

УДК 676.019.264

М.В. Емельянова, Д.Г. Чухчин, Е.В. Новожилов

Емельянова Марина Викторовна родилась в 1980 г., окончила в 2002 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры биотехнологии Архангельского государственного технического университета. Имеет 4 печатные работы, область интересов – процессы биотехнологии 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 шелоков, ферментных технологий в химической переработке древесины, технологий очистки сточных вод.



**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИПАЗЫ
В ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ**

Показана возможность использования липазы для обессмоливания лиственной химико-механической массы и лиственной сульфатной целлюлозы. Установлено снижение активности фермента в присутствии сульфатной целлюлозы вследствие сорбции липазы на волокно.

Ключевые слова: липаза, смола, химико-механическая масса, сульфатная целлюлоза, активность, сорбция.

К одной из развивающихся сфер применения ферментов в целлюлозно-бумажной промышленности относится борьба со смоляными затруднениями, возникающими при производстве механических масс, целлюлозы, бумаги и картона [5, 10]. Смолистые вещества древесины в процессе ее переработки претерпевают различные физико-химические изменения и образуют липкие отложения «вредной смолы» на рабочих поверхностях оборудования, снижая его производительность, а также ухудшая качество готовой продукции. Самые проблемные отложения на бумагоделательных машинах происходят из-за неполярной фракции – жиров, представляющих

собой в основном триглицериды насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Для снижения содержания смолы в целлюлозных волокнистых полуфабрикатах нами предложен фермент липаза, разрушающий жиры и ограничивающий таким образом возможность отложения вредной смолы.

Липаза *Resinase A2X** успешно используется в производстве механических масс из свежесрубленной древесины сосны на заводах Японии, Китая, США, Канады [12], а также для удаления из макулатуры типографской краски на основе растительных масел [4]. Менее известно о возможности ее использования в производстве целлюлозы. После сульфитной варки в кислой среде большая часть жиров остается в целлюлозе практически без изменений. При ферментной обработке липазой происходит значительное разрушение смолы сульфитной целлюлозы [11].

При сульфатной варке в щелочной среде жиры исходной древесины интенсивно омыляются с образованием солей жирных кислот. Тем не менее, из-за ограниченного доступа химикатов внутрь волокон в лиственной сульфатной целлюлозе часть жиров сохраняется. О глубоком залегании части смолы в волокне свидетельствует иногда наблюдаемое в производстве появление вредной смолы на стадии щелочной обработки в конце отбелики целлюлозы. Доказано [3, 10], что жиры, содержащиеся в смоле лиственной сульфатной целлюлозы, способны разлагаться под действием липазы.

Наша задача – оценить эффективность применения липазы в производстве различных целлюлозных волокнистых полуфабрикатов для удаления смолы и решения проблемы смоляных затруднений.

В исследовании использовали различные методы контроля: экстракцию смолы органическими растворителями, микроскопический контроль, титриметрическое определение активности липазы по отношению к трибутирину.

В России для производства механических масс используют мало-смолистые хвойные породы древесины: ель и пихту, из лиственных – наиболее широко осину. Было проверено действие фермента липазы *Resinase A2X* на хвойную химико-механическую массу (ХММ) Сокольского ЦБК и осиновую химико-термомеханическую массу (ХТММ) Сясьского ЦБК. Механические массы обрабатывали липазой следующих в условиях: рН 7,0, температура 60 °С, концентрация массы – 8 %, продолжительность обработки – 2 ч, расход фермента – 0,3 и 0,6 кг/на 1 т ХММ или ХТММ. Затем механическую массу промывали водой, обрабатывали хелатом (трилон Б) и отбеливали в одну ступень пероксидом водорода в условиях: температура 60 °С, концентрация массы – 8 %, продолжительность обработки – 2 ч, концентрация H_2O_2 в растворе – 17 г/л.

Как видно из данных табл. 1, обработка липазой хвойной ХММ не привела к снижению содержания экстрактивных веществ, что объясняется

* Выражаем благодарность компании «Novozymes A/S» (Дания) за предоставление образцов ферментов липазы и ксиланазы.

