

**И. И. Осовская
И. А. Федоскин**

**ГИДРОФИЛЬНОСТЬ ПРИРОДНЫХ
ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

**КИСЛОТНЫЙ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ
ГИДРОЛИЗ ПРИ ОТБЕЛКЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ**

Учебное пособие

**Санкт-Петербург
2022**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«Санкт-Петербургский государственный университет
промышленных технологий и дизайна»
Высшая школа технологии и энергетики**

**И. И. Осовская
И. А. Федоскин**

ГИДРОФИЛЬНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

КИСЛОТНЫЙ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПРИ ОТБЕЛКЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Учебное пособие

Утверждено Редакционно-издательским советом ВШТЭ СПбГУПТД

Санкт-Петербург
2022

УДК 541.183.2
ББК 35.71я7
О 352

Рецензенты:

кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой материаловедения
Высшей школы технологии и энергетики Санкт-Петербургского государственного
университета промышленных технологий и дизайна

А. Н. Евдокимов;

доктор химических наук, главный ведущий сотрудник института
высокомолекулярных соединений РАН

А. В. Теньковцев

Осовская, И. И.

О 352 Гидрофильность природных полимерных материалов. Кислотный и ферментативный гидролиз при отбелке целлюлозы: учеб. пособие / И. И. Осовская, И. А. Федоскин. — СПб.: ВШТЭ СПбГУПТД, 2022. — 58 с.

ISBN 978-5-91646-322-4

Учебное пособие соответствует программам и учебным планам дисциплины «Гидрофильность природных полимерных материалов» для студентов, обучающихся по направлению подготовки 18.04.01 «Химическая технология». В учебном пособии изложены современные представления о кислотном и ферментативном гидролизе при отбелке целлюлозы.

Пособие предназначено для подготовки магистров очной формы обучения.

УДК 541.183.2
ББК 35.71я7

ISBN 978-5-91646-322-4

© ВШТЭ СПбГУПТД, 2022
© Осовская И. И., Федоскин И. А., 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. СТРУКТУРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ	5
1.1. Процессы делигнификации при отбелке целлюлозы	5
2. КИСЛОТНЫЙ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПРИ ОТБЕЛКЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ	13
2.1. Кислотный гидролиз целлюлозы.....	13
2.1.1. Кислотный гидролиз – предварительная стадия при отбелке сульфатной хвойной целлюлозы	20
2.2. Ферментативный гидролиз.....	21
2.2.1. Ферментативный гидролиз – предварительная стадия при отбелке сульфатной лиственной и сульфатной хвойной целлюлоз.....	49
2.2.2. Ферментативный гидролиз – предварительная стадия в производстве целлюлозы для химической переработки.....	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных проблем целлюлозно-бумажной промышленности в настоящее время – создание и внедрение экологически безопасных технологий отбели волокнистых полуфабрикатов. Применяемые в производстве целлюлозы схемы отбели включают использование хлорсодержащих реагентов, что приводит к образованию высокотоксичных хлорфенолов и диоксинов в сточных водах и готовой продукции.

Основной тенденцией в развитии технологии отбели волокнистых полуфабрикатов является повышение конкурентоспособности беленых полуфабрикатов при соблюдении требований по охране окружающей среды. Новая технология отбели должна обеспечивать для предприятия баланс между затратами на производство, качеством целлюлозы и влиянием на окружающую среду. Использование диоксида хлора при отбели целлюлозы по технологии ECF способствует решению этой задачи. Как известно, диоксид хлора обладает высокой делигнифицирующей способностью и селективностью. В настоящее время проводятся интенсивные работы, направленные на улучшение делигнифицирующей способности и селективности процесса отбели при использовании пероксида водорода.

Поэтому в современном производстве стали применяться новые экологичные способы отбели по технологии ECF и TCF, позволяющие добиться снижения негативного воздействия отбели на окружающую среду.

Наиболее перспективными бесхлорными отбеливающими реагентами являются кислород, озон и пероксид водорода. Несмотря на наиболее глубокую проработку, использование кислорода в технологических операциях сдерживается его низкой реакционной способностью, требующей проведения процессов при повышенных температурах и давлении. Применение озона ограничивается очень низкой селективностью: наряду с высоким сродством к лигнину он очень активен в реакциях с полисахаридами, что приводит к их существенной деструкции.

В последние годы значительно возрос интерес специалистов к использованию пероксида водорода как в качестве единственного отбеливающего реагента, так и в существующих в мировой практике схемах отбели ECF и TCF.

Также одним из возможных решений данной проблемы является введение в технологию делигнификации целлюлозного волокна дополнительной степени селективного кислотного или ферментативного гидролиза целлюлозы.

Кардинальным способом решения экологических проблем целлюлозно-бумажной промышленности является создание схем отбели, исключающих использование хлорсодержащих соединений (TCF-технология) или элементарного хлора (ECF-технология). Однако для достижения высокой конечной белизны товарного продукта все эти схемы требуют предварительного снижения содержания остаточного лигнина в целлюлозе перед отбелкой, что достигается предварительным кислотным или ферментативным гидролизом целлюлозы.

1. СТРУКТУРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

1.1. Процессы делигнификации при отбелке целлюлозы

В ЦБП древесина является первичным волокнистым сырьем, и качество этого сырья будет влиять на качество выпускаемой продукции. Качество определяется содержанием волокон, и их длиной и гибкостью.

Таблица 1 – Характеристики древесных волокон

Клетки	Массовая доля, %	Длина (l), мм	Диаметр (d), мм	Гибкость, l/d
<i><u>Хвойные</u></i>				
Трахеиды	90–95	1,5–5	0,02–0,08	100–200
<i><u>Лиственные</u></i>				
Клетки либриформа	60–70	0,3–2	0,02–0,05	40–50
Членики сосудов	20–30	0,2–1,3	0,02–0,5	6–10

В древесине хвойных пород содержится много волокнистых клеток (более 90 %). Эти клетки более длинные, чем клетки либриформа, поэтому древесину хвойных пород в ЦБП называют длиноволокнистым сырьем. Древесина лиственных пород содержит меньше волокон. Эти клетки короче и более жесткие, чем трахеиды хвойных. Массовая доля члеников сосудов, имеющих широкие полости и жесткие клеточные стенки достигает 20–30 %, что оказывает сильное влияние на качество этого волокнистого сырья.

Натронная целлюлоза во всем мире вырабатывается только из древесины лиственных пород, так как древесина хвойных пород варится по натронному методу гораздо труднее лиственной, и выход целлюлозы из нее меньше, чем при сульфатной варке. Натронная лиственная целлюлоза по показателям: механической прочности несколько уступает еловой сульфитной целлюлозе, но отбеливается так же легко, как сульфитная. В белемом виде натронная лиственная целлюлоза используется главным образом для выработки книжных и журнальных бумаг.

Все большее значение приобретает производство сульфатной целлюлозы из древесины лиственных пород. Древесина лиственных пород при сульфатной варке дает целлюлозу, обладающую довольно высокими показателями механической прочности, как это видно из данных табл. 2.

Таблица 2 – Показатели механической прочности хвойной и лиственной древесины

Порода	Выход целлюлозы от древесины, %	Перманганатная жесткость	Разрывная длина, м	Число двойных перегибов	Сопротивление продавливанию, кПА
Ель	50,7	123	10070	5340	660
Береза	51,8	95	10750	2295	673

Березовая. сульфатная целлюлоза характеризуется более высокими показателями механической прочности, чем хвойная сульфитная. Прочность ее составляет 70–80 % от прочности сульфатной целлюлозы. Большая часть лиственной сульфатной целлюлозы подвергается отбелке и служит полуфабрикатом для выработки печатных и типографских бумаг.

В промышленности совершенствуются методы отбелки целлюлозы и разрабатываются новые методы окислительной делигнификации древесины с целью создания экологически безопасных и ресурсосберегающих технологий. Особенность отбелки – необходимость воздействия на лигнин, уже подвергавшийся химической обработке в ходе варки (остаточный лигнин), т. е. на наиболее трудно удаляемый лигнин с измененной под действием варочных реагентов структурой. Поэтому отбеливающий реагент должен вызывать интенсивное разрушение остаточного лигнина, не затрагивая при этом полисахариды, т. е. отличаться высокой избирательностью (селективностью). Продукты окислительной деструкции лигнина хорошо растворяются в разбавленных растворах щелочи. Кроме того, в щелочной среде происходит дополнительное набухание целлюлозы, что облегчает проникновение отбеливающих реагентов и удаление продуктов деструкции лигнина. Это делает желательным чередование при отбелке обработки в кислой среде с обработкой в щелочной.

Обычно отбелку технических целлюлоз проводят в несколько ступеней различными реагентами. Гирер, внесший значительный вклад в химию отбелки, систематизировал отбеливающие реагенты на основе общности механизмов протекающих реакций и природы активных промежуточных частиц. Реагенты по начальной реакции с лигнином подразделяются на катионные, анионные и свободно-радикальные. Соответственно, при отбелке протекают гетеролитические (катионные в кислой и анионные в щелочной среде) и гомолитические реакции. Катионные и окислительные радикальные реакции относятся к электрофильным (атакуются бензольные кольца и двойные связи в

пропановой цепи), а анионные и восстановительные радикальные – к нуклеофильным реакциям (атакуются структуры с карбонильными группами). Многие хлор- и кислородсодержащие отбеливающие реагенты в условиях отбели при взаимодействии с субстратом образуют дополнительно различные активные частицы как ионные, так и свободно-радикальные, что значительно усложняет химические превращения компонентов технической целлюлозы.

По химическому составу и механическим показателям беленая и небеленая целлюлозы резко отличаются друг от друга. Небеленая целлюлоза, даже мягкая, содержит не менее 1,5–2 % лигнина, а в обычной беленой целлюлозе лигнина всего 0,4–0,5 %. Кроме того, при отбелке в раствор переходит 1–1,5 % гемицеллюлоз, уменьшается зольность и смолистость.

Некоторое снижение механической прочности целлюлозного волокна происходит при отбелке вследствие его частичного разрушения.

Применяя на некоторых стадиях дополнительную щелочную обработку, получают полуфабрикат, близкий по свойствам к хлопковой целлюлозе, называемой облагороженной целлюлозой.

В процессе облагораживания происходит дополнительная очистка волокна от сопутствующих веществ. В результате целлюлоза получает более высокие показатели содержания α -целлюлозы, степень полимеризации, медное число, вязкость раствора, содержание смол, зольность и др.

Основной из задач отбели является максимальное удешевление этого процесса, что достигается, во-первых, уменьшением до минимума потерь целлюлозы и, во-вторых, выбором реагентов, обеспечивающих требуемую степень белизны при минимальных затратах. Кроме того, если при различных способах отбели получают равноценные конечные полуфабрикаты при равной стоимости реагентов, предпочтение отдается тому способу, который требует наименьших капитальных затрат, эксплуатационных расходов, затрат труда, энергии и тепла.

В общем случае процесс отбели с извлечением лигнина можно понимать как продолжение процесса варки. Как и при варке, при отбелке целлюлоз для производства бумаги необходимо извлечь лигнин при максимальном сохранении углеводов. При традиционных способах варки невозможно обеспечить полную делигнификацию древесины без значительного разрушения углеводной части и ее растворения. Но так как лигнин легко окисляется, остатки его можно извлечь, окисляя и растворяя их в водном растворе щелочи. При варке окислители не используют из-за их значительного расхода и высокой стоимости. Кроме того, окислители действуют на углеводы при высоких температурах. Многие отбеливающие реагенты, например, диоксид хлора в этих условиях к тому же быстро разлагается. Поэтому окисление целлюлозы

проводят после варки в нейтральной или восстановительной среде для удаления основной массы лигнина и разделения древесины на волокна.

Таким образом, окислитель для отбелики должен быть дешевым и минимально воздействовать на углеводы. В наибольшей степени в этом отношении приемлем диоксид хлора.

Наиболее дешевый хлор легко взаимодействует с лигнином при низких температурах, но он только хлорирует и окисляет лигнин, практически не растворяя его. Хлор экономит реагенты, кроме того, хлорлигнин легко растворяется в разбавленном растворе щелочи.

Однако в настоящее время с целью снижения экологической нагрузки на окружающую среду широко применяется диоксид хлора.

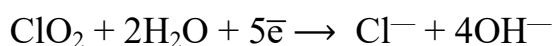
Окислительные свойства диоксида хлора связаны с присутствием в его молекуле хлора, находящегося в окисленном состоянии с положительной валентностью. Окисляя, диоксид хлора может последовательно восстанавливаться в различные соединения. Степень восстановления зависит от величины pH. В кислой среде диоксид хлор восстанавливается до хлорида Cl^- , и окислительная способность используется полностью, в щелочной среде – до хлорита ClO_2^- и окислительная способность используется лишь на 1/5. Тем не менее в щелочной среде реакция протекает очень интенсивно, и bleaching действие диоксида хлора проявляется сильнее. Окислительная способность диоксида хлора определяется окислительно-восстановительным потенциалом, который зависит от pH среды. Отбелику диоксидом хлора обычно проводят при pH 3-5. В этих условиях окислительный потенциал имеет большое значение, и в растворе присутствует в основном диоксид хлора и очень небольшое количество хлорита. Окислительная способность раствора используется полностью. При такой отбелике деструкции целлюлозы практически не происходит, вязкость и содержание α -целлюлозы не изменяются.

Широкое применение отбелики диоксидом хлора объясняется двумя причинами: во-первых, возможностью отбелики почти любых полуфабрикатов с приданием им высокой степени белизны при стабильности цвета и незначительной потери прочности волокна; во-вторых, разработкой нескольких способов производства диоксида хлора, который экономически стал конкурировать с гипохлоритом. Кроме того, его применение позволяет обеспечить высокое качество полуфабрикатов при незначительных дополнительных затратах.

При наличии достаточного количества диоксида хлора лигнин окисляется и хлорируется, превращаясь в растворимое соединение. Многие компоненты древесной смолы также окисляются, превращаясь в бесцветные вещества. Структурные элементы углеводной части подвергаются деструкции лишь под

действием больших количеств диоксида хлора, высокой температуры и необоснованно длительной продолжительности обработки.

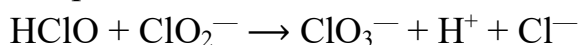
Диоксид хлора – сильный окислитель, который восстанавливается до хлорид иона, согласно уравнению:



Когда делигнификация целлюлозы осуществляется в кислой среде, диоксид хлора восстанавливается лигнином до хлористой кислоты HClO_2 , и хлорноватистой кислоты HClO , в серии последовательных реакций. Хлористая кислота или хлорит-ион, в зависимости от величины pH отбеливающего реагента, неактивны по отношению к лигнину; хлорноватистая кислота и элементарный хлор являются продуктами реакции восстановления диоксида хлора, которые могут выступать как окислители или реагировать в направлениях, ведущих к образованию хлорированных органических веществ. Также необходимо принимать во внимание участвующие в реакции свободные радикалы, например, монооксид хлора ($\text{ClO}^\cdot$), образующийся при двухэлектронном восстановлении диоксида хлора лигнином. Неорганические соединения хлора, образующиеся за счет реакции восстановления диоксида хлора лигнином, могут взаимодействовать друг с другом или распадаться различными путями. Так хлористая и хлорноватистая кислоты могут реагировать с образованием диоксида хлора:



В реакции, зависящей от pH, хлорит реагирует с хлорноватистой кислотой с образованием хлората:



Хлорат является неактивным реагентом в реакциях делигнификации диоксидом хлора и, следовательно, его образование ведет к потере активного химиката. Кроме того, образуется молекулярный кислород в результате разложения хлората, монооксида хлора и диоксида хлора. В условиях делигнификации диоксидом хлора в кислой среде молекулярный кислород не является активным отбеливающим реагентом.

Древесина на 25–30 % состоит из лигнина, являющегося своего рода цементирующим веществом волокон, что придает ей прочность. Реакции лигнина с отбеливающими реагентами обычно изучаются на модельных соединениях, содержащих функциональные группы и структурные элементы в пропорциях, соответствующих их содержанию в лигнине.

Диоксид хлора является электрофилом и поэтому атакует положение с высокой электронной плотностью, в фенольных и нефенольных кольца лигнина, а также сопряженных с кольцами этиловых группах. Основываясь на результатах исследований модельных соединений лигнина, можно

классифицировать два принципиальных типа реакций при использовании диоксида хлора в качестве делигнифицирующего реагента – реакция окисления и реакции замещения хлором в ароматическом кольце.

Окисление диоксидом хлора лигнина и его модельных соединений сопровождается реакциями хлорирования. При обработке модельных соединений лигнина диоксидом хлора обнаруживаются хлорароматические соединения, означая, что реакции замещения в ароматическом кольце контролируются с реакциями окислительного расщепления кольца.

Результаты исследований модельных соединений лигнина показывают, что фенольные кольца более активны по отношению к диоксиду хлора, по сравнению со своими нефенольными двойниками. Это подразумевает, что в промышленных условиях отбели диоксид хлора реагирует, в основном, с фенольными структурами остаточного лигнина. Нефенольные структуры могут косвенным путем реагировать с диоксидом хлора, благодаря их превращению в фенольные структуры под влиянием хлорноватистой кислоты или элементарного хлора, при восстановлении диоксида хлора. В лигнине помимо фенольных и неструктурных фенольных единиц, повышенной электронной плотностью характеризуются также сопряженные с бензольным кольцом двойные связи. При действии диоксида в кислой среде при величине рН 3–5 проходит окисление альдегидных групп до карбоксильных. Окислению подвергаются как конечные полуацетальные группы, так и альдегидные группы, образовавшиеся за счет окисления целлюлозы каким-либо другим окислителем. На гидроксильные группы в кислой среде диоксид хлора не действует. Все это объясняет высокую селективность процесса делигнификации целлюлозы диоксидом хлора в кислой среде и стабильность белизны целлюлозы.

В настоящее время нашел широкое применение в качестве отбеливающего реагента пероксид водорода. Пероксид водорода как отбеливающий реагент имеет преимущества перед другими кислородсодержащими окислителями: по реакционной способности он превосходит кислород, а по селективности – озон.

