

УДК 663.15

## ТЕХНОЛОГИЯ ОСАХАРИВАНИЯ БИОМАССЫ МИСКАНТУСА ПРИ ПОМОЩИ КОММЕРЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2014 г. Т.Н. Горячкова<sup>1,2</sup>, К.Г. Старостин<sup>1,2</sup>, И.А. Мещерякова<sup>1</sup>,  
Н.М. Слынько<sup>1,2</sup>, С.Е. Пельтек<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> ООО Линия солнца, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 1 октября 2014 г. Принята к публикации 21 октября 2014 г.

Одним из ключевых путей снижения себестоимости биотехнологического производства является разработка для культивирования микроорганизмов дешевых субстратов, не конкурирующих с продуктами питания. В статье проанализированы возможности использования коммерчески доступных препаратов с целлюлозолитической активностью для осахаривания биомассы мискантуса сорта Сорановский – новой технической культуры, внесенной в реестр сельскохозяйственных культур РФ в 2013 г., в сравнении с осахариванием биомассы других травянистых растений – канареечника тростниковидного, кендыря ланцетовидного и сиды гермафродитной. Для ферментативного гидролиза были использованы коммерчески доступные препараты целлюлаз грибного происхождения: ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus*, целлюлаза из *Aspergillus niger*, целлюбиаза и целлюлаза из *Pen. verruculosum*. Ферментативному гидролизу предшествовала предобработка щелочной перекисью. Самой легко гидролизуемой из исследованных нами оказалась биомасса канареечника. Различными комбинациями ферментов удалось добиться 100-процентной конверсии в пересчете на массу гидролизуемых компонентов, что соответствует 70 % конверсии в пересчете на биомассу для всех образцов биомассы.

**Ключевые слова:** мискантус, гидролиз растительной биомассы, «зеленая химия», гликозид гидролаза, целлюлаза, ксиланаза.

### ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень науки в области молекулярной биологии обеспечивает широкомасштабное внедрение в промышленность биотехнологий. Имеющееся на планете видовое разнообразие растений представляет неисчерпаемые возобновляемые ресурсы для таких отраслей промышленности, как производство биотоплива, целлюлозы, исходных компонентов для крупнотоннажной химии. Развитие технологий «зеленой химии» приведет к существенному снижению негативного антропогенного воздействия на окружающую среду, появлению экологически-дружественных технологических процессов, рациональному природопользованию. Уже сегодня в ряде стран успешно функционирует биотехнологическое произ-

водство биоэтанола, полимолочной кислоты и 1,3-пропандиола (Erickson *et al.*, 2012). Одним из ключевых путей снижения себестоимости биотехнологического производства является разработка для культивирования микроорганизмов дешевых субстратов, не конкурирующих с продуктами питания. Интенсивное внедрение биотехнологий в промышленность в первую очередь ограничено тем, что значительные успехи в селекции микроорганизмов и ферментативных технологиях разрабатываются, как правило, без учета себестоимости получения растительной биомассы и процессов очистки целевого продукта. В понятие «биомасса» включают самые разнообразные растительные источники и даже органические отходы. Следует отметить, что при разработке технологии эффективного осахаривания растительной

биомассы необходимо ориентироваться на конкретный вид растений, тогда возможно получить значительно более стабильный и экономически эффективный технологический процесс.

В этой статье проанализированы возможности использования коммерчески доступных препаратов с целлюлозолитической активностью для осахаривания биомассы мискантуса сорта Сорановский – новой технической культуры, внесенной в реестр сельскохозяйственных культур РФ в 2013 г., с целью получения дешевых субстратов для культивирования микроорганизмов. Мискантус представляет собой быстрорастущий злак, неприхотливый к условиям выращивания. Это многолетнее растение дает стабильные урожаи биомассы 10–15 т/га. Для сравнения были взяты образцы других высокоурожайных по биомассе растений.

