

**ХИМИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ДРЕВЕСИНЫ**

УДК 676.019.172

***А.С. Аксенов, Д.Г. Чухчин, Е.В. Новожилов,  
С.В. Беневоленский, А.М. Чулкин***

Аксенов Андрей Сергеевич родился в 1982 г., окончил в 2004 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры биотехнологии АГТУ. Имеет 7 печатных работ в области использования ферментных препаратов в ЦБП.



Чухчин Дмитрий Германович родился в 1971 г., окончил в 1993 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии Архангельского государственного технического университета. Имеет более 50 печатных работ в области химической переработки древесины.



Новожилов Евгений Всеволодович родился в 1950 г., окончил в 1972 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор технических наук, профессор кафедры биотехнологии Архангельского государственного технического университета, член-корреспондент РАЕН, лауреат премии им. М.В. Ломоносова. Имеет около 140 научных трудов в области технологии комплексной переработки сульфитных и сульфатных щелоков, ферментных технологий в химической переработке древесины, технологий очистки сточных вод.

**ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ КСИЛАНАЗ  
НА БЕЛИМОСТЬ СУЛЬФАТНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ\***

Методом ВЭЖХ установлено влияние отдельных фракций препаратов на белимость лиственной и хвойной сульфатной целлюлозы.

*Ключевые слова:* ксиланаза, ксилан, хроматография, сульфатная целлюлоза, белимость.

---

\* Работа выполнена в рамках ФЦНТП по приоритетному направлению «Живые системы».

Ряд зарубежных фирм выпускают ферменты ксиланазы, предназначенные для использования в производстве сульфатной беленой целлюлозы. Они, как правило, не являются однокомпонентными и содержат разное количество индивидуальных ферментов, которые оказывают различное влияние на эффективность ферментной обработки целлюлозы. Ранее нами показано [2], что промышленно выпускаемые ферментные препараты могут существенно отличаться как по специфической активности, так и по степени очистки от посторонних активностей.

Целью данного исследования являлась оценка влияния состава ферментных препаратов на эффективность их действия как добавок, улучшающих белимость сульфатной целлюлозы.

Для разделения ферментов на фракции использовали метод ВЭЖХ (хроматографическая система «Стайер», программа «Мультихром»), который позволяет анализировать состав ферментного препарата, степень его очистки, присутствие в нем других активностей, различие фракций по молекулярной массе [1]. В препаратах ксиланаз с использованием этого метода были выделены несколько фракций. Хроматограммы различных препаратов ксиланаз имеют аналогичный вид, но наблюдаются расхождения в количестве, высоте и местоположении пиков, что связано с методами получения, выделения и очистки ферментов.

На рис. 1 приведена хроматограмма одного из ферментов, применяемых в промышленности, – Biobrite УНВ (Канада). Кроме основного пика 2, характеризующего ксиланазную активность препарата, на хроматограмме имеются также пики 1 и 3, что может свидетельствовать о присутствии в препарате посторонних активностей (фракции 1, 3). Фракция 4 содержит низкомолекулярные добавки, стабилизирующие фермент в растворе.

Выделенные фракции фермента использовали для обработки небеленой сульфатной лиственной целлюлозы. Условия обработки: продолжительность 120 мин, pH 7, температура 60 °С. Расход фракций по отношению к целлюлозе был пропорционален их содержанию в исходном препарате фермента.

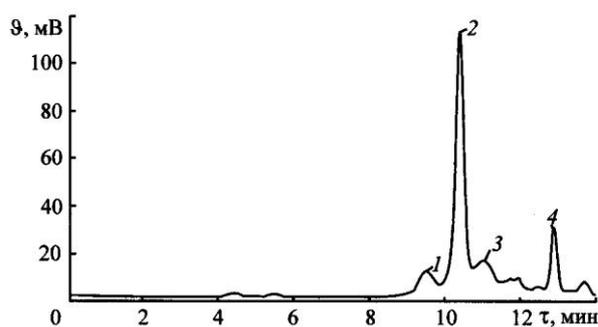


Рис. 1. Хроматограмма препарата ксиланазы Biobrite УНВ (здесь и далее, на рис. 2, номер пика совпадает с номером фракции)

Таблица 1

**Ферментативная обработка небеленой лиственной сульфатной целлюлозы фракциями, выделенными из препарата Biobrite UHB**

Образец	$D_{237}$ фильтрата*	Число Каппа
Контроль**	2,1	12,8
Фермент	2,9	11,3
Фракция фермента:		
1	2,2	12,0
2	3,4	11,0
Сумма фракций 3 и 4	2,5	12,0

\* В условных единицах оптической плотности.

\*\* Здесь и далее, в табл. 3 – 5, без добавки фермента и его фракций.

