

УДК 577.15

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КОНВЕРСИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

© 2024 г. А. С. Аксенов<sup>1, \*</sup>, И. Г. Синельников<sup>2</sup>, А. Р. Шевченко<sup>1</sup>, К. А. Майорова<sup>1</sup>, Д. Г. Чухчин<sup>1</sup>, Д. О. Осипов<sup>2</sup>, М. В. Семёнова<sup>2</sup>, О. А. Синицына<sup>3</sup>, А. М. Рожкова<sup>2</sup>, **Е. В. Новожилов<sup>1</sup>**, А. П. Синицын<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, 163002 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологий” РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>3</sup>Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*email: a.s.aksenov@narfu.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

Определена реакционная способность восьми промышленно вырабатываемых образцов целлюлозы и полуцеллюлозы при ферментативном гидролизе препаратами гликозил-гидролаз B151 и F10, продуцируемых штаммом гриба-аскомицета *Penicillium verruculosum*. Впервые показано, что среди волокнистых полуфабрикатов, доступных на рынке целлюлозно-бумажной промышленности России, максимально высокий выход глюкозы от исходной древесины при биокатализе с использованием целлюлаз и гемицеллюлаз характерен для полуцеллюлоз, полученных после варки лиственной древесины с зеленым щелоком. Установлена высокая степень ферментативной конверсии белой сульфатной целлюлозы из хвойной древесины, что в сочетании с возможностью получения модифицированных полисахаридных материалов из негидролизующего остатка делает данный субстрат наиболее перспективным для развития биохимических подходов на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности. Показано, что высушивание полуфабрикатов отрицательно влияет на эффективность гидролиза целлюлозы, а механический размол улучшает показатели процесса ферментативного осахаривания.

**Ключевые слова:** целлюлазы, ксиланазы, *P. verruculosum*, полуцеллюлоза, сульфатная варка, гемицеллюлозы, сульфитная делигнификация, биоэкономика

DOI: 10.31857/S0555109924030068 EDN: EWVSDY

Получение продуктов с высокой добавленной стоимостью из древесины все чаще подразумевает применение различных биохимических методов [1, 2]. Важное место при разработке принципиально новых и совершенствовании существующих технологий переработки лигноцеллюлозного сырья занимает ферментативный гидролиз полисахаридов [3, 4]. Например, частичная биокаталитическая деструкция глюкуронооксиана в сульфатной целлюлозе позволяет снизить расход химикатов при последующей отбелке [5]. Глубокий ферментативный гидролиз древесных целлюлозы и гемицеллюлоз до моносахаридов позволяет производить не только биотопливо, но и органические кислоты, аминокислоты и другие продукты микробиологического синтеза [6]. На предприятиях отечественной целлюлозно-бумажной промышленности (ЦБП) ранее осуществлялась биохимическая переработка сахаров

сульфитных щелоков, которые являлись отходами кислого сульфитного способа варки хвойной древесины, в этанол [7]. В настоящее время многие заводы перешли на бисульфитный способ варки или закрыты по экологическим причинам. Несмотря на это, потенциал получаемых целлюлозных продуктов для биохимических производств раскрыт далеко не в полном объеме.

Для увеличения реакционной способности целлюлозосодержащих материалов, особенно древесных, требуется предварительная обработка, направленная на измельчение растительного сырья, разрушение кристаллической структуры целлюлозы, полное или частичное удаление лигнина [8–11]. Предлагаемые способы направлены на разрушение лигноуглеводной матрицы и частичную делигнификацию: паровой взрыв (автогидролиз) [12, 13], обработка кислотами и щелочами [14], варка с органическими растворителями [15, 16]

и эвтектическими смесями [17], с “зелеными” химикатами [18], применение ионных жидкостей [19]. Для повышения эффективности процессов применяют одновременно несколько видов воздействия на сырье. Следует при этом отметить, что в литературе практически не рассматриваются доступность, стоимость и опыт промышленной регенерации используемых реагентов.

На целлюлозных заводах в основном цикле производства применяются следующие методы, которые можно рассматривать как подготовительные стадии к последующему ферментативному гидролизу полисахаридов: измельчение древесины до технологической щепы, химические методы делигнификации при варке и отбелке целлюлозы, размол при изготовлении бумаги и картона и другие. В результате получают волокнистые полуфабрикаты с различным выходом от исходной древесины: полуцеллюлоза лиственная (выход от абсолютной сухой древесины, а.с.д. – 75–80%), технические целлюлозы, полученные сульфатным и сульфитным способом из хвойных и лиственных пород древесины (выход – 40–55% от а.с.д.). Способы удаления лигнина, которые используются при получении технических целлюлоз из древесины, являются эффективными и экономически оправданными. При производстве небеленой целлюлозы в ходе варки растворяется до 95% лигнина древесины, при выработке белой целлюлозы практически полностью удаляется остаточный лигнин, оказывающий как правило негативный эффект на биокаталитические процессы, обусловленный сокращением доступной для ферментов поверхности целлюлозных волокон и непродуктивной адсорбцией целлюлаз на лигнине [20–22]. Таким образом, получаемые в ЦБП волокнистые полуфабрикаты, представляющие собой смесь целлюлозы и гемицеллюлоз (общее содержание 80–95%) с определенным количеством примесей в зависимости от типа варки и породы древесины, выступают подготовленными субстратами для ферментативной конверсии в простые сахара [23–25].