Гидролиз растительной биомассы можно осуществить методами химии с использованием сильных кислот и щелочей, физики – измельчение, воздействие давлением и высокой температурой, биотехнологии (ферментативный гидролиз) и микробиологии. Краугольным камнем в вопросе деполимеризации полисахаридов клеточной стенки растений является себестоимость получения сахаросодержащего субстрата. Ферментативные реакции энергетически менее затратны и экологически безопасны, однако их эффективность в значительной степени определяется доступностью субстрата (волокна целлюлозы) и его структурой. Поэтому целью настоящей работы была разработка комбинированного процесса, включающего как механохимические предобработки, так и ферментативную стадию осахаривания предобработанной биомассы, для того чтобы обеспечить максимальную степень конверсии биомассы в сахара.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использованы образцы биомассы мискантуса сорт Сорановский, канареечника тростниковидного, кендыря ланцетовидного и сиды гермафродитной, выращенных на экспериментальных полях ИЦиГ СО РАН, урожая 2013 г.

Мискантус сорт Сорановский – многолетнее травянистое растение, размножающееся вегетативным способом, через корневища, с

прямостоячими, облиственными стеблями до 300 см высотой (урожайность зеленой массы – 75–80 т/га). Биомасса содержит 44 % целлюлозы, 23 % лигнина и 26 % гемицеллюлозы (Слынько и др., 2013).

Канареечник тростниковидный – многолетнее злаковое кормовое растение до 2 м высоты, имеет стелющиеся корни, линейные листья шириной до 2 см (содержание целлюлозы – 44,2 %, урожайность зеленой массы – 30–35 т/га).

Сиды гермафродитная – растение из семейства мальвовых, рыхлорневищное, стебли достигают высоты 300–350 см (содержание целлюлозы 40 %, урожайность зеленой массы 39–45 т/га).

Кендырь ланцетовидный – растение из семейства кутровых. Стебель высотой 80–120 см, в верхней части ветвистый (содержание целлюлозы 70 %, урожайность зеленой массы – нет данных).

Помол проводили измельчителем МАН-30 (производства ЗАО МВМ, РФ). Порошки смешивали с водой в соотношении жидкая фаза к твердой – ЖТ, мл/г, равном 10. Для ферментативного гидролиза использованы коммерчески доступные препараты: ЦеллолюксА и Целлолюкс F (НПО «Сиббиофарм»), ксиланаза из *Thermomyces lanuginosus*, целлюлаза из *Aspergillus niger* (Sigma), а также любезно предоставленные А.П. Синицыным Целлобиаза F10 и Целлюлаза В1 из *Pen. verruculosum*.

Рассеивание на фракции проводили на ротапе (шейкере-рассеивателе фракций) через сита 300 меш (с диаметром отверстий ~50 мкм), 200 меш (~71 мкм) и 150 меш (~100 мкм) со скоростью вращения 100 мин<sup>-1</sup> при одновременном встряхивании с частотой 180 мин<sup>-1</sup> в течение 20 мин. Общее количество восстанавливающих сахаров определяли колориметрическим методом с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНСК-реагент). Долю конверсии биомассы в сахара определяли в пересчете на холоцеллюлозу из расчета содержания холоцеллюлозы в растительной биомассе 70 %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Порошки биомассы получали путем измельчения соломы. Следует отметить, что использование твердых добавок в процессе измельчения

приводит к уменьшению тонины помола, однако вносит балластные вещества в реакционную смесь. На рис. 1 приведен фракционный состав помолотой с различными добавками биомассы мискантуса. Добавки брали в соотношении 10 % по массе. Ранее нами было показано, что после помола с речным песком и поташем процесс ферментативного гидролиза биомассы мискантуса происходит эффективнее в 2,0 и 2,3 раза, соответственно (Слынько и др., 2013). Для ферментирования были использованы образцы биомассы мискантуса, канареечника и кендыря, помолотые без добавок. К концу вегетации стебель сиды грубеет и деревенеет, поэтому для увеличения эффективности гидролиза образец биомассы сиды был измельчен с добавкой речного песка (10 %).

