

# Зачем нужны зубы

## ИЛИ Влияние механического воздействия на ферментативные процессы



© А. Л. Бычков, 2014

Для многих из нас слово «реакция» вызывает ассоциации со стеклянными колбами и ретортами, заполненными разноцветными жидкостями, в которых идут таинственные химические превращения различных веществ. Однако химическая реакция может проходить не только в жидкой или газообразной фазе, но и в твердой. Одной из ключевых проблем современной химии твердого тела является проблема управления реакционной способностью твердых веществ. В случае растительного сырья эта проблема непосредственно связана с эффективностью технологий производства из доступного и дешевого сырья полезных продуктов, таких как биотопливо, экологически чистые антибиотики и лечебно-профилактическое питание

**М**еханохимией называют раздел химии твердого тела, изучающий превращения твердых веществ и их смесей, их физико-химические превращения при механических воздействиях (деформировании, трении, ударном сжатии). Частным случаем таких превращений являются *механоферментативные процессы*, предусматривающие предварительную активацию субстрата и его последующий ферментативный гидролиз.

Хочется добавить, что хотя активным изучением подобных процессов ученые занялись сравнительно недавно, большинство животных, не исключая человека, осуществляет механоферментативный гидролиз изо дня в день на протяжении всей жизни. Речь идет о пищеварении, точнее, об активации переваривания компонентов пищи благодаря предварительной механической обработке зубами.

Изучением механоферментативных процессов и созданием соответствующих технологий, только с использованием уже специальных механических устройств, в течение ряда лет занимаются исследователи лаборатории химии твердого тела Института химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск).

### Если бы у сахара были зубы, он бы сам себя съел\*

Для начала определимся, в чем же состоит польза механоферментативного гидролиза природных полимеров – белков и углеводов? Известно, что в пространственной организации структуры таких молекул можно выделить несколько уровней: от простой цепочки последовательно соединенных мономеров до сложных агрегатов из нескольких макромолекул. В ряде случаев полимеры различной природы даже могут взаимодействовать друг с другом, образуя сложные супрамолекулярные комплексы.

Возьмем, к примеру, клетки растений, которые в отличие от клеток животных покрыты особой прочной оболочкой. Растительная стенка состоит из своего рода лигнин-гемицеллюлозного «бетона», армированного целлюлозными волокнами. Иногда такая структура дополнительно упрочняется диоксидом кремния, особенно в покровных и проводящих тканях. Супрамолекулярную архитектуру клеточных стенок дрожжей, относящихся уже к грибам, составляет разветвленная сетка маннопротеинов и хитина, прикрепленная к высокомолекулярному полисахариду –  $\beta$ -1,3-глюкану.

Подобное супрамолекулярное строение биологических структур способствует выполнению клетками своих функций, однако значительно усложняет

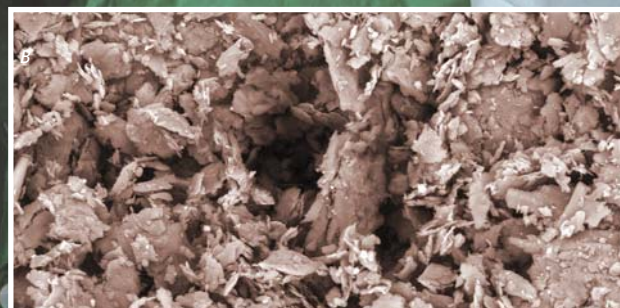
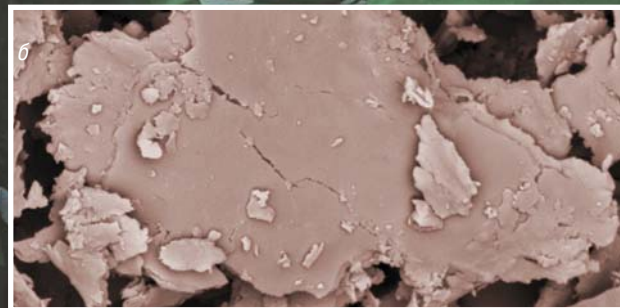
\* В качестве подзаголовков автором использованы русские пословицