

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КОМПЛЕКС
ЦЕЛЛЮЛАЗ *Penicillium*
ДЛЯ ОСАХАРИВАНИЯ
ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ**

Аркадий П. Синицын

*Химический факультет МГУ
им.М.В.Ломоносова*

Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

Соавторы:

**Попов В.О.¹, Сеницына О.А.², Рожкова А.М.¹,
Федорова Е.А.², Морозова В.В.², Зоров И.Н.²,
Гусаков А.В.², Семенова М.В.¹, Кондратьева Е.Г.¹,
Саттрутдинов А.Л.¹, Короткова О.Г.¹, Осипов Д.О.¹,
Беккаревич А.О.³, Матыс В.Ю.³, Бубнова Т.В.³, Кошелев А.В.³,
Окунев О.Н.³**

¹ Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

² Химический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

Основные цели:

- Получить глюкозу и другие сахара, био-топливо (этанол & бутанол) и другие продукты из возобновляемой растительной биомассы и лигноцеллюлозного сырья с помощью принципов, методов и подходов биокатализа, т.е с помощью применения ферментов и микроорганизмов

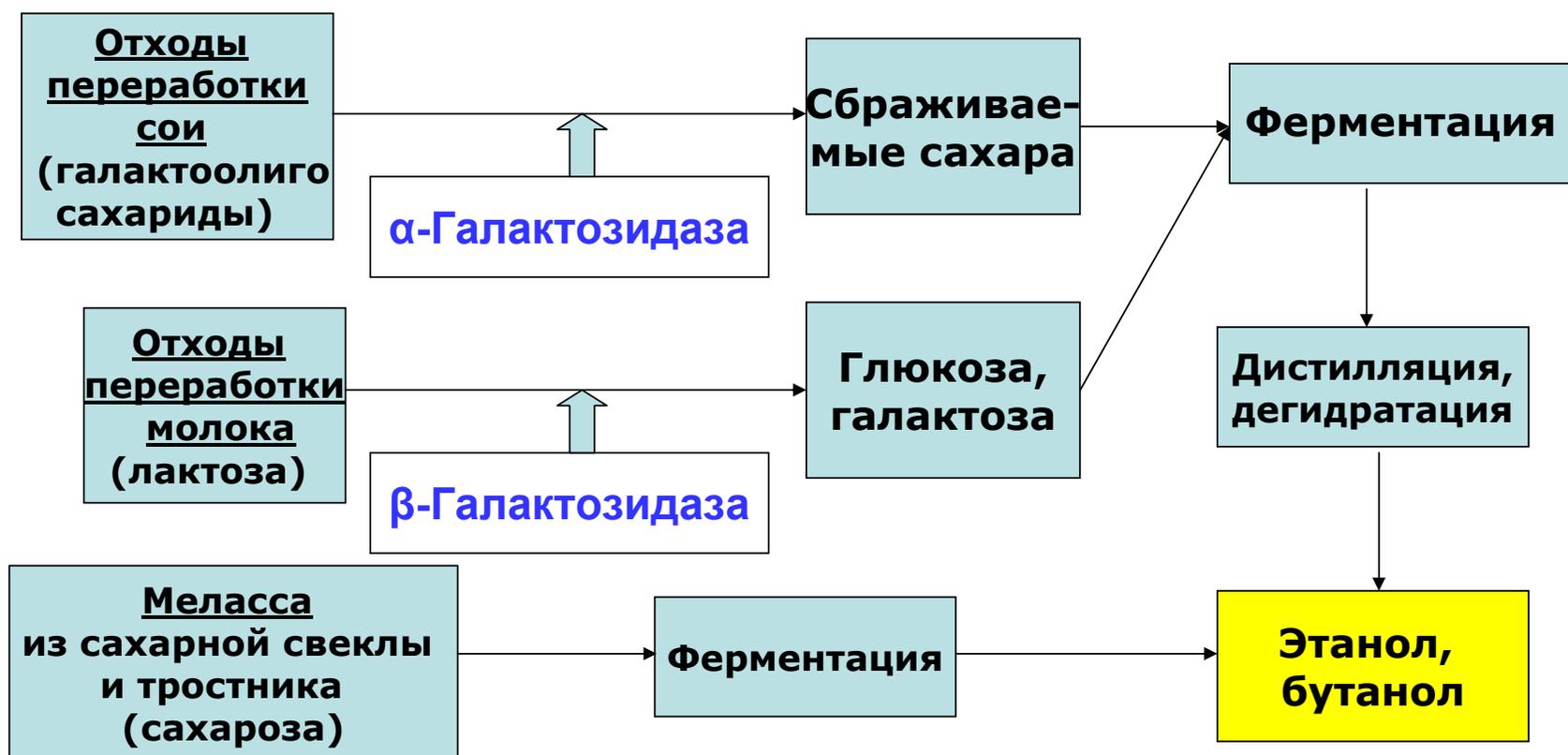
Стратегия достижения цели

- ❑ Идентификация видов возобновляемого сырья, характерных для определенных регионов, его доступности и цены
- ❑ Создание экономически оправданного биотехнологического процесса конверсии возобновляемого сырья в ферментируемые сахара, био-топливо и другие полезные продукты
- ❑ Достижение полной утилизации сырья, получение широкого спектра продуктов с высокой добавленной стоимостью, реализация принципа биофабрики

