Биоорганическая химия, Т. 7. №10, 1981.
5. Гречишников В., Швыдков В., Гейнель В. // Комбикорма: производство и использование, научно-технический и производственный журнал. 2014. № 6. С. 69-71.
6. Zang Meng, Song Xiaoxu, T.W. Deines T.W., Pei Z.J., Wang Donghai // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012. V. 212. P.1–9.
7. Fillat U., Ibarra D., Eugenio M., Moreno A., Pejo E., Sampedro R. // Fermentation. 2017. V. 3, Iss.17. P.1–30.

THE STUDY OF THE PROCESS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PEAT TYPE OF THE TVER REGION WITH THE AIM OF OBTAINING MONOSACCHARIDES

Lakina N. V.¹, Doluda V. Yu.¹, Rabinovich, G. Yu.², Shkileva I. P.¹,
Lakina M. E.¹, Doluda E. O.¹

¹Tver State Technical University, Tver

²All-Russian Research Institute of Reclaimed Lands

The paper presents experimental data on the effective application of multienzyme complexes “Agrocel” and “Agrosil” in the hydrolysis of the peat type with the purpose of obtaining monosaccharides. The resulting valuable products can be successfully used in pharmaceutical practice and for biofuels. The optimal temperature range of 50-55°C and pH 4.5-5.5 in the process of enzymatic hydrolysis of peat substrates was determined.

Keywords: *enzymatic hydrolysis, monosaccharides, cellulose, glycosidase, cellulase.*

Об авторах:

ЛАКИНА Наталия Валерьевна – кандидат химических наук, доцент, кафедра Стандартизации, сертификации и управления качеством, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», lakina@yandex.ru

ДОЛУДА Валентин Юрьевич – кандидат химических наук, профессор, кафедра Биотехнологии и химии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», doludav@yandex.ru

РАБИНОВИЧ Галина Юрьевна – доктор биологических наук, директор ФГБНУ «Всероссийский НИИ мелиорированных земель», vniimz@list.ru

Вестник ТвГУ. Серия: Химия. 2019. № 1(35).

ШКИЛЕВА Ирина Павловна – кандидат химических наук, профессор, кафедра Биотехнологии и химии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», shkileva.2014@mail.ru

ЛАКИНА Маргарита Евгеньевна – студент ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», lakinamargarita@yandex.ru

ДОЛУДА Евгений Олегович - студент ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», evgenydoluda@yandex.ru

Поступила в редакцию 11 декабря 2018 года