В России созданы рекомбинантные штаммы *Penicillium verruculosum* (синоним *Talaromyces verruculosus*) – продуценты комплекса ферментов, эффективных при ферментативном осахаривании различных лигноцеллюлозных материалов [26, 27]. Показана высокая реакционная способность полуфабрикатов ЦБП – целлюлозы и полуцеллюлозы при биокаталитической конверсии ферментными препаратами *P. verruculosum* [28–31]. Вместе с тем отсутствует многосторонний анализ биохимических превращений полуфабрикатов ЦБП, выпускающихся в настоящее время как товарные продукты по отработанным технологиям, как с высоким выходом (полуцеллюлозы), так

и с низким (беленые сульфатные и сульфитные целлюлозы).

Цель работы – оценка способности к ферментативному гидролизу различных видов технических целлюлоз и полуцеллюлоз, получаемых на предприятиях химико-лесного комплекса России.

## МЕТОДИКА

**Отбор образцов волокнистых полуфабрикатов.** В качестве субстратов для ферментативного осахаривания использовали образцы целлюлозных полуфабрикатов с известными выходами, промышленно выработанных на 3-х целлюлозных заводах России, расположенных на территории Архангельской и Ленинградской областей. Были отобраны образцы белой и небеленой технической лиственной и хвойной целлюлозы, полученной путем традиционных сульфатной [30], сульфитной варок [31] и реже используемых режимов варки – нейтрально-сульфитной и варки в зеленом сульфатном щелоке [28]. Долю остаточного лигнина определяли в образцах полуфабрикатов после предварительной спиртовой экстракции по стандартным методикам, основанным на кислотном гидролизе полисахаридов и последующем определении суммарного и количества нерастворимого и кислоторастворимого лигнинов [35]. Для определения полисахаридного состава [38] исходных проб целлюлозы и полуцеллюлозы лиофильно высушенные образцы подвергали исчерпывающему гидролизу и последующему анализу с использованием ВЭЖХ системы LC-20 Prominence (“Shimadzu”, Япония) с постколоночной дериватизацией сахаров аргинином и флуориметрическим детектированием продуктов. Разделение проводили на колонке Shim-pack ISA-07/S2504 (“Shimadzu”, Япония) 250 × 4 мм. Содержание ключевых компонентов в составе целлюлозных полуфабрикатов приведено в табл. 1.

**Ферментные препараты.** Для определения реакционной способности целлюлозных полуфабрикатов к биокаталитической конверсии использовали лабораторные ферментные препараты, продуцируемые штаммами гриба-аскомицета *P. verruculosum*: препарат В151#3–340.н, содержащий комплекс карбогидраз (целлобиогидролаз, эндоглюканаз, эндоксилаза), и препарат F10#3–341.н, основным компонентом которого является β-глюкозидаза. Субстратную специфичность ферментных препаратов по отношению к фильтровальной бумаге (ФБ), натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ); березовому ксилану (ксилан); микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), *n*-НФ-β-D-глюкопиранозиду (*n*-НФГ) и целлобиозе определяли в соответствии с методами [39, 40]. Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури [41]. Общие

**Таблица 1.** Компонентный состав промышленных целлюлозных полуфабрикатов

Название	Порода	Выход от древесины**, %	Основные компоненты, %		
			Целлюлоза	Гемичеселлюлозы	Лигнин
Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза	Береза/осина	77	61.6	15.4	22.0
Полуцеллюлоза после варки с зеленым щелоком	Береза/осина	78	60.6	16.8	21.6
Беленая сульфатная целлюлоза	Береза/осина	45	72.3	25.1	—
Небеленая сульфатная целлюлоза	Береза/осина	49	70.9	24.6	2.0
Беленая сульфатная целлюлоза (с КЩО*)	Береза/осина	44	74.5	23.3	—
Беленая сульфатная целлюлоза	Сосна/ель	40	80.3	19.4	—
Небеленая сульфатная целлюлоза	Сосна/ель	47	78.8	18.9	3.0
Беленая сульфитная целлюлоза	Ель	42	78.5	15.8	—

\* Кислородно-щелочная обработка; \*\* значения выходов полуфабрикатов от исходной древесины при промышленной реализации различных термохимических стадий.

и удельные активности использованных ферментных препаратов приведены в табл. 2.

**Подготовка целлюлозосодержащих субстратов-полуфабрикатов ЦБП к ферментативному гидролизу.** Образцы целлюлозных полуфабрикатов подвергали размолу на промышленной дисковой мельнице по ГОСТ 14363.4–89. Преимущественно проводили ферментативный гидролиз не подвергавшихся сушке образцов полуфабрикатов. Для исследования влияния ороговения целлюлозных волокон и анализа углеводного состава полуфабрикатов производили лиофильную сушку на установке FreeZone 2,5 (“Labconco”, США).

**Ферментативный гидролиз целлюлозных полуфабрикатов.** Ферментативный гидролиз проводили при концентрации субстрата 50–100 г/л по сухому веществу при 50°C с постоянным перемешиванием 150–250 об./мин в лабораторных биореакторах двух типов: ферментере Biostat A Plus 1L (“Sartorius”, Германия) и шейкере – инкубаторе ES-200 (“Biosan”, Латвия). Для поддержания оптимального pH в реакционной смеси применяли 0.1 М Na-ацетатный буфер (pH 5.0). Использовали смесь ферментных препаратов *P. verrucosum* B151 и F10 с расходом 10 мг белка/г а.с.в. (7 ед. АФБ/г) и 3 мг белка/г а.с.в. (210 единиц целлюлозной активности/г) соответственно.