Таблица 2

**Характеристика активностей различных ксиланаз, определенных в одинаковых условиях**

Препарат	Активность, ед./мл		Общий белок, г/л	Ксиланазная активность/ целлюлазная активность
	ксиланазная	целлюлазная		
Ксиланаза F-912	700	0,7	5,5	1000
Biobrite UHB	6000	14,9	8,0	402
Escorlp TX 200A	4100	31,0	4,5	132

Ксиланазы непосредственно не действуют на остаточный лигнин сульфатной целлюлозы, однако раскрытие структуры волокна и разрыв лигнуглеводных связей приводят к растворению лигнина [3, 4], о чем можно судить по увеличению оптической плотности фильтрата и снижению числа Каппа целлюлозы. Как видно из данных табл. 1, наибольший вклад в этот процесс внесла фракция 2, причем эффективность ее действия оказалась даже несколько выше, чем самого фермента, из которого эта фракция была выделена.

Обработка целлюлозы другими фракциями фермента также привела к снижению числа Каппа, но в гораздо меньшей степени. Поскольку дополнительное растворение лигнина имеет место, можно полагать, что минорные активности этих фракций фермента могут быть или ксиланазными, или целлюлазными. Какие именно активности проявляют минорные фракции 1 и 3, нам установить не удалось, однако, судя по данным табл. 2, в этом ферменте присутствует целлюлазная активность, вероятнее всего, принадлежащая фракции 1. При наличии такой активности в результате частичной деструкции целлюлозы растворение остаточного лигнина также интенсифицируется и, как следствие, число Каппа уменьшается. Однако, как это неоднократно было показано различными исследователями, присутствие в ксиланазах побочной целлюлазной активности ведет к снижению показателей механической прочности беленой целлюлозы.

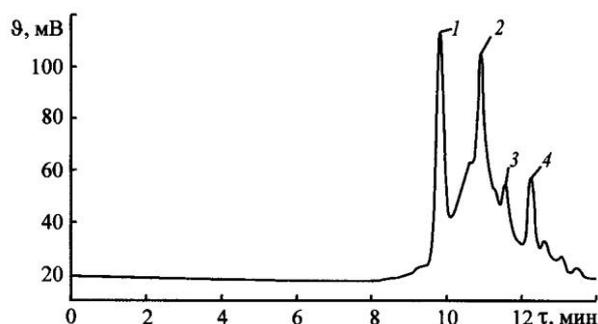


Рис. 2. Хроматограмма ферментного препарата ксиланазы F-912

В России ведутся исследования по получению препаратов ксиланаз для различных отраслей промышленности. В институте ГосНИИГенетики (г. Москва) была выделена ксиланаза с использованием штамма гриба *P. canescens* F-912 (далее ксиланаза F-912). Путем направленной модификации штамма-продуцента методами генной инженерии целлюлазная активность в препаратах этой ксиланазы была практически полностью устранена.

Как видно из данных табл. 2, доля целлюлазной активности в отечественном ферменте в несколько раз ниже, чем в зарубежных препаратах, используемых в производстве сульфатной целлюлозы. Более низкий уровень ксиланазной активности в ксиланазе F-912 объясняется тем, что этот препарат выделен в лабораторных условиях без применения методов концентрирования.

Как видно из хроматограммы ксиланазы F-912 (рис. 2), в состав препарата входит несколько фракций, различающихся по молекулярной массе. Фракции 1 и 2, обладающие активностью, имеют примерно равное соотношение в ферменте. Вещества, входящие во фракции 3 и 4 и имеющие низкую молекулярную массу (ММ), – стабилизаторы ферментного препарата.

Фракции 1 и 2 были выделены хроматографическим методом и, наряду с исходным ферментом, использованы для обработки промышленных образцов лиственной и хвойной сульфатной целлюлозы, число Каппа которых составляло соответственно 15,5 и 38,6. Условия ферментной обработки: рН 7,0, температура 60 °С, продолжительность обработки 60 мин. Расход фракций был пропорционален их содержанию в исходном препарате фермента.

Контрольный образец обрабатывали в аналогичных условиях. Для оценки белимости целлюлозы проводили начальные стадии отбелки по схеме Д<sub>0</sub> – Щ<sub>1</sub>. Расход химикатов задавали в зависимости от числа Каппа небеленой целлюлозы.

Как видно из данных табл. 3, обработка и хвойной, и лиственной сульфатной целлюлозы фракциями 1 и 2 приводит к снижению числа Каппа

Таблица 3

**Влияние обработки сульфатной целлюлозы  
ксилаказой F-912 и выделенными фракциями  
фермента на число Каппа после начальных  
стадий отбелки**

Образец	Число Каппа целлюлозы после стадий Д <sub>0</sub> – Щ <sub>1</sub>
Контроль	14,1 / 8,7
Фермент	12,8 / 7,8
Фракция фермента:	
1	13,3 / 8,5
2	13,5 / 8,0
Сумма фракций 1 и 2	13,3 / 8,0

Примечание. В числителе приведены данные для лиственной, в знаменателе – для хвойной целлюлозы.

целлюлозы после начальных стадий отбелки. При действии на хвойную целлюлозу несколько большее снижение числа Каппа достигается при использовании фракции 1, имеющей большую ММ.

Обработка лиственной целлюлозы фракцией 2 привела к снижению числа Каппа целлюлозы по сравнению с контролем на 0,7 ед., в то время как для фракции 1 эта разница составила всего 0,2 ед. Кроме того, при обработке целлюлозы смесью фракцией 1 и 2 снижение числа Каппа было таким же, как и при действии одной фракции 2. Следовательно, фракция 2, имеющая меньшую ММ, оказалась при обработке лиственной целлюлозы значительно эффективнее фракции 1.