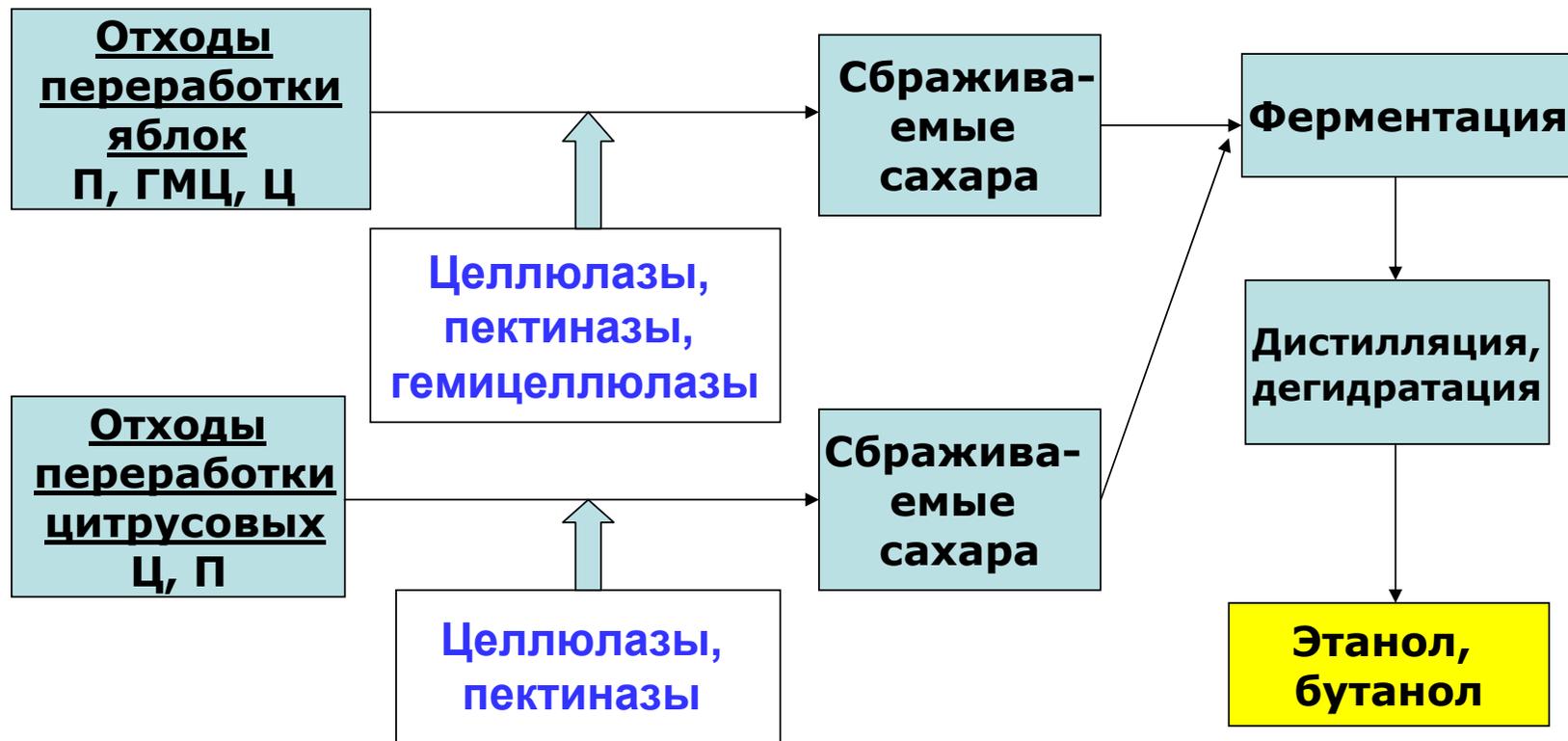
Виды возобновляемого углевод-содержащего сырья

- Сахароза, меласса (из сахарного тростника и сахарной свеклы)
- Отходы пищевой промышленности (переработки яблок, цитрусовых, сои, молока, и т.д.)
- Крахмалосодержащее сырье (зерно, картофель)
- Растительная биомасса
 - Древесина и отходы ее переработки
 - Однолетние растения, солома, трава, водоросли, и т.п.
 - Целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства

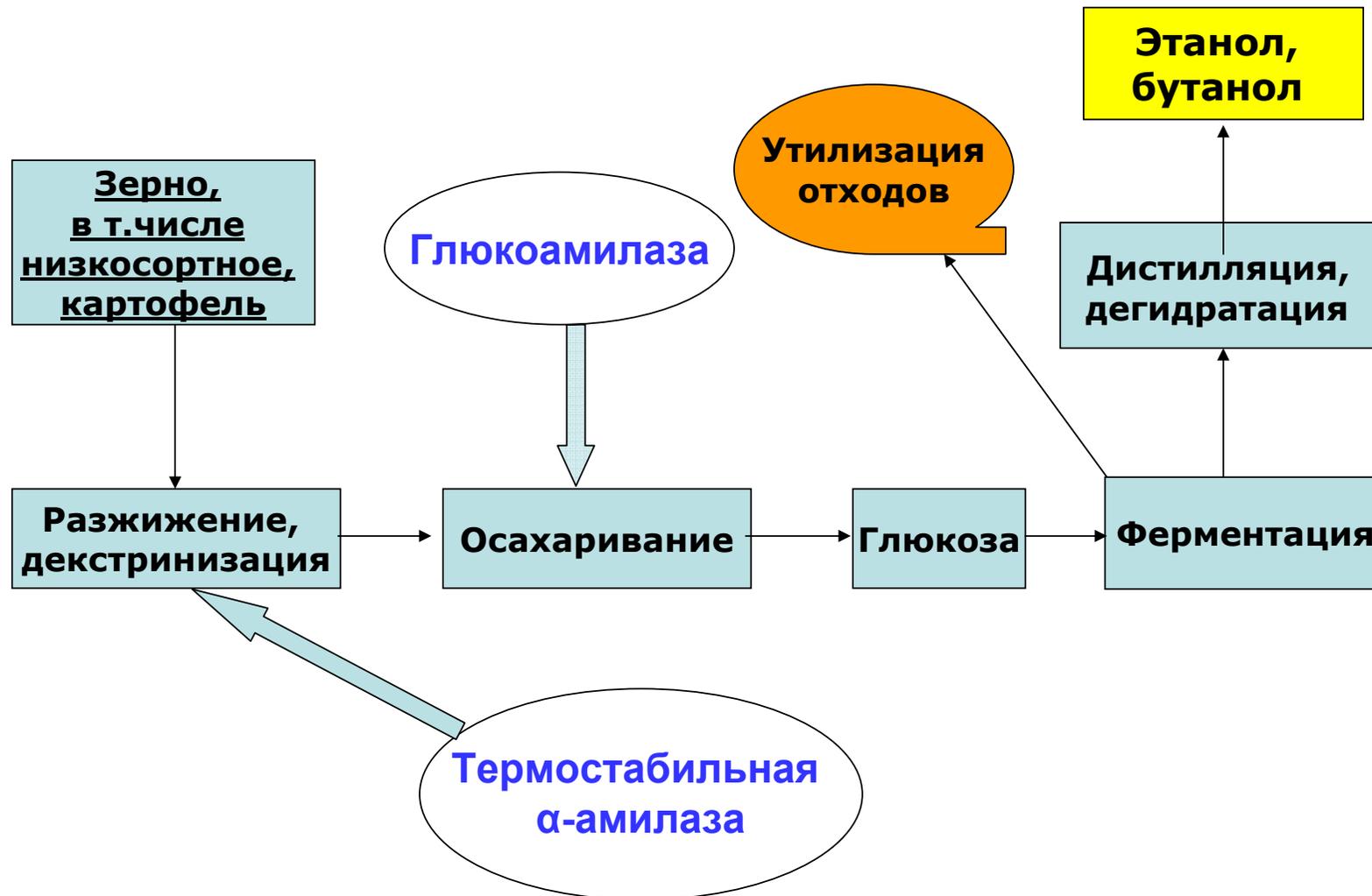
Получение спиртов из отходов пищевой промышленности



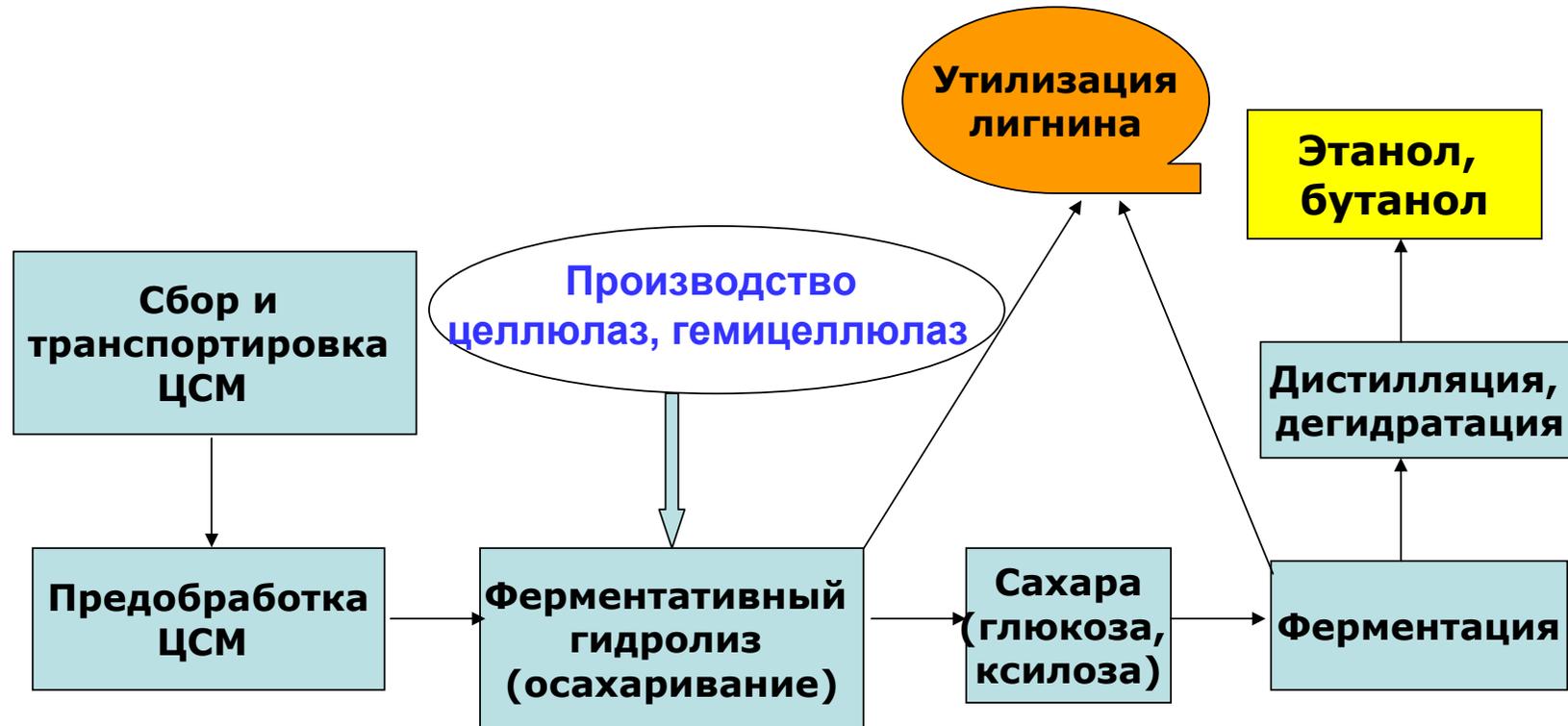
Получение спиртов из отходов промышленности