**Анализ реакционной способности к гидролизу промышленных полуфабрикатов.** Выбранный в данной работе подход предполагает проведение ферментативного гидролиза промышленных видов

целлюлозных полуфабрикатов в одинаковых условиях, что дает возможность сравнить и оценить их реакционную способность и потенциальный выход глюкозы и восстанавливающих сахаров. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по методу Шомоди–Нельсона [40]. Концентрацию глюкозы измеряли глюкозооксидазно-пероксидазным методом с использованием автоматического анализатора мембранного типа “Энзискан Ультра” (Лабовэй, Россия). Реакционную способность древесных полисахаридов при ферментативном осахаривании оценивали по степени гидролиза до восстанавливающих сахаров [30], а также выходу глюкозы от а.с.в. [31].

**Электронная микроскопия.** С целью исследования изменений целлюлозных волокон в ходе ферментативного гидролиза провели микроскопию лиофильно высушенных образцов биомодифицированных полуфабрикатов после 24 ч гидролиза. Микрофотографии образцов получены на электронном микроскопе ZEISS “SIGMA VP” (“Carl Zeiss”, Германия) с применением технологии напыления слоя золото-палладиевой смеси толщиной до 5 нм на установке Q150T ES (Quorum, Великобритания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Древесина хвойных и лиственных пород по потенциалу для биохимических производств превосходит многие недревесные виды растительного

Таблица 2. Общие и удельные активности ферментных препаратов *P. verruculosum*

Препарат	ФБ	КМЦ	МКЦ	Ксилан	n-НФГ	Целлобиоза
Активность, ед/г препарата						
B151#3-340.н	706	18830	–	25000	1670	–
F10#3-341.н	186	7000	853	3800	39850	46660
Активность, ед/мг белка						
B151#3-340.н	0.7	19.7	–	26.2	1.8	–
F10#3-341.н	0.3	10.7	1.3	5.8	60.8	71.2

сырья. Суммарное содержание полисахаридов в древесине сопоставимо с их содержанием в зерновом сырье [42, 43]. Теоретически возможный выход моносахаридов при гидролизе составляет 66–72% от а.с.д. [44]. В результате процессов делигнификации древесной щепы и отбелки полуфабрикатов доля целлюлозы в полуфабрикатах возрастает (табл. 1). С точки зрения потенциального образования глюкозы в ходе гидролиза, полуфабрикаты из хвойных пород древесины имеют несомненное преимущество перед листовыми образцами и недревесными видами целлюлозосодержащих материалов.

Для коммерциализации биохимической переработки полисахаридов полуцеллюлоз и технических целлюлоз предприятия ЦБП обладают рядом преимуществ: на действующих заводах уже перерабатывают хвойные и листовые породы древесины в крупных масштабах (до 4–5 млн м<sup>3</sup>), они имеют развитую инфраструктуру, обученный персонал, водные ресурсы, действующее энергохозяйство, отлаженную систему регенерации химикатов и тепла. Главное направление развития биохимических производств – получение продуктов с высокой добавленной стоимостью как из целевых продуктов ферментативного гидролиза – глюкозы и других сахаров, так и из твердых и жидких отходов, образующихся при биокатализе.

Наиболее популярным и востребованным полуфабрикатом является сульфатная целлюлоза. Сульфатная варка представляет собой процесс селективной делигнификации древесины под действием гидросульфид-анионов в щелочной среде в диапазоне температур 140–175°C. Образующийся в результате варки черный щелок – отработанный варочный раствор, обогащенный продуктами щелочной деполимеризации основных компонентов древесины (лигнин, компоненты гемицеллюлозного происхождения, экстрактивные вещества и др.), направляется на сжигание и каустизацию, тем самым на сульфат–целлюлозных заводах производится регенерация реагентов и тепловой энергии [30]. Значительная часть сульфатной целлюлозы

вырабатывается в беленом виде по технологии без применения молекулярного хлора. После химического и механического воздействия такие полуфабрикаты имеют более низкую степень полимеризации по сравнению с целлюлозой в природном состоянии, практически не содержат лигнин и смолы. Беленая сульфатная хвойная целлюлоза обладала максимальной реакционной способностью при ферментативном гидролизе комплексом карбогидраз *P. verruculosum* среди всех изучаемых субстратов (табл. 3). За 48 ч процесса степень конверсии субстрата превышала 80%, среди растворимых продуктов преобладала глюкоза. Для листовых образцов была характерна существенная разница в степени гидролиза и количестве образующихся гексоз, что связано с компонентным составом и локализацией нецеллюлозных полисахаридов. Известно, что сульфатные целлюлозы из листовых пород древесины содержат больше ксилана, так как в среде белого сульфатного щелока за счет удаления уроновых остатков происходит стабилизация ксиланов. Данный эффект проявлялся в виде адсорбции полимера на поверхности целлюлозных волокон к концу варки, что обеспечивало повышение выхода полуфабриката и улучшение бумагообразующих свойств волокна [45]. Благодаря высокой эндоксилазной активности используемых ферментных препаратов *P. verruculosum* в растворимых продуктах гидролиза листовых целлюлоз происходил глубокий гидролиз ксиланов, сопровождавшийся накоплением ксилозы и ксилоолигосахаридов различной длины цепи [30, 31].

