

УДК 547.458.8+577.152

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ

© *М.Я. Иоелович*

*Designer Energy Ltd, 2 Bergman St, Rehovot 76100 (Israel),
e-mail: bd895892@zahav.net.il*

Изучена кинетика ферментативного гидролиза образцов целлюлозы с различными структурными характеристиками. Установлено, что с увеличением кристалличности образцов целлюлозы скорость процесса их ферментативного гидролиза снижается. Для анализа кинетических кривых было использовано топохимическое уравнение Аврами – Колмогорова – Ерофеева (АКЕ). Расчеты кинетического параметра n показали, что скорость ферментативного гидролиза образцов целлюлозы с высокой степенью кристалличности определяется диффузией молекул фермента в целлюлозный субстрат. С уменьшением степени кристалличности целлюлозы вклад диффузии снижается, в то время как кинетический вклад в суммарную скорость процесса гидролиза возрастает.

Ключевые слова: целлюлоза, структура, ферментативный гидролиз, кинетика.

Введение

Одним из важных направлений современной биотехнологии является ферментативный гидролиз целлюлозы с целью получения глюкозы. Несмотря на многочисленные исследования, некоторые проблемы гидролиза целлюлозы не были решены, и среди них – кинетический механизм ферментативного гидролиза. Было установлено, что эффективный порядок процесса ферментативного гидролиза целлюлозы, как правило, ниже единицы. Это объясняется диффузионным ограничением скорости гидролиза [1–3]. Диффузионные процессы играют важную, а иногда и определяющую роль в гетерогенной системе, содержащей растворимый фермент и нерастворимый субстрат. Известно, что молекулы целлюлолитических ферментов имеют большую молекулярную массу, порядка 30–100 kDa. Вследствие этого гидролиз может лимитироваться процессом диффузии крупных молекул фермента в структуру целлюлозы.

Как известно, в случае гетерогенной реакции, осложненной диффузией, для описания кинетики интегрального процесса рекомендуется использовать топохимическое уравнение Аврами – Колмогорова – Ерофеева (АКЕ) [4–6]. В связи с вышесказанным, основной целью данной работы являлась проверка возможности применения уравнения АКЕ для изучения кинетического механизма ферментативного гидролиза образцов целлюлозы.

Рентгенографические исследования образцов проводили на дифрактометре «Rigaku Ultima Plus» (CuK α -излучение, $\lambda = 0,15418$ нм) в диапазоне углов $\varphi = 2\theta$ от 5 до 80°. Степень кристалличности (X) и аморфности (A) образцов целлюлозы определяли по методикам [7, 8]. Содержание альфа-целлюлозы и среднюю степень полимеризации (СП) целлюлозы определяли стандартными методами TAPPI T-203 и T-230 соответственно.

Экспериментальная часть

Иоелович Михаил Яковлевич – профессор, доктор химических наук, e-mail: bd895892@zahav.net.il

Объектами исследования являлись целлюлозные материалы, имеющие различные структурные характеристики (табл. 1).

Таблица 1. Характеристики образцов целлюлозы

Образцы	Альфа-Ц, %	СП	X	A
Сульфитная целлюлоза (СЦ)	95	1100	0,63	0,37
Крафт-целлюлоза (КЦ)	92	960	0,65	0,35
Мерсеризованная КЦ (КЦМ)	99	910	0,53	0,47
Фильтровальная бумага (ФБ)	99	1200	0,71	0,29
Хлопковая целлюлоза (ХЦ)	98	1600	0,69	0,31
Аморфизованная ХЦ (ХЦА)	97	1550	0,38	0,62
Мерсеризованная ХЦ (ХЦМ)	99	1520	0,55	0,45
Гидролизованная ХЦ (ХЦГ)	–	180	0,77	0,23
Микрокристаллическая целлюлоза (МСС)	–	170	0,75	0,25
Регенерированная целлюлоза (РЦ)	–	150	0,25	0,75

