

УДК 547.458.8

**ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ЯМР-<sup>1</sup>H-РЕЛАКСАЦИИ  
ХАРАКТЕРА НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК  
ХЛОПКОВОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ  
В РЕЗУЛЬТАТЕ ЕЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ**

**A <sup>1</sup>H-NMR-RELAXATION STUDY  
OF COTTON CELLULOSE SUPRAMOLECULAR RESTRUCTURING  
AS THE RESULT OF ITS BIOCHEMICAL DEGRADATION**

*Ю.Б. ГРУНИН, Т.Ю. ГРУНИНА, М.С. ИВАНОВА, С.В. ФЕДОСОВ, В.Г. КОТЛОВ*

*YU.B. GRUNIN, T.YU. GRUNINA, M.S. IVANOVA, S.V. FEDOSOV, V.G. KOTLOV*

(Поволжский государственный технологический университет,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Ивановский государственный политехнический университет)

(Volga State University of Technology,  
Lomonosov Moscow State University,  
Ivanovo State Polytechnic University)

E-mail: GruninYB@volgatech.net

*Характер изменения надмолекулярной структуры целлюлозы в ходе химического воздействия и ферментативной дезинтеграции изучен методом ЯМР-<sup>1</sup>H-релаксации. Предварительная химическая обработка образцов целлюлозы существенно влияет на эффективность ее ферментативной деградации. Подтверждено, что основной компонент целлюлазного комплекса – эндо-1,4-β-глюканаза – производит наибольшие изменения в структуре целлюлозы.*

*Changes in supramolecular structure of cellulose under chemical exposure and enzymatic disintegration is studied by the <sup>1</sup>H-NMR-relaxation. Preliminary chemical treatment of cellulose samples significantly affects the efficiency of its enzymatic degradation. It is confirmed that the main component of cellulose complex – endo-1,4-β-glucanase – gives the strongest influence on cellulose structure.*

**Ключевые слова:** целлюлоза, ЯМР-релаксация, ферментативный гидролиз, надмолекулярная структура.

**Keywords:** cellulose, NMR-relaxation, enzymatic hydrolysis, supramolecular structure.

Целлюлоза – наиболее распространенный полимер растительного и животного происхождения, обладающий уникальными свойствами воспроизводства, биодegradации и возможностью получения материалов с заданными свойствами на ее основе путем биологической и физико-химической переработки.

В процессе эксплуатации тканевых материалов на основе целлюлозы последние часто подвергаются разнообразным внешним биохимическим воздействиям. Причиной биологической деградации является действие на структуру материалов со стороны ферментов, выделяемых микроорганизмами, грибами и бактериями. Однако вплоть до настоящего времени характер надмолекулярных перестроек целлюлозы, происходящих при этом, является предметом дискуссии. Настоящая работа, таким образом, направлена на углубление знаний в области ферментативной деградации целлюлозы.

В качестве основного метода проведенных нами исследований был применен протонный магнитный резонанс в рамках его современных приложений.

В настоящем эксперименте использовалась целлюлоза хлопкового волокна (ГОСТ 595–79), представляющая собой исходный образец. Для каждого объекта исследования из исходного и обработанного тем или иным способом хлопка, готовили образцы с фиксированным влагосодержанием  $w$  с использованием метода изопиестических серий [1] в диапазоне от 2 до 50% (% воды от массы сухого хлопкового волокна).

С целью анализа надмолекулярных перестроек, вызванных внешним биохимическим воздействием, были проведены измерения структурных параметров образцов и их сорбционных свойств целлюлозы с применением методик протонного магнитного резонанса. Измерения были выполнены на релаксметре Spin Track [2] с рабочей частотой 20 МГц. Регистрировать спад свободной индукции (ССИ) удавалось с периодом нечувствительности приемного тракта менее 8 мкс, что оказалось очень важным для анализа сигналов от полисахаридов с временами спин-спиновой релаксации, не превышающими 20 мкс.