Сульфитные методы делигнификации древесины предполагают частичную кислотную деградацию легкогидролизуемых древесных полисахаридов под действием активного реагента диоксида серы при 140–150°C, а также гидролиз и переход в раствор лигнина в форме лигносульфонатов [31]. Несмотря на то, что сульфитные способы утратили свое значение и доля полуфабрикатов на рынке целлюлозно-бумажной продукции не превышает 5–10%, опыт реализации крупномасштабных биохимических производств сохранился в виде

**Таблица 3.** Результаты ферментативного осахаривания целлюлозных полуфабрикатов различных производственных режимов

№ обр.	Вид технической целлюлозы	Дополнительная обработка	Степень конверсии, %	Выход глюкозы от субстрата, %
Полуфабрикаты из лиственных пород древесины				
1	Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза	—	34	21
2	Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза	Размол (22°ШР)	39	22
3	Полуцеллюлоза после варки с зеленым щелоком	—	59	47
4	Полуцеллюлоза после варки с зеленым щелоком	Размол (70°ШР)	62	49
5	Беленая сульфатная целлюлоза	—	70	59
6	Беленая сульфатная целлюлоза	Сушка	52	41
7	Небеленая сульфатная целлюлоза	—	56	47
8	Беленая сульфатная целлюлоза (с КЩО)	—	55	42
Полуфабрикаты из хвойных пород древесины				
9	Беленая сульфатная целлюлоза	—	84	83
10	Небеленая сульфатная целлюлоза	—	64	61
11	Беленая сульфатная целлюлоза	Сушка	44	39
12	Беленая сульфитная целлюлоза	—	78	72
13	Беленая сульфитная целлюлоза	Сушка	45	43

\* Степень размола, в единицах Шоппер–Риглера.

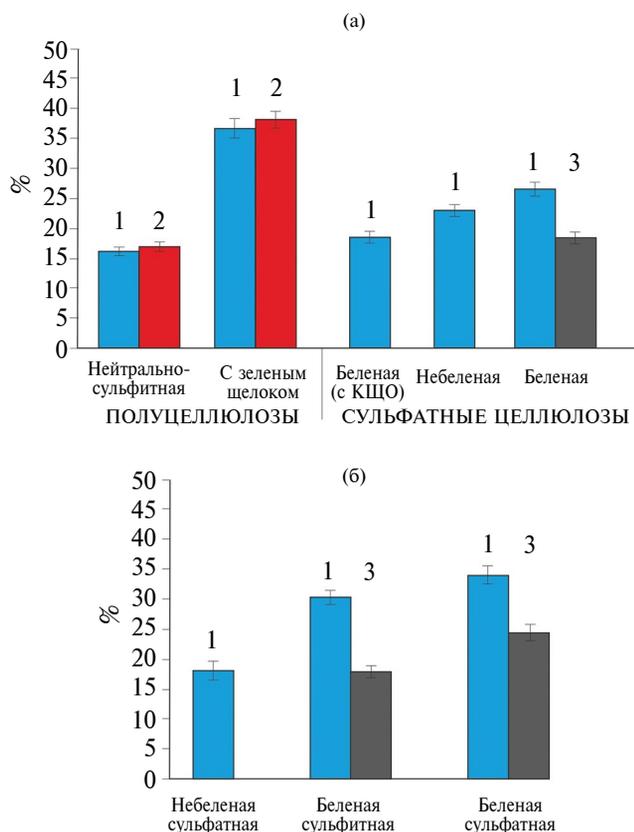
непрерывного культивирования продуцентов кормовой биомассы на среде с сульфитными щелоками [46, 47]. Беленая сульфитная целлюлоза вырабатывается из хвойных пород древесины и обладает высокой реакционной способностью при ферментативном гидролизе (табл. 3).

Полуфабрикаты высокого выхода, полуцеллюлозы, производят в больших объемах из лиственных пород древесины. Нейтрально-сульфитный способ предполагает варку с использованием сульфита натрия при рН среды в интервале 6–8 и получение полуцеллюлозы с минимальной степенью деструкции целлюлозы. В результате ферментативного гидролиза нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы выход глюкозы не превышал 50% от исходных глюканов в субстратах. Способ варки полуцеллюлозы с зеленым щелоком экономически более обоснован, так как использует в качестве варочного раствора реагент, после хорошо отлаженной системы регенерации, существующей на сульфат–целлюлозных заводах. Щелочная среда и механизм делигнификации, близкий к сульфатному способу [28], обуславливал улучшенную реакционную способность данных полуфабрикатов

высокого выхода из древесины при ферментативном гидролизе. Степень конверсии и выход глюкозы сопоставимы с некоторыми образцами небеленых сульфатных целлюлоз.

Считается, что размол древесных полуфабрикатов положительно влияет на адсорбцию целлюлаз и улучшает реакционную способность целлюлозы при ферментативном гидролизе [48]. В настоящих исследованиях был обнаружен эффект размола двух видов полуцеллюлоз, но он не превышал 5%. Вероятно, это связано с тем, что интенсивная фибриляция целлюлозных волокон при размолу усиливала отрицательное действие лигнина.

Другим фактором, влияющим на реакционную способность древесных полуфабрикатов, является высушивание [28, 30, 49]. Полученные нами ранее результаты свидетельствовали о резком снижении степени ферментативного гидролиза как хвойных, так и лиственных сульфатных целлюлоз [30]. Необратимое ороговение волокон связано с поведением полисахаридов при высушивании, прежде всего гемицеллюлоз [49]. Наблюдалось образование более плотной структуры волокон, что существенно снижало доступность субстрата для



**Рис. 1.** Показатели выхода глюкозы от абсолютно сухой древесины (%), используемой в технологических процессах получения полуфабрикатов из лиственных (а) и хвойных пород (б): 1 – до высушивания; 2 – после размола; 3 – после высушивания.