относительно невысокой долей жиров в смоле древесины ели и пихты (табл. 1). Использование липазы в количестве 0,3 ... 0,6 кг/т при обработке

Таблица 1

**Эффективность обессмоливания механических масс липазой
Resinase A2X (с отбелкой H₂O₂)**

Механическая масса	Расход фермента, кг/т	Экстрактивные вещества	Белизна
		%	
Хвойная ХММ:			
исходная	–	0,86	65,4
обработанная липазой	0,3	0,87	65,0
«	0,6	0,88	64,3
Лиственная ХТММ:			
исходная	–	0,88	73,9
обработанная липазой	0,3	0,76	74,1
«	0,6	0,57	73,5

ХТММ из лиственной древесины с последующей отбелкой H₂O₂ обеспечило снижение содержания смолы в беленой механической массе на 14 ... 35 %.

Микроскопическим методом нами [3] было подтверждено эффективное действие липазы на смолу, выделенную из хвойной и лиственной древесины, сульфитной хвойной и сульфатной лиственной целлюлозы. Визуально наблюдаемое уменьшение количества смоляных частиц под действием липазы наглядно свидетельствует о разрушении жиров смолы во всех указанных образцах.

При отбелке лиственной сульфатной целлюлозы периодически возникают смоляные затруднения. Представляло интерес проверить возможность применения липазы для избавления от вредной смолы в производстве этого вида целлюлозы.

На ряде предприятий для улучшения белимости сульфатной целлюлозы уже применяют ферменты класса ксиланаз [6]. Параметры обработки целлюлозы ксиланазой совпадают с параметрами эффективного действия липазы, поэтому нами была исследована возможность совместного применения этих ферментов.

Сульфатную лиственную целлюлозу (число Каппа 14,8) отбирали на Архангельском ЦБК после промывки на фильтре. В условиях АЦБК небеленую целлюлозу хранят в башнях высокой концентрации, в их нижней части разбавляют фильтратом с отбелки и направляют в бассейн низкой концентрации, затем в массный бассейн, после чего обрабатывают ксиланазой в течение 50 ... 60 мин в поглотительной колонке и отбельной башне и промывают на фильтре.

Моделируя производственные условия, выдерживали небеленую целлюлозу в течение 2 ч при температуре 70 °С и концентрации массы 8 %, затем массу разбавляли водой до концентрации 3,5 % и выдерживали в те-

чение 40 мин при температуре 55 °С. После этого, не промывая массу, внесли ферменты и вели обработку в течение 1 ч при температуре 55 °С. Расход ксиланазы *Pulprzyme* HC составлял 0,5 кг/т целлюлозы, расход липазы *Resinase* A2X – 0,3 кг/т целлюлозы. В некоторых опытах (табл. 2) после

Таблица 2

**Обработка лиственной сульфатной целлюлозы ферментами
Pulprzyme HC и *Resinase* A2X [4]**

Условия обработки (фермент–продолжительность)	Содержание смолы в целлюлозе, %		Число Каппа целлюлозы после D ₀ -Щ
	после обработки ферментами	после стадий D ₀ -Щ	
<i>Pulprzyme</i> – 60 мин	0,61	0,54	4,0
<i>Pulprzyme</i> / Щ – 60 мин / 40 мин	0,39	0,43	3,8
<i>Pulprzyme</i> + <i>Resinase</i> – 60 мин	0,61	0,47	4,2
(<i>Pulprzyme</i> + <i>Resinase</i>) / Щ – 60 мин / 40 мин	0,27	0,29	4,0

ферментной обработки без промывки проводили стадию щелочения (Щ). Целлюлозу промывали водой, одну часть ее отбирали для анализов, а другую отбеливали по сокращенной схеме D₀-Щ (расходы: диоксида хлора (по активному хлору) – 18 кг/т целлюлозы; NaOH – 10 кг/т целлюлозы).

Содержание смолы в небеленой лиственной сульфатной целлюлозе составляло 0,99 % (при экстракции этанолом) и уменьшилось до 0,61 % при обработке ксиланазой и промывке водой (табл. 2). Таким образом, значительная часть смолы перешла в фильтрат при промывке целлюлозы. После отбелики этого образца целлюлозы по схеме D₀-Щ наблюдалось дальнейшее снижение содержания смолы до 0,54 %. В условиях производства деструкция смолы в процессе многоступенчатой отбелики в сочетании с применением ПАВ и промывкой массы после каждой ступени приводит к тому, что в беленой целлюлозе остается обычно 0,20 ... 0,25 % смолы.