Основным компонентом небеленых древесных полуфабрикатов, придающих им окраску, является лигнин, а именно те структурные единицы его полимерной молекулы, которые содержат функциональные группы с хромогенными свойствами. К таким структурным единицам относятся фрагменты с а-карбонильной группой, стильбеновые, хиноидные и хинонметидные структуры.

Основные выводы о механизме окислительного обесцвечивания пероксидом водорода в щелочной среде получены на основе экспериментов с

модельными соединениями лигнина, выделенными препаратами лигнина, а также при изучении изменений хромофорного состава лигноцеллюлозных материалов в твердой матрице.

Поскольку в процессах отбели пероксидом водорода принимают участие промежуточные продукты его распада, многочисленные исследования посвящены процессам саморазложения пероксида водорода, анализу состава активных форм кислорода в зависимости от условий эксперимента. Измерение абсолютных констант скорости начальных реакций, $\text{HO}\cdot$ радикалов с модельными соединениями лигнина и углеводов позволило предложить «фактор селективности», применимый к процессам отбели, включающим образование этих радикалов. В сильнощелочном растворе $\text{HO}\cdot$ быстро превращается в анионную форму оксил-анион-радикал $\text{O}\cdot^-$, который наряду с лигнином атакует и углеводные компоненты лигноцеллюлозного материала. Реакция с целлюлозой дает карбонильные структуры, открывая путь к щелочному разложению ее через β -элиминирование, что приводит к снижению выхода и прочностных свойств беленых целлюлоз.

Супероксидный анион-радикал $\text{O}_2\cdot^-$ образуется при восстановлении кислорода:



Эта реакция эндотермична и требует активации субстрата и/или высокой температуры для протекания с приемлемой скоростью. В условиях щелочной пероксидной отбели этот анион-радикал гидратирован и его нуклеофильный характер выражен намного меньше, чем в органических растворителях, обычно используемых для оценки его химизма. Поэтому при отбели $\text{O}_2\cdot^-$ действует как восстановитель и как слабый, т. е. селективный, окислитель по отношению к молекулам, имеющим подвижные атомы водорода. Главным объектом его атаки являются радикальные центры в лигнине или углеводах, генерированные гидроксильными радикалами. Взаимодействие радикалов субстрата с пероксид-анион-радикалами приводит к появлению интермедиатов пероксидного типа и далее к раскрытию кольца, образованию оксирановых структур и расщеплению сопряженных двойных связей.

Образование гидроксильных радикалов в условиях пероксидной отбели катализируется катионами переходных металлов:



В целом этот процесс нежелателен при отбели, так как до 30 % пероксида водорода теряется при саморазложении, поэтому проводятся работы по изучению влияния ионов переходных металлов на разложение H_2O_2 , а также поиск стабилизирующих добавок, повышающих эффективность пероксидной отбели.

Успешное применение пероксидной отбелки в промышленном масштабе при создании полностью свободной от хлорсодержащих реагентов технологии возможно путем решения следующих проблем:

- снижения начальной жесткости целлюлозы, либо более углубленной делигнификации при варке или на стадиях предварительных окислительных обработок;
- повышения эффективности отбеливающего действия пероксида водорода.

Большие возможности для широкого внедрения пероксида водорода в технологии получения целлюлозы открываются в результате разработки способов углубленной варки древесины, позволяющих получать лигноцеллюлозный материал с очень низким содержанием остаточного лигнина. Использование такого исходного материала позволяет проводить процесс отбелки при соотношениях H_2O_2 : лигнин, соответствующих максимальной эффективности реакции деструкции хромофоров.

Предварительную делигнификацию осуществляют с помощью обработки лигноцеллюлозного материала кислородом или озоном. Показана также возможность окислительной делигнификации персульфатом натрия, эффективно протекающей в сильнощелочной среде.

Эффективность отбеливающего действия пероксида водорода значительно повышается при использовании хелатирующих агентов, связывающих катионы переходных металлов и снижающих тем самым непроизводительный расход пероксида водорода. Обработку лигноцеллюлозных материалов комплексообразователями проводят либо в процессе отбелки, либо вводя предварительную стадию. В качестве комплексообразователей используют фосфаты, полифосфаты, аминополикарбоновые кислоты или их соли, нитрилуксусную и этилендиаминтетрамилфосфоновую кислоты. Найдены оптимальные условия хелатирования, максимально устраняющие вредное действие катионов переходных металлов и способствующие сохранению катионов Mg и Ca, стабилизирующих пероксид водорода при отбелке.

Результаты теоретических и практических исследований убедительно показывают, что, несмотря на всю сложность механизма реакций и его зависимость от большого числа факторов, отбелка целлюлозы пероксидом водорода без применения хлорсодержащих окислителей позволяет получать продукт с соответствующими техническим требованиям показателями качества. Главенствующую роль во внедрении пероксидной технологии в промышленность играет комплексное решение задачи путем сочетания перспективной технологии, углубленной делигнификации с применением биотехнологических стадий предобработки, а также использованием катализаторов на стадии отбелки.

2. КИСЛОТНЫЙ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПРИ ОТБЕЛКЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

2.1. Кислотный гидролиз целлюлозы

Древесина во всех областях ее использования подвергается различным воздействиям. Химические реакции древесины – это преимущественно реакции основных макромолекулярных компонентов клеточных стенок, т. е. целлюлозы, полиоз и лигнина. Реакция кислотного гидролиза является наиболее важной и типичной реакцией деструкции. Гидролиз, приводящий к разрыву гликозидных связей, протекает в три стадии. На первой стадии протон кислоты-катализатора быстро взаимодействует с гликозидным кислородом, связывающим два звена моносахарида с образованием связи С-О с образованием промежуточного циклического карбкатиона. Протонирование может также происходить по кислороду пиранозного цикла, что приводит к раскрытию последнего и образованию нециклического карбкатиона. Наиболее вероятный тип промежуточного карбкатиона не установлен. На последней стадии карбкатион инициирует быстрое присоединение молекулы воды с образованием конечного продукта и освобождением протона. Принцип катализируемого кислотой расщепления гликозидных связей является общим для таких реакций. Однако на кинетику и ход деструкции в целом оказывают влияние кислотная среда и природа образца. Условия гидролиза характеризуются природой кислоты, ее концентрацией, значением рН, силой кислоты, температурой и давлением. Факторы, определяемые образцом, включают его фазовое состояние, физическую структуру, доступность при гетерогенном гидролизе (наиболее важны реакции гидролиза в гетерогенной среде, когда твердый полисахарид взаимодействует с водным раствором кислоты. Если же полисахарид полностью растворяется в кислотном растворе, реакция идет в гомогенной среде, и ее участники находятся в жидкой фазе), конформационные эффекты, строения цикла звена моносахарида и имеющиеся в нем заместители. Выбор кислоты и ее концентрации зависят от вида гидролизуемого образца и цели гидролиза. Повышение температуры и давления увеличивают скорость гидролиза в некоторой степени в зависимости от характеристик кислоты (рКа; рН). На поведение гликозидных связей при гидролизе существенно влияют два фактора, которые действуют или сами по себе, или накладываются друг на друга. Первый фактор – это конформация звеньев сахаров, второй – индукционный эффект, вызываемый некоторыми заместителями. К индукционному эффекту относят изменение электронной плотности на кислороде цикла под влиянием различных заместителей.

С химической точки зрения гидролиз целлюлозы аналогичен гидролизу дисахаридов. В присутствии кислотных катализаторов происходит быстрое образование промежуточного комплекса между глюкозидным кислородом и протоном, приводящие к медленному, определяющему скорость реакции, расщеплению глюкозидной связи у С₍₁₎. При избытке воды реакция, как

правило, подчиняется уравнению первого порядка; тем не менее изучение начальных стадий реакции гидролиза показало, что во многих случаях они могут быть описаны уравнением нулевого порядка.

При изучении кинетики гидролитической деструкции скорость реакции устанавливали по понижению степени полимеризации (P) в зависимости от времени гидролиза. Точность метода определяется его чувствительностью. Так для макромолекулы, содержащей тысячу элементарных звеньев, разрыв одной связи соответствует степени гидролиза 0,1 %, что, однако, приводит к уменьшению средней степени полимеризации с 1000 до 500.

Интерес к гидролизу целлюлозы проявляется в течение многих лет и относится к проблемам аналитического и препаративного характера. Исследование процесса гидролиза целлюлозы представляет интерес с двух точек зрения. Во-первых, изучение кинетики гидролиза может быть принципиально использовано для получения информации о наличии в макромолекуле целлюлозы аномальных элементарных звеньев, отличающихся от обычных α -D-глюкопиранозных звеньев, связанных (1-4)- β связью. Во-вторых, процесс гидролиза целлюлозы в разбавленных кислотах всегда осложняется тем, что целлюлоза нерастворима в гидролизующей среде. Однако в участках структуры, набухающих в воде (в первом приближении это «аморфные» участки), деструкция принципиально может протекать так же, как и в гомогенной среде. Таким образом реакция гидролиза целлюлозы может быть использована для исследования структуры различных типов целлюлоз.

В настоящее время существует потребность в разработке новых технологий получения глюкозы. В качестве сырья для получения глюкозы используются традиционные пищевые и непищевые источники, такие как древесные и травянистые растения, запасы которых велики и постоянно возобновляются естественным путем, а также различные целлюлозосодержащие отходы. Одним из способов деградации целлюлозы до глюкозы является кислотный гидролиз. При этом целлюлозу обрабатывают концентрированной серной кислотой при высоких температурах (170–180 °C) в гидролизных аппаратах. Получаемый гидролизат очень загрязнен примесями и для получения глюкозы требует дополнительной очистки, что в свою очередь ведет к усложнению технологии процесса получения гидролизата и увеличению себестоимости получения готовой продукции. В результате кислотного гидролиза образуются побочные продукты (фурфурольный конденсат и лигнин), которые загрязняют окружающую среду.

С практической точки зрения представляет интерес использование кислотного гидролиза при отбелке целлюлозы, а также для получения из древесной целлюлозы сахаров, пригодных для последующего превращения в спирт.

Качественный анализ продуктов частичного или полного гидролиза целлюлозы был использован для исследования ее химического строения. Наиболее эффективно для этой цели проведение процесса гидролиза в гомогенной среде в концентрированных растворах кислот; образующиеся сахара могут быть идентифицированы методом бумажной хроматографии

после разбавления, нейтрализации и деионизации гидролизной смеси. Этим методом многие исследователи обнаружили в продуктах гидролиза целлюлозы ксилозу и маннозу. Возможно, что эти сахара образуются при гидролизе окклюдированных гемицеллюлоз. Были сделаны попытки выделить чистую целлюлозу путем экстракции или фракционного осаждения из раствора. Однако при фракционном осаждении производных целлюлозы из раствора существует опасность одновременного осаждения маннана и ксилана, поэтому наличие других сахаров в гидролизате не является доказательством того, что эти сахара были связаны с ангидроцеллюлозой в макромолекуле целлюлозы. Более убедительное доказательство – выделение продуктов частичного гидролиза и определение в них дисахаридов с глюкозо-ксилозными и глюкозо-маннозными связями. Такие дисахариды были получены при гидролизе α -целлюлозы, выделенной из карибской сосны. Однако эти факты также не могут служить окончательным доказательством, что в макромолекулах хлопковой или древесной целлюлозы существуют какие-либо другие связи, кроме (1-4)- β -глюкозидных.

Набухание целлюлозы в воде, не похожее на набухание большинства полукристаллических полимеров в жидкостях, отличается тем, что набухшие области выделяются достаточно отчетливо и незначительно изменяются под действием внешних факторов, таких как температура. Результаты, полученные при дейтерировании, показали, что доступные для набухания участки соответствуют в первом приближении аморфным областям. Следовательно, скорость и глубина реакций, протекающих в водной среде, зависят от количественного содержания аморфной фракции в препарате целлюлозы. Процесс гидролиза целлюлозы разбавленными водными растворами кислот не является в этом отношении исключением.

Давно замечено, что степень гидролиза целлюлозы ограничена и что первоначально быстрая потеря веса, обусловленная отщеплением растворимых олигосахаридов, затем уменьшается. Полностью деструктурированная часть препарата целлюлозы соответствует содержанию в нем аморфной фракции, и, следовательно, процесс гидролиза целлюлозы разбавленными кислотами может быть использован для определения содержания этой фракции. Указанный метод использовали для исследования ряда препаратов природной и регенерированной целлюлозы, причем существовала корреляция между этими и другими методами определения количества аморфной целлюлозы.

Были высказаны сомнения, можно ли использовать метод гидролиза для определения содержания кристаллической фракции, так как обычно в процессе гидролиза кристалличность повышается, благодаря дополнительной ориентации разорванных цепей, приводящей к более высокой упорядоченности структуры (процесс рекристаллизации). Эта точка зрения была высказана Германсом и затем подтверждена экспериментально. Хорошо известно, что рекристаллизация происходит на начальных стадиях процесса гидролиза, поэтому определение содержания аморфной фракции этим методом может дать заниженные значения по сравнению с истинными.

Изучение последующих стадий процесса гидролиза позволяет понять

механизм гидролиза и его зависимость от структуры целлюлозы.

Скорость потери веса целлюлозного образца на этой стадии процесса имеет строгую зависимость в полулогарифмических координатах.

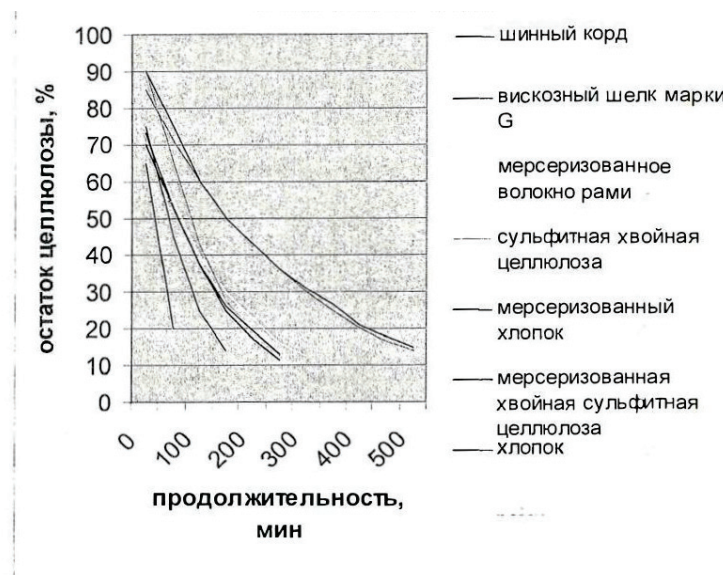


Рис. 1. Зависимость (в полулогарифмических координатах) потери веса от продолжительности гидролиза в гетерогенной среде

На рис. 1 приведены данные для ряда образцов целлюлозы, характеризующие зависимость логарифма остаточного веса образца после гидролиза от времени обработки. Экстраполяция к нулевому времени дает возможность определить по потере веса содержание аморфной фракции. Продукты гидролиза целлюлозы после завершения начальной стадии этого процесса приобретают форму стержнеобразных частиц, длина которых зависит от природы исходной целлюлозы и составляет для хлопка, например, 400 Å при ширине 100 Å. Следует отметить, что такие элементы структуры, образовавшиеся в процессе гидролиза, вероятно, обусловлены размером кристаллических участков в препаратах недеструктированной целлюлозы. Длина этих частиц, определенная с помощью электронного микроскопа, коррелирует с предельным значением СП, рассчитанным по вязкости, что свидетельствует об ориентации макромолекул целлюлозы вдоль длинной оси кристаллитов. Известно, что подобная ориентация цепей характерна для микрофибрилл природной целлюлозы и, очевидно, кристаллы чередуются с аморфными участками по длине микрофибрилл.

Низкая скорость деструкции кристаллитов на последующих стадиях гидролиза подтверждается тем фактом, что некоторые свойства этих материалов остаются постоянными даже после удаления 80 % всего материала. Так длина элементов надмолекулярной структуры, определенная с помощью электронного микроскопа, молекулярный вес макромолекул, входящий в эти элементы, и поглощение ими влаги остаются неизменными. Кристалличность

стержнеобразных частиц, образующихся на начальных стадиях процесса гидролиза целлюлозы, также остается постоянной.

Инвариантность поведения различных образцов целлюлозы на последующих стадиях гидролиза, а также логарифмическая зависимость снижения веса образцов от времени гидролиза объясняются различным экспоненциальным распределением элементов структуры по размеру и тем, что кислота действует на эти элементы только с концов. Независимо от природы образцов целлюлозы характер распределения элементов по размерам остается экспоненциальным даже при уменьшении массы гидролизующего материала. Следовательно, скорость гидролиза на последующих стадиях, которая различна для разных образцов целлюлозы, зависит от числа образовавшихся элементов структуры. Наблюдалась корреляция между длиной таких элементов и скоростью гидролиза.

Процесс гидролитической деструкции целлюлозы и его связь со структурой целлюлозы можно характеризовать следующим образом. Первоначально гидролизующему действию подвергаются глюкозидные связи участков макромолекул, находящихся в аморфных областях. Связи между звеньями макромолекул, расположенных на поверхности кристаллитов, хотя и доступны действию водных растворов кислот, практически очень устойчивы. На этой стадии процесса гидролиза деструкцию целлюлозы можно определить по уменьшению молекулярного веса или по количеству образовавшихся растворимых олигосахаридов. Последний метод – косвенный, т. к. определение проводится уже после прошедшей рекристаллизации целлюлозы. Поэтому получаемые значения, по-видимому, занижены. Количество аморфной фракции, установленное по скорости гидролиза, всегда меньше, чем определенное другими методами, такими как дейтерирование и рентгенография, т. к. при помощи последних методов определяется также и поверхность кристаллитов.

На последних стадиях процесса гидролиза действию кислоты подвергаются только глюкозидные связи, находящиеся на концах кристаллитов. Скорость гидролиза на этой стадии процесса резко уменьшается. При характеристике особенностей этой стадии следует учитывать экспоненциальный характер распределения элементов надмолекулярной структуры, который обусловлен статистическим расположением аморфных участков по длине микрофибрилл. Это представление достаточно обосновано для препаратов природной целлюлозы, в которых имеются отчетливо выраженные микрофибриллы, и требует некоторых коррективов для описания процессов гидролиза регенерированной целлюлозы, где существуют отдельные области, связывающие между собой микрофибриллы.