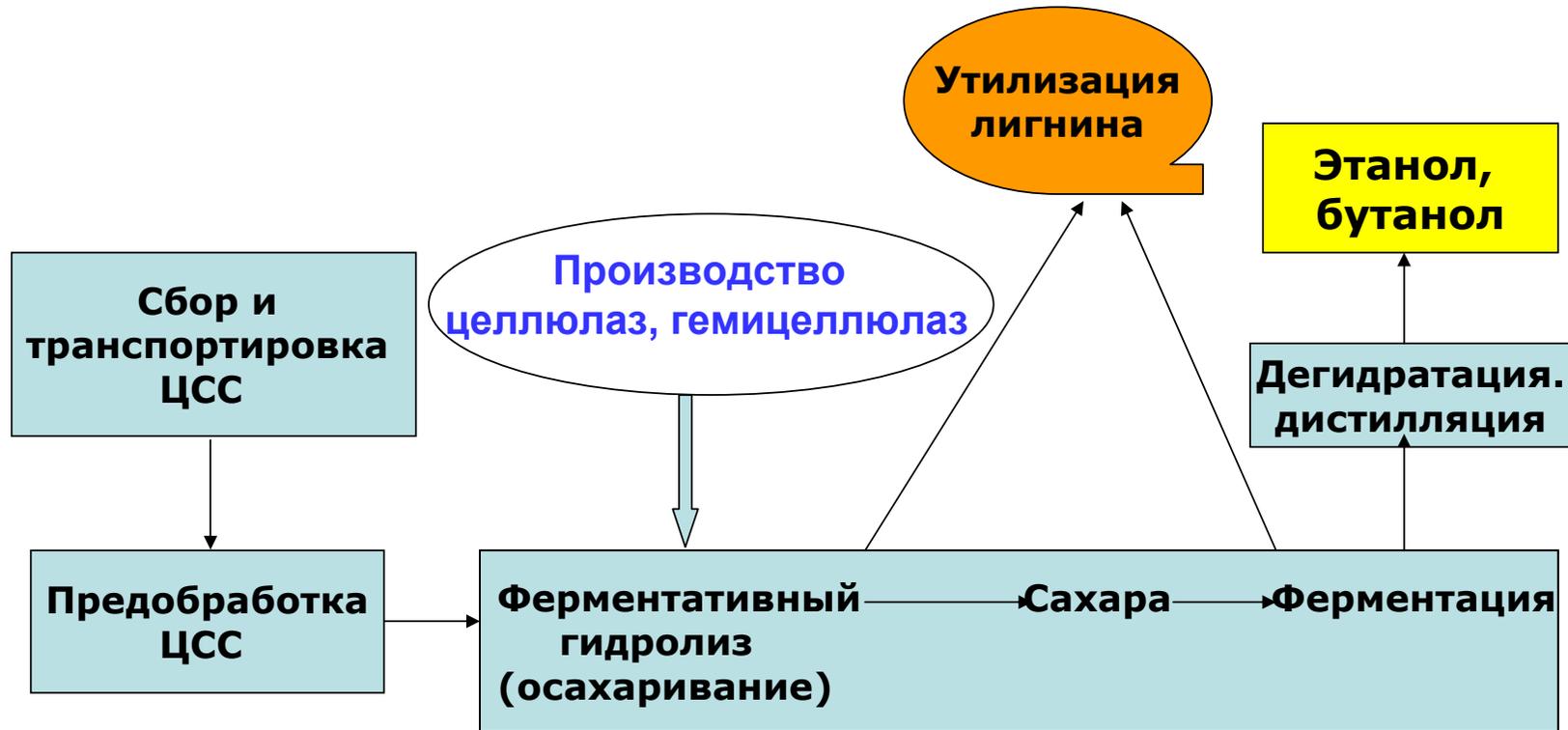
Получение спиртов из крахмалистого сырья



Получение спиртов из целлюлозосодержащего сырья (раздельные гидролиз и сбраживание)



Получение спиртов из целлюлозосодержащего сырья (одновременный гидролиз и сбраживание)



Одновременный гидролиз и ферментация

Крахмалистое и лигноцеллюлозное сырье имеют разный состав

Этанол из кукурузы (крахмала)



72% Крахмала
10% Целлюлоза/Гемицеллюлоза
9% Белок
4% Масло
4% Другое



Глюкоза

Брожение

Этанол

Выход ~ 520 л этанола /сух.тонну
Расход ферментов ~ 0,2 г белка/ л

Этанол из лигноцеллюлозной биомассы



38% Целлюлоза
32% Гемицеллюлоза
17% Лигнин
13% Другое

Предобработка



Глюкоза, ксилоза

Выход ~ 320-340 л этанола /сух.тонну
Расход ферментов ~ 10-20 г белка/ л

Выбор ферментов для гидролиза растительного сырья



Спиртовая барда



Зерновая шелуха



Кукурузные стебли



Солома



Древесина

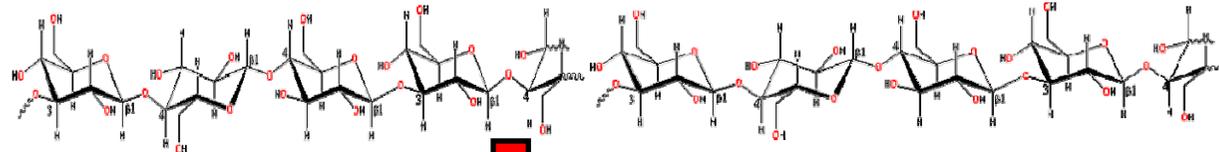


Стебли тростника (багасса)