биокатализаторов. В работе [50] показана более высокая степень ороговения сульфитной целлюлозы по сравнению с сульфатной, что объяснялось более низким содержанием ксилана и агрегацией целлюлозных молекул в кристаллических и аморфных областях при кислой сульфитной варке.

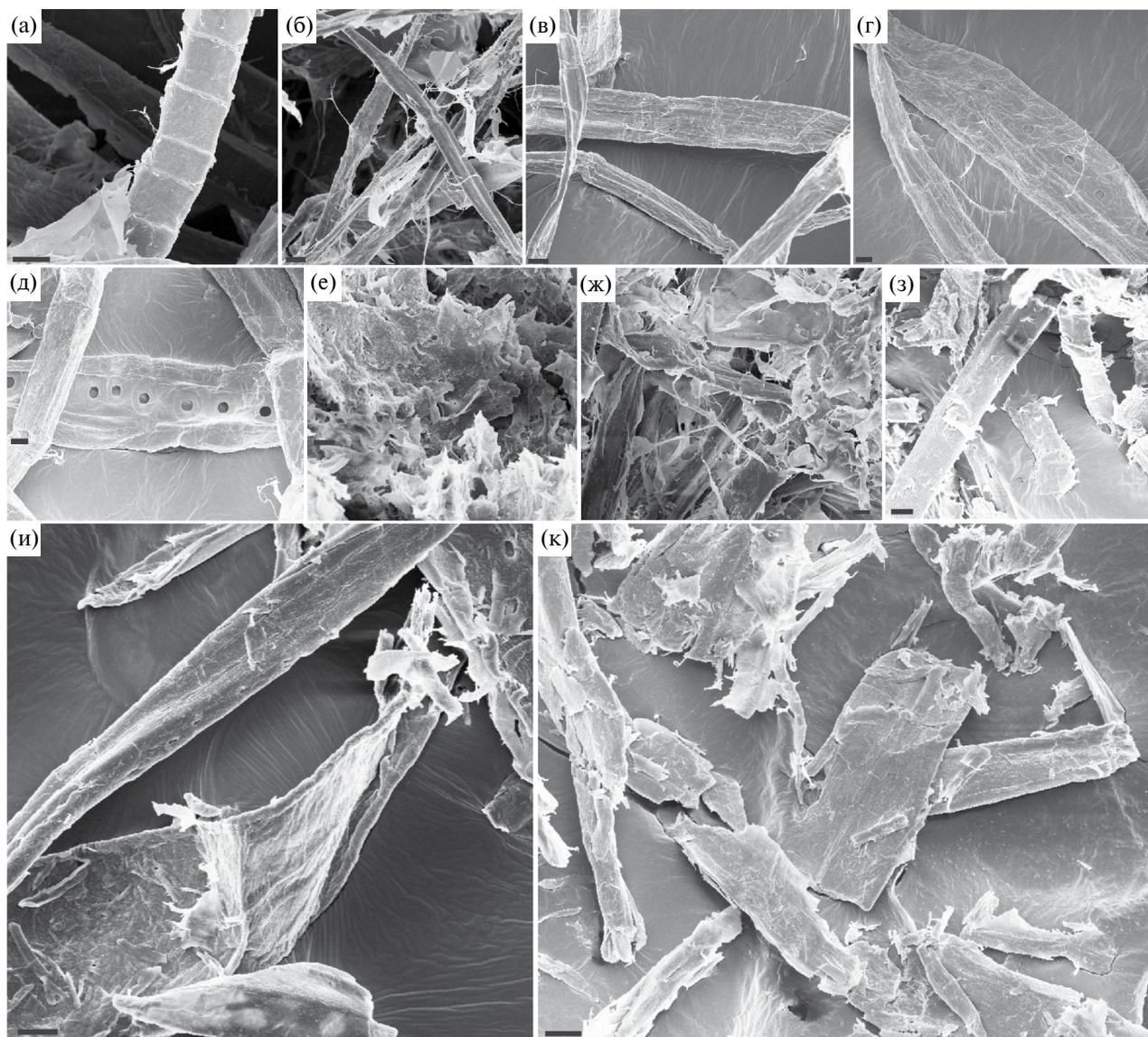
При ферментативном гидролизе различных образцов сухих технических целлюлоз препаратами *P. verruculosum* эффективность гидролиза снижалась на 25–50% (табл. 3). Для высушенной сульфатной целлюлозы из хвойных пород выход глюкозы при ферментативной конверсии уступал данному показателю для лиственной целлюлозы после сушки. Полученные результаты свидетельствовали в пользу целесообразности промышленной реализации гидролиза целлюлоз во влажном состоянии, без каких-либо дополнительных стадий высушивания на существующих предприятиях ЦБП.

Важным показателем оценки эффективности ферментативного осахаривания растительного сырья является степень конверсии до глюкозы исходного лигноцеллюлозного материала, с учетом его потерь в ходе стадий предварительной подготовки. Рассматриваемые способы подготовки (варка,

отбелка) не только улучшали реакционную способность получаемых субстратов, но и влияли на содержание в них полисахаридных компонентов. Если при получении полуфабрикатов высокого выхода происходит делигнификация и деструкция гемицеллюлоз, то при выработке белых технических целлюлоз происходит потеря более 55% компонентов древесины, в том числе и целлюлозы. Полуцеллюлозы, полученные методом варки с зеленым щелоком, наиболее перспективны в концепции биорефининга древесины, так как для них характерен максимальный выход глюкозы через 48 ч ферментативного гидролиза с использованием *P. verruculosum* (рис. 1). Кроме того, техническая реализация рассматриваемого метода предварительной подготовки к процессу биоконверсии может быть облегчена при интегрировании нового производства на существующем сульфат–целлюлозном предприятии. В этом случае становится возможным совместная регенерация химикатов и энергии с системой сульфатного способа делигнификации древесины.