Для растворения наиболее вредной смолы, расположенной на поверхности целлюлозных волокон, после ферментной стадии было опробовано щелочение. Лучшие результаты дала совместная обработка липазой и ксиланазой в сочетании с щелочением: содержание остаточной смолы в целлюлозе оказалось в 1,5–2 раза ниже, чем при использовании только ксиланазы (табл. 2). Повышение pH среды обеспечило не только растворение, но и стабилизацию смолы, присутствующей в растворе в эмульгированном состоянии. Наглядным показателем эффективности такой технологии явился достигнутый уровень содержания смолы в небеленой и полубеленой лиственной целлюлозе – 0,27 ... 0,29 %. Это практически столько же, сколько в беленой целлюлозе в конце процесса отбелики. Фильтрат после промывки небеленой целлюлозы содержал основную часть растворенных компонентов смолы. Значительная доля этого фильтрата возвращалась на разбавление массы и из-за неполной отмывки вместе с целлюлозной массой поступала на

отбелку. На первой стадии отбелки D_0 в кислой среде это приводило к обратному осаждению части смолы на волокно.

Чтобы уменьшить вероятность смоляных затруднений, необходимо проводить щелочение и максимально полно выводить фильтрат от промывки небеленой целлюлозы из производственного цикла. Положительный эффект щелочной обработки проявляется также в некотором снижении числа Каппа целлюлозы после стадий D_0 -Щ (табл. 2). Этот эффективный способ контроля смолы может быть рекомендован предприятиям.

Ферментная обработка сульфатной лиственной целлюлозы смесью ксиланазы и липазы имеет свои особенности. Необходимое для действия ферментов образование фермент-субстратного комплекса приводит к их иммобилизации на целлюлозных волокнах. Так, в конце стадии обработки сульфатной целлюлозы ксиланазой более 90 % фермента находилось в массе [9]. Однако специфическая адсорбция ксиланазы на сульфатной целлюлозе носит в значительной степени обратимый характер, так как при последующей промывке в фильтрат переходит около 55 % фермента. Остальное его количество вместе с целлюлозой поступает на отбелку.

Ксилан находится как на поверхности, так и внутри целлюлозных волокон. Ферменты имеют довольно большие размеры (не менее 20 кДа), что ограничивает возможность их проникновения во внутренние пространства клеточных стенок. Важно отметить, что ксиланаза при удалении поверхностно расположенного ксилана раскрывает структуру волокна, что может способствовать более эффективному действию липазы. В то же время, при совместном применении липазы и ксиланазы число Каппа полубеленой целлюлозы несколько больше, чем при использовании только ксиланазы. Осаждение липазы на поверхности целлюлозных волокон может ограничивать действие ксиланазы и мешать последующей делигнификации целлюлозы отбеливающими реагентами.

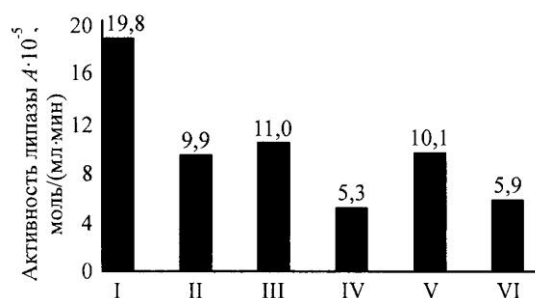
Для более детального изучения процессов, протекающих при взаимодействии липазы с сульфатной целлюлозой, было исследовано действие этого фермента на трибутирин в присутствии целлюлозы. Трибутирин, являющийся триглицеридом масляной кислоты, в наших экспериментах использовался как аналог жиров. Он применяется в качестве стандартного вещества при оценке активности липазы. Метод основан на расчете скорости, с которой фермент гидролизует трибутирин до масляной кислоты, количество которой определяют титрованием 0,1 н раствором NaOH.

К небеленой лиственной сульфатной целлюлозе Котласского ЦБК и образцам этой целлюлозы, взятым с разных ступеней отбелки, добавляли липазу. Суспензию целлюлозы концентрацией массы 0,2 % выдерживали 15 мин при периодическом перемешивании для иммобилизации фермента на волокне. Отдельно готовили мелкодисперсную эмульсию трибутирина с максимально возможной площадью поверхности раздела фаз, диспергируя трибутирин в ультразвуковом дезинтеграторе UD-2 (Польша). Сразу после смешивания суспензии целлюлозы с сорбированной липазой и эмульсии трибутирина проводили определение активности фермента при температуре

30 °С, рН 7,0, концентрациях целлюлозы, фермента и трибутирина соответственно 0,2, 0,0002 и 1 %.