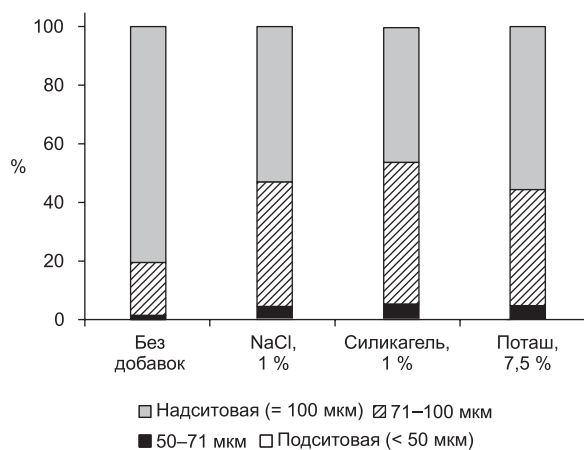


Рис. 1. Фракционный состав помолотой с различными добавками биомассы мискантуса.

После помола были последовательно проведены щелочная обработка 1 %  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  при 100 °С, обработка щелочной перекисью, ферментативный гидролиз целлюлазами ЦеллолюксА и ЦеллолюксF. На рис. 2 приведены результаты анализа гидролизатов биомассы мискантуса на содержание восстанавливающих сахаров после обработки перекисью водорода в различных концентрациях. Исходя из приведенных на рис. 2 данных далее для предобработки биомассы использовали концентрацию перекиси водорода 4 %. Аналогичную предобработку провели для всех образцов биомассы. Ферментативный гидролиз проводили 72 ч для всех образцов. Отношение массовых долей

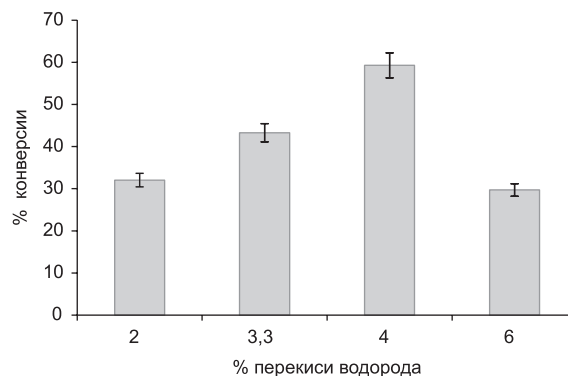
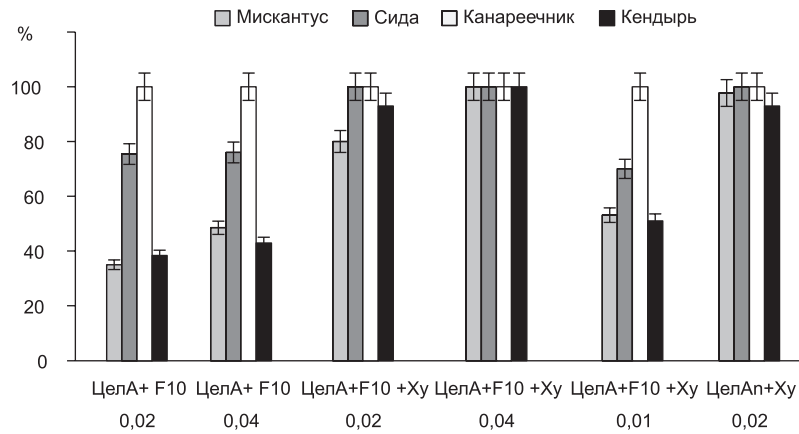


Рис. 2. Подбор концентрации перекиси водорода для обработки биомассы перед ферментативным гидролизом. Долю конверсии (в %) определяли по соотношению взятой исходно биомассы к концентрации общих восстанавливающих сахаров в гидролизате.