Отрицательное влияние лигнина на ферментативный гидролиз промышленных целлюлоз не всегда подтверждается [35–37]. В сульфатных и сульфитных образцах целлюлозы содержание лигнина в количестве до 4% не оказывало существенного влияния на выход сахаров [35]. Объяснением такого явления может служить изменение структуры и свойств лигнина в ходе предобработки, которые в ряде случаев увеличивают эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы [36]. Например, показано, что сульфирование лигнина приводит к снижению неспецифической адсорбции целлюлаз и улучшению реакционной способности целлюлозных субстратов к ферментативному гидролизу [37]. Наши исследования подтверждают неоднозначное влияние концентрации лигнина на эффективность ферментативного получения сахаров из полуфабрикатов ЦБП: образцы № 3 и 7 имеют более высокую степень конверсии в сравнении с образцом № 8, с практически полностью удаленным лигнином в процессах варки и отбелки (табл. 3).

Беленые сульфатные целлюлозы обладали хорошей реакционной способностью при ферментативном гидролизе, но эффективность биопроцессов определялась технологическими особенностями конкретных целлюлозных заводов. Например, при использовании стадии кислородно-щелочной обработки (КЩО) полуфабрикатов с сокращением расхода хлорсодержащих отбеливающих химикатов, резко снижался выход глюкозы и других моносахаридов от древесины (табл. 3, рис. 1). Сульфатная целлюлоза из лиственных пород древесины, полученная по классической схеме отбеливания, без стадии КЩО, обладала высокой реакционной способностью при ферментативном гидролизе.



**Рис. 2.** Электронные микрофотографии образцов исходных волокнистых полуфабрикатов ЦБП и частично гидролизованных карбогидразами *P. verrucosum*: а – волокна нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы; б – волокна полуцеллюлозы, полученной варкой с зеленым щелоком; в-волокна лиственной беленой сульфатной целлюлозы; г – волокна хвойной беленой сульфатной целлюлозы; д – волокна хвойной беленой сульфитной целлюлозы; е – волокна нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы после ферментативной обработки (48 ч, степень конверсии 34%); ж – волокна полуцеллюлозы, полученной варкой с зеленым щелоком после ферментативной обработки (48 ч, степень конверсии 39%); з – волокна лиственной беленой сульфатной целлюлозы после ферментативной обработки (22 ч; степень конверсии 50%); и – волокна хвойной беленой сульфатной целлюлозы после ферментативной обработки (24 ч, степень конверсии 62%); к – волокна хвойной беленой сульфитной целлюлозы после ферментативной обработки (24 ч; степень конверсии 48%). Масштабная линейка – 10 мкм.

Основным преимуществом белых сульфатных целлюлоз в сравнении с полуцеллюлозами является возможность получения не только гидролизатов с высоким содержанием глюкозы и без растворимых фрагментов лигнина, но и новых полисахаридных продуктов с высокой добавленной стоимостью [31]. В результате ферментативного воздействия происходят структурно-морфологические изменения целлюлозных волокон, называемые

“ферментативной модификацией” [51] или “биомодификацией” [52]. Нерастворимый продукт гидролиза полуфабрикатов представляет собой полисахаридный комплекс, состоящий в основном из целлюлозы и гемицеллюлоз, с измененным по сравнению с исходным субстратом составом, кристалличностью, степенью полимеризации и другими параметрами, зависящими от степени ферментативной конверсии [53]. На первых этапах

гидролиза под действием эндоглюканаз происходит разрушение волокон целлюлозы до более коротких фрагментов с увеличением количества концевых групп, являющихся новыми активными центрами для действия целлобиогидролаз целлюлазного комплекса. Более продолжительное воздействие ферментов способствует глубокой деструкции аморфных областей полисахаридов с повышением доли кристаллической фракции с уменьшенной длиной волокна. Так в течение 48 часов средняя длина волокон образцов полуцеллюлоз сократилась в среднем в 8 раз (рис. 2е, 2ж), когда как для лиственной беленой сульфатной целлюлозы (рис. 2з), и хвойной беленой сульфатной (рис. 2и) и сульфитных целлюлоз (рис. 2к) данный показатель за более короткий промежуток времени снизился в 15–20 раз. Структурные и механические показатели полученных биомодифицированных полисахаридных комплексов позволяют рассматривать их в качестве альтернативы порошковым целлюлозам, широко используемым в пищевой и фармацевтической отраслях промышленности [54], а также в качестве матрицы для создания легких пористых криогелевых каркасов [53].

\* \* \*

Ферментативная конверсия полуфабрикатов ЦБП с использованием эффективных отечественных биокатализаторов позволяет получать гидролизаты, содержащие простые сахара, пригодные для дальнейшей микробной конверсии. Среди лигноцеллюлозных субстратов, доступных в промышленных объемах, максимально высокий выход глюкозы от исходной древесины при ферментативном гидролизе с использованием целлюлаз и гемицеллюлаз *P. verruculosum* характерен для полуцеллюлоз, полученных после варки лиственной древесины с зеленым щелоком. Установлена высокая степень ферментативной конверсии беленой сульфатной целлюлозы из хвойной древесины, что в сочетании с возможностью получения модифицированных полисахаридных материалов из негидролизуемого остатка делает данный субстрат наиболее перспективным для развития биохимических подходов на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности. Полученные результаты позволяют оценить потенциал различных методов физико-химического и механического воздействий на древесину, реализуемых на предприятиях химико-лесного России, с целью создания новых технологий получения продуктов микробиологического синтеза из ферментативных гидролизатов, богатых глюкозой.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.** Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22–24–20136).