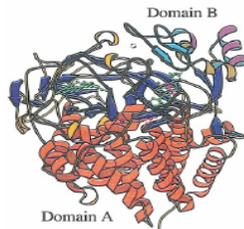


Сельскохозяйственные отходы

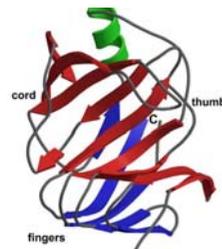
Предобработка



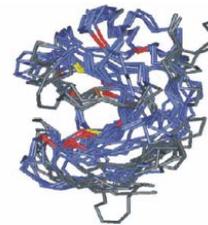
Выбор ферментов для гидролиза



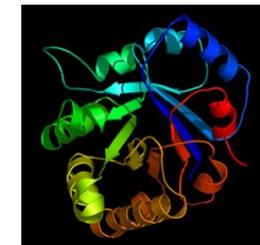
EG



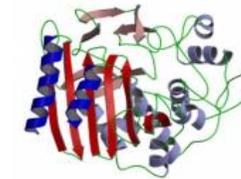
CBM



β -G



Ксиланазы



Дополнит. ферменты

Сбраживаемые сахара (C5 и C6)



Проблемы

- ❑ Необходимость эффективного метода предварительной обработки лигноцеллюлозного сырья
- ❑ Необходимость расширения сырьевой базы
- ❑ «Локализация» сырья, логистика
- ❑ Необходим более эффективный комплекс ферментов для осахаривания лигноцеллюлозного сырья
- ❑ Выбор между отдельным и одновременным гидролизом и ферментацией
- ❑ Необходимо иметь дрожжи, эффективно сбраживающие C5 сахара
 - Бутанол может быть получен из C6 и C5 сахаров
- ❑ Необходим способ эффективной утилизации лигнина

Цели исследования

- ❑ Оценить эффективность различных методов предварительной обработки растительного сырья
- ❑ Сравнить осахаривающую активность целлюлазных комплексов из различных источников

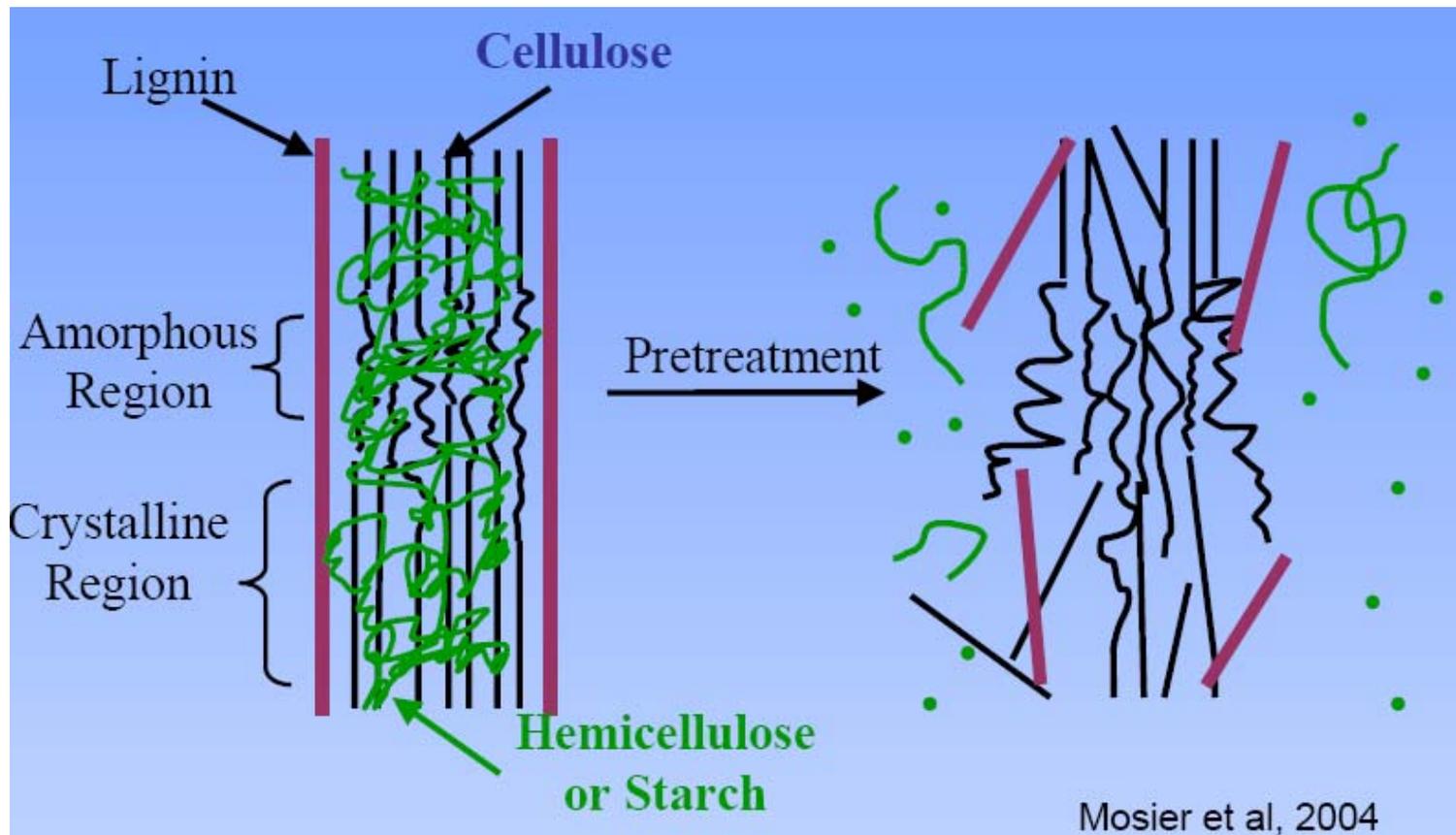
Предварительная обработка растительного сырья

- Лигноцеллюлозное сырье (древесина, однолетние растения, солома, и т.д.) обладает низкой реакционной способностью, поэтому для увеличения эффективности его ферментативного гидролиза (осахаривания) требуется проведение предварительной обработки.

Виды предварительной обработки:

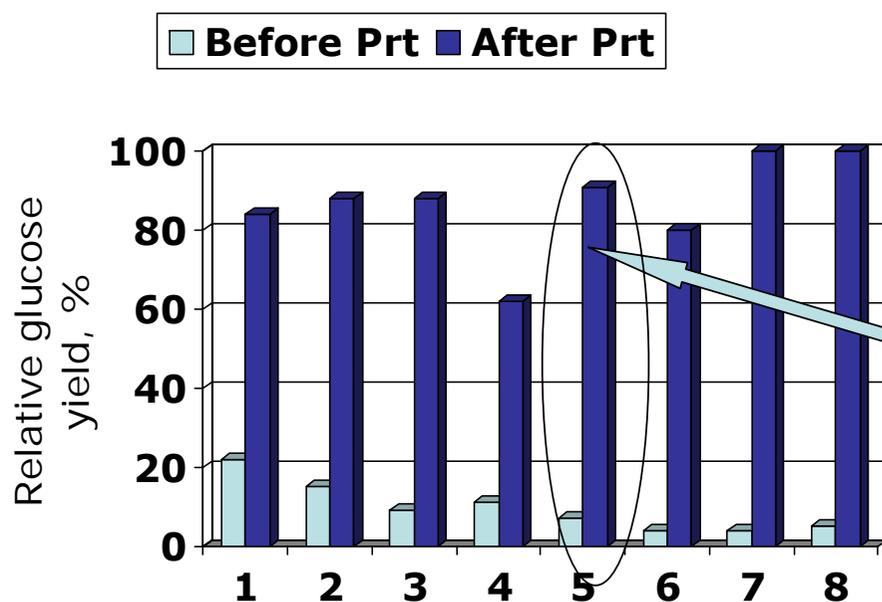
- Физическая (γ -облучение и др.)
- Химическая (кислоты, щелочи, жидкий аммиак, органонольв, и т.д.)
- Механическая (сухое измельчение)
- Термомехано-химическая (автогидролиз, паровой взрыв,экструзия)
- Биологическая (делигнификация с помощью микроорганизмов)

Предварительная обработка приводит к разрушению кристаллической структуры целлюлозы и/или разрушению (удалению) лигнина



Сравнение эффективности различных методов предобработки разных видов лигноцеллюлозного сырья

10 FPU / 1 г субстрата + 20 bGU / г, [S] = 100 г/л, pH 5, 50°C, 24 h

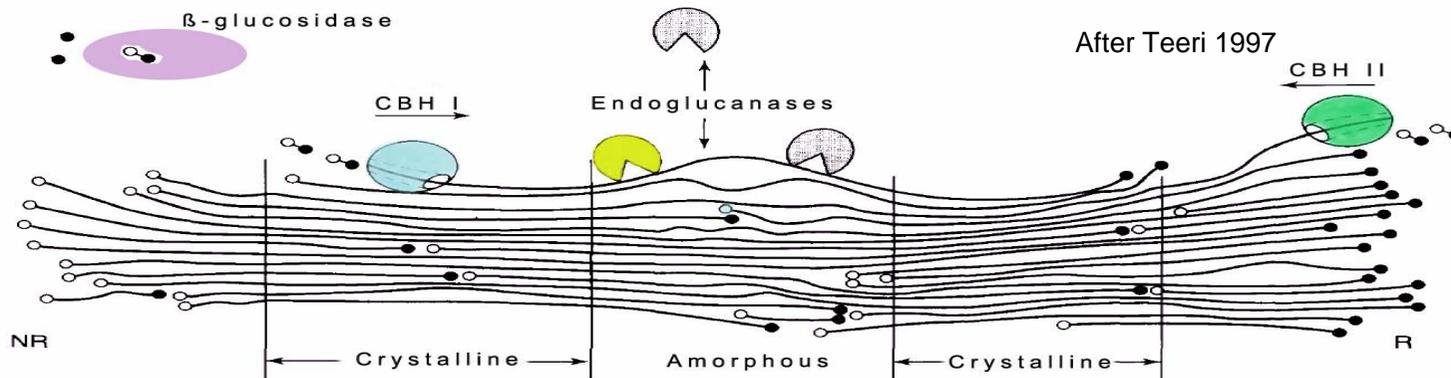


1. Багасса / паровой взрыв
2. Пшеничная солома / паровой взрыв
3. Овсяная шелуха / паровой взрыв
4. Рисовая шелуха / паровой взрыв
5. Хвойная древесина / сухое измельчение
6. Лиственная древесина / паровой взрыв
7. Лиственная древесина / органоазоль
8. Целлюлоза (ЦБК)