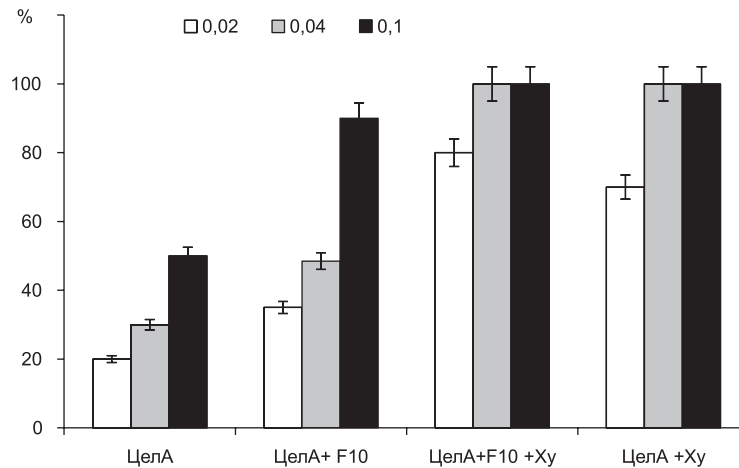
ферментативной смеси к биомассе и состав ферментативных смесей указаны в подписях к рисункам. Гидролиз целлюлазой Целлолюкс А (ЦелА) в комбинации с целлобиозой F10 (F10) и ксиланазой из *T. lanuginosus* (Ху) проводили при 55 °С, гидролиз целлюлазой из *A. niger* (ЦелАn) в комбинации с ксиланазой из *T. lanuginosus* (Ху) при 37 °С (рис. 3 и 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Гликозид гидролазы – большой класс ферментов, осуществляющих широкий спектр реакций, включая расщепление целлюлозы и гемицеллюлозы до моносахаридов (Bhalla *et al.*, 2013). Эффективный гидролиз целлюлоз требует совместного действия эндо- и экзоглюканаза, взаимодействующих с нерастворимым субстратом, и  $\beta$ -глюкозидаз, расщепляющих олигосахара. Эндоглюканызы случайным образом разрушают внутренние гликозидные связи, тем самым быстро увеличивая количество восстанавливающих концов цепей полисахаридов. Экзоглюканызы отщепляют олигосахара (главным образом, целлобиозу) с восстанавливающего или невосстанавливающего концов, что приводит к быстрому высвобождению олигосахаров, но медленному уменьшению длины полимера (Zhang *et al.*, 2006). Для эффективного гидролиза растительной биомассы необходим гидролиз целлобиозы, так как целлобиоза ингибирует эндо- и экзоглюканызы (Shen *et al.*,



**Рис. 3.** Ферментативный гидролиз биомассы целлюлазой Целлолюкс А (ЦелА) в комбинации с целлобиазой F10 (F10) и ксиланазой из *T. lanuginosus* (Ху); и целлюлазой из *A. niger* (ЦелАn) в комбинации с ксиланазой из *T. lanuginosus* (Ху). По горизонтали указано массовое соотношение ферментативного комплекса и биомассы в реакционной смеси (г/г). По вертикали указаны проценты гидролизованной холоцеллюлозы.



**Рис. 4.** Ферментативный гидролиз биомассы мискантуса целлюлазой Целлолюкс А (ЦелА) в комбинации с целлобиазой F10 (F10) и ксиланазой *T. lanuginosus* (Ху). По горизонтали указано массовое соотношение ферментативного комплекса и биомассы в реакционной смеси (г/г). По вертикали указаны проценты гидролизованной холоцеллюлозы.