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Braghiroli F.L., Passarini L.* // Current Forestry Reports. 2020. V. 6. P. 172–183. <https://doi.org/10.1007/s40725-020-00112-9>
2. *Gonçalves M.C.P., Romanelli J.P., Cansian A.B.M., Pucci E.F.Q., Guimaraes J.R., Tardioli P.W., Saville B.A.* // Ind. Crop. Prod. 2022. V. 186. 115213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115213>
3. *Семёнова М.В., Гусаков А.В., Телицин В.Д., Синуцын А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 5. С. 477–484. <https://doi.org/10.31857/S0555109921050147>
4. *Синуцын А.П., Синуцына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 6. С. 551–560. <https://doi.org/10.31857/S0555109920060161>
5. *Zhou B., Wang Y., Jiang Z., Salam A., Li K.* // J. Wood Chem. Technol. 2021. V. 41. № 4. P. 150–159. <https://doi.org/10.1080/02773813.2021.1938130>
6. *Kumar B., Verma P.* // Fuel. 2021. V. 288. 119622. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119622>
7. *Rabinovich M. L.* // Cell. Chem. Tech. 2010. V. 44. № 4. P. 173–186.
8. *Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J.* // Biores. Technol. 2010. V. 101. № 13. P. 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
9. *Zhu J.Y., Pan X.J.* // Biores. Tech. 2010. V. 101. № 13. P. 4992–5002. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>
10. *Hendriks A.T.W.M., Zeeman G.* // Biores. Technol. 2009. V. 100. № 1. P. 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
11. *Kucharska K., Rybarczyk P., Hołowacz I., Łukajtis R., Glinka M., Kamiński M.* // Molecules. 2018. V. 23. № 11. 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
12. *Asada C., Sasaki C., Uto Y., Sakafuji J., Nakamura Y.* // Biochem. Eng. J. 2012. V. 60. P. 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.013>
13. *Pielhop T., Amgarten J., von Rohr P.R., Studer M.H.* // Biotech. Biofuels. 2016. V. 9. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0567-1>
14. *Doménech P., Manzanares P., Álvarez C., Ballesteros M., Duque A.* // Holzforschung. 2020. V. 75. № 3. P. 250–259. <https://doi.org/10.1515/hf-2020-0068>

15. Vaidya A.A., Murton K.D., Smith D.A., Dedual G. // Biomass conv. Bioref. 2022. V. 12. № 11. P. 5427–5442. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02373-9>
16. Xu X., Wang K., Zhou Y., Lai C., Zhang D., Xia C., Pugazhendhi A. // Fuel. 2023. V. 338. P. 127361. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127361>
17. Zhao X., Zhan Y., Han L., Sun X., Zhang T., Zhao Z. // Processes. 2023. V. 11. № 4. P. 1293. <https://doi.org/10.3390/pr11041293>
18. Yin X., Wei L., Pan X., Liu C., Jiang J., Wan. K. // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. 670061. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670061>
19. Moniruzzaman M., Goto, M. // Appl. Ionic liq. Biotech. 2019. P. 61–77. [https://doi.org/10.1007/10\\_2018\\_64](https://doi.org/10.1007/10_2018_64)
20. Wu W., Li P., Huang L., Wei Y., Li J., Zhang L., Jin Y. // Biomass. 2023. V. 3. № 1. P. 96–107. <https://doi.org/10.3390/biomass3010007>
21. Przybysz Buzafa K., Kalinowska H., Małachowska E., Boruszewski P., Krajewski K., Przybysz P. // Energies. 2019. V. 12. № 15. 2952. <https://doi.org/10.3390/en12152952>
22. Cai C., Zhang C., Li N., Liu H., Xie J., Lou H., Pan X., Zhu J. Y., Wang F. // Renew. Sust. En. Rev. 2023. V. 183. 113445. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113445>
23. Van Wyk J.P.H. // Biomass Bioen. 1999. V. 16. № 3. P. 239–242.
24. Jin Y., Jameel H., Chang H. M., Phillips R. // J. Wood Chem. Tech. 2010. V. 30. № 1. P. 86–104. <https://dx.doi.org/10.1080/02773810903578360>
25. Buzafa K., Przybysz P., Rosicka-Kaczmarek J., Kalinowska H. // Cellulose. 2015. V. 22. P. 663–674. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0522-x>
26. Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Осипов Д.О. и др. // Лес. Вест. 2012. Т. 8. № 91. С. 129–135.
27. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 4. С. 312–333. <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-312-333>
28. Новожилов Е.В., Аксенов А.С., Демидов М.Л., Чухчин Д.Г., Доценко Г.С., Осипов, Д.О., Сеницын А.П. // Кат. Пром. 2014. Т. 4. С. 74–80. <https://dx.doi.org/10.1134/S2070050414040138>
29. Новожилов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкунова И.В., Рожкова А.М. и др.// Кат. Пром. 2015. Т. 5. С. 78–83. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-78-83>
30. Akseonov A.S., Tyshkunova I.V., Poshina D.N., Guryanova A.A., Chukhchin D.G., Sinelnikov I.G. et. al. // Catalysts. 2020. V. 10. 536. <https://doi.org/10.3390/catal10050536>
31. Shevchenko A.R., Mayorova K.A., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., Telitsin V.D. et al // Fermentation. 2023. V. 9. 936. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110936>
32. Saini J.K., Patel A.K., Adsul M., Singhania R.R. // Renewable Energy. 2016. V. 98. P. 29–42. <https://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.089>
33. Cai C., Li J., Hirth K., Huber G. W., Lou H., Zhu J. Y. // ChemSusChem. 2020. V. 13. P. 4649–4659. <https://doi.org/10.1002/cssc.202001120>
34. Brondi M.G., Elias A. M., Furlan F.F., Giordano R.C., Farinas C.S. // Sci. Rep. 2020. V. 10. 7367. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64316-6>
35. Aldaeus F., Larsson K., Srndovic J. S., Kubat M., Karlström K., Peciulyte A., Olsson L., Larsson, P. T. // Cellulose. 2015. V. 22. P. 3991–4002. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0766-0>
36. Huang C., Li R., Tang W., Zheng Y., Meng, X. // Fermentation. 2022. V. 8, 558. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100558>
37. Wang Z.J., Lan T.Q., Zhu J.Y. // Biotech. Biofuels. 2013. V. 6. 9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-9>
38. Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnäkki A., Saake B., Uotila K., Simolin H., Hemming J., Holmbom B. // Ind. Crops Prod. 2009. V. 29. P. 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.11.003>
39. Ghose T.K. // Pure Appl. Chem. 1987. V. 59, P. 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
40. Nelson, N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 2. P. 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)
41. Lowry O.H., Roseborough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275. [https://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
42. Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. // Biores. Technol. 2005. V. 96. № 6. P. 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
43. Sun S., Sun S., Cao X., Sun R. // Biores. Technol. 2016. V. 199. P. 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
44. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. М.: Лесная промышленность, 1989. 496 с.
45. Ek M.; Gellerstedt G., Henriksson G. Pulping Chemistry and Technology. / Eds. M. Ek, G. Gellerstedt, G.r Henriksson. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2009. V. 2. 471 p.
46. Мингазова Л.А., Канарский А. В., Крякунова Е.В., Канарская З.А. // Лесн. Журн. 2020. Т. 2. № 374. С. 146–158. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-2-146-158>