Спады ССИ измерялись как отклики спиновой системы на одиночный  $90^\circ$  импульс длительностью 1,8 мкс. Поскольку спады ССИ использовались и для анализа формы временного спада, и для преобразования в спектральную линию, измерения проводились на частоте, отличной от резонансной на 100 кГц, с целью минимизации помех. Время регистрации ССИ составляло 2 мс с шагом выборки отсчетов квадратурного сигнала в 0,2 мкс, количество накоплений составляло 100, время повторения сканов при накоплении сигнала было равно 1000 мс.

Времена спин-спиновой релаксации для образцов целлюлозы влажностью до 5% определялись методами ССИ и Спинового Эха, а для более влажных образцов (>5%) применялась последовательность Карра-Парселла-Мейбума-Гилла (CPMG) [3]. Длительности  $90^\circ$  и  $180^\circ$  импульсов составляли 1,8 и 3,6 мкс соответственно.

Для определения параметров структурной организации целлюлозы и ее гидрофильных свойств применялись методики, разработанные ранее.

Емкость адсорбционного монослоя воды ( $w_m$ ) рассчитывалась из условия быстрого обмена в мультикомпонентных системах в рамках теории Бломбергера-Парселла-Паунда (БПП) [1], [4]:

$$w_m = T_{2m} \frac{w_i}{T_{2i}}, \quad (1)$$

где  $T_{2m}$  – время спин-спиновой релаксации протонов монослоя воды;  $T_{2i}$  – измеренное значение времени спин-спиновой релаксации при влагосодержании образца  $w_i$ .

Площадь удельной поверхности ( $S_{уд}$ ) определяли по формуле [1]:

$$S_{уд} = 3500w_m. \quad (2)$$

Степень кристалличности образцов ( $k$ ) вычисляли на основе экспериментального факта о соответствии числа молекул аморфных областей целлюлозы (поверхностных) и количества молекул воды в моноадсорбционном слое [5]:

$$k = 1 - 9w_m. \quad (3)$$

Средний поперечный размер кристаллитов ( $d_k$ ) находили по соотношению [6]:

$$d_k = \frac{2d_m}{1 - \sqrt{k}}, \quad (4)$$

где  $d_m$  – эффективный поперечный размер глюкопиранозного кольца, равный 6 Å.

По современным представлениям ферментативный гидролиз высокоупорядоченной целлюлозы в природе происходит при обязательном участии двух типов ферментов: 1,4-β-D-глюкан-глюканогидролаза – эндоглюканаза; 1,4-β-D-глюкан-целлобиогидролаза – целлобиогидролаза (C<sub>1</sub>-фермент) [4]. Первый осуществляет начальную стадию гидролиза, второй отщепляет целлобиозные остатки с нередуцирующего конца молекулы субстрата. Однако ни один из названных типов ферментов не производит глубокого гидролиза целлюлозы без участия другого фермента. Причина этого явления, вероятно, кроется в надмолекулярной структуре целлюлозы и остается до конца невыясненной, вследствие того, что не изучен процесс взаимодействия этих ферментов с высокоупорядоченной кристаллической целлюлозой.

Образцы для данного исследования были приготовлены по методике, предложенной в работах [7]. Целлюлоза хлопкового волокна (ГОСТ 595–79) подвергалась действию как целой нефракционированной ферментной системы, так и отдельной фракции эндо-1,4-β-глюканазы, выделенных из гриба *Geotrichum Candidum*, а также эндо-1,4-β-глюканазы, содержащейся в ферментном препарате фирмы Rapidase, в котором отсутствует целлобиогидролаза C<sub>1</sub>-фермента. Анализировались также образцы хлопка, последовательно обработанные как этиловым спиртом и диэтиловым эфиром, так и этиловым спиртом, а затем диэтиловым эфиром с выдержкой в растворе мочевины. После обработки мочевиной хлопок промывали водой с последующим высушиванием.

Обработка мочевиной ослабляет водородные связи (прежде всего межмолекулярные) в целлюлозе.