Существует ряд исследований, интерпретированный с точки зрения простой двухфазной модели структуры целлюлозы. Эта модель предусматривает наличие кристаллических и аморфных участков аналогично принятой в 30-х годах бахромчато-мицеллярной теории строения целлюлозы. Единственное отличие, внесенное в последние годы, заключается в необходимости учитывать поверхность кристаллитов как третий фактор,

определяющий структуру целлюлозы.

В настоящее время считают, что такое представление о структуре полимеров недостаточно для большинства плавящихся кристаллических полимеров с высоким уровнем структурной организации, в которых первичными звеньями роста при кристаллизации являются сферолиты. Однако возможно, что при получении регенерированной целлюлозы осаждением ее из раствора, например, в процессе формирования полотна, количество начальных центров кристаллизации настолько велико, что рост зарождающихся сферолитов происходит лишь до очень ограниченных размеров из-за быстрого соударения с другими образующимися сферолитами. В начальных стадиях процесса кристаллизации сферолиты имеют стержнеобразный вид и представление о бахромчато-мицеллярной структуре не только оправданно, но и предпочтительно. По сравнению, например, с полиоксиэтиленом, в котором растущие элементы надмолекулярной структуры достаточно велики и рассеивают свет, в целлюлозе такие кристаллические элементы малы, что определяет высокую прозрачность полученных материалов (например, волокон большого диаметра).

Этот вывод подтверждает, что целлюлоза отличается от других кристаллизующихся полимеров не формой кристаллических образований, а меньшей величиной кристаллитов и более высокой плотностью. Это отличие можно объяснить спецификой строения макромолекулы целлюлозы или способом образования надмолекулярной структуры при кристаллизации целлюлозы из растворов. Установлено, что в соответствующих условиях можно получить сферолиты не только целлюлозы, но и ее производных. Недавно Мэнли показал, что при кристаллизации триацетата целлюлозы образуются пластинчатые монокристаллы, характеризующиеся складчатой формой, подобно тому, как это имеет место для полиэтилена и других синтетических полимеров. Попытки получить монокристаллы целлюлозы при омылении триацетата целлюлозы не увенчались успехом, так как при омылении в водной среде происходит разрушение структуры с последующей рекристаллизацией. Предположение о возможности складчатой упаковки макромолекул целлюлозы поставило исследователей перед необходимостью решения вопроса о том, не связаны ли вышеописанные отклонения при определении скорости гидролиза целлюлозы с высококристаллической структурой таких образований.

Определение доступности методом дейтерирования показало, что она не изменяется в процессе гидролиза. Это привело к предположению, что диффузное рассеяние, наблюдаемое на рентгенограммах, объясняется не наличием межкристаллического аморфного вещества, а дефектностью кристаллической решетки. При объяснении наблюдаемой инвариантности свойств продуктов гидролиза целлюлозы был сделан вывод об образовании поверхности кристаллитов преимущественно беспорядочными аморфными участками. На основании этих данных можно предположить, что свойства микрофибрилл природной и регенерированной целлюлоз можно описать, исходя из представлений о складчатой структуре и монокристаллах, обладающих спиральной упорядоченностью. Однако более обоснованным

является, по-видимому, предположение о чередовании кристаллических и аморфных участков (с учетом аморфности поверхности кристаллитов). Серьезным возражением является также то, что с точки зрения представления о складчатой структуре целлюлозы нельзя объяснить образование при гидролизе отдельных кристаллитов, ширина которых равна ширине начальных микрофибрилл. Образование таких кристаллитов можно легко объяснить только наличием в целлюлозе аморфной фракции, находящейся между кристаллитами и неустойчивой к действию кислот. Аналогичное возражение можно сделать при исследовании процесса щелочной деструкции целлюлозы. Все эти возражения тем не менее не исключают возможности наличия в природной или регенерированной целлюлозе макромолекул, обладающих складчатой структурой. Возможно, что складки могут быть расположены вдоль аморфных участков микрофибрилл и что они вообще могут возникать в таких участках. Однако до настоящего времени не существует каких-либо прямых подтверждений этого предположения.

Уже давно в литературе указывалось на наличие в макромолекуле целлюлозы аномальных связей, обладающих пониженной устойчивостью к действию кислот. Зависимость скорости гидролиза целлюлозы от ее химического строения, и в том числе от наличия окисленных гидроксильных групп, в настоящее время достаточно изучена. Имеются данные, что такие аномальные связи могут возникать из-за физической неоднородности структуры; при этом константа скорости гидролиза этих слабых связей более чем в 10000 раз выше, чем для обычных глюкозидных связей. Такое различие значительно превышает возможность увеличения скорости в результате неоднородности химического строения.

Выяснение вопроса о причинах образования аномальных связей требует тщательного критического обсуждения. Все выполненные исследования неизбежно проводили в гетерогенной среде, в которой наличие кристаллической фракции оказывает очень большое влияние на скорость реакции. Показано, что начальная скорость гидролиза целлюлозы, особенно регенерированной, значительно выше, чем скорость гидролиза обычных, вполне доступных (1-4)- β -глюкозидных связей в молекулах растворимых олигосахаридов. Впоследствии эти данные подтвердились. В природной целлюлозе такие отличия хотя и имеют место, но выражены менее отчетливо. При растворении и последующей регенерации целлюлозы число слабых связей заметно возрастает, но даже с учетом наличия таких связей общая константа скорости приблизительно на четыре порядка выше, чем для гидролиза обычной глюкозидной связи. Это, а также тот факт, что образование таких связей в регенерированной целлюлозе не зависит от условий регенерации целлюлозы из раствора, дает возможность сделать вывод, что их образование объясняется скорее физической, а не химической неоднородностью целлюлозы. Наличие аномальных напряжений, которые возникают при переходе в твердое состояние даже при небольшом числе связывающих узлов, может вызвать образование складчатой структуры.

2.1.1. Кислотный гидролиз – предварительная стадия при отбелке сульфатной хвойной целлюлозы

Кислотный гидролиз целлюлозы при отбелке используется как предварительная ступень в отбелке лиственной сульфатной целлюлозы, которая не приводит к значительным потерям механической прочности моноволокна и позволяет значительно снизить расход ClO_2 на отбелку целлюлозы. Частичный кислотный гидролиз снижает содержание гексенуроновых кислот в целлюлозе, потребляющих в процессе отбелки диоксид хлора.

Снижение металлов переменной валентности в целлюлозе происходит в результате разрушения при гидролизе группировок гексенуроновых кислот, являющихся основным источником заряженных групп целлюлозы. Основным преимуществом нового способа регулирования содержания металлов переменной валентности перед отбелкой целлюлозы по схеме ECF A - Д₁ - П - Д₂ - К может быть исключение комплексов этилентриаминпентаацетата (ЭТПА) и диэтилентриаминпентаацетата (ДТПА), характеризующихся низкой способностью к биоразложению.

Кроме фактора снижения содержания металлов переменной валентности при гидролизе в кислых средах происходит активация лигнина, приводящая к повышению его реакционной способности и более эффективному удалению его при отбелке.

Использование дополнительной ступени кислотного гидролиза позволяет повысить белизну целлюлозы на 3 % при допустимом снижении механических показателей и снизить содержание лигнина. Но вследствие того, что в хвойной целлюлозе количество гексенуроновых кислот значительно меньше, чем в лиственной целлюлозе, то безусловно эффект кислотного гидролиза хвойной целлюлозы существенно меньше. В связи с этим для хвойной целлюлозы в качестве дополнительной ступени предпочтительнее будет ферментативный гидролиз.

2.2. Ферментативный гидролиз

Традиционный эффективный способ применения хлорсодержащих химикатов как отбеливающих агентов был подвергнут критике сначала экологическими группами, а затем потребителями. В ответ на это давление были разработаны альтернативные технологии отбели с частичной или полной заменой таких химикатов, особенно молекулярного хлора (Cl_2). В качестве одной из альтернативных технологий были разработаны процессы с использованием ферментов (энзимов).

Главная задача отбели целлюлозы заключается в удалении лигнина при сохранении углеводной части. В начале 1980-х гг. были предложены два различных подхода с использованием ферментов для решения этой задачи, но лишь один из них привел к успешной разработке промышленного процесса. Цель данной главы – обсудить применение таких ферментов, называемых гемицеллюлазами (особенно ксиланаз), для усиления удаления лигнина с помощью химических реакций в многоступенчатой отбелке. Такой процесс, иногда называемый «форсированием отбели», был с успехом осуществлен на целлюлозных заводах по всему миру. Альтернативный способ прямой делигнификации с использованием ферментов, называемых лигниназами и лакказами, которые действуют непосредственно на лигнин, все еще находится в стадии изучения и ждет возможной будущей коммерциализации.

Экологические и потребительские интересы, а также обязательные постановления способствуют исследованиям в области применения ферментов при отбелке, так как они легко биологически разрушаются и не дают вклада в образование хлорорганических соединений.

Ферменты являются высокоспецифичными катализаторами химических реакций. Как катализаторы ферменты не расходуются и требуются лишь в малых количествах для конкретной реакции. Ферменты состоят главным образом из углерода, кислорода, водорода и азота и относятся к белкам (протеинам), молекулы которых вырабатываются живыми организмами. Ферменты часто называют, добавляя суффикс «аза» к названию конкретного субстрата, отдельные реакции которого они катализируют. Например, целлюлаза – катализирует гидролиз целлюлозы, а ксиланаза – гидролиз ксилана. Способность ферментов катализировать только специфические реакции делает особенно уместным их применение в целлюлозно-бумажной промышленности. Так, например, ксиланаза катализирует гидролиз ксилана, но не целлюлозы.

Ферменты производят ферментацией в процессе роста определенных микроорганизмов в большом масштабе. Полученные ферменты отделяют от микроорганизмов различными методами сепарации. Ферменты обычно поставляют в концентрированной жидкой форме, которая стабильна, безопасна в обращении и не содержит каких-либо живых организмов.

Ферменты, используемые в отбелке, поступают на рынок от нескольких фирм-поставщиков. Благоприятное влияние ферментов при отбелке

зависит от используемой схемы отбелки, содержания остаточного лигнина в целлюлозе, задаваемой конечной белизны и экологических интересов предприятий. Основная цель отбелки целлюлозы с участием ферментов направлена на снижение расхода хлорсодержащих химикатов в процессе отбелки и уменьшение содержания адсорбируемого органического галогенида (АОХ) в сточных водах. Обработку ферментами успешно применяли в обычных схемах отбелки с хлорсодержащими химикатами, таких как (Х/Д)-Щ-Д-Щ-Д, в ЕСF-схемах (свободных от молекулярного хлора) и в ТСF-схемах (полностью свободных от хлора), а также в схемах с использованием кислорода, пероксида и озона.

Ферменты – органические вещества белковой природы, которые синтезируются в клетках и во много раз ускоряют протекающие в них реакции, не подвергаясь при этом химическим превращениям. Вещества, оказывающие подобное действие, существуют и в неживой природе и называются катализаторами. Ферменты (от лат. *fermentum* – брожение, закваска) иногда называют энзимами (от греч. *en* – внутри, *zyme* – закваска). Все живые клетки содержат очень большой набор ферментов, от каталитической активности которых зависит функционирование клеток. Практически каждая из множества разнообразных реакций, протекающих в клетке, требует участия специфического фермента. Изучением химических свойств ферментов и катализируемых ими реакций занимается особая, очень важная область биохимии – энзимология.

Многие ферменты находятся в клетке в свободном состоянии, будучи просто растворены в цитоплазме; другие связаны со сложными высокоорганизованными структурами. Есть и ферменты, в норме находящиеся вне клетки; так ферменты, катализирующие расщепление крахмала и белков, секретируются поджелудочной железой в кишечник. Секретируют ферменты и многие микроорганизмы. Первые данные о ферментах были получены при изучении процессов брожения и пищеварения. Большой вклад в исследование брожения внес Л. Пастер, однако он полагал, что соответствующие реакции могут осуществлять только живые клетки. В начале 20 в. Э. Бухнер показал, что сбраживание сахарозы с образованием диоксида углерода и этилового спирта может катализироваться бесклеточным дрожжевым экстрактом. Это важное открытие послужило стимулом к выделению и изучению клеточных ферментов. В 1926 г. Дж. Самнер из Корнеллского университета (США) выделил уреазу; это был первый фермент, полученный в практически чистом виде. С тех пор обнаружено и выделено более 700 ферментов, но в живых организмах их существует гораздо больше. Идентификация, выделение и изучение свойств отдельных ферментов занимают центральное место в современной энзимологии.

Ферменты, участвующие в фундаментальных процессах превращения энергии, таких как расщепление сахаров, образование и гидролиз высокоэнергетического соединения аденозинтрифосфата (АТФ), присутствуют в клетках всех типов – животных, растительных, бактериальных. Но есть ферменты, которые образуются только в тканях определенных организмов. Так

ферменты, участвующие в синтезе целлюлозы, обнаруживаются в растительных, но не в животных клетках. Таким образом, важно различать «универсальные» ферменты и ферменты, специфичные для тех или иных типов клеток. Иными словами, чем более клетка специализирована, тем больше вероятность, что она будет синтезировать набор ферментов, необходимый для выполнения конкретной клеточной функции.

Практический интерес к изучению ферментов продиктован, прежде всего, их исключительно высокими каталитическими характеристиками: активностью (способны увеличивать скорости химических реакций в миллионы раз) и специфичностью (селективностью) действия (катализируют химическое превращение какого-либо единственного вещества (субстрата) без образования побочных продуктов). Для экспериментального изучения ферментов и ферментативных реакций применяются практически все известные на сегодняшний день молекулярно-биологические, химические и физико-химические методы исследования природных полимеров и процессов химического катализа: селективная модификация ферментов с помощью различных химических реагентов, методы генной и белковой инженерии (в частности, сайт-направленный мутагенез), рентгеноструктурный анализ и различные виды спектрального анализа (ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрия, УФ и ИК спектроскопия), хроматография разных видов, всевозможные методы химической кинетики и т. д. Кроме этого, в последнее время все более широко используются подходы, связанные с математическим моделированием биохимических процессов.

К настоящему времени охарактеризованы несколько тысяч ферментов, для многих сотен из них достаточно подробно описаны структуры их комплексов с субстратами и вероятные механизмы биологической активности. Полученные в результате научных изысканий данные открывают серьезные возможности для получения искусственно созданных биокатализаторов с заданными свойствами, и в частности, субстратной специфичностью, что расширяет сферу практического использования ферментативного катализа.

Уникальные каталитические свойства ферментов уже сейчас обеспечили им применение в самых разных областях биотехнологии: от научных исследований (генная инженерия, изучение структуры биополимеров) до промышленных процессов. Однако технологическое использование биокаталитических систем сталкивается с рядом трудностей: трудоемкостью отделения ферментов от продуктов реакции после завершения процесса, лабильность ферментов при различных агрессивных воздействиях (тепловых, кислотных, протеолизе и т. д.), высокая стоимость ферментов. В последнее время были найдены возможные пути преодоления этих сложностей, что связано, прежде всего, с научными достижениями в области белковой инженерии и инженерной энзимологии. Основная задача инженерной энзимологии – разработка биотехнологических процессов с использованием биокатализаторов. Основным методом инженерной энзимологии является применение иммобилизованных ферментов. С использованием идей и разработок инженерной энзимологии создан ряд биотехнологий в областях:

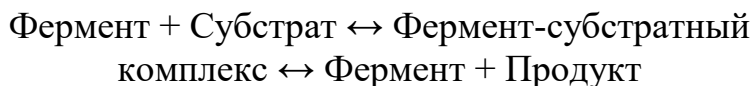
синтеза и модификации органических соединений (аминокислот, нуклеозидов, антибиотиков, стероидов и др.), биоконверсии растительного сырья (ферментативный гидролиз целлюлозы), химического и биохимического анализа (биосенсоры, ферментный и иммуноферментный анализ в медицине), фармацевтике (фермент-содержащие лекарственные препараты).

Все ферменты являются белками, простыми или сложными (т. е. содержащими наряду с белковым компонентом небелковую часть). Ферменты – крупные молекулы, их молекулярные массы лежат в диапазоне от 10000 до 1000000 дальтон (Да). Для сравнения укажем мол. массы известных веществ: глюкоза – 180, диоксид углерода – 44, аминокислоты – от 75 до 204 Да. Ферменты, катализирующие одинаковые химические реакции, но выделенные из клеток разных типов, различаются по свойствам и составу, однако обычно обладают определенным сходством структуры. Структурные особенности ферментов, необходимые для их функционирования, легко утрачиваются. Так при нагревании происходит перестройка белковой цепи, сопровождающаяся потерей каталитической активности. Важны также щелочные или кислотные свойства раствора.

Большинство ферментов лучше всего «работают» в растворах, рН которых близок к 7, когда концентрация ионов H^+ и OH^- примерно одинакова. Связано это с тем, что структура белковых молекул, а, следовательно, и активность ферментов сильно зависят от концентрации ионов водорода в среде. Не все белки, присутствующие в живых организмах, являются ферментами. Иную функцию выполняют структурные белки, многие специфические белки крови, белковые гормоны и т. д.

Многие ферменты с большой молекулярной массой проявляют каталитическую активность только в присутствии специфических низкомолекулярных веществ, называемых коферментами (или кофакторами). Роль коферментов играют большинство витаминов и многие минеральные вещества; именно поэтому они должны поступать в организм с пищей. Витамины РР (никотиновая кислота, или ниацин) и рибофлавин, например, входят в состав коферментов, необходимых для функционирования дегидрогеназ. Цинк – кофермент карбоангидразы, фермента, катализирующего высвобождение из крови диоксида углерода, который удаляется из организма вместе с выдыхаемым воздухом. Железо и медь служат компонентами дыхательного фермента цитохромоксидазы.

Вещество, подвергающееся превращению в присутствии фермента, называют субстратом. Субстрат присоединяется к ферменту, который ускоряет разрыв одних химических связей в его молекуле и создание других; образующийся в результате продукт отсоединяется от фермента. Этот процесс представляют следующим образом:



Продукт тоже можно считать субстратом, поскольку все ферментативные

реакции в той или иной степени обратимы. Правда, обычно равновесие сдвинуто в сторону образования продукта, и обратную реакцию бывает трудно зафиксировать.