Ферментативный гидролиз образцов проводили целлюлолитическим ферментом GC-220 (Genencor Inc, США) с добавкой 25% об. бета-глюкозидазы NS-188 (Novozymes A/S, Дания) при pH=4.8 и температуре 50 °С [9]. Содержание целлюлозы в гидролизующей среде составляло 50 г/л. Доза целлюлолитического фермента была 12 мг/г целлюлозы. Степень конверсии целлюлозы в глюкозу (α) рассчитывали по формуле

$$\alpha = C_t / C_0, \quad (1)$$

где C_t – концентрация глюкозы после ферментативного гидролиза за время t , C_0 – максимальная концентрация глюкозы (0.3086 М) при полном превращении целлюлозы в глюкозу.

Обсуждение результатов

Кинетические кривые ферментативного гидролиза несухих образцов целлюлозы представлены на рисунке 1. При определенном времени гидролиза степень конверсии была выше для целлюлозного образца, имеющего более аморфизованную структуру. Сушка образцов вызывает снижение степени конверсии целлюлозы (рис. 2).

Для анализа экспериментальных кинетических кривых ферментативного гидролиза образцов целлюлозы было использовано топохимическое уравнение Аврами – Колмогорова – Ерофеева (АКЕ):

$$\ln(1 - \alpha) = -K t \cdot n, \quad (2)$$

где α – степень конверсии; K – коэффициент, зависящий от константы скорости; t – время, n – кинетический параметр, который характеризует кинетический механизм процесса, а именно: если $n = 1$, то это процесс первого порядка, если $n = 0,5$, то это чисто диффузионный процесс, а если n находится в диапазоне от 0,5 до 1, то это промежуточный случай, когда скорость процесса в той или иной степени осложнена диффузией.

С целью определения параметров n и K уравнение АКЕ было представлено в линейной логарифмической форме

$$\ln F = \ln K + n \ln t, \quad (3)$$

где $F = -\ln(1-\alpha)$.

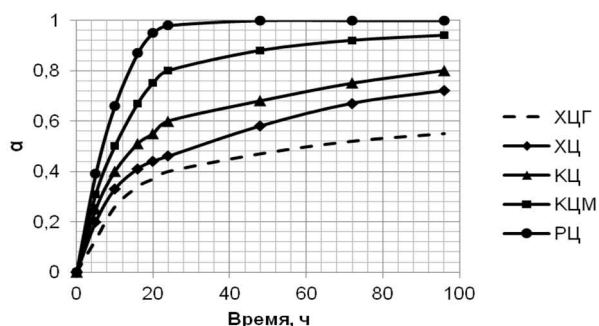


Рис. 1. Кинетические кривые ферментативного гидролиза несухих образцов целлюлозы

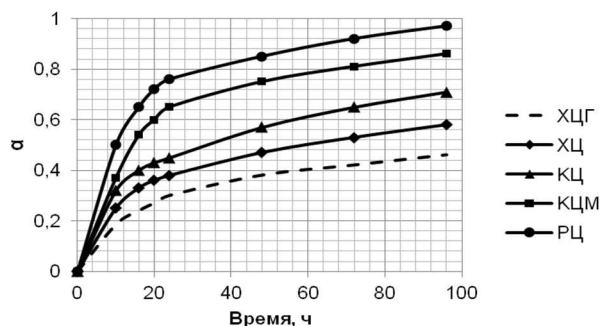


Рис. 2. Кинетические кривые ферментативного гидролиза сухих образцов целлюлозы

Проверка подтвердила, что экспериментальные кинетические кривые действительно можно линеаризовать в координатах уравнения (3), как это показано, например, на рисунке 3.