Для подтверждения вышесказанного было исследовано состояние воды в исходном

и обработанных хлопковых волокнах путем измерения времен спин-спиновой релаксации  $T_2$  на различных стадиях увлажнения. В рамках теории БПП времена спин-спиновой релаксации характеризуют молекулярную подвижность адсорбированной воды, которая зависит от состояния целлюлозного препарата как адсорбента, ее пористости, дисперсности, степени кристалличности, содержания активных центров адсорбции, расположенных на поверхности кристаллитов. Таким образом, указанные методы позволяют дать анализ структурной организации целлюлозы и установить характер ее изменения в процессе внешних воздействий.

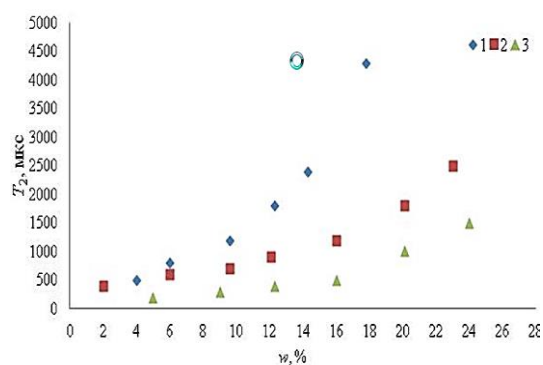


Рис. 1

На рис. 1 (зависимость времени спин-спиновой релаксации  $T_2$  от влагосодержания  $w$  образцов хлопковой целлюлозы: 1 – хлопок исходный; 2 – хлопок, обработанный спиртом и эфиром; 3 – хлопок, обработанный спиртом, эфиром и мочевиной) представлены зависимости времен спин-спиновой релаксации  $T_2$  от влагосодержания  $w$  для образцов исходного и обработанного хлопка. Для всех кривых характерно увеличение  $T_2$  с ростом влагосодержания, что свидетельствует об увеличении молекулярной подвижности сорбированной воды, которая при низких значениях влагосодержания заполняет микропоры, а при более высоких – субмикропоры, мезопоры [8] и пустоты в структуре сорбента.

Низкие значения  $T_2$  при малых влагосодержаниях образцов свидетельствуют о возникновении прочных связей молекул моноадсорбированной воды с активной поверхностью адсорбента. В качестве активных центров выступают группы -ОН, -СООН,

-CH<sub>2</sub>OH, расположенных на поверхности кристаллитов. При этом доминирующий вклад в релаксацию вносят вращательные движения молекул адсорбата, поскольку трансляционные степени свободы в этом случае не проявляются, а существуют только в пределах полимолекулярно-адсорбированных слоев воды, что характеризуется большими значениями T<sub>2</sub>.

Для кривой 2 на рис. 1 характерно более медленное увеличение T<sub>2</sub> с ростом влагосодержания w, чем для кривой 1. Это свидетельствует о том, что после обработки хлопкового волокна спиртом и эфиром происходит уменьшение трансляционной подвижности воды, связанное с тем, что из его пор удаляются сопутствующие компоненты, входящие в состав хлопкового волокна, затрудняющие процесс сорбции воды, и препятствующие ферментативному гидролизу. Дополнительная обработка образца мочевиной усиливает описанный выше эффект (кривая 3). Целлюлозные микрофибриллы, на поверхности которых были разорваны доступные реагенту межцепочечные водородные связи, адсорбируют значительно боль-

шее количество воды. Судя по кривой 3, можно сказать, что на активированных таким образом фибриллах хлопкового волокна существенно возросло содержание воды связанной с помощью сил моно- и полимолекулярной адсорбции: 22% влаги в обработанных образцах против 12...13% в исходном хлопке (кривая 1). Это свидетельствует в пользу диспергирования кристаллитов микрофибриллы и возрастания микропористости целлюлозы.

Описываемая ситуация подтверждается данными табл. 1 (параметры надмолекулярной структуры целлюлозы), в которой представлены определенные методами, описанными выше, параметры надмолекулярной структуры целлюлозы. Из данных следует, что последовательная обработка спиртом и эфиром, а также спиртом, эфиром и мочевиной приводит к увеличению емкости адсорбционного монослоя, увеличению удельной площади поверхности, уменьшению степени кристалличности, среднего размера кристаллитов, входящих в состав микрофибрилл, и, как следствие, это приводит к возрастанию микропористости.