В истории борьбы США и Японии за господство на Тихом океане и в Юго-Восточной Азии в годы второй мировой войны помимо трагических моментов был и один курьезный эпизод, о котором не упоминают военные хроники. Дело в том, что поначалу американский десант нес весьма чувствительные потери от микроскопической плесени. Во влажном и жарком климате эта удивительная зеленая плесень в считанные дни превращала в труху хлопчатобумажные, брезентовые тенты и палатки, оставляя элитные части армии под палящим солнцем и тропическими ливнями буквально в чем мать родила. Положение казалось столь серьезным, что Министерство обороны США вынуждено было даже организовать специальный научный центр в Нейтике (штат Массачусетс). Именно там из разложившегося обмундирования выделили грибок, вырабатывающий необыкновенно агрессивные ферменты – целлюлазы, которые и разрушали целлюлозную основу ткани. Справедливости ради заметим, что на самом деле честь открытия расщепляющих целлюлозу микроорганизмов принадлежит нашему соотечественнику – русскому микробиологу В. Л. Омелянскому. Однако до работ американцев с помощью одних только ферментов (без микроорганизмов) удавалось разлагать лишь аморфные или растворимые производные целлюлозы, например, карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ), которая при заваривании образует студенистый клейстер (хорошо знакомый в быту обойный клей). Целлюлазы, разрезая длинные молекулы КМЦ, на глазах превращают студень в жиденький киселек. Ферменты же нового гриба этим не ограничивались. За пару дней при 30 – 50 °С и рН 4–5 они почти без остатка разлагали хлопковое волокно. А ведь хлопковая целлюлоза (так называемая целлюлоза I) имеет настоящую кристаллическую укладку, стабилизированную межмолекулярными водородными связями. Она настолько плотная, что между соседними молекулами не проникают даже протоны. Недаром отдельные кристаллиты хлопкового волокна выдерживают кипячение в крепких растворах соляной кислоты.

Для объяснения различия с другими микроорганизмами Э. Рис и его коллеги из Нейтика предположили, что новый грибок, названный в честь своего первооткрывателя *Trichoderma reesei*, образует особый фермент (Cl), который первым действует на хлопковое волокно и переводит молекулы целлюлозы в аморфное состояние, делая доступными для остальных целлюлаз (C_x). Такую целлюлозу действительно можно получить, если залить хлопок 85 %-й фосфорной кислотой и дать постоять в холодильнике. Получится студень наподобие клея КМЦ. Если постепенно разбавлять его водой, начнут выпадать хлопья аморфной целлюлозы. Она легко гидролизуется целлюлазами, превращаясь в глюкозу и ее димер – целлобиозу, но во влажном виде аморфная целлюлоза постепенно снова кристаллизуется. Правда, образует она уже не целлюлозу I, а иную упорядоченную структуру. Но суть от этого не меняется: в условиях, в которых действуют целлюлазы, аморфная целлюлоза менее

устойчива, чем кристаллическая. Значит, чтобы катализировать процесс набухания кристаллической целлюлозы, фермент должен получать энергию извне. Но откуда?

После войны интерес к ферментам Риса долго носил преимущественно академический характер. Ситуацию изменил энергетический кризис, выявивший полную зависимость современной западной цивилизации от экспорта нефти. Естественно, сразу обострился интерес к альтернативным источникам энергии. Вспомнили и про целлюлозу, ежегодное воспроизводство которой составляет 100 млрд тонн. Целлюлазы превращают ее в глюкозу – удобное сырье для получения этанола, рассматриваемого как моторное топливо будущего. Потому они и оказались в центре внимания. На волне всеобщего интереса в 1974 г. по инициативе И. В. Березина начались исследования целлюлаз и на химическом факультете МГУ. И почти сразу были получены результаты, которые никак не укладывались в общепринятые представления. В те годы еще не были расшифрованы пространственные структуры сотен белков, известные ныне. Поэтому структура целлюлаз, по аналогии с одним из первых изученных ферментов – лизоцимом из яичного белка, представлялась довольно просто: в виде компактной глобулы с углублением (активным центром), в котором происходит каталитический разрыв целлюлозной цепи. Лизоцим действительно похож на целлюлазы: он хорошо разжижает карбоксиметилхитин – близкий аналог КМЦ – и имеет такой же механизм катализа. Лизоцим можно выделить из смеси белков куриного яйца аффинной хроматографией. Для этого смесь пропускают через колонку с хитином из панциря креветок. Лизоцим задерживается, а другие белки выходят. Затем колонку промывают раствором вещества (например, карбоксиметилхитина), которое проникает в активный центр адсорбированного на хитине лизоцима и вытесняет его в раствор. Так получают чистый фермент уже без примесей других яичных белков. Другие тоже попытались выделить целлюлазы аффинной хроматографией. Пропустили раствор образуемых грибом белков через колонку с целлюлозой. И сразу были озадачены: вместе с сопутствующими белками вышло и некоторое количество целлюлаз. Те же, что задержались, повели себя не менее неожиданно – никак не хотели покидать колонку, промытую концентрированным раствором КМЦ. Вязкость выходящего из колонки раствора КМЦ при этом была почти как у воды, значит, молекулы КМЦ действительно попадали в активный центр застрявших целлюлаз и там расщеплялись. Стало ясно, что ферменты цепляются за целлюлозу не активным центром, расщепляющим КМЦ, а чем-то иным, с чем КМЦ не взаимодействует. Очевидно, этот дополнительный центр связывания узнает не отдельные молекулы, а поверхность целлюлозы как целое.

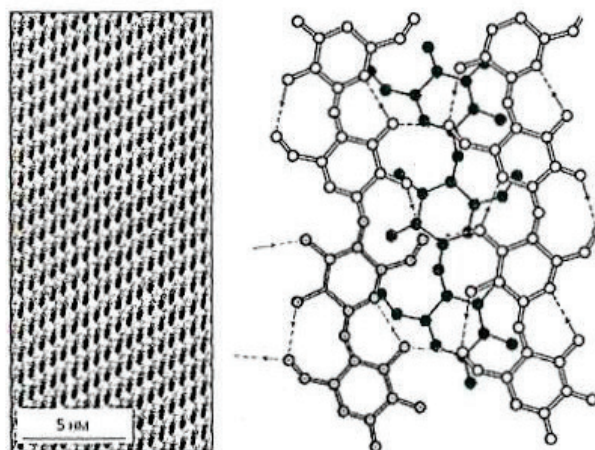


Рис. 2. Микрофотография поверхности целлюлозы I и схема ее строения

Каждое целлобиозное звено (одно из них выделено) образует связи с соседними молекулами одного слоя. Внутримолекулярные водородные связи стабилизируют каждую цепь, межмолекулярные – прочно сшивают между собой соседние цепи. Целлюлозная молекула нижнего слоя показана черным цветом. Одновременно были опубликованы данные японских исследователей, которые изучали глюкоамилазу (фермент гриба *Aspergillus awamori*, превращающий крахмал в глюкозу), и обнаружено, что и этот грибной фермент прикрепляется к гранулам нерастворимого крахмала вовсе не активным центром, а другим участком полипептидной цепи. С помощью протеазы – субтилизина – удалось вырезать этот участок и проанализировать. Выяснилось, что он содержит 30–40 аминокислотных остатков и до 50 % углеводов по массе. Укороченная глюкоамилаза переставала расщеплять гранулы сырого крахмала, но продолжала хорошо переваривать набухший крахмальный клейстер. Впоследствии было установлено, что в среде роста гриба содержится как полноразмерный фермент, так и его усеченные формы.

Среди целлюлаз *Trichoderma reesei* также обнаружены ферменты, которые различались почти на два порядка по эффективности связывания с поверхностью нерастворимой целлюлозы, хотя были одинаково активны по отношению к КМЦ. Это позволило заключить, что не у всех целлюлаз есть обособленный участок, позволяющий им связываться с нерастворимой целлюлозой. Вот тогда и вспомнили о C_1 - C_x -гипотезе американских исследователей и стали искать взаимосвязь между содержанием прочно связывающихся целлюлаз у разных грибов и их способностью разрушать кристаллическую целлюлозу. Такая корреляция вскоре была обнаружена, при этом оказалось, что дело вовсе не в концентрировании фермента на поверхности целлюлозы: даже 100-кратное увеличение количества плохо связывающихся ферментов не приводило к полному разложению кристаллической целлюлозы, зато с аморфной целлюлозой они справлялись очень эффективно. Они предположили, что фрагмент белковой молекулы

специфически адсорбируется на поверхности целлюлозы и расклинивает пучки ее микрофибрилл, тем самым помогая проникать молекулам воды, в результате целлюлоза набухает, что в значительной мере облегчает работу ферментам-гидролазам. Такое явление (адсорбционное понижение прочности, или эффект П. А. Ребиндера) широко известно в физико-химической механике. Однако, в отличие от Риса, мы считали, что дело не в специфическом типе ферментативного катализа, а в механическом расслоении целлюлозы на отдельные фибриллы, которые стабилизируются прочно адсорбированными белками, работающими как высокоспецифичные поверхностно-активные вещества. Для проверки своей гипотезы мы стали специально подавлять каталитическое действие прочно связывающихся ферментов снижением температуры и добавлением ингибиторов, однако и в этих условиях обработанная ферментами бумага при сильном встряхивании рассыпалась на отдельные волокна значительно легче, чем без них. Забегая вперед, заметим, что спустя почти 10 лет, в начале 90-х годов, к тому же выводу пришли и канадские специалисты из Ванкувера. Они показали, что выделенный ими сорбционный центр бактериальной целлюлазы хорошо диспергирует кристаллическую целлюлозу и помогает каталитической части фермента расщеплять ее даже в усеченном виде.

В 70-ые же годы стало ясно, что белок, который Рис принимал за C_1 -фермент, в действительности обладает очень слабой, но вполне измеримой способностью к гидролизу целлюлозных молекул с образованием целлобиозы. Поэтому его переименовали в целлобиогидролазу. Так как *Trichodama ressei* образует еще одну целлобигидролазу, их обозначили соответственно, как целлобиогидролазы I и II. Помимо них у гриба обнаружили от четырех до шести типов эндоглюканаз C_x -ферментов, отвечающих за разжижение растворов КМЦ. Чтобы выяснить, какие именно ферменты обладают центром прочной сорбции, из набора белков, вырабатываемых грибом, сначала отобрали те, которые прилипают к целлюлозе. Полученную целлюлозную пасту нанесли на поверхность пластины геля для изоэлектрофокусирования. Под действием электрического поля ферменты отрывались от неподвижных частиц целлюлозы и выстраивались в геле в соответствии со своими изоэлектрическими точками. Затем их окрасили специфическими красителями и сравнили полученную картину с результатами гельэлектрофореза исходного набора белков. Выяснилось, что на целлюлозе прочно адсорбируются целлобиогидролазы I и II и эндоглюканызы I и II, но не эндоглюканаза III. Наиболее специфичным оказалось именно связывание целлобиогидролазы I - C_1 -фермента Риса. На основе полученных данных и был сформулирован новый механизм разложения кристаллической целлюлозы. Слабо сорбирующимся эндоглюканазам (усеченным формам эндоглюканаз I и II, а также эндоглюканазе III) отводилась в нем роль ферментов, расщепляющих внешние аморфные области целлюлозы и открывающих внутренние дефекты. Туда проникают прочно сорбирующиеся целлобиогидролазы и эндоглюканызы, расклинивающие пучки на отдельные фибриллы, которые постепенно разрушаются с разных концов целлюлозных молекул.

Как только в 1983 г. в журнале «Biotechnology» была опубликована полная аминокислотная последовательность целлобиогидролазы I, внимание сразу привлек богатый оксиаминокислотами фрагмент, который мог бы служить местом прикрепления углеводов и сорбционным центром, подобным имеющемуся у глюкоамилазы. Такой фрагмент – 20-членный пептид, в котором, чередуясь с остатками пролина, соседствуют 14 остатков треонина и серина, – находится вблизи С-конца молекулы. Нуклеотидная последовательность, кодирующая С-концевой участок молекулы целлобиогидролазы, отделена от остальной части гена незначащей вставкой (интроном). Все это позволило заключить, что центр связывания у целлюлаз самостоятельная структура, которая работает подобно якорю, хвосту или клину, а не как капкан, захватывающий молекулу целлюлозы.

Предсказанная конструкция сорбционного центра давала возможность конструировать самые разные гибридные белки: хвостатые ферменты, антитела, токсины, белковые ингибиторы. На их основе можно было бы создавать биоактивные ткани и перевязочные материалы, специфические тест-системы на полосках бумаги, наконец, фармпрепараты пролонгированного действия на микрокристаллической целлюлозе. Однако отделить от целлобиогидролазы I участок связывания на целлюлозе и определить его последовательность нам не удалось, хотя были испытаны разные протеазы: субтилизин, трипсин, химотрипсин. Лишь через три года с этой задачей справились в совместной работе специалисты из Бельгии и Швеции. Для этого они использовали протеазу иного типа – папаин. Полученные ими данные в основном подтвердили наши предположения, но не полностью. Богатый пролином и треонином фрагмент, принятый нами за сорбционный центр, оказался линкером – связкой между двумя частями молекулы целлобиогидролазы I именно там и действовал папаин: он вызывал появление в растворе каталитической части фермента, которую легко увидеть по катализируемой ею специфической реакции с флуоресцентным производным целлобиозы. Хвост же остается на поверхности, откуда его можно смыть детергентом (проще говоря, стиральным порошком). Он оказался 35-членным пептидом, расположенным на С-конце молекулы фермента сразу вслед за линкером. Связывание его с целлюлозой обеспечивали три остатка тирозина.

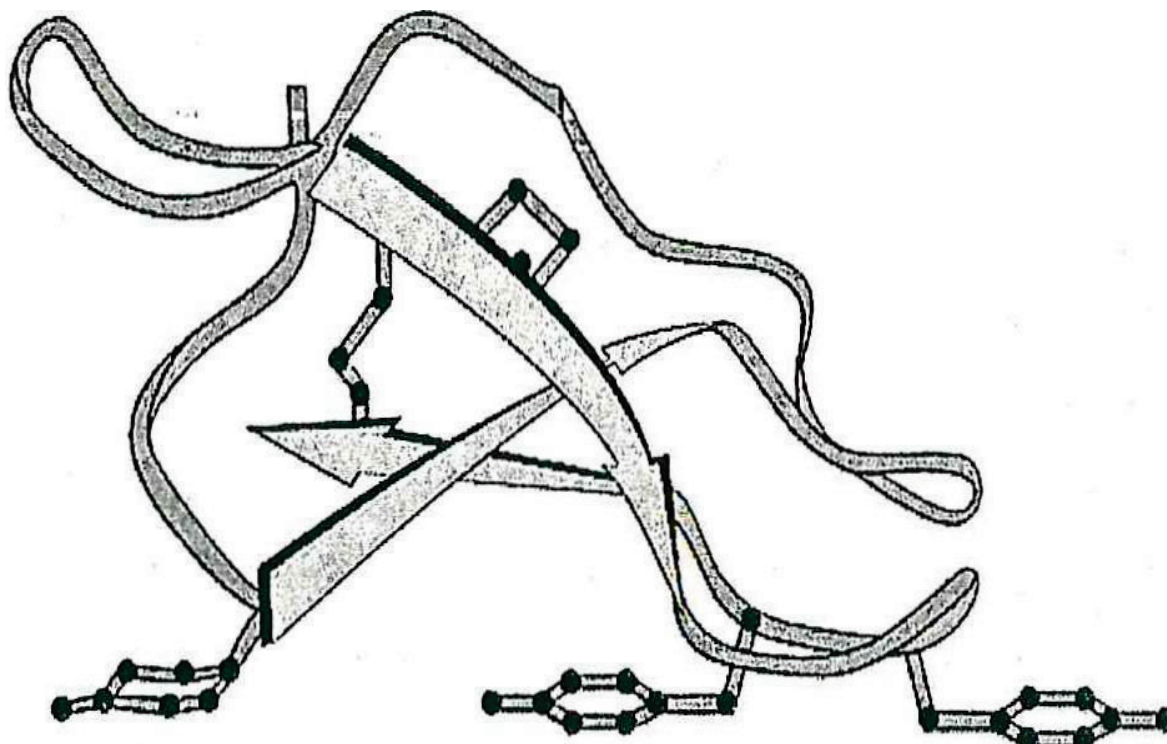


Рис. 3. Структура сорбционного центра (целлюлозосвязывающего домена) целлобиогидролазы I

В 1989 г. финские, шведские и американские исследователи совместными усилиями расшифровали пространственную структуру сорбционного центра (или субстратсвязывающего модуля, как теперь говорят) целлобиогидролазы I. Он, действительно, имеет клиновидную форму с двумя плоскими гранями – гидрофильной и гидрофобной, обращенной к поверхности целлюлозы. Линкер, связывающий его с каталитической частью, имеет гибкую (шарнирную) и жесткую (гликозилированную) части. Интересно, что хвостовая часть грибных целлюлаз по своей форме очень напоминает совсем, казалось бы, далекий белок – низкомолекулярный ингибитор протеаз из картофеля. Трудно сказать, случайное ли это совпадение. Однако заметим, что ингибиторы протеаз иногда тоже выполняют функции хвоста у ферментов, которые они ингибируют. Так построена, например, панкреатическая прокарибксопептидаза А.

Фермент образуется в неактивном состоянии (как змея, кусающая свой хвост), когда ингибитор «затыкает» активный центр фермента, не давая ему начать работу раньше времени. Расщепление линкера протеазой ведет к отделению хвостового фрагмента и активации фермента.