Как видно из приведенных диаграмм (см. рисунок), активность иммобилизованной на целлюлозе липазы снижается по сравнению с контрольной пробой с $20 \cdot 10^{-5}$ до $(5 \dots 11) \cdot 10^{-5}$ моль/(мл·мин). Причиной этого может являться блокирование активных центров фермента при его

Активность A липазы, иммобилизованной на сульфатной лиственной целлюлозе после варки и различных ступеней отбелки:
 I – контроль, II – небеленая целлюлоза, III – КЩО, IV – D₁,
 V – Щ₂, VI – D₂



8*

сорбции на волокно. Активность липазы может также уменьшаться вследствие осаждения трибутирина на целлюлозу. Однако в условиях опыта трибутирин по отношению к ферменту был взят с большим избытком, поэтому его количества в растворе и на поверхности волокна было вполне достаточно для взаимодействия с липазой.

Быстрое уменьшение остаточной активности фермента в растворе при добавлении целлюлозы часто рассматривают как прямое доказательство его сорбции на волокне [2]. Активность липазы в присутствии целлюлозы, взятой после варки или после щелочных стадий отбелки, в 2 раза ниже, а в присутствии целлюлозы после кислых ступеней – в 4 раза ниже, чем в контроле. Вероятно, это связано с различной сорбционной способностью этих образцов целлюлозы по отношению к липазе. Липаза, имеющая гидрофобный субстратный центр, как и смола, сорбируется в большей степени на целлюлозе после кислой обработки, чем после щелочной. В любом случае снижение активности липазы в присутствии целлюлозы является нежелательным, так как уменьшает эффективность действия фермента.

Иммобилизованные ферменты широко используют в биотехнологических процессах для катализа реакций деструкции субстрата в растворенном состоянии [1]. Иммобилизация обеспечивает высокую стабильность работы фермента. Например, иммобилизованная β -глюкозидаза при обработке гидролизатов целлюлозы в реакторе колонного типа при температуре 40 °С в течение двух недель сохраняла не менее 95 % активности [2]. Однако далеко не всегда этот прием дает нужный эффект. В отдельных случаях в зависимости от вида адсорбента активность фермента после иммобилизации снижалась на 70 ... 90 %. Это объяснялось стерическими затруднениями доступа субстрата к активному центру фермента. Фактически фермент имеется в достаточном количестве, однако наблюдается его псевдоинактивация,

связанная с потерей мобильности прочно адсорбированного фермента или его неспецифической адсорбцией на носителе.

При изучении адсорбции органических веществ нейтрально-сульфитного (моносльфитного) щелока целлюлозными волокнами было установлено [7], что сульфатная небеленая целлюлоза обладает высокой сорбционной способностью по отношению к гемицеллюлозам, лигнину, компонентам смолы. На сульфитную целлюлозу преимущественно пересаживались частично разрушенные гемицеллюлозы. Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза с выходом около 80 % от древесины, близкая по химическому составу к ХММ, не обладала способностью сорбировать вещества нейтрально-сульфитного щелока. Липаза как фермент, взаимодействующий с гидрофобными веществами, имеет соответствующие структуры, обладающие гидрофобными свойствами. С их помощью она, как и частицы смолы, может связываться с сульфат-целлюлозными волокнами. Ранее осаждение липазы на волокна и прочное связывание с ними отмечено при обработке сульфитной целлюлозы [11]. О сорбции липазы на сульфатную целлюлозу в наших опытах (табл. 2) свидетельствовало увеличение содержания в ней общего азота на 67 % по сравнению с обработкой целлюлозы одной ксиланазой.

Липаза применяется в водорастворимой форме, при этом катализ идет на границе жир–вода и разворачивание глобулы фермента с образованием активной формы происходит на поверхности жировых молекул. Как показал контроль за смолой при окрашивании Суданом IV, ее компоненты в волокнах лиственной сульфатной целлюлозы расположены крайне неравномерно. При хорошем распределении фермента в суспензии целлюлозы имеет место элемент случайности – весьма вероятно адсорбция липазы не только на субстрате – жирах, которые доступны действию фермента, но и неспецифическая сорбция его на целлюлозных волокнах, приводящая к исключению молекул фермента из процесса катализа.