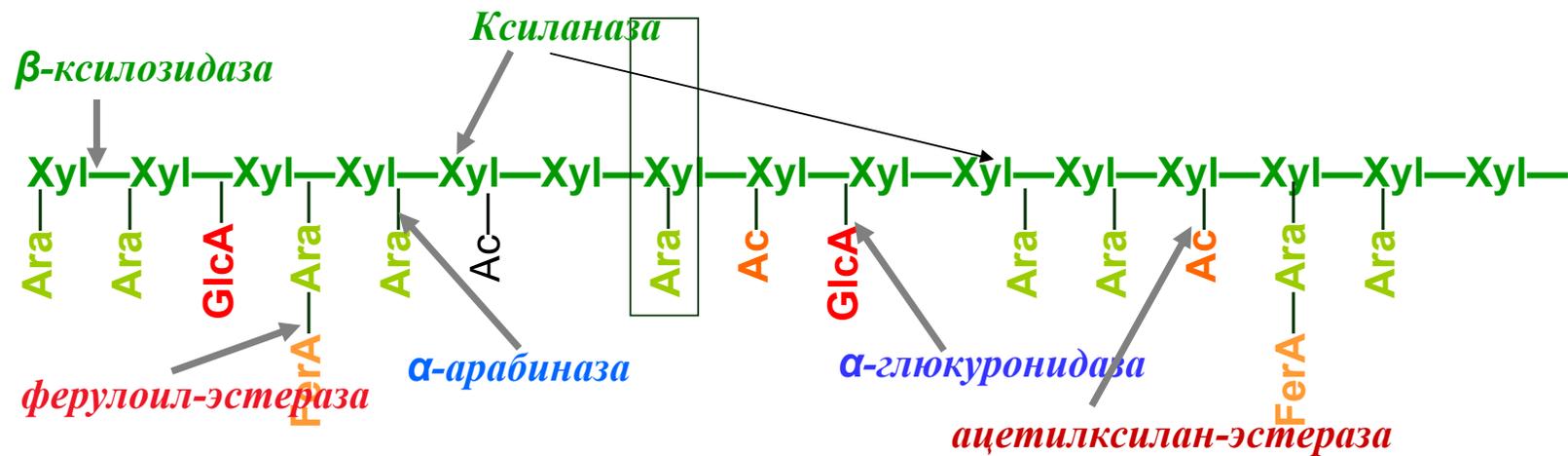
Выводы (I)

- ❑ Предобработка лигноцеллюлозного сырья играет важную роль для увеличения его реакционной способности
- ❑ Метод сухого измельчения существенно увеличивает реакционную способность лигноцеллюлозного сырья