В результате обработки экспериментальных кривых для исследованных образцов целлюлозы были рассчитаны параметры уравнения АКЕ. Из расчетов следует (рис. 4), что для образцов целлюлозы с высокой степенью кристалличности (ХЦГ, МСС) кинетический параметр n составляет 0,5, что свидетельствует о диффузионном кинетическом механизме ферментативного гидролиза этих образцов. С уменьшением степени кристалличности и увеличением степени аморфности целлюлозы значение параметра n возрастает, что указывает на переход процесса в промежуточную область $0,5 < n < 1$, в которой скорость ферментативного гидролиза зависит как от кинетических, так и от диффузионных факторов. При этом с увеличением степени аморфности целлюлозы вклад диффузии снижается, а вклад кинетического фактора в интегральную скорость процесса возрастает. В случае полностью аморфной целлюлозы в несухом состоянии значение кинетического параметра n может достичь 1, что указывает на отсутствие диффузионных ограничений и переход к реакции первого порядка. Сушка целлюлозы образцов уменьшает объем пор и доступность структуры целлюлозы для ферментов, что снижает кинетический вклад и усиливает вклад диффузии в интегральную скорость процесса ферментативного гидролиза.

Параметр K в уравнении АКЕ также возрастает с увеличением степени аморфности целлюлозы (рис. 5). Кроме того, значение коэффициента K для несухих образцов выше, чем для высушенных образцов целлюлозы.

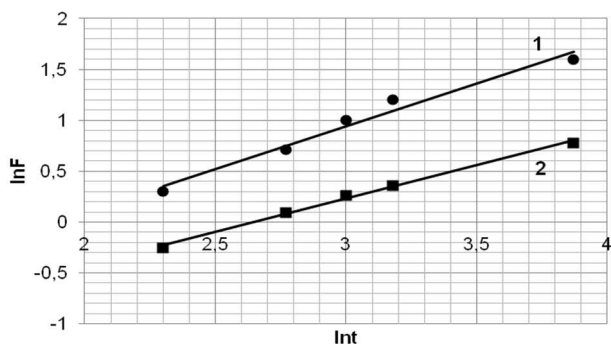


Рис. 3. Линеаризованные кинетики ферментативного гидролиза несухого (1) и сухого (2) образца регенерированной целлюлозы

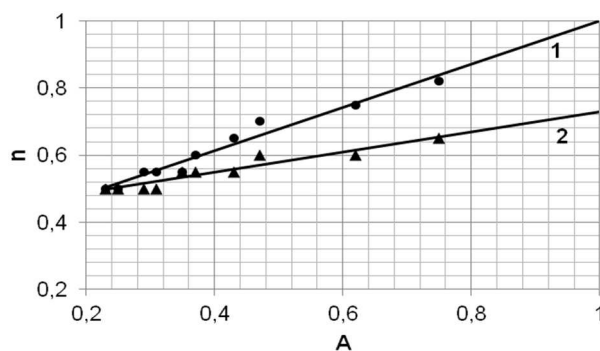


Рис. 4. Зависимость кинетического параметра n от степени аморфности целлюлозы в несухом (1) и сухом (2) состоянии

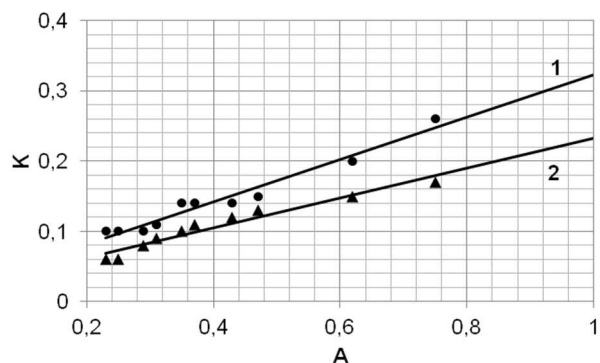


Рис. 5. Зависимость кинетического коэффициента K от степени аморфности целлюлозы в несухом (1) и сухом (2) состоянии

Выводы

1. Установлено, что с увеличением кристалличности и уменьшением пористости образцов целлюлозы скорость процесса их ферментативного гидролиза снижается.
2. Показано, что экспериментальные кинетические кривые ферментативного гидролиза образцов целлюлозы могут быть адекватно описаны с помощью топохимического уравнения Аврами – Колмогорова – Ерофеева (АКЕ).

3. На основе параметров уравнения АКЕ установлен вклад диффузионного и кинетического механизмов в интегральную скорость ферментативного гидролиза образцов целлюлозы с различной степенью кристалличности в сухом и влажном состояниях.

Список литературы

1. Ohmine K., Ooshima H., Harano Y. Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from *Trichoderma viride* // *Biotechnol. Bioeng.* 1983. Vol. 25. Pp. 2041–2053.
2. Sarkar A.K., Eters J.N. Enzymatic hydrolysis of cotton fibers: modeling using an empirical equation // *J. Cotton Sci.* 2004. Vol. 8. Pp. 254–260.
3. Wang Z., Xu J., Cheng J.J. Modeling biochemical conversion of lignocellulosic materials for sugar production – a review // *Bioresources*, 2011. Vol. 6, no. 4. Pp. 5282–5306.
4. Avrami M. Kinetics of phase change: transformation – time relations for random distribution of nuclei // *J. Chem. Phys.* 1940. Vol. 8. Pp. 212–224.
5. Gorbachev V.M. To the problem of applying the equation of Kolmogorov, Erofeev, Kazeev, Avrami and Mampel to the kinetics of non-isothermal transformations // *J. Thermal Analysis Calorimetry.* 1981. Vol. 20, no. 2. Pp. 483–485.
6. Зильберглейт М.А., Симхович Б.С., Резников В.М. Исследование процесса делигнификации древесины водными растворами уксусной кислоты // *Химия древесины.* 1987. №6. С. 28–34.
7. Ioelovich M. Accessibility and crystallinity of cellulose // *Bioresources.* 2009. Vol. 4, N3. Pp. 1168–1177.
8. Ioelovich M., Leykin A., Figovsky O. Study of cellulose paracrystallinity // *Bioresources.* 2010. Vol. 5, N3. Pp. 1393–1407.
9. Ioelovich M., Morag E. Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis // *Bioresources.* 2011. Vol. 6, N3. Pp. 2818–2834.

Поступило в редакцию 7 августа 2013 г.

Ioelovich M.Ia. THE KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE MATERIALS

*Designer Energy Ltd, 2 Bergman St, Rehovot 76100 (Israel),
e-mail: bd895892@zahav.net.il*

In this paper we study the kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose samples with different structural characteristics of. Found that with increasing crystallinity of cellulose samples speed the process of enzymatic hydrolysis decreases. For the analysis of the kinetic curves were used topochemical Avrami equation – Kolmogorov – Erofeev (AKE). Kinetic parameter n Calculations have shown that the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose samples with a high degree of crystallinity is determined by diffusion of the enzyme molecules into the cellulosic substrate. With the decrease of the crystallinity degree of cellulose contribution of diffusion decreases, while the contribution to the total kinetic rate of hydrolysis increases.

Keywords: cellulose, structure, enzymatic hydrolysis kinetics

References

1. Ohmine K., Ooshima H., Harano Y. *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, vol. 25, pp. 2041–2053.
2. Sarkar A.K., Eters J.N. *J. Cotton Sci.*, 2004, vol. 8, pp. 254–260.
3. Wang Z., Xu J., Cheng J.J. *Bioresources*, 2011, vol. 6, no. 4, pp. 5282–5306.
4. Avrami M. *J. Chem. Phys.*, 1940, vol. 8, pp. 212–224.
5. Gorbachev V.M. *J. Thermal Analysis Calorimetry*, 1981, vol. 20, no. 2, pp. 483–485.
6. Zil'bergleit M.A., Simkhovich B.S., Reznikov V.M. *Khimiya drevesiny*, 1987, no. 6, pp. 28–34. (in Russ.).
7. Ioelovich M. *Bioresources*, 2009, vol. 4, no. 3, pp. 1168–1177.
8. Ioelovich M., Leykin A., Figovsky O. *Bioresources*, 2010, vol. 5, no. 3, pp. 1393–1407.
9. Ioelovich M., Morag E. *Bioresources*, 2011, vol. 6, no. 3, pp. 2818–2834.

Received August 7, 2013