47. Новожиллов Е.В. // Лесн. Журн. 1999. Т. 2. № 3. С. 180–188.
48. Ko C.H., Chen F.J., Lee J.J., Tzou D.L.M. // Cellulose. 2011. V. 18. P. 1043–1054.  
<https://doi.org/10.1007/s10570-011-9534-y>
49. Laivins, G.V., Scallan, A.M. // Prod. Paper. 1993. V. 2. P. 1235–1260.  
<https://doi.org/10.15376/frc.1993.2.1235>
50. Rebuzzi, F., Evtuguin, D.V. // Macromol. Symposia. 2005. V. 232. № 1. P. 121–128.  
<https://doi.org/10.1002/masy.200551414>
51. Kamaya Y. // J. Ferm. Bioeng. 1996. V. 82. P. 549–553.  
[https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81250-0](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81250-0)
52. Garcia-Ubasart J., Torres A.L., Vila C., Pastor F.I.J., Vidal T. // Ind. Crop. Prod. 2013. V. 44. P. 71–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.019>
53. Shevchenko A.R., Tyshkunova I.V., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., Telitsin V.D. et al. // Catalysts. 2023. V. 13. № 1. 103.  
<https://doi.org/10.3390/catal13010103>
54. Mayorova K., Aksenov A., Shevchenko A. // AIP Conf. Proc. 2023. V. 2931, P. 030005-1-030005-8  
<https://doi.org/10.1063/5.0178421>

## Enzymatic Conversion of Wood Materials from the Pulp and Paper Industry

A. S. Aksenov<sup>a, \*</sup>, I. G. Sinelnikov<sup>b</sup>, A. R. Shevchenko<sup>a</sup>, K. A. Mayorova<sup>a</sup>, D. G. Chukhchin<sup>a</sup>,  
D. G. Osipov<sup>b</sup>, M. V. Semenova<sup>b</sup>, O. A. Sinitsyna<sup>c</sup>, A. M. Rozhkova<sup>b</sup>,  
E. V. Novozhilov<sup>a</sup>, A. P. Sinitsyn<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>Northern (Arctic) Federal University named after M. V. Lomonosov, Arkhangelsk, 163002 Russia

<sup>b</sup>Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>c</sup>Chemical Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

The reactivity during enzymatic hydrolysis of 8 industrially produced samples of pulps and semi-chemical pulps by enzyme preparations of glycosyl hydrolases B151 and F10 produced by a strain of ascomycete fungus *Penicillium verruculosum* has been determined. It is shown for the first time that among fibrous pulps available on the market of pulp and paper industry in Russia, the highest level of yield of glucose from the initial wood during biocatalysis using cellulases and hemicellulases is characteristic of semi-chemical pulps obtained after cooking of hardwood with green liquor. A high degree of enzymatic conversion of softwood bleached kraft pulp has been established, which in combination with the possibility of obtaining modified polysaccharide materials from non-hydrolysable residue makes this cellulosic substrate the most promising for the development of biological processes at pulp and paper industries. It is shown that drying of pulp negatively affects the efficiency of cellulose hydrolysis, while mechanical milling improves the performance of the enzymatic saccharification process.

**Keywords:** cellulases, xylanases, *P. verruculosum*, semi-chemical pulps, kraft pulping, hemicelluloses, sulfite delignification, bioeconomy