Т а б л и ц а 1

№	w <sub>m</sub> , г/г	S <sub>уд</sub> , м <sup>2</sup> /г	k	d <sub>k</sub> , Å
1 <sub>1</sub>	0,04	140	0,64	60
2 <sub>1</sub>	0,05	175	0,55	46,44
3 <sub>1</sub>	0,047	164,06	0,58	50,07
2 <sub>2</sub>	0,06	210	0,46	37,29
3 <sub>2</sub>	0,066	231	0,41	33,07
4 <sub>2</sub>	0,06	210	0,46	37,29

Индексы, указанные в номерах образцов, соответствуют порядковым номерам рисунков, на которых представлены зависимости времен спин-спиновой релаксации T<sub>2</sub> от влагосодержания w.

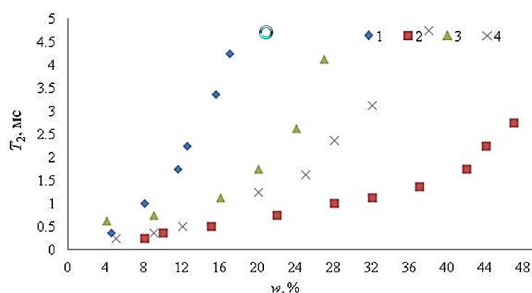


Рис. 2

На рис. 2 (зависимость времени спин-спиновой релаксации T<sub>2</sub> от влагосодержания w образцов: 1 – хлопок исходный; 2 – хлопок, обработанный спиртом, эфиром и целлюлазой *G. Candidum*; 3 – хлопок, обработанный спиртом, эфиром, фракцией эндо-1,4-β-глюконазы; 4 – хлопок, обработанный спиртом, эфиром, мочевиной и препаратом фирмы Rapidase) показаны зависимости времен спин-спиновой релаксации T<sub>2</sub> от влагосодержания w для хлопковых целлюлоз, подвергнутых обработке ферментами после предварительного воздействия на них эфиром, спиртом и в отдельных случаях мочевиной. Обработку проводили небольшими концентрациями ферментов в

стационарных условиях, поэтому гидролиз волокна мог пройти только в небольшой степени и хлопок не потерял своей волокнистой структуры.

Кривая 2 на рис. 2 была получена для образца хлопкового волокна, обработанного спиртом, эфиром и затем целлюлолитическим ферментным препаратом *G. Candidum*, который содержит как эндо-1,4-β-глюканазу, так и C<sub>1</sub>-фермент.

Кривая 3 (рис. 2) представляет зависимость T<sub>2</sub>=f(w) для хлопкового волокна, обработанного спиртом, эфиром, а затем фракцией препарата *G. Candidum* и в значительной степени очищенным от C<sub>1</sub>-фермента.

Кривая 4 (рис. 2) получена для хлопка, обработанного спиртом, эфиром, мочевиной, а затем препаратом целлюлазы французской фирмы Rapidase. Известно, что этот препарат имеет высокую активность эндо-1,4-β-глюканазы, но, по-видимому, не содержит целлюбиогидролазы (C<sub>1</sub>) [4].

Обращает на себя внимание тот факт, что кривые рис. 2, полученные для образцов хлопка, обработанного ферментами, резко отличаются от кривых рис. 1, полученных для исходного хлопка и образцов, претерпевших только обработку растворителями и мочевиной. Первые показывают сравнительно малые значения спин-спиновой релаксации T<sub>2</sub> даже при больших влагосодержаниях (25...50% влажности). Это свидетельствует о росте активной удельной поверхности хлопкового волокна и о появлении большого количества новых активных центров сорбции – гидроксильных и карбоксильных групп, появившихся в результате расщепления ферментами макромолекул целлюлозы. Все это приводит к ослаблению меж- и внутримолекулярных водородных связей в микрофибриллах целлюлозы, следовательно, к увеличению общего количества относительно свободных протонсодержащих поверхностных активных центров ее фрагментов, что и находит отражение в изменении параметров ЯМР-релаксации [5], [9]. Результатом этого процесса является ограничение молекулярной подвижности сорбата даже при относительно высоком содержании влаги в образцах.