2008). Расщепление целлобиозы до глюкозы осуществляется  $\beta$ -глюкозидазами. Именно этой активностью обладает целлобиоза F10, и ее добавление в состав реакционной смеси повышает эффективность гидролиза более чем в 1,5 раза (рис. 4). Первичная клеточная стенка растений состоит из целлюлозных фибрилл, погруженных в матрикс, в состав которого входят другие полисахариды. Лигноцеллюлозная биомасса содержит примерно 70 % полисахаридов, состоящих из остатков гексозы (целлюлоза) и пентозы (гемицеллюлоза) (Aris-

tidou, Penttila, 2000). При полном гидролизе этих полисахаридов образуется смесь гексоз (глюкоза, галактоза, манноза) и пентоз (арабиноза, ксилоза) (Kumar *et al.*, 2008; Schädel *et al.*, 2010). Суммарное содержание целлюлозы и гемицеллюлозы (70 %) характеризует предельно возможную долю конверсии биомассы в сахара. Основной компонент гемицеллюлозы является разветвленным полимером, основа которого состоит из остатков D-ксилопираноз, соединенных  $\beta$ -1,4-связью. Ферментативный гидролиз гемицеллюлозы требует большого количества

активностей, в первую очередь эндо- $\beta$ -1,4-ксилазной. Для этой цели мы использовали ксиланазу из *T. lanuginosus* (Ху).

На рис. 3 видно, что обогащение реакционной смеси ксиланазой обеспечивает полный гидролиз холоцеллюлозы всех образцов биомассы. Причем для гидролиза биомассы сиды и канареечника можно исключить целлобиазу из реакционной смеси, содержащей ксиланазу. Небольшой целлобиазной активности, которой обладает один из ферментов реакционной смеси, оказалось достаточно. Для полного гидролиза биомассы мискантуса и кендыря добавка к смеси целлобиазы обязательна.

ЦеллолюксА, согласно описанию производителя, представляет собой комплексный ферментный препарат грибного происхождения, содержит в своем составе комплекс ферментов целлюлазно-глюканазно-ксилазанного действия. Однако этого комплекса недостаточно для полного гидролиза биомассы, даже при использовании соотношения фермента к биомассе 0,1 (рис. 4). Самой легко гидролизуемой из исследованных нами оказалась биомасса канареечника. Для полного гидролиза достаточно ферментативной смеси как на основе целлюлазы Целлолюкс А, так и на основе целлюлазы из *A. niger* с добавкой либо целлобиазы, либо ксиланазы, причем потребовалась минимальная из исследованных доз (см. рис. 3).

Использованные нами измельчение на мельнице и предобработка щелочной перекисью обеспечили оптимальные условия для последующего ферментативного гидролиза. Только для биомассы сиды механическая предобработка была усилена добавлением абразивного агента (песка). Основная цель предобработки – растворить гемицеллюлозу и сделать целлюлозу более доступной для ферментов. Ферментативные препараты без дополнительных предобработок не обеспечивают полный гидролиз биомассы. Так, например, В.В. Будаевой с соавт. (2013) ферментативный гидролиз пеллет из рапсовой соломы без химической предобработки позволил получить лишь 31 % конверсии биомассы. Для предобработки могут быть использованы как кислота (разбавленная или концентрированная), так и щелочь, но применение концентрированной кислоты менее привлекательно для производства по экологическим соображениям

(Wyman, 1996). В зависимости от температуры процесса, в реакционной системе при кислотной предобработке могут быть обнаружены такие продукты деградации углеводов полимеров и лигнина, как фурфурол, НМФ и фенольные соединения, которые ингибируют стадии ферментации (Saha *et al.*, 2005; Beg *et al.*, 2001).

Оптимальные условия для удаления лигнина из состава биомассы создает обработка щелочной перекисью, поэтому в условия щелочной предобработки (NaOH / Ca(OH)<sub>2</sub>) добавляется окисляющий агент – кислород или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Saha, Cotta, 2006). Тайские авторы провели сравнительный анализ гидролиза биомассы 18 различных травянистых растений, произрастающих в Таиланде. Доля конверсии биомассы в сахара составила для различных трав 50–62 % в пересчете на биомассу, что соответствовало 70–80 % в пересчете на массу гидролизуемых компонентов (холоцеллюлозы). В наших экспериментах удалось добиться 100-процентной конверсии в пересчете на массу гидролизуемых компонентов, что соответствует 70 % конверсии в пересчете на биомассу.