Выводы

Сорбция липазы лиственной сульфатной целлюлозой снижает активность фермента в 2-3 раза. Использование липазы в иммобилизованном на волокне состоянии малоэффективно, так как жиры находятся не в окружающей жидкости, а в основном локализованы внутри целлюлозных волокон. Лучший результат дает совместное применение ксиланазы и липазы с последующей щелочной обработкой целлюлозы и промывкой ее водой. Достаточно эффективное действие липазы на смолу различных видов ХММ связано не только с более высоким содержанием в них жиров, но и, в определенной степени, с тем, что сорбционная способность полуфабрикатов высокого выхода ниже, чем у сульфатной и сульфитной целлюлозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин, И.В. Имобилизованные ферменты и клетки [Текст] / И.В.Березин // Биотехнология. – 1985. – № 2. – С. 113–116.
2. Гусаков, А.В. Биокатализаторы на основе грибных целлюлаз: фундаментальные и прикладные аспекты [Текст]: автореф. дис. ... докт. хим. наук / А.В. Гусаков; МГУ. – М., 2005. – 59 с.
3. Емельянова, М.В. Действие фермента *Resinase A2X* на смолу древесины и целлюлозы [Текст] / М.В. Емельянова, Е.В.Новожилов, Д.Г. Чухчин // Современная наука и образование в решении проблем экономики Европейского Севера: материалы Междунар. научно-техн. конф., посвященной 75-летию АЛТИ–АГТУ. – Архангельск, 2004. – Т. 1. – С. 209–211.
4. Емельянова, М.В. Совместное применение ксиланазы и липазы в схеме отбелки сульфатной лиственной целлюлозы [Текст]/ М.В. Емельянова, Е.В. Новожилов // Наука – Северному региону: сб. научн. тр. – Архангельск, 2005. – Вып.62. – С. 72–74.
5. Лапин, В.В. Биотехнологии в целлюлозно-бумажной промышленности [Текст]/ В.В. Лапин // Целлюлоза, бумага, картон. – 2003. – № 11-12. – С. 20–23.
6. Новожилов, Е.В. Международный семинар по биотехнологии в АГТУ [Текст] / Е.В. Новожилов, Н.И. Богданович // Лесн. журн. – 2004. – № 3. – С. 144–145. – (Изв. высших учебн. заведений).
7. Новожилов, Е.В. О сорбции гемицеллюлоз моносльфитного щелока целлюлозой [Текст] / Е.В. Новожилов, Г.Ф. Прокшин, Б.Д. Богомолов // Химия древесины. – 1978. – № 6. – С. 63–67.
8. Петерсен, Х.Х. Применение ферментов в технологии переработки макулатуры [Текст] / Х.Х. Петерсен // Современные научные основы и инновационные технологии бумажно-картонных материалов с использованием вторичного волокна из макулатуры: науч. тр. 7-й Междунар. науч.-техн. конф. – Караваево, 2006. – С. 31–34.
9. Bernier, R.L. Fate of residual xylanase after treatment and bleaching of softwood kraft pulp [Text] / R.L. Bernier [et al.] // Bioresource Technology 50. – 1994. – P. 79–83.
10. Biotechnology in Pulp and Paper Industry [Text] / Volum editor: K.-E. Ericsson. – 1997. – 40 p.
11. Fischer, K. Adsorption of lipase on pulp fibers during biological pitch control in paper industry [Text] / K.Fischer, K. Messner // Enzyme Microb. Technol. – 1992. – Vol.14, June. – P. 470–473.
12. Fujita, Y. Recent advances in Enzymatic Pitch Control [Text] / Y.Fujita [et al.] // Tappi Journal. – April, 1992. – P. 117–122.

Архангельский государственный
технический университет

Поступила 8.11.05

M.V. Emeljanova, D.G. Chuhchin, E.V. Novozhilov

Prospects of Using Lipase in Pulp-and-paper Production

The possibility of using lipase for deresination of hardwood chemical-mechanical mass and hardwood sulphate pulp is shown. The decrease of enzyme activity in the presence of sulphate pulp resulting from lipase sorption on fiber is established.