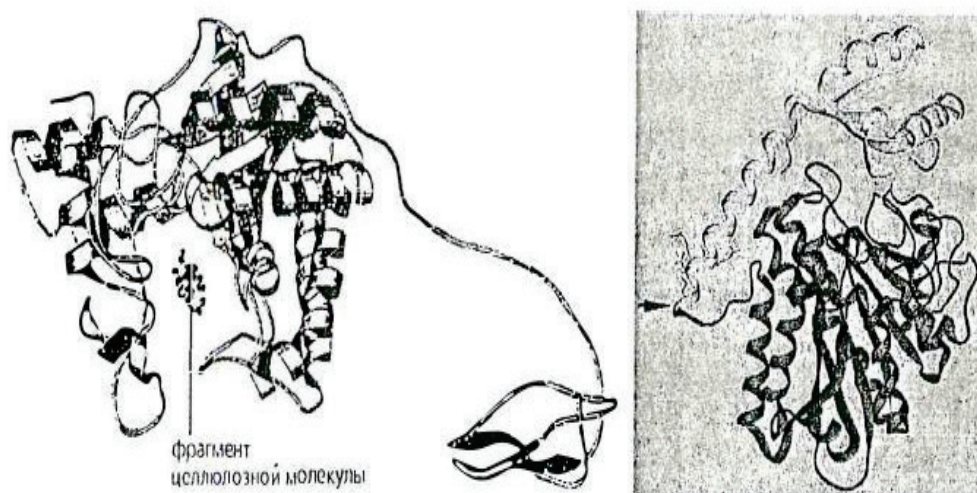


Рис. 4. Примеры хвостатых ферментов

Слева: Активный центр целлобиогидролазы II охватывает фрагмент расщепляемой целлюлозной молекулы, как клещами. Небольшой сорбционный центр прикреплен к основной части молекулы через длинный соединительный пептид – линкер.

Справа: Хвостовой домен прокарбоксипептидазы (выделен голубым цветом) закрывает активный центр фермента (гибкие неструктурированные петли в верхней части каталитического домена, показанного красным цветом). После протеолитической активации (расщепления связующего линкера в области, отмеченной синей стрелкой) хвостовая часть молекулы отделяется и фермент становится активным. Зеленый шарик – ион металла в активном центре, зеленые ломанные «антенны» вблизи сайта расщепления олигосахариды, ковалентно связанные с белком. Для линкеров, соединяющих разные модули в белках, такое явление (гликозилирование) весьма характерно. Полагают, что это защищает линкеры от «несанкционированного» расщепления неспецифическими «чужими» протеазами. Сходство пространственных структур белковых ингибиторов ферментов и субстратсвязывающих модулей целлюлаз натолкнуло на мысль о создании гибридных модулей, обладающих и теми и другими свойствами. В связывание с целлюлозой вовлечены ароматические остатки, лежащие в бета-тяжах, а в связывание с протеазами – остатки в области гибкой петли. Таким образом, можно пытаться создать химерные белковые ингибиторы малого размера, прочно адсорбирующиеся на целлюлозных подложках. Такие ингибиторы могут найти применение в медицине и фармации как препараты пролонгированного действия. И все же, как работают на гладкой поверхности кристаллической целлюлозы хвостатые ферменты, подобные целлобиогидролазе I? Этот вопрос вызывает бурные дискуссии уже многие годы. Мысль о том, что «неживая» молекула фермента перемещается по поверхности, кажется фантастической. Однако можно весьма

просто показать, что молекулы хвостатых ферментов способны, например, прыгать от одной частицы целлюлозы к другой. Для этого удобно использовать окрашенную целлюлозу. По химической природе это та же крашеная хлопковая ткань, только измельченная в пыль. Ферменты срезают с ее поверхности короткие «ворсинки» — олигосахариды, на которых держится краситель: происходит, проще говоря, линька. Это качество целлюлаз широко используют при производстве вылинявшей джинсовой ткани, «варенки». Раньше лишнюю краску удаляли в стиральных машинах пемзой. Теперь используют биоабразивы целлюлазы. Так вот, если посадить хвостатые целлюлазы сначала на частицы обычной микрокристаллической целлюлозы, а затем добавить порошок окрашенной целлюлозы, то сначала ничего заметить не удастся. Но спустя какое-то время (от 15–20 мин. до полутора часов, в зависимости от условий) окрашенная целлюлоза начинает линять, и в растворе появляются молекулы красителя. Поскольку частицы белой целлюлозы за такой срок не успевают полностью перевариться, это значит, что часть хвостатых молекул «перепрыгнула» с белых частиц на окрашенные и начала там работать.

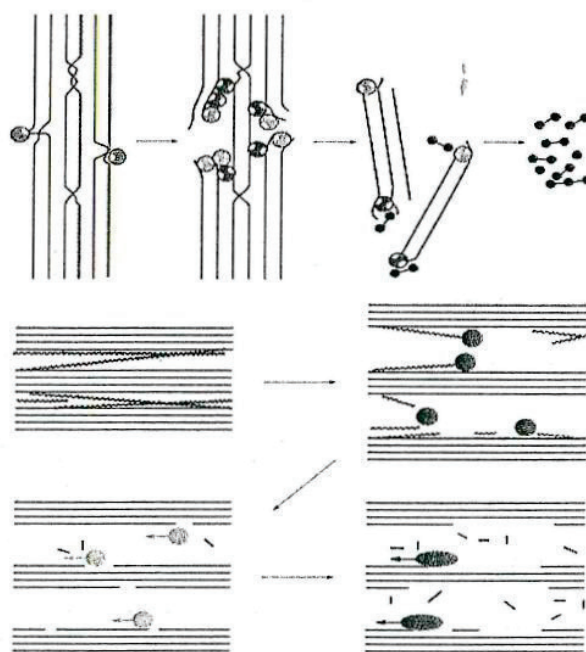


Рис. 5. Механизм ферментативного гидролиза кристаллической целлюлозы

Вверху, по представлениям 1984 г., сначала слабо сорбирующиеся на целлюлозе эндоглюканазы (синие кружки с одним сегментом — активным центром) атакуют внешне неупорядоченные участки целлюлозной фибриллы. В образовавшиеся дефекты проникают прочно связывающиеся эндоглюканазы (розовые кружки с двумя сегментами — активным и сорбционным центрами) и целлобиогидролазы (зеленые кружки также с двумя сегментами), которые

расклинивают их и обнажают внутренние неупорядоченные области. Образуются короткие микрокристаллиты, которые расщепляются ферментами с концов (показано действие разных типов ферментов с разных концов кристаллита). В результате образуются молекулы целлобиозы («гантельки»), а также небольшое количество глюкозы и трисахарида-целлотриозы.

Внизу, по современным представлениям, разложение пучков целлюлозных фибрилл начинается с удаления связующих неупорядоченных молекул слабо сорбирующимися эндоглюканазами III (фиолетовые кружки), лишенными сорбционных доменов. Далее отдельные фибриллы разрушаются прочно сорбирующимися «хвостатыми» эндоглюканазами I и II (зеленые кружки), которые образуют на поверхности кристаллитов разрывы целлюлозных молекул. Эти разрывы расширяются в разные стороны «хвостатыми» целлобиогидролазами I и II (красные и желтые эллипсы). В результате образуются молекулы целлобиозы, глюкозы и целлотриозы. Конечно же, не скука заставляет целлюлазы покидать «обжитую» частицу целлюлозы ради новой. «Приказывает» им равномерно заселять всю доступную поверхность Второй закон термодинамики, разрешающий в изолированных системах наиболее вероятные процессы. Другое дело, что перераспределение может занимать разное время, в зависимости от того, насколько прочно прикрепляются молекулы к поверхности. Например, чем дольше целлюлазы сидят на белой целлюлозе, тем труднее перескакивают потом на окрашенную. Видимо, «осваивают» дефекты структуры, откуда труднее потом выбраться. Много ли успевают сделать ферменты, пока сидят в одном месте? В растворе за полчаса-час каждая молекула разрезает тысячи молекул КМЦ. На поверхности число разрывов во много раз меньше. Часть времени адсорбированные целлюлазы «сидят без дела», и их активные центры могут в это время расщеплять проплывающие мимо молекулы КМЦ. Могут они и захватывать из раствора флуоресцирующие производные глюкозы, пришивая их к поверхности. Эта реакция называется трансферазной активностью. Впрочем, заметить ее можно лишь с помощью специальной техники. Но как же все-таки плотно упакованная цепь целлюлозы попадает в активный центр целлобиогидролаза? Ведь для того чтобы отщепить молекулу целлобиозы, ферменту необходимо оторвать от поверхности конец цепи длиной до 10 глюкозных остатков. Значит, даже у цепей, лежащих на краю поверхности микрокристаллита, нужно разорвать по паре водородных связей на каждое целлобиозное звено. Откуда же берется для этого столько энергии?

По одной из гипотез, целлобиогидролаза использует энергию, выделяющуюся при разрыве гликозидной связи, аналогично тому, как АТФаза миозиновой головки использует энергию гидролиза АТФ для мышечного сокращения. Пока доказательств этого не получено. Мы рассматриваем и другой возможный источник энергии. По нашим данным, каталитическая часть фермента обладает очень высоким сродством к изолированному фрагменту целлюлозной цепи длиной не менее четырех глюкозных остатков. В свою очередь сорбционный центр обладает столь же высоким сродством к поверхности целлюлозы. Но целый фермент связывается с целлюлозой лишь

чуть-чуть прочнее, чем каждая из его частей. Таким образом, они связываются или поочередно, или не полностью. Этот вывод можно подкрепить рядом доводов. Во-первых, слишком прочное связывание затрудняло бы высвобождение фермента для нового каталитического процесса. Во-вторых, при ограниченной длине линкера каталитическая и сорбционная части должны мешать друг другу связываться в полную силу, так как первая нуждается в гидратированном конце изолированной молекулы целлюлозы, а вторая в гидрофобных участках гладкой поверхности. В-третьих, как уже говорилось, часть сидящих на поверхности молекул имеет не до конца заполненный активный центр. Таким образом, у фермента, видимо, есть резерв энергии связывания: разность между оптимальным и частично ослабленным связыванием обеих частей. Передаточным механизмом, преобразующим этот резерв в энергию, необходимую для разрыва водородных связей вокруг расщепляемой молекулы целлюлозы, может служить упругая деформация жесткой гликозилированной части линкера, не позволяющей обоим доменам одновременно реализовать оптимальное связывание. Ее можно уподобить упругому удилищу, которое постепенно вытягивает «рыбу» (конец целлюлозной молекулы) из «воды» (сетки водородных связей) на «крючке» (каталитическом домене). В этом сравнении «леска» – это гибкая шарнирная часть линкера, а «рыболов» – сорбционный домен.

В целлюлазном катализе известно явление, когда сидящий на одном месте «рыболов» вытягивает всю «рыбу», до которой дотянется «леска» – линкер, и остается затем без работы. Его называют непродуктивным связыванием, или обратной инактивацией фермента на поверхности целлюлозы. Чтобы заставить фермент снова работать, можно либо добавить свежей целлюлозы, переманив «рыболова» на новое место, либо срезать «леску» специальной протеазой, как иногда поступает гриб – хозяин фермента. Освобожденный каталитический домен может по крайней мере, расщеплять аморфную целлюлозу там, где он до нее не дотянулся бы, оставаясь привязанным к сорбционному домену.

Но возможен и другой поворот: «рыба» вместе с «крючком» в какой-то момент перетянет «рыболова» и оторвет его от поверхности. Жесткая гликозилированная часть линкера работает при этом как трамплин или качели-перевески. Последовательность событий при этом может быть такой. Сначала связывается сорбционный центр, а каталитический остается свободен. Затем происходит медленный переход в состояние, в котором с целлюлозой связаны оба центра, но лишь частично. Далее снова медленный переход, когда сорбционный центр освобождается полностью, а каталитический полностью заполняется. И лишь затем происходит быстрая каталитическая реакция с выбросом растворимого продукта, сопровождаемая освобождением каталитического центра и связыванием сорбционного. Потом цикл повторяется. Не правда ли, похоже на гусеницу-землемера, поочередно поднимающую то голову, то хвост при перемещении по поверхности? Или на улитку, несущую за собой свою раковину – каталитический домен.

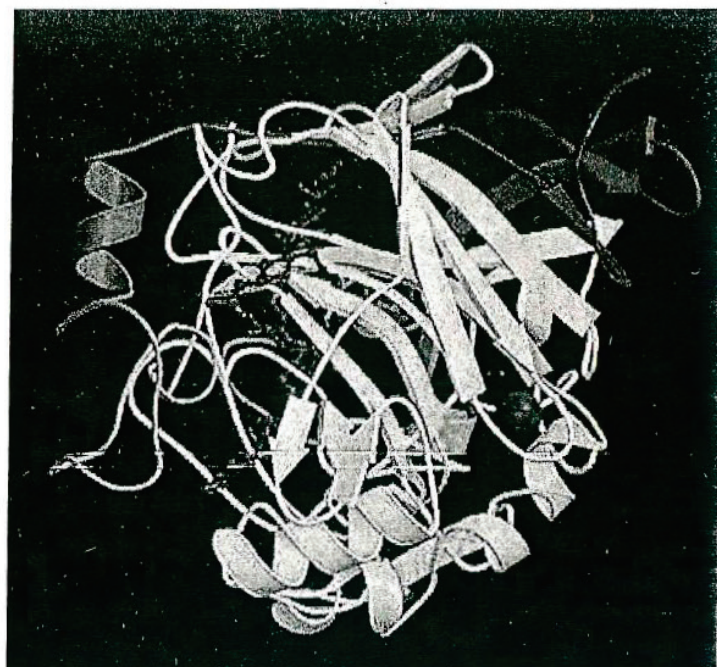


Рис. 6. Структура каталитической части целлобиогидролазы I

В самом деле, вместо дискретных стадий может происходить непрерывное «перетекание» ферментного комплекса по пути реакции от начального состояния к конечному, как у гусеницы со множеством ножек. Разумеется, этот гипотетический механизм, названный нами катерпиллерным катализом, требует детальной экспериментальной проверки.

Целлюлолитические ферменты вырабатываются в основном определенными видами простейших, бактерий, грибов, круглых червей, моллюсков и насекомых. Целлюлоза – основная пища для этих организмов, и фермент необходим для ее переваривания. Имеются данные об образовании целлюлозы также в высших растениях, где ее роль сводится, по-видимому, к размягчению клеточных стенок перед их ростом. Для высших растений и большинства высших животных (кроме жвачных) целлюлоза не является питательным веществом. Поскольку целлюлоза нерастворима, ее необходимо расщеплять вне клеточной мембраны, т. е. на поверхности стенки гриба или на некотором расстоянии от нее. В местах контакта гиф грибов с клеточными стенками целлюлозных материалов образуются отверстия, при этом растворение клеточных стенок наблюдается даже на некотором расстоянии от проникающих гиф. При культивировании грибы выделяют целлюлолитические ферменты в культуральную среду. Целлюлазы бактериального происхождения могут быть конститутивными, т. е. способными образовываться при росте организма на любом субстрате. В грибах они обычно адаптивны, т. е. процесс синтеза может происходить или подавляться при росте микроорганизма непосредственно на целлюлозе. Целлюлазы образуются при росте грибов на целлюлозе или аналогичных полиглюканах, содержащих (1-4)- β -глюкозидную связь (например, лишенин и поли- β -глюкан овса и ячменя). Эти ферменты

индуцируются также растворимыми целлодекстринами, в том числе целлобиозой и некоторыми трисахаридами, в состав которых входит целлобиоза. Это 3²-О-β-глюкозилцеллобиоза и 2¹-О-α-глюкоцеллобиоза. 4²-О-β-Глюкозилламинарибоза не индуцирует синтез целлюлаз, так как в этом трисахариде целлобиозная часть молекул находится у невосстанавливающего конца. Лактоза (4-О-β-D-галактозилглюкоза), аналог целлобиозы, так же как и софороза (2-О-β-D-глюкозилглюкоза), относится к хорошим индукторам целлюлозы, причем софороза индуцирует только *T. viride* (см. табл. 3).

Кажущийся индуцирующий эффект выпускаемой промышленностью глюкозы, которая не является индуктором, объясняется наличием небольшой примеси софорозы (0,006 %). Фактически индуктором целлюлазы в грибах, растущих на целлюлозе, является не сама целлюлоза, а растворимые продукты ее гидролиза, особенно целлобиоза. Присутствующая в высоких концентрациях целлобиоза или другие источники углерода, способные к быстрому превращению в культуральной среде, значительно подавляют образование грибами целлюлазы. Однако, регулируя скорость расхода целлобиозы, можно получить такое же большое количество целлюлазы, как при использовании целлюлозы в качестве субстрата. Интересно, что целлобиоза является одновременно продуктом ферментативной деятельности, индуктором и репрессором образования ферментов, а также ингибитором ферментативной активности. При росте грибов на целлюлозе фермент образуется в небольших количествах и медленно расщепляет целлюлозу до целлобиозы, которая индуцирует дальнейший синтез фермента. Целлобиоза расходуется настолько быстро, что ее концентрация никогда не достигает того уровня, при котором проявляются ее свойства репрессора. Свойства целлобиозы как индуктора можно продемонстрировать только при пониженной скорости ее превращения, чего достигают при оптимальной температуре проведения процесса, пониженной аэрации, избытке или недостатке минеральных компонентов. Другим способом поддержания низких концентраций целлобиозы является использование в качестве индуктора октаацетата целлобиозы. Многие грибы содержат эстеразы, омыляющие нерастворимый октаацетат целлобиозы с медленным выделением целлобиозы. Этот процесс аналогичен медленному образованию целлобиозы в процессе роста микроорганизмов на целлюлозе. Образование целлюлазы зависит от наличия минеральных веществ, pH среды и условий реакции. В Японии разработан процесс выращивания *T. viride* на пшеничных отрубях для получения целлюлазы в промышленном масштабе. В процессе роста микроорганизма ферменты выделяются в жидкую среду. При центрифугировании или фильтрации они быстро отделяются от культуральной жидкости и оставшейся целлюлозы. Водные экстракты этой культуры можно обрабатывать таким же образом. Очищают ферменты диализом, а также осаждением сульфатом аммония или растворителями (ацетон, этанол, пропанол-2 и т. д.). Разделение отдельных компонентов ферментного комплекса и отделение их от других белков проводят методом хроматографии на колонках с использованием в качестве наполнителя сефадекса, диэтиламиноэтилсефадекса (ДЭАЭ-сефадекс), ионообменных смол и различных типов целлюлоз. Для этих же целей можно использовать метод электрофореза.