Различают три направления развития производства биомассы: увеличение общего количества биомассы, произведенной на гектар в год, поддержание устойчивой продуктивности при минимизация затрат и увеличение количества конечных продуктов, которое может быть произведено из единицы биомассы. В качестве потенциальных энергетических растений исследуют водоросли и высшие растения. Введение в агрокультуру новых видов растений, дающих большие урожаи биомассы с высоким содержанием целлюлозы и низким содержанием лигнина, выращиваемых традиционными методами сельского хозяйства, может оказаться перспективным направлением развития агропромышленного комплекса.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана бюджетным проектом VI.58.1.3 и грантом фонда Сколково № МГ 4/14.

## ЛИТЕРАТУРА

- Будаева В.В., Макарова Е.И., Скиба Е.А., Сакович Г.В., Симицкий В.В., Лисовский Д.Л., Ивашевич О.А. Исследование кислотного и ферментативного гидролиза пеллет из рапсовой соломы // Ползуновский вестник. 2013. № 3. С. 173–179.
- Слынько Н.М., Горячкова Т.Н., Шеховцов С.В., Банникова С.В., Бурмакина Н.В., Старостин К.В., Розанов А.С., Нечипоренко Н.Н., Вепрев С.Г., Шумный В.К., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Биотехнологический потенциал новой технической культуры – мискантус сорт Сорановский // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/1. С. 765–771.
- Aristidou A., Penttila M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization // Current Opinion Biotechnology. 2000. V. 11 (2). P. 187–198.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. P. 326–338.
- Bhalla A., Bansal N., Kumar S., Bischoff K.M., Sani R.K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes // Bioresour Technol. 2013. V. 128. P. 751–759.
- Erickson B., Nelson, J.E., Winters P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals // Biotechnol. J. 2012. V. 7. P. 176–185.
- Kumar R., Singh S., Singh O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. P. 377–391.
- Saha B.C., Cotta M.A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. P. 449–453.
- Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., Wu Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol // Proc. Biochem. 2005. V. 40. P. 3693–3700.
- Schädel C., Blöchl A., Richter A., Hoch G. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types // Plant Physiology Biochemistry. 2010. V. 48 (1). P. 1–8.
- Shen Y., Zhang Y., Ma T., Bao X., Du F., Zhuang G., Qu Y. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing  $\beta$ -glucosidase // Biores. Technol. 2008. V. 99. P. 5099–5103.
- Wyman C.E. Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor Francis. Washington, 1996. P. 417.
- Zhang P.Y., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement, screening and selection strategies // Biotechnol. Adv. 2006. V. 24. P. 452–481.

## TECHNOLOGY OF MISCANTHUS BIOMASS SACCHARIFICATION WITH COMMERCIALY AVAILABLE ENZYMES

T.N. Goryachkovskaya<sup>1,2</sup>, K.V. Starostin<sup>1,2</sup>, I.A. Meshcheryakova<sup>1</sup>, N.M. Slynko<sup>1,2</sup>, S.E. Peltek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,

e-mail: peltek@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Sunline LLC, Novosibirsk, Russia

### Summary

We analyzed the possibility of using commercially available enzymes with cellulolytic activity for saccharification of miscanthus biomass, Soranovsky variety, a new crop registered in Russia in 2013, in comparison to the saccharification of biomasses of *Phalaris arundinacea*, *Thrachomitum lancifolium*, and *Sida hermaphrodita*. For enzymatic hydrolysis, we used commercially available fungal cellulases: *Thermomyces lanuginosus* xylanase, *Aspergillus niger* cellulase, and *Pen. verruculosum* cellobiase and cellulase. A biomass was ground and incubated in alkaline peroxide. The highest rate of hydrolysis was observed with the *Phalaris arundinacea* biomass. We tested various combinations of enzymes and achieved 100 % conversion for all samples relative to the weight of hydrolyzable components, which corresponds to 70 % conversion of biomass.

**Keywords:** Miscanthus, hydrolysis of plant biomass, “green chemistry”, glycoside, hydrolase, cellulase, xylanase.