Появление большого количества центров сорбции мы склонны относить за счет аморфизации поверхности микрофибрилл целлюлозы при их диспергировании, происходящей под действием ферментов. Эндо-1,4-β-глюканаза, взаимодействуя с субстратом, разрывает меж- и внутримолекулярные водородные связи целлюлозы. Освобождаемые гидроксильные группы на "разрыхленных" ферментом участках приобретают способность активно сорбировать воду.

Анализируя данные табл. 1 и характер зависимости T<sub>2</sub> от влагосодержания w, можно прийти к выводу, что уже при малых влагосодержаниях целлюлозы молекулы воды диффундируют в пространства между элементарными микрофибриллами, формирующими ее микрофибриллу, и производят расклинивающую ее давление между гидрофильными поверхностями соседствующих микрофибрилл. Движущей силой такого расклинивающего давления может служить сильное диполь-дипольное взаимодействие молекул воды с активными центрами поверхности целлюлозы, при котором молекулы воды, интенсивно проникая в микропористое пространство, образуют, как показывает расчет, избыточное расклинивающее давление, превышающее 10<sup>6</sup> Па. Описываемый эффект далее поддерживается слоями молекул воды за счет сил поверхностного натяжения, но уже при больших влагосодержаниях. Данный процесс создает условия сравнительно легкого проникновения в образующиеся межфибрилярные пространства биохимических препаратов, включающих целлюлазный комплекс. Основаниями для такого рода утверждений является оказание сильного влияния ферментативного гидролиза целлюлозы на возрастание диспергирования, резкий рост удельных поверхностей, уменьшение степени кристалличности и размеров кристаллитов. Например, удельная поверхность образцов после ферментативного гидролиза почти в 1,7 раза превышает значения исходного образца и более чем в 1,3 раза превышает соответствующие значения удельной поверхности образцов, обработанных спиртом, эфиром и мочевиной.

Таким образом, результаты, представленные в табл. 1, подтверждают те выводы, которые были сделаны выше при изучении молекулярной подвижности сорбированной воды в препаратах целлюлозы.

Интересным представляется то, что хлопковое волокно, обработанное спиртом и эфиrom, а затем фракцией, содержащей эндо-1,4- $\beta$ -глюканазу фирмы Rapidase, в которой также практически отсутствует целлобиогидролаза (рис. 2, кривая 4), имело зависимость времени спин-спиновой релаксации  $T_2$  от влагосодержания  $w$ , аналогичную той, которая свойственна образцам, полученным при обработке нефракционированной ферментной системой *G. Candidum* (рис. 2, кривая 3), что коррелирует с данными табл. 1. Таким образом, те резкие изменения в надмолекулярной структуре целлюлозы, которые обнаруживаются методом ЯМР и описаны выше, производят один тип ферментов целлюлазной системы эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы. Именно этот фермент (а не  $C_1$ -фермент) ответственен за увеличение влагосодержания и за снижение упорядоченности целлюлозы в процессе ее ферментного гидролиза.

Возможно,  $C_1$ -фермент в ферментной системе *G. Candidum* действительно являясь целлобиогидролазой, удаляет с поверхности фибрилл ставшие доступными для него после действия эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы олигосахариды, гидролизуя их и переводя их в раствор в виде дисахарида.  $C_1$ -фермент, таким образом, обнажая поверхность целлюлозных фибрилл от коротких целлюлозных цепей, дает возможность эндо-1,4- $\beta$ -глюканазе осуществлять новую атаку на освобожденных участках, тем самым непрерывно способствуя своим участием углублению процесса гидролиза.