Таблица 3 – Индуцирование целлюлазы в *Trichoderma viride*

Индуктор	Число единиц образовавшегося на 1 мг индуктора	
	C ^α ₁	(1-4)-β-глюканаза
Полиглюканы		
хлопковая лента	9,8	5,4
хлопковое полотно	10,8	8,3
еловая целлюлоза	8,8	10,0
фильтровальная бумага	7,0	8,5
КМЦ (CЗ=0,5)	-	0,6
сульфат целлюлозы (CЗ=0,4)	-	0,8
лихенин	-	7,8
овес	-	0,8
ячмень	-	6,6
Олигосахариды		
целлобиоза	2,5	3,8
целлотриоза	-	0,6
целлогексоза	-	0,4
октаацетат целлобиозы	-	1,5
2 ¹ -α--глюкоцеллобиоза	-	2,8
6 ² -β-глюкоцеллобиоза	-	18,0
лактоза	1,0	4,8
софороза	1200,0	2800,0
Не являются индукторами		
глюкоза (очищенная на угле)	0	0
крахмал	0,03	0,04
глицерин	0,02	0,03



Рис. 7. Регулирование образования и активности целлюлазы

Иногда появляются работы по кристаллизации целлюлазы или одного из ее компонентов. Такие препараты содержат кроме целлюлазы и другие ферменты, например, ксилазу и амилазу. До настоящего времени не удалось получить препараты кристаллической целлюлазы, не содержащие других ферментов. Ферменты грибов наиболее стабильны в кислых средах. При pH выше 8 они быстро разрушаются, максимальную активность они проявляют при pH $4,5 \pm 1,0$. Для температуры 50 °C лучшие результаты получены при хранении проб фермента не дольше 4 часов. Кроме химической конверсии целлюлозы существует биоконверсия, при которой проводится ферментативный гидролиз целлюлозы. Ферментативный гидролиз имеет ряд преимуществ перед кислотным, так как гидролиз идет при более низких температурах (50 °C), не требует дорогостоящего оборудования, получаемый гидролизат целлюлозы в гораздо меньшей степени загрязнен побочными веществами и его можно использовать без дальнейшей очистки для ряда биотехнологических процессов. Использование в процессе ферментативного гидролиза малоотходных технологий позволяет утилизировать отходы, получаемые в процессе ферментативного гидролиза, и снизить опасность загрязнения окружающей среды. Эффективность гидролиза целлюлозы и относительный состав продуктов (как правило, глюкоза и целлобиоза) зависят от сбалансированности состава целлюлазного комплекса и уровня активности компонентов, т. е. от качественного и количественного состава комплекса. Основные требования к составу целлюлазного комплекса заключаются в том, чтобы он имел высокие эндоглюканазную и целлобиогидролазную активности, без которых невозможен глубокий ферментативный гидролиз целлюлозы. Как известно, традиционные биохимические методы очистки (ионообменная хроматография, гель-фильтрация, электрофорез и т. д.) в промышленных масштабах приводят к большим затратам, что делает процесс получения очищенных ферментных препаратов нерентабельным. Поэтому изучение способов мембранного разделения, позволяющих получать сбалансированный состав ферментативного комплекса целлюлаз из разных источников-продуцентов и соответствующих гидролизуемому продукту, в настоящее время является очень актуальным и необходимым для развития технологий биоконверсии растительного сырья. Целлюлаза представляет собой группу ферментов, действующих одновременно и последовательно. Впервые предположение о наличии в целлюлазном комплексе нескольких компонентов было сделано на основании того факта, что в отличие от целлюлолитических грибов, быстро растущих на всех целлюлозных материалах и перерабатывающих всю целлюлозу, действие внеклеточных ферментов, выделенных из этих культур, обычно ограничивается гидролизом производных целлюлозы или набухшей целлюлозы. В таких ферментных препаратах содержание компонента C₁, необходимого для разрушения кристаллической целлюлозы, недостаточно высоко. Наличие отдельных компонентов подтверждается различиями в их ферментативной активности в отношении препаратов целлюлозы, обнаруженными для целлюлаз выделенных из разных организмов, или для целлюлаз из одного организма, растущего в разных условиях.



Рис. 8. Целлюлазный комплекс

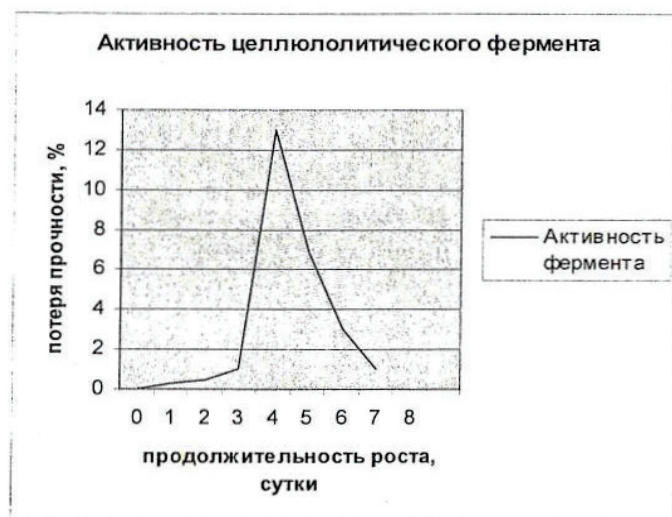


Рис. 9. Активность целлюлолитического фермента, образующегося в процессе роста *Myrothecium verrucaria*, определенная по потере прочности хлопчатобумажной пряжи

Ниже перечислены компоненты целлюлазного комплекса, которые в нескольких лабораториях удалось разделить и показать различия в их действии:

- 1) C_1 – фермент, необходимый для разрушения кристаллической целлюлозы;
- 2) эндо-(1-4)- β -глюканазы;
- 3) экзо-(1-4)- β -глюканазы;
- 4) β -глюкозиданы;
- 2) и 3) – C_x .

Применяемые здесь обозначения согласуются с номенклатурой, принятой для целлюлозы и углеводов, тогда как обычно в номенклатуре ферментов греческие буквы предшествуют цифрам, например, β -(1-4).

Фермент C_1 действует на кристаллические участки препарата целлюлозы (например, хлопковое волокно) таким образом, что становится возможным последующее действие ферментов C_x . Фермент C_1 в большом количестве обнаружен во внеклеточных препаратах *T. viride* и *Trametes sanguinea*. Характер его действия не ясен. До настоящего времени остается открытым вопрос, определяется ли во всех проведенных измерениях активности C_1 один и тот же фермент. «Гидроцеллюлазный» метод, возможно, позволяет наиболее точно определить активность C_1 . Он заключается в турбидиметрическом исследовании дисперсии микрокристаллического препарата целлюлозы. Одновременное образование целлобиозы может являться доказательством наличия примеси глюканазы. Самые чистые «гидроцеллюлазы», не содержащие примеси эндо-глюканазы, не образуют свободных сахаров. Эти препараты обладают очень интересным свойством. Они обуславливают распад микрокристаллических частиц целлюлозы (диаметром 6 мкм) на большое число (800–1500) более мелких частиц (фрагментов).

Некоторые описанные в литературе компоненты напоминают C_1 . К ним относится «А»-фермент, вызывающий снижение разрывной прочности препаратов хлопковой целлюлозы, и другой компонент, понижающий прочность нити. Некоторые исследователи подразделяют фермент C_1 на компоненты, наличие которых можно обнаружить различными методами. Возможность использования препарата « C_1 » для воздействия на некристаллические области целлюлозных препаратов вызывает сомнение. Фибриллирование полосок фильтровальной бумаги является сложным процессом, требующим действия других компонентов, кроме C_1 .

Механизм превращения кристаллической целлюлозы под действием C_1 в модификацию, доступную действию других ферментов, не выяснен. Необходимость наличия β -глюканазы в препарате C_1 дает возможность предположить, что C_1 превращает небольшие количества кристаллической целлюлозы в реакционноспособную форму, которую глюканаза должна переработать, прежде чем начнется дальнейшее действие C_1 . Если это предположение правильно, то становится ясным, почему изменения, вызванные непосредственно действием C_1 , трудно заметить. Существует предположение, что C_1 является не ферментом в обычном смысле, а белком, образующим с

макромолекулой целлюлозы водородные связи, более прочные, чем водородные связи в самой целлюлозе, и таким образом, разрушающим надмолекулярную структуру целлюлозы.

Комплекс ферментов C_x гидролизует (1-4)- β -глюкозидные связи в макромолекуле целлюлозы, при этом эндо-(1-4)- β -глюканазы действуют статистически, а экзо-(1-4)- β -глюканазы разрушают макромолекулу с концов. Выяснение природы компонентов C_x сделало нецелесообразным употребление термина « C_x », так как он стал синонимом термина «(1-4)- β -глюканаза». (1-4)- β -глюканазы гидролизуют кристаллическую целлюлозу только в присутствии C_1 , в отсутствие C_1 протекает гидролиз лишь аморфной. Эндо-ферменты являются типичными статически действующими глюканазами, способными гидролизовать высокомолекулярные полиглюканы. Нельзя определить скорость гидролиза таких полисахаридов экзо-ферментами вследствие относительно небольшого количества концевых элементарных звеньев в макромолекулах. Эндо-(1-4)- β -глюканазы действуют предпочтительно на более длинные макромолекулы. (Это странно, т. к. при степени полимеризации выше 6 растворимость декстринов значительно снижается.) При действии на растворимые производные целлюлозы эндо-ферментов происходит быстрое понижение вязкости их растворов при относительно медленном увеличении количества концевых восстанавливающих групп. Ферменты действуют не вполне статистически, так как очевидно, что разрыв обеих концевых связей меньше влияет на скорость гидролиза, чем разрыв остальных связей в макромолекуле. Другим ограничивающим фактором является нижний предел размера макромолекул, подвергающихся ферментативному гидролизу. Скорость гидролиза увеличивается с повышением СП полисахарида, но только до тех пор, пока полисахарид остается растворимым. Целлобиоза не гидролизруется эндо-глюканазой, целлотриоза также практически устойчива к действию фермента, целлотетраоза гидролизуется большинством эндо-глюканаз, однако не всеми. Основными продуктами, образующимися при действии эндо-(1-4)- β -глюканазы, являются целлобиоза и целлотриоза. Подобно большинству эндо-глюканаз, целлюлозный эндо-фермент действует с сохранением конфигурации заместителей у первого углеродного атома.

Влияние химической модификации целлюлозы на ее доступность действию эндо-глюканазы не вполне ясно. Любые изменения структуры целлюлозы, вызывающие повышение растворимости ее в воде или разрушение кристаллической структуры, увеличивают скорость гидролиза. Наличие заместителей существенно замедляет скорость гидролиза связей, находящихся рядом с заместителями, и степень гидролиза понижается с повышением числа заместителей в элементарном звене.

Раньше предполагали, что для получения препаратов целлюлозы, вполне устойчивых к ферментативной деструкции, необходимо наличие заместителей в каждом элементарном звене макромолекулы. В настоящее время исследователи склоняются к выводу, что для достижения этой цели достаточно ввести заместитель в одно из двух элементарных звеньев макромолекулы, при условии равномерного чередования заметных и незамещенных звеньев.

Исследование ферментативного гидролиза арабоноксилана показало, что ксиланаза проявляет активность только при наличии двух смежных звеньев ксилозы, не содержащих заместителей. Исследования процесса ферментативной деструкции производных целлюлозы показали, что те же требования необходимы для обеспечения активного действия целлюлазы. Однако в этом случае допускается наличие заместителя в «аглюконе» у атома C₍₆₎ (но не у C₍₂₎ или C₍₃₎),

Результаты изучения действия других эндо-глюконаз дают возможность сделать вывод, что наличие смежных элементарных звеньев в макромолекуле полимера, не содержащих заместителей, является общим требованием для протекания процесса ферментативного гидролиза. Поэтому оба концевых элементарных звена в макромолекуле разветвленных продуктов гидролиза обычно не содержат заместителей.

Экзо-(1-4)-β-глюканазы последовательно отщепляют концевые элементарные звенья макромолекулы целлюлозы со стороны невозстанавливающего конца. Эти ферменты изучены хуже, чем эндо-глюканазы. Экзо-глюканазы образуются в *T. viride*; к этому классу ферментов относится, очевидно, и «целлобиаза» *Stachybotrys atra*. Они действуют наиболее активно на молекулы олигосахаридов, содержащие 4–7 элементарных звеньев, которые образовались в результате действия эндо-ферментов и, следовательно, играют важную роль в общем процессе деструкции целлюлозы до глюкозы. Благодаря высокой специфичности экзо-(1-4)-β-глюканазы почти не действуют на производные целлюлозы и глюканы, содержащие разные типы связей между элементарными звеньями или разветвления. Эти ферменты могут отщеплять одно или два концевых звена, не содержащих заместителей, однако дальнейшая деполимеризация макромолекулы может затормозиться из-за любых отклонений в регулярности структуры макромолекулы.

β-глюкозидаза гидролизует целлобиозу и другие целлодекстрины с очень низкой СП до глюкозы. На целлюлозу эти ферменты не действуют. Экзо-глюканазы, так же как и β-глюкозидазы, вызывают гидролиз целлобиозы, целлотриозы и целлотетраозы, причем экзо-фермент действует на олигомеры более высокого молекулярного веса, вызывая инверсию (обращение конфигурации глюкозидного центра). β-глюкозидаза очень быстро гидролизует дисахарид и трисахарид, но по мере увеличения степени полимеризации сахаридов скорость гидролиза заметно снижается. Продукты ферментативного гидролиза сохраняют В-конфигурацию. Глюканолактон значительно ингибирует действие β-глюкозидазы, но связи (1-1)-β, (1-2)-β, (1-3)-β, (1-6)-β гидролизуются этим ферментом так же хорошо, как и (1-4)-β связи. Экзо-глюказаны обладают большей избирательностью.

Полное разделение всех компонентов целлюлазы и выяснение их роли является трудной задачей, тем не менее все большее число исследователей начинает понимать, что ферментативная активность – это результат действия группы ферментов, а не одного фермента.

Были определены молекулярные веса различных компонентов целлюлазы.

Таблица 4 – Молекулярный вес целлюлаз различных микроорганизмов

Микроорганизмы	Молекулярный вес			
	C ₁	эндо-(1-4)-β- глюканазы	экзо-(1-4)-β- глюканазы	β-глюкозиданы
<i>Irpex lacteus</i>		10000		
		50000		
<i>Myrothecium verrucaria</i>		5300		
		30000		
		55000		
		49000		
<i>Penicillium chrysogenum</i>		32000		
<i>Penicillium notatum</i>		35000		
<i>Polyporus versicolor</i>		11000		
		51000		
<i>Trichoderma koningii</i>		26000		
		50000		
<i>Trichoderma viride</i>	60000	52000	76000	
	61000	12000		50000
		50000		

Фермент C₁ из *T. viride*, вероятно, представляет собой гликопротеин с молекулярным весом около 60000. Для эндо-(1-4)-β-глюканаз характерны значительные различия в размерах, молекулярный вес их изменяется в пределах 5300–55000. Возможно, небольшие частицы представляют собой фрагменты «нормального» фермента.

Молекулярный вес экзо-β-глюканаз и β-глюкозидаз 50000–76000. Предполагают, что глюкозидазы, как правило, имеют более высокий молекулярный вес, чем эндо-глюканазы.

Для ряда эндо-(1-4)-β-глюканаз был проведен аминокислотный анализ, в результате которого установлено, что в некоторых ферментах преобладают аминокислоты основного характера, а в других – кислотного. Количество серосодержащих аминокислот невелико (меньше 2 % общего их количества). Полисахариды связаны с различными фракциями ферментов, причем их количество колеблется от 1 до 50 % (от веса фермента). Наличие полисахаридов, химически связанных с молекулой фермента, может обеспечивать многообразие компонентов (1-4)-β-глюканазы, о котором было давно известно. Однако до настоящего времени не установлено связи между структурой ферментов и функцией полисахаридов.

Гемицеллюлозы – это полисахариды, связанные в растениях с целлюлозой и лигнином. Основными гемицеллюлозами являются ксиланы и маннаны. В лиственных и хвойных древесных породах варьируются не только относительное содержание этих двух групп полисахаридов, но также и их химический состав. В ходе варочных процессов происходит значительное модифицирование гемицеллюлоз. При сульфатной варке в начальном периоде нагревания, когда концентрация щелочи сравнительно высока, ксилан частично разрушается и лишается заместителей, таких как ацетильные и арабинозные группы. По мере протекания варки концентрация щелочи

уменьшается и на поверхности целлюлозных микрофибрилл переосаждаются деградированные короткие цепи ксиланов в более или менее кристаллической форме. В целом ксилан составляет свыше 90 % гемицеллюлоз в лиственной сульфатной целлюлозе и 50 % в хвойной. Вследствие переосаждения гемицеллюлозы концентрируются на микрофибриллах, находящихся на поверхностях волокон, хотя часть их остается в исходных местах внутри волокон. Согласно одной из господствующих гипотез механизма активности ксиланаз при отбелке, предполагают, что эти ферменты катализируют гидролиз ксилана, переосажденного на поверхности целлюлозных волокон, способствуя более легкому удалению фрагментов лигнина внутри и на поверхности волокна при последующей отбелке и щелочной обработке. Эта гипотеза не подтверждается результатами экспериментов, в которых целлюлоза делигнифицировалась в условиях высокой щелочности, предотвращающих отклонения ксилана на волокнах. В этом случае обработка ксиланазами приводила к снижению количества химиката, требующегося для достижения конечной белизны, равной конечной белизне обычной целлюлозы с ксиланом, переосажденным на поверхностях волокон. Согласно другой гипотезе, ксиланазы, катализируя деструкцию ксилана в клеточной стенке, позволяют «замурованному» в ней лигнину более легко диффундировать из волокна. Большая часть другого главного гемицеллюлозного полисахарида — глюкоманнана в древесине хвойных пород также растворяется в щелочи, но из-за нестабильности он быстро и полностью деструктируется при 130 °С. Поэтому в технической целлюлозе количественное отношение глюкоманнана к ксилану является таким же или становится ниже по сравнению с исходной древесиной как для лиственных, так и для хвойных пород. Глюкоманнан, остающийся в волокне, все же устойчив к растворению в щелочи и деструкции. Исследования механизма действия маннаназ на техническую целлюлозу были начаты только в середине 90-х гг. Согласно современным представлениям, целлюлазные комплексы, продуцируемые различными микроорганизмами, представляют собой полиферментные системы, состоящие из ферментов, различающихся по молекулярному строению и механизму (способу) действия на целлюлозу. При этом следует иметь в виду, что из-за большого многообразия целлюлазных комплексов и составляющих их индивидуальных ферментов, а также вследствие сложности строения и многообразия форм целлюлозы, невозможно дать однозначную картину действия целлюлазного комплекса на целлюлозу. Действие бактерий на целлюлозные волокна заключается в проникновении их в стенку волокна, рост гиф во внутреннем канале и разрушение (переваривание) целлюлозы. В благоприятных условиях действие бактерий быстро приводит к снижению прочности целлюлозных материалов. Ткань разрушается или на ней образуются дырки; древесина крошится. После разрушения структуры начинается интенсивная деструкция целлюлозы.