Механизм ферментативного гидролиза целлюлозы



Механизм ферментативного гидролиза ксилана



Ферментные препараты целлюлаз и сопутствующих ферментов

☐ **Продуцент - *Penicillium sp.***

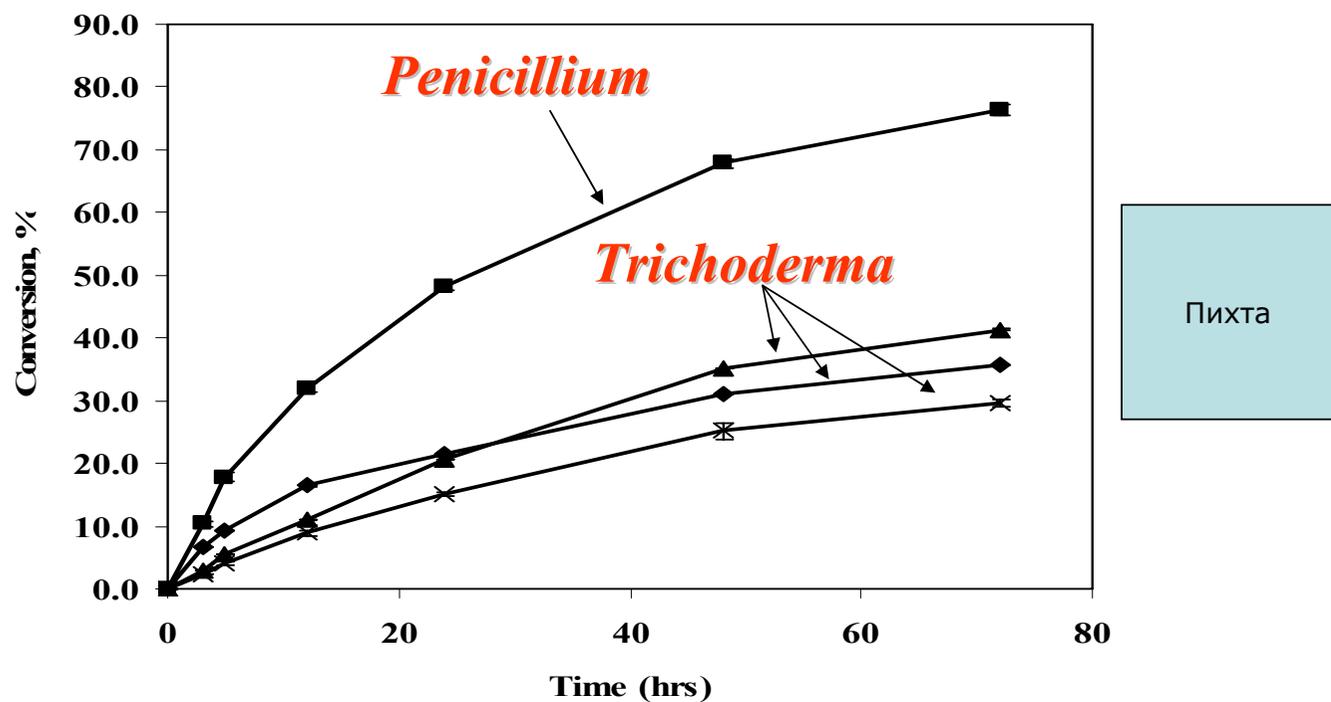
- MSUBC1
- MSUBC2

☐ **Продуцент - *Trichoderma sp.***

- MSUBC3
- MSUBC4
- TR1
- TR2
- TR3

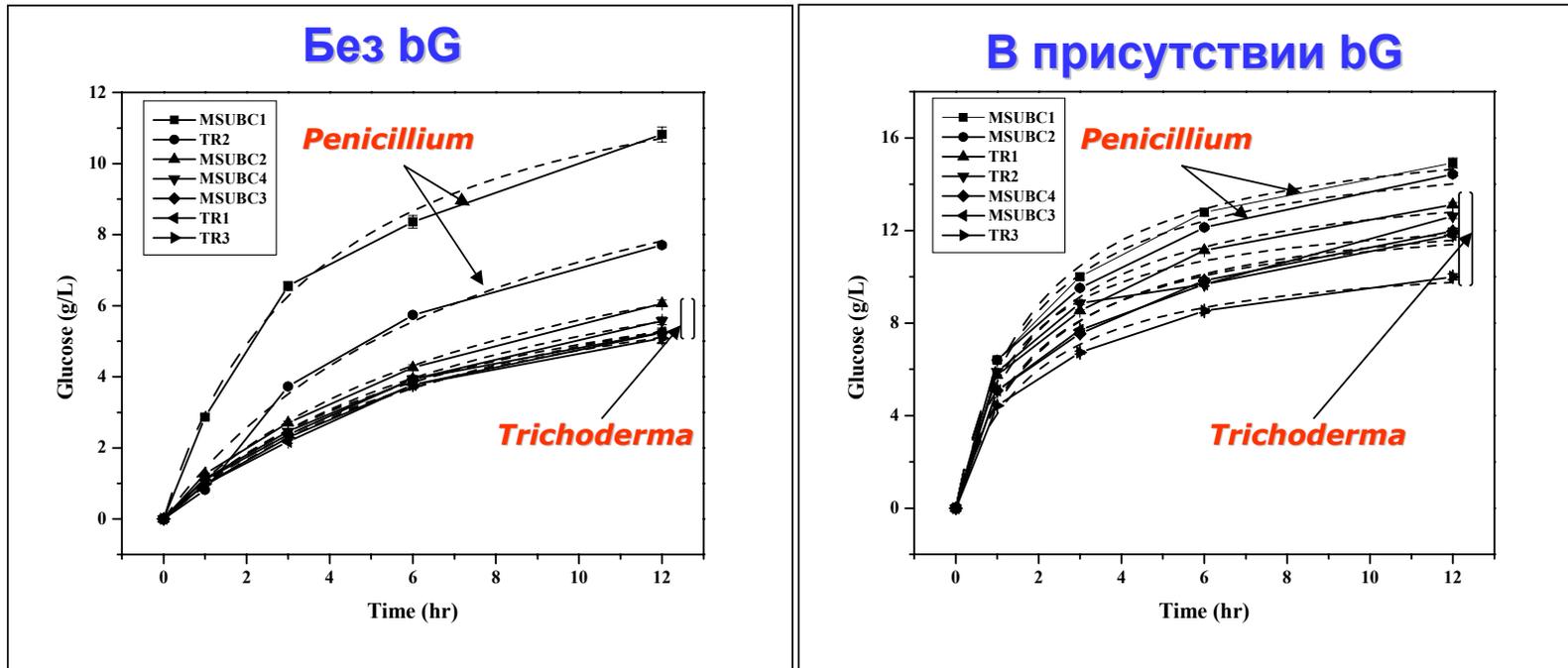
Гидролиз пихты, обработанной паровым взрывом разными целлюлазами

10 FPU / 1 г субстрата, [S] = 5%, pH 5, 50°C



Гидролиз тополя, предобработанного органоэольвом, разными целлюлазами

10 FPU / 1 г субстрата, [S] = 5%, pH 5, 50°C
bG – 20 bGU/g (Novo 188)



Сравнение компонентного состава целлюлазных комплексов *Penicillium* и *Trichoderma*

Penicillium

(основные ферменты)

- Четыре Eg
 - Четыре СВН
 - Две ХГ
 - β -глюкозидаза
 - Две ксиланазы
-
- Различные минорные ферменты

Trichoderma

(основные ферменты)

- Eg1, Eg2
 - СВН1, СВН2
 - (Ксиланазы) – да или нет, в зависимости от условий ферментации
-
- Различные минорные ферменты

Вероятный механизм воздействия лигнина на ферменты



Выводы (II)

- Ферменты *Penicillium* обладают более высокой осаживающей активностью, ферменты *Trichoderma*

- Возможные причины этого:
 - Более высокая удельная активность индивидуальных ферментов
 - Большая разнообразность целлюлазного комплекса
 - Наличие β -глюкозидазы (целлобиазы)
 - Меньшая степень ингибирования лигнином

Созданы промышленные штаммы - продуценты целлюлаз и амилаз

- *Penicillium verrucosum* – целлюлазы
- *Trichoderma longibrachiatum* – целлюлазы

Важно: целлюлазы *Penicillium* обладают уникально высокой осаживающей способностью по сравнению с *Trichoderma* (существенно, что именно целлюлазы *Trichoderma* используются ведущими мировыми биотехнологическими компаниями)