## ВЫВОДЫ

1. Установлен характер надмолекулярных перестроек в ходе различных видов биохимического воздействия на процесс гидролиза, заключающийся в резком увеличении удельной поверхности целлюлозы, снижении степени кристалличности, уменьше-

нии среднего поперечного размера кристаллитов микрофибрилл.

2. Показано, что основным компонентом целлюлазного комплекса, вызывающим наибольшее изменение в структуре целлюлозы, является эндо-1,4- $\beta$ -глюканаза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Грунин Ю.Б., Грунин Л.Ю., Никольская Е.А. и др. Особенности процессов сорбции паров воды и азота на целлюлозе // Журнал физической химии. – 2013. Т. 87, №1. С. 1...5.
2. ЯМР-анализатор "Спин Трэк" [Электронный ресурс]. – Режим доступа URL: <http://www.nmr-design.com>, свободный. Язык русский.
3. Чижик В.И. Ядерная магнитная релаксация. – СПб.: СПбГУ, 2004.
4. Грунин Ю.Б. Анализ системы целлюлоза-вода модифицированными методами протонного магнитного резонанса. – Рига, 1989.
5. Грунин, Л.Ю., Грунин Ю.Б., Таланцев В.И. и др. Особенности структурной организации и сорбционных свойств целлюлозы // Высокомолекулярные соединения. – Серия А, 2015. Т. 57, №1. С.46...55.
6. Грунин Ю.Б., Грунин Л.Ю., Гальбрайт Л.С. и др. Особенности диспергирования кристаллической целлюлозы при ее увлажнении // Химические волокна. – 2017, №5. С.31...36.
7. Клесов А.А., Григораиш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы // Биоорганическая химия. – 1981. Т.7, №10. С.1538...1552.
8. Дубинин М.М. Новое в области адсорбции паров микропористыми адсорбентами // Журнал физической химии. – 1987. Т.61, №5. С.1301...1305.
9. Грунин Ю.Б., Грунин Л.Ю., Таланцев В.И. и др. Надмолекулярные перестройки в целлюлозе в ходе гидратации // Биофизика. – 2015. Т.60, Вып.1. С.53...64.

## REFERENCES

1. Grunin Yu.B., Grunin L.Yu., Nikol'skaya E.A. i dr. Osobennosti protsessov sorbtzii parov vody i azota na tsellyuloze // Zhurnal fizicheskoy khimii. – 2013. T.87, №1. S. 1...5.
2. YaMR-analizator "Spin Trek" [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa URL: <http://www.nmr-design.com>, svobodnyy. Yazyk russkiy.
3. Chizhik V.I. Yadernaya magnitnaya relaksatsiya. – SPb.: SPbGU, 2004.
4. Grunin Yu.B. Analiz sistemy tsellyuloza-voda modifitsirovannymi metodami protonnogo magnitnogo rezonansa. – Riga, 1989.
5. Grunin, L.Yu., Grunin Yu.B., Talantsev V.I. i dr. Osobennosti strukturnoy organizatsii i sorbtсионnykh svoystv tsellyulozy // Vysokomolekulyarnye soedineniya. – Seriya A, 2015. T. 57, №1. S.46...55.

6. Grunin Yu.B., Grunin L.Yu., Gal'braykh L.S. i dr. Osobnosti dispergirovaniya kristallicheskoj tsellyulozy pri ee uvlazhnenii // Khimicheskie volokna. – 2017, №5. S.31...36.

7. Klesov A.A., Grigorash S.Yu. Fermentativnyy gidroliz tsellyulozy // Bioorganicheskaya khimiya. – 1981. T.7, №10. S.1538...1552.

8. Dubinin M.M. Novoe v oblasti adsorbtsii parov mikroporistymi adsorbentami // Zhurnal fizicheskoy khimii. – 1987. T.61, №5. S.1301...1305.

9. Grunin Yu.B., Grunin L.Yu., Talantsev V.I. i dr. Nadmolekulyarnye perestroyki v tsellyuloze v khode gidratatsii // Biofizika. – 2015. T.60, Vyp.1. S.53...64.

Рекомендована кафедрой физики. Поступила 14.12.18.

---