Действие микроорганизмов на целлюлозу аналогично действию расщепляющих ферментов, выделяемых грибами. Микроорганизм, как правило, действует локально, и большая часть целлюлозного материала сохраняет свои первоначальные свойства. В этом заключается отличие действия бактерий от

действия ферментов в том случае, когда образец полностью погружен в раствор фермента.

Действие фермента на целлюлозный материал вызывает ряд изменений:

1. Набухание целлюлозы в растворе щелочи, которое является наиболее быстрым и чувствительным способом характеристики активности целлюлозы, повышается. Хлопковые волокна, обработанные менее 30 мин. (при 50 °С) очень разбавленными фильтратами фермента, приобретают повышенную набухаемость в 18 %-ном растворе едкого натра. Других изменений не было обнаружено. Это объясняется, по-видимому, гидролизом первичной стенки; потерявшая прочность стенка не препятствует набуханию в щелочи вторичной стенки.

2. При кратковременном выдерживании волокон с раствором фермента (в течение 2 ч) образуются поперечные трещины, а затем при обработке (течение 5 суток) появляются спиральные трещины. Аналогичные изменения происходят в клеточных стенках древесины. Наблюдаемая при этом потеря разрывной прочности может частично объясняться появлением поперечных и спиральных трещин. Хрупкость деструктированных целлюлозных волокон может быть обусловлена действием полученного Селби фермента «А».

3. Степень полимеризации целлюлозы снижается. При действии микроорганизмов этого не происходит, т. к. СП непереваренных (неразложившихся) остатков волокна остается постоянной, благодаря локальному действию бактерий и быстрому разрушению олигомерных фрагментов. Наблюдается так же увеличение растворимости целлюлозы в щелочи (10 %-ный раствор NaOH), что объясняется, очевидно, образованием продуктов более низкого молекулярного веса.

4. Уменьшение молекулярного веса и образование восстанавливающих сахаров (рис. 6) происходит гораздо медленнее, чем перечисленные выше изменения, особенно в том случае, если в ферментном препарате содержится небольшое количество компонента C_1 • остаток после гидролиза характеризуется пониженным поглощением влаги и повышенной устойчивостью к действию ферментов. Это обусловлено, по-видимому, удалением аморфных, более доступных участков целлюлозы. Как указывалось, выше, действие целлюлазы сводится в основном к ферментативному гидролизу (1-4)- β -глюканазой. Устойчивость целлюлозы к действию фермента в значительной степени обуславливается недоступностью для большинства молекул ферментов кристаллических участков волокон, связанных межмолекулярными водородными связями. Роль компонента Q состоит в разрыхлении или гидратировании кристаллической целлюлозы и в создании, таким образом, условий, при которых гликозидные связи в этих участках становятся доступными при действии fS-глюканазы. Прежде чем начнется гидролиз, фермент должен связаться с целлюлозой. Имеются доказательства, что для связывания эндо-(1-4)- β -глюканазы необходимо наличие в макромолекуле минимум двух смежных элементарных звеньев, связанных (1-4)- β -связью. Разрывается соседняя связь. Так как в макромолекуле целлюлозы все гликозидные связи имеют строение (1-4)- β , результат такой деструкции

нельзя определить путем анализа продуктов гидролиза. Если глюканы содержат различные типы связей, фермент связывается с (1-4)-β-целлобиозной группой, но может расщеплять только связи (1-3)-β или (1-4)-β. Следовательно, специфичность действия эндо-β-глюканазы в большей степени определяется химическим строением фрагмента полимера, связанного с ферментом, чем природной гидролизуемой связи. Кинетика ферментативной деструкции целлюлозы изучена недостаточно из-за затруднений, обусловленных нерастворимостью целлюлозных препаратов и сложностью состава ферментов. Использование растворимых препаратов модифицированной целлюлозы не представляется возможным из-за наличия заместителей в макромолекуле. Исследования, проведенные с использованием растворимых олигосахаридов, дают приблизительное представление о возможной активности фермента по отношению к растворимой целлюлозе. Попытки объяснить действия ферментов на нерастворимые препараты целлюлозы привели к четкому выводу о зависимости скорости гидролиза от величины доступной поверхности полимера. Скорость деструкции целлюлозы пропорциональна концентрации фермента.

В ряде случаев было подсчитано число разорванных связей на молекулу фермента за секунду. Для растворимых олигосахаридов и производных целлюлозы приведенные в литературе значения находятся в пределах 5–29 связей в 1 с как для эндо-, так и для экзо-(1-4)-β-глюканаз. При деструкции сухой целлюлозы скорости разрыва значительно ниже. Эти значения очень низки по сравнению с аналогичными опубликованными данными для ферментов, гидролизующих крахмал (300 – для α-амилазы, и 4000 – для β-амилазы).

Таблица 5 – Значение констант Михаэлиса для целлюлаз *Trichoderma viride*

Гидролизуемый материал	K _m * 10 ⁻⁴ , моль/л	
	экзо-β-глюканазы	эндо-β-глюканазы
Целлобиоза	2300	190,0
Целлотриоза	180	31,0
Целлотетраоза	65	24,0
Целлопетаоза	60	7,0
Целлогексаоза	160	1,0

Целлюлазы и родственные им по составу ферменты благодаря высокой специфичности и мягким условиям деструкции могут быть использованы для выделения и анализа полисахаридов. В отличие от ферментативных методов химические методы значительно менее специфичны и требуют более жестких условий обработки. Так, например, при выделении лигнина из еловой древесины, осуществляют деструкцию целлюлозы целлюлазой, при этом деструкция лигнина происходит лишь в незначительной степени. Аналогичным образом действием фермента *Rhizopus arrhizus* удаляют примеси β-глюкана из препаратов ксилана. Вещество может быть охарактеризовано на основании

продуктов, образующихся при его ферментативном гидролизе. Так, полимер, который под действием эндо-(1-4)- β -глюканазы полностью превращается в целлобиозу или целлотриозу, может быть только целлюлозой. Аналогичным образом можно определить наличие целлюлозы в сложной смеси, если при гидролизе последней образуется целлобиоза. Тем не менее отрицательный результат не всегда говорит об отсутствии данного полимера, например, целлюлозы. В некоторых случаях целлюлоза может быть экранирована другим полимером. Который препятствует взаимодействию фермента с целлюлозой. Поэтому перед ферментативной деструкцией необходимо проводить измельчение препарата. Целлюлазу используют для определения целлюлозы в плодовых телах слизевиков (миксомицетов) и в клеточных стенках фикомицетов. Для идентификации других полиглюканов в грибах применяют аналогичные по составу ферменты: имеются положительные результаты при использовании этих ферментов при изучении структуры сложных полисахаридов. Описан интересный способ использования целлюлазы для удаления клеточных стенок при выделении протопластов клеток высших растений и некоторых фикомицетов. Другие гидролитические ферменты применяли для удаления клеточных стенок патогенных грибов. Протопласты, остающиеся при удалении клеточной стенки, являются в настоящее время широко используемым объектом физиологических исследований, включая проблему синтеза клеточной стенки. В процессе эксплуатации целлюлозные материалы подвержены действию целлюлолитических ферментов. При действии этих ферментов достаточно легко разрушаются хлопок, древесина, бумага, целлофановая пленка, вязкий шелк; ацетатные волокна и пленка устойчивы к деструкции благодаря высокой степени замещения гидроксильных групп в макромолекуле этого эфира целлюлозы. Модификация целлюлозы, направленная на улучшение ее основных свойств, часто повышает и устойчивость к гниению. Так обработка различными реагентами с целью придания целлюлозным материалам несминаемости одновременно вызывает устойчивость материала к гниению. Иногда возникают неожиданные проблемы. Например, создание бумаги, обладающей повышенной прочностью в мокром состоянии, привело к тому, что использованная бумага не разлагалась в обычных очистных сооружениях. Новые водорастворимые краски содержат в качестве загустителя карбоксиметилцеллюлозу или метилцеллюлозу. Поэтому достаточно незначительного роста гриба или бактерий для того, чтобы вызвать деструкцию этих загустителей, в результате чего краски разжижаются и разрушаются. В течение многих лет в Японии использовали метод ферментизации микроорганизмами для повышения усвояемости зерна и соевых бобов, применяемых в качестве пищевых продуктов. В настоящее время для аналогичных целей используют целлюлазы. Утверждают, что такая обработка повышает питательную ценность кормов для животных. Тойяма, который является авторитетом в этой области, показал, что применение целлюлазы и родственных по составу ферментов со многими продуктами питания может быть очень полезным. Недавно он установил, что обработка риса ферментом увеличивает его смачиваемость и способность сорбировать воду. Таким путем

можно получить мгновенно разваривающийся рис.

Используя ферменты, можно наиболее эффективно выделить ценное содержимое клеточной стенки растений. Целлюлазу можно применять как средство для удаления грубых волокон из выжимок семян масличных культур, для обработки микробных клеток, применяемых в пищевой промышленности, и для экстракции ценных компонентов из трав и соевых бобов, агара из красных водорослей, эфирных масел и пахучих веществ из различных растений. Целлюлазы были использованы для осветления сока цитрусовых. Эти ферменты вводили в продукты, ускоряющие расщепление в септических танках, а также использовали в производстве бумаги для сокращения времени измельчения бумажной массы. Исследователи, работающие с целлюлазой, предполагают создать рентабельный процесс превращения целлюлозных отходов в глюкозу. В этом смысле обнадеживает успех промышленного применения ферментов для превращения крахмала в глюкозу. Основной проблемой остается получение достаточно активных ферментов и высокорекреационноспособных целлюлозных материалов для того, чтобы в течение сравнительно непродолжительного времени можно было бы получить значительные количества сахара. Образующиеся сахара можно использовать как источник глюкозы или превращать в белок и жир, применяя как питательную среду для соответствующих микроорганизмов. Сахара можно использовать также для производства спирта. Предполагается, что применение спирта в качестве топлива для двигателей внутреннего сгорания приведет к уменьшению загрязнения атмосферы. После многих лет обсуждений вопроса о целесообразности использования метода микробиологической деструкции в промышленном масштабе исследователи снова пытаются разработать ускоренный вариант такого процесса. На одном из последних симпозиумов были рассмотрены достижения в исследовании основных проблем ферментативной деструкции, таких как механизм действия компонента C_1 . Предполагают, что C_1 удерживает гидролизующие компоненты C_x [эндо-(1-4)- β -глюканазы] на твердом препарате целлюлозы, ускоряя тем самым ее гидролиз. Проведены успешные исследования по сопоставлению размера пор твердых целлюлозных препаратов со способностью фермента к диффузии. Вновь возрос интерес к использованию целлюлаз для повышения качества кормов, превращению отходов целлюлозы в белок действием клеток *Cellulomonas* и в глюкозу обработкой ферментами. Недавно удалось получить в небольшом масштабе растворы глюкозы с концентрацией 30 % при ферментативной деструкции целлюлозы. Это потребовало очень высоких концентраций фермента, предварительного нагревания и тщательного измельчения целлюлозы. Растворы глюкозы с концентрацией до 10 % были получены на опытной установке непрерывной деструкции с использованием прогретой и размолотой целлюлозы и фильтрата культуры *T. viride* в качестве фермента.

Первоначальные исследования применения ферментов в отбелке проводились с целью имитации действия дереворазрушающих грибов в природе. Самую большую группу грибов, разрушающих древесину, составляют

Basidiomycetes (базидиомицеты, базидиальные грибы), а лучше всех изучены те, которые вызывают гниение древесины с преимущественным разрушением лигнина и придают древесине белый цвет. Обработка в лабораторных условиях небеленой сульфатной целлюлозы грибом белой гнили *Phanerochaete chrysosporium* приводит к значительному понижению числа Каппа. Хотя отбелка этим грибом в промышленности не осуществима, так как данный организм требует более пяти дней выращивания для того, чтобы целлюлоза достигала существенной делигнификации. Исследования применения ферментов, вырабатываемых базидиомицетами, для лабораторной отбелки целлюлозы привела к открытию лигнинпероксидаз (первоначально называемых лигниназами). Позднее правда сообщили, что различные смеси лигнинпероксидаз с марганецзависимыми пероксидазами не делигнифицировали, как ожидалось, небеленую сульфатную целлюлозу, хотя лигнинсодержащие вещества, по-видимому, переходили в раствор, как свидетельствовали данные абсорбционной спектроскопии. Наряду с лигнинпероксидазами и марганецзависимыми пероксидазами преобладающим ферментом многих грибов белой гнили является лакказа – фермент, катализирующий синтез лигнина в растущих растениях. Лабораторные результаты показали, что обработка небеленой хвойной (из северных пород) сульфатной целлюлозы лакказой в присутствии красителя 2,2-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) натрия (АБТС) вызывает падение числа Каппа более, чем на 25 %, что указывает на прямую делигнификацию. Эта работа не вышла за стены лаборатории, но использование лакказы в комбинации с медиатором ароматических молекул и кислородом позволило достичь существенного снижения числа Каппа небеленой сульфатной целлюлозы.

2.2.1. Ферментативный гидролиз – предварительная стадия при отбелке сульфатной лиственной и сульфатной хвойной целлюлоз

Одно из новых направлений в создании экологически безопасного процесса переработки древесины в целлюлозу связано с использованием в качестве делигнифицирующих агентов ферментов. Действие ферментов направлено на гидролиз лигноуглеводных связей и на расщепление гемицеллюлоз, в том числе сорбирующихся на поверхности целлюлозы при варке и ограничивающих делигнификацию.

В целлюлозно-бумажной промышленности разрабатывается несколько биотехнологических процессов: биологическая делигнификация древесины, биологическая отбелка целлюлозы, биологическая очистка сточных вод. Использование биологических методов обработки древесины и целлюлозы позволяет увеличить степень белизны, уменьшить расход химических реагентов, уменьшить загрязнение окружающей среды. Биологический метод обеспечивает сохранение прочностных качеств целлюлозы, понижает жесткость. С целью снижения жесткости и получения целлюлозы с белизной более 30 % ISO целесообразно применять схемы отбелки с биоделигнификацией дереворазрушающими грибами – грибами белой гнили

(род *Trametes*). Эти грибы способны изменять структуру лигноцеллюлозных субстратов, увеличивая доступ химических реагентов к лигнину, а также разрушать лигноуглеводную матрицу, благодаря чему происходит более легкое освобождение лигнина. Воздействие грибов белой гнили на древесину приводит к деструкции лигнина, сопровождающейся окислительными реакциями, что может способствовать более легкой последующей делигнификации. Наиболее эффективными биоделигнификаторами являются следующие культуры грибов – *Trametes (Coriolus) villosus*, *Rhanerochaete chrysosporium*, *Rhanerochaete sanguinea*. Биохимическая обработка приводит к увеличению содержания карбонильных групп и карбоксильных групп и уменьшению содержания алифатических гидроксильных групп. Содержание фенольных гидроксидов может и возрастать, и понижаться. Под действием грибов белой гнили происходит биодеструкция лигнина, которая является окислительным процессом. В результате в лигнине значительно возрастает массовая доля кислорода и понижается содержание метоксильных групп. Увеличение содержания кислорода происходит в результате окисления α -углеродных атомов и окислительной деструкции связей между β - и γ -углеродными атомами пропановой цепи. Отношение кислорода к углероду и метоксильных групп к углероду понижается. Дальнейшей ступенью деструкции лигнина под действием грибов белой гнили является окислительное расщепление связей β -0-4 с концевыми фенилпропановыми единицами. Деструкция лигнина происходит за счет расщепления арил-арильных, алкил-алкильных С-С связей алифатической цепи, а также разрыва лигноуглеводных связей, что приводит к более легкому извлечению его из лигноуглеводной матрицы древесины. Окисление осуществляется непосредственно в макромолекуле лигнина и затрагивает как низко-, так и высокомолекулярные составляющие лигнина. *Trametes (Coriolus) villosus* и *Rhanerochaete sanguinea* в процессе окисления не разрушают ароматические кольца, а происходит разрыв алифатических С-С связей. Одновременно с реакциями разрыва связей в лигнине протекают реакции, приводящие к образованию простых эфирных связей ($C_{ар}-O-C$, а также $C_{ар}-C$ связей).

Главная задача отбелки целлюлозы заключается в удалении лигнина при сохранении углеводной части. В начале 1980-х гг. были предложены два различных подхода с использованием ферментов для решения этой задачи, но лишь один из них привел к успешной разработке промышленного процесса. Такой процесс, иногда называемый «форсированием отбелки», был с успехом осуществлен на целлюлозных заводах по всему миру. Альтернативный способ прямой делигнификации с использованием ферментов, называемых лигниназами и лакказами, которые действуют непосредственно на лигнин, все еще находится в стадии изучения и ждет возможной будущей коммерциализации. В 1987 г. финские исследователи предложили новую идею – использовать для обработки небеленых сульфатных целлюлоз ферменты из группы эндо-бета-ксиланаз (кратко: ксиланазы). О предыдущих работах по применению ксиланаз, но не для отбелки, сообщали в начале 70-х гг.; эти работы касались удаления гемицеллюлоз из технических целлюлоз в

производстве целлюлозы для химической переработки. О влиянии ксиланаз на отбелку сообщали также некоторые другие группы исследователей. Эти первоначальные сообщения вызвали проведение исследований во многих академических лабораториях и промышленных группах, посвященных влиянию различных ксиланаз на отбелку. С 1988 г. начали появляться патенты на применение ферментов при отбелке. Первые заводские испытания были проведены в 1988 г. Во многих работах подчеркивается, что выбор фермента определяется породой древесины (для целлюлозы, полученной из лиственной древесины, которая содержит от 22 до 28 % ксилана, используются ксиланазы, для хвойной – помимо ксиланазы и маннаназы) и исходной жесткостью небеленой целлюлозы. Наряду с обработкой ксиланазой применяется и ферментная обработка Mn-пероксидазой. Возможно и применение смесей секреторных ферментов грибковой культуры *Trametes versicolor*, лакказы и Mn-пероксидазы.