Использование метода ВЭЖХ позволило выявить неоднородность отечественного препарата ксиланазы и наличие в нем двух фракций, обладающих ксиланазной активностью и различающихся специфичностью действия на сульфатную хвойную и лиственную целлюлозу.

Различие в действии отдельных фракций препарата ксиланазы F-912 проявляется и при проведении отбелки хвойной сульфатной целлюлозы по полной схеме, например по схеме Ф-Д<sub>0</sub>-Щ<sub>1</sub>-Д<sub>1</sub>-Щ<sub>2</sub>-Г-Д<sub>2</sub>-К. При равном расходе белящих химикатов у целлюлозы, прошедшей предварительную обработку фракцией 1 достигается более низкое число Каппа на промежуточной стадии отбелки и наблюдается более высокая белизна в конце ее (табл. 4). Фракция 1 по эффективности действия не уступает исходному ферменту.

Фирмы-производители ксиланаз определяют их активность по собственным методикам в разных единицах, что затрудняет объективное сравнение препаратов между собой. Наиболее достоверным методом оценки является ферментная обработка различными ксиланазами выбранного образца целлюлозы с определением числа Каппа целлюлозы на начальных стадиях отбелки, а также белизны целлюлозы после завершения отбелки. Такие исследования показали, что эффективность действия ксиланазных ферментов неодинакова.

Таблица 4

**Отбелка хвойной сульфатной целлюлозы после предварительной обработки ксиланазой F-912 или выделенными фракциями фермента**

Образец	Число Каппа целлюлозы после стадии Щ <sub>2</sub>	Белизна целлюлозы, %
Контроль	6,0	81,3
Фермент	5,3	82,9
Фракция фермента:		
1	5,3	83,2
2	5,6	82,5
3	5,8	81,6

Таблица 5

**Влияние ксиланазной обработки на белимость и разрывную длину хвойной сульфатной целлюлозы**

Образец	Расход, кг/т целлюлозы	Число Каппа после стадии Щ <sub>2</sub>	Белизна, %	Разрывная длина, м
Контроль	–	5,8	84,2	9600
Есорилр TX 200 А	0,3	4,5	85,9	8700
Ксиланаза F-912	1,5	5,0	85,8	9500

Была проведена обработка хвойной сульфатной целлюлозы с числом Каппа 38,9 различными ферментами в одинаковых условиях и ее последующая отбелка по схеме Д<sub>0</sub>-Щ<sub>1</sub>-Д<sub>1</sub>-Щ<sub>2</sub>-Г-Д<sub>2</sub>-К (табл. 5). Ранее нами было показано [1], что промышленно выпускаемый фермент Есорилр TX 200 А имеет побочные активности, в том числе, вероятно, и целлюлазную активность. Их наличие не сказалось на делигнификации целлюлозы и ее белизне, но отрицательно повлияло на важный показатель механической прочности целлюлозы – разрывную длину. При обработке целлюлозы ксиланазой F-912, практически свободной от целлюлазной активности, при высокой белизне разрывная длина находится на высоком уровне, таком же, как у целлюлозы в контрольном опыте.

Проведенные исследования показали, что в области получения ферментных препаратов для целлюлозно-бумажной промышленности перспективным является создание монокомпонентных высокоочищенных ксиланаз, предназначенных для обработки отдельных видов целлюлозы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенов, А.С. Промышленное использование ксиланаз при отбелке сульфатной целлюлозы [Текст] / А.С. Аксенов, Е.В. Новожилов, О.А. Демашев, А.А. Опарина // Целлюлоза. Бумага. Картон (пилотный научный выпуск). – 2006. – С. 15–17.
2. Аксенов, А.С. Характеристика ксиланаз различными методами [Текст] / А.С. Аксенов, Е.В. Новожилов, Д.Г. Чухчин // Химия и технология растительных веществ: тез. докл. IV Всерос. науч. конф. «Химия и технология растительных веществ», г. Сыктывкар. – 2006. – С. 309.

3. *Kantelinen, A.* Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases [Text] / A. Kantelinen, B. Hortling, J. Sundquist, M. Linko, L. Viikari // *Holzforschung*. – 1993. – 47. – P. 318–324.

4. *Munk, N.* Bleech boosting with xylanases: recent research results [Text] / N. Munk, A.M. Nissen, H. Lund // *Proc. 47<sup>th</sup> Appita Ann. Gen. Conf.* – 1992. – Vol. 1. – P. 257.

Архангельский государственный  
технический университет

ГосНИИГенетика (г. Москва)

Поступила 13.03.06

*A. S. Aksenov, D.G. Chukhchin, E.V. Novozhilov,  
S.V. Benevolinsky A.M. Chulkin*

### **Impact of Fractions of Xylanases Enzymatic Agents on Sulphate Pulp Brightness**

The impact of certain fractions of agents on brightness of hardwood and softwood sulphate pulp is established.