В промышленности часто применяют комплекс ферментов в виде энзимной смеси. Несмотря на достаточно большое количество работ, в которых изучалось влияние ферментативной обработки целлюлозы на процессы варки и отбелки целлюлозного материала, приходится признать, что исследования носят фрагментарный характер, а результаты этих исследований не раскрывают механизм взаимодействия целлюлозы и лигнина с ферментами различного происхождения, что не позволяет подобрать оптимальные условия их культивирования и биосинтеза. Благоприятное влияние ферментов при отбелке зависит от используемой схемы отбелки, содержания остаточного лигнина в целлюлозе, задаваемой конечной белизны и экологических интересов предприятий. В большинстве случаев вводится в поток массы перед башней высокой концентрации для хранения небеленой целлюлозы обычно перед насосом подачи массы в башню. При правильном применении ферментов в башне небеленой массы можно снизить расход делигнифицирующих химикатов на (15–25) %. Соответственно уменьшается содержание адсорбируемого органического галогенида (АОХ) в сточных водах. Эффект отбелки наблюдается при использовании как гемицеллюлазных, так и оксидазных ферментов, хотя они принципиально отличаются по механизму взаимодействия с лигноцеллюлозной массой. Если лигнолитические ферменты катализируют окислительные процессы деструкции лигнина, то действие гемицеллюлаз направлено на гидролиз лигноуглеводных связей, в том числе сорбированных на поверхности целлюлозных волокон при варке гемицеллюлоз и ограничивающих удаление лигнина. Гидролитическое воздействие ксиланазных препаратов обнаруживается после щелочной экстракции гидролизованных лигноуглеводных фрагментов. Действие оксидазных ферментов приводит к более значительному увеличению белизны целлюлозной массы, поэтому есть основания считать, что оксидазные ферменты имеют очень высокий потенциал в процессах биоотбелки. По экономическим соображениям в целлюлозно-бумажной промышленности нашли применение гемицеллюлазные ферменты. Двумя основными ферментами, деструктирующими гемицеллюлозную главную цепь, являются эндо-1-4-β-D ксиланаза и эндо-1,4-

β -D маннаназа, называемые кратко, соответственно ксиланазами и маннаназами. Ксиланазы и маннаназы вырабатываются многими видами бактерий и грибов. Ксиланазы – ферменты, применяемые в промышленной отбелке, получают из нескольких различных источников. При ферментной обработке ксиланазами разрушается небольшая часть расположенного на поверхности волокон ксилана, разрываются лигноуглеводные связи, что делает остаточный лигнин сульфатной целлюлозы более доступным, значительно облегчается его удаление различными отбеливающими реагентами. При этом достигается экономия химикатов, снижается сброс токсичных хлорсодержащих органических соединений. Важным преимуществом ферментной обработки является то, что внедрение этого процесса не требует больших затрат. Промышленные препараты ферментов включают главным образом эндо-1,4- β -D-ксиланазы. Сопутствующие ферменты могут влиять на качество технической целлюлозы. Например, катализируя гидролиз целлюлозы, целлюлазы оказывают отрицательное влияние на выход и прочность технической целлюлозы.

Для процесса отбелки чаще всего применяют такие ферменты, как лакказа, ксиланаза и их смеси в сочетании с отбеливающими и делигнифицирующими агентами (пероксид водорода, диоксид хлора). Замечено также, что ферментная обработка ксиланазой ощутимо влияет на снижение жесткости, уменьшает расход диоксида хлора на отбелку и как следствие сокращает на 20 % содержание хлорированных органических соединений в сточных водах. В последние годы наметился переход к биотехнологиям второго поколения: активизировался поиск новых ферментов, более эффективных, чем ксиланаза. Результаты опытов с грибковыми ферментами лакказой и Mn-пероксидазой, выращенными из бактерий *Trametes versicolor*, дают снижение жесткости с 11,1 ед. Каппа после кислородной делигнификации до 7–8 ед. Каппа, увеличение белизны целлюлозы на (8–10) %. Для увеличения белизны применяют различные комбинации ферментных обработок и разнообразные энзимные смеси. Изучено воздействие на листовенную сульфатную целлюлозу грибковых культур Mn-пероксидазы и лакказы. Обработка такой энзимной смесью дает увеличение белизны целлюлозы на (10–15) %. Использование ксиланазных ферментов при дополнительной ступени отбелки сульфатной листовенной и сульфатной хвойной целлюлоз позволяет повысить показатель белизны до уровня мировых стандартов (88–90) ISO. Интересно отметить, что в настоящее время налаживается промышленное производство ферментов: Ксиланаза ОАО «Восток» и Ксиланаза ЛУМ.

2.2.2. Ферментативный гидролиз – предварительная стадия в производстве целлюлозы для химической переработки

Растворимая целлюлоза используется в качестве сырья при производстве различных продуктов на основе целлюлозы, в том числе вискозного волокна, первого промышленно производимого регенерированного целлюлозного волокна.

В отличие от целлюлозы для производства бумаги растворимая целлюлоза должна содержать высокое содержание целлюлозы (90 – 99 %), низкое содержание гемицеллюлоз (2 – 4 %), и лишь следы остаточного лигнина, экстрактивных веществ и минералов. Также желательны определенная степень полимеризации и равномерное молекулярно-массовое распределение.

Перерабатываемость растворимой целлюлозы часто характеризуется ее реакционной способностью по отношению к растворителям и реагентам. Целлюлоза с высокой реакционной способностью может улучшить однородность и качество конечных продуктов целлюлозы и снизить потребность в реагентах, например, использование сероуглерода в производстве вискозы, снижение производственных затрат и воздействия на окружающую среду.

К целлюлозе для химической переработки предъявляются особые требования, которые отличаются от требований, предъявляемых к целлюлозе для получения бумаги. Помимо достижения высокой белизны целлюлозы необходимо также наиболее полно удалить не только лигнин, но и другие нецеллюлозные компоненты, такие как глюкуроноксиланы и глюкоманнаны, пентозаны и гексозаны. Примеси гемицеллюлоз негативно влияют на процесс получения вискозной целлюлозы, так как вызывают помутнение растворов эфиров целлюлозы, понижают их фильтруемость, снижают качество конечного продукта за счет снижения прочности волокна.

Первые исследования по использованию ферментов для селективного удаления гемицеллюлоз из волокнистых полуфабрикатов были проведены в Институте химии древесины АН Латвийской ССР в 1975–1978 гг. В ходе исследования было выявлено, что препарат ксилоаваморин с основной ксиланазной активностью удалял около 15 % гемицеллюлоз из холоцеллюлозы сосны и 3–8 % гемицеллюлоз из технических целлюлоз. Дальнейшие исследования применения монокомпонентных гемицеллюлаз показали, что они способны гидролизовать незначительную часть гемицеллюлоз, при этом ксиланазы эффективнее маннааз, при их действии может также частично удаляться маннан. Повысить эффективность ферментативной деструкции гемицеллюлоз можно с помощью смеси маннааз и ксиланаз. Ксиланаз гидролизует ксилан, выделенный из вискозной целлюлозы, в 1,3–2,3 раза быстрее, чем природные ксиланы, выделенные из древесины.

Имеются исследования с совместным применением ксиланазы с арабинофуранозидазой для увеличения степени удаления ксилана. Гидролиз глюкуроноксилана и маннана можно также повысить использованием различных целлюлаз, так как действие целлюлолитических ферментов приводит к частичной деструкции целлюлозных цепей, в результате повышается доступность гемицеллюлоз для ксиланаз и маннааз.

Реакционная способность целлюлозы имеет большое значение при производстве целлюлозы для химической переработки. Для вискозной целлюлозы одним из важных показателей является способность к вискозообразованию, которую можно оценить расходом гидроксида натрия и сероуглерода для приготовления хорошо фильтруемого раствора вискозы.

Исследования показали, что реакционная способность целлюлозы зависит от распределения водородных связей, растворимости в щелочах и высокой молекулярной однородности.

Одним из способов повысить реакционную способность растворимой целлюлозы может быть использование целлюлаз.

Применение целлюлаз для снижения вязкости вискозной целлюлозы является весьма перспективным. Микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, синтезируют разнообразные виды ферментов целлюлазного типа, отличающиеся специфичностью действия. Целлюлазные комплексы способны расщеплять β -1,4-глюкозидные связи в полимерных формах целлюлозы. Основными ферментами комплекса, отвечающими за деструкцию макромолекул целлюлозы, являются эндоглюканазы и целлобиогидролазы. Эндоглюканазы способны произвольно расщеплять связи по длине макромолекулы, действуя преимущественно на аморфные участки, а целлобиогидролазы (ЦБГ) осуществляют гидролиз высокоупорядоченных участков фибрилл до целлобиозы.

Еще одна группа ферментов целлюлозного комплекса – это целлобиазы (β -глюкозидазы), обладают узкой специфичностью и гидролизуют только целлобиозу, которая при накоплении в реакционной среде ингибирует действие других целлюлаз. Действуя индивидуально, ферменты целлюлазного комплекса разрушают целлюлозу лишь в незначительной степени, но различные комбинации двух видов ферментов способны вызывать более глубокую деструкцию целлюлозы хлопка, при этом наибольшим эффектом обладает смесь ЦБГ и ЭГ.

В смеси ферментов ЭГ и ЦБГ первый из ферментов осуществляет фрагментацию макромолекул целлюлозы и таким образом увеличивает концентрацию невосстанавливающих концов целлюлозных цепей, являющихся субстратом для второго фермента.

Для использования целлюлазы в роли реагента для улучшения качества растворимой целлюлозы нужно уделить особое внимание подбору фермента. Целлюлаза должна обладать мягким и избирательным действием, так как использование многокомпонентных целлюлазных препаратов может привести к снижению конечных свойств волокна.

Целлюлаза, вызывая деструкцию, приводит к увеличению растворимости целлюлозы в щелочах, что связано со снижением средней СП целлюлозы.

Ферментативная обработка смесью целлюлаз сульфитной вискозной целлюлозы приводит к быстрому снижению СП, а также степени кристалличности. ЭГ, в основном действует на аморфные участки целлюлозы, что способствует набуханию клеточной стенки и разделению микрофибрилл относительно друг друга, что способствует более легкому проникновению растворителей. Действие ЭГ способно также повышать реакционную способность целлюлозы в процессе вискозообразования. При использовании обработанной ферментом целлюлозы при производстве вискозы можно снизить расход сероуглерода на ксантагенирование в 1,5 раза, с 30 до 20 % по

отношению к массе волокна, при этом фильтруемость вязкозных растворов сохраняется на достаточно на высоком уровне. При этом повышение реакционной способности происходит при небольшом расходе фермента, а оптимальный результат можно достичь при небольшом времени обработки (10–30 мин.). Дальнейшее увеличение продолжительности обработки приводит к снижению реакционной способности, что возможно происходит из-за глубоких изменений структуры целлюлозы при воздействии фермента.

При одинаковом значении вязкости целлюлоза, обработанная ферментом, имеет большую реакционную способность, чем целлюлоза после кислотного гидролиза. Вязкость, СП, молекулярно-массовое распределение не характеризуют в достаточной степени реакционную способность обработанных ферментом целлюлоз, ее улучшение связывают в основном с усилением набухания целлюлозы. Применение размола перед введением ферментов позволяет дополнительно повысить способность к вискозообразованию, но при этом значительно снижается выход волокна.

Высокая реакционная способность обработанной ферментом целлюлозы может быть вызвана ослаблением водородных связей при применении целлюлаз.

Установлено, что именно целлюлозосвязывающий домен (ЦСД) ферментов способен образовывать разрыв водородных связей между макромолекулами целлюлозы и снижать степень упорядоченности, что важно на начальных стадиях ферментативного гидролиза целлюлозы. Методами Фурье-спектроскопии и дифракции рентгеновских лучей было обнаружено снижение степени кристалличности, ослабление и разрыв водородных связей хлопковой целлюлозы и хвойной целлюлозы для химической переработки. Предполагается, что ЦСД ферментов могут подготавливать целлюлозу к гидролитическому действию целлюлаз, способствовать отделению фибрилл с поверхности волокон.

Таким образом, применение ферментных технологий в процессе многоступенчатой отбелки целлюлозы для химической переработки позволяет уменьшить содержание остаточных гемицеллюлоз, повысить отбеливаемость и уменьшить расход отбеливающих реагентов, а также отрегулировать в заданных пределах вязкость целлюлозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кислотный и ферментативный гидролиз целлюлозы являются одними из методов, применяемых при производстве технической целлюлозы и целлюлозы для химической переработки. В качестве предварительных стадий перед отбелкой целлюлозы эти способы обработки позволяют в дальнейшем уменьшить расход химических реагентов, снижая нагрузку на окружающую среду при сохранении качества конечной продукции. Используемые на данный момент в целлюлозно-бумажной промышленности ферменты позволяют не только получать продукты с заданными эксплуатационными характеристиками, но и снизить промышленные затраты, связанные с расходом химических реагентов на отбелку. На данный момент проводится множество исследований на тему внедрения биотехнологий в целлюлозно-бумажную промышленность. Так как ферменты являются биологически чистыми катализаторами, способными интенсифицировать множество процессов, тем самым повышая эффективность производства.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Азаров, В. И., Буров, А. В., Оболенская, А. В. Химия древесины и синтетических полимеров [Текст] / В. И. Азаров, А. В. Буров, А. В. Оболенская. – СПб., 1999. – 628 с.
2. Байклз, Н., Сегал, Л. Целлюлоза и ее производные [Текст] / Н. Байклз, Л. Сегал; пер. с англ. – М., 1974. – 512 с.
3. Рабинович, М. Л., Мельник, М. С. Хвостатые ферменты. – URL: <http://www.port-all.ru/Librari> (дата обращения 24.10.22). – Текст: электронный.
4. Медведева, Е. Н., Вершаль, В. В., Бабкин, В. А. Пероксид водорода – перспективный реагент для создания экологически чистой технологии производства целлюлозы. Химия в интересах устойчивого развития [Текст] / Е. Н. Медведева, В. В. Вершаль, В. А. Бабкин. – 1996. – № 4. – 137 с.
5. Новожилов, Е. В., Пошина, Д. Н. Биотехнологии в производстве целлюлозы для химической переработки (обзор) / Е. В. Новожилов, Д. Н. Пошина // Химия растительного сырья. – 2011. – № 3. – С. 15–32.
6. Исследование методов активации блененой сульфатной лиственной целлюлозы для повышения ее реакционной способности / Д. Н. Пошина, П. В. Поротова, К. Ю. Тереньтев // Лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 113–124.
7. Basma, M. E., Nabil, A. I. Recent Developments in Sustainable Finishing of Cellulosic Textiles Employing Biotechnology. *Journal of Cleaner Production*. 2021. Volume 284, 2021. P. 1–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124701>
8. Kaur, P., Bhardwaj, N. K., Sharma, J. Pretreatment with xylanase and its significance in hemicellulose removal from mixed hardwood kraft pulp as a process step for viscose. *Carbohydrate Polymers*. 2016. Volume 145, 2016. P. 95–102. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.023>
9. Ibarra, D., Köpcke, V., Ek M. Behavior of different monocomponent endoglucanases on the accessibility and reactivity of dissolving-grade pulps for viscose process. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010. Volume 47, 2010. P. 355–362. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2010.07.016](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.016)
10. Jiang, W., Zhou, X. Enzymatic preparation of oxidized viscose fibers-based biosorbent modified with ϵ -polylysine for dyes removal and microbial inactivation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Volume 166, 2021. P. 509–520. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.208>.
11. Li, W., Shen, H., Ma, M., Kiu, L., Cui, C., Chen, B., Fan, D., Tan, T. Synthesis of ethyl oleate by esterification in a solvent-free system using lipase immobilized on PDMS-modified nonwoven viscose fabrics. *Process Biochemistry*. 2015. Volume 50, 2015. P. 1859–1869. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.012>
12. Miao, Q., Chen, L., Huang, L., Tian, C., Zheng, L., Ni, Y. A process for enhancing the accessibility and reactivity of hardwood kraft-based dissolving pulp for viscose rayon production by cellulase treatment. *Bioresource Technology*. 2014. Volume 154, 2014. P. 109–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.040>
13. Chen, C., Duan, C., Li, J., Liu, Y., Ma, X., Zheng, L., Stavik, J., Ni, Y. Cellulose (Dissolving Pulp) Manufacturing Processes and Properties: A Mini-

Review. *Bioresources*. 2016. Volume 11, 2016. P. 5553–5564.

14. Liu, Y., Shi, L., Cheng, D., He, Z. Dissolving Pulp Market and Technologies: Chinese Prospective – A Mini-Review. *Bioresources*. 2016. Volume 11, 2016. P. 7902-7916.

15. Arce, C., Llano, T., Garcí'a, P., Coz, A. Technical and environmental improvement of the bleaching sequence of dissolving pulp for fibre production. *Cellulose*. 2020. Volume 27, 2020. P. 4079–4090. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1277-5>

Учебное издание

**Осовская Ираида Ивановна
Федоскин Иван Алексеевич**

Гидрофильность природных полимерных материалов

Кислотный и ферментативный гидролиз при отбелке целлюлозы

Учебное пособие

Редактор и корректор А. А. Чернышева
Техн. редактор Д. А. Романова

Учебное электронное издание сетевого распространения

Системные требования:
электронное устройство с программным обеспечением
для воспроизведения файлов формата PDF

Режим доступа: http://publish.sutd.ru/tp_get_file.php?id=202016, по паролю.
- Загл. с экрана.

Дата подписания к использованию 21.11.2022 г. Рег.№ 5096/22

Высшая школа технологии и энергетики СПбГУПТД
198095, СПб., ул. Ивана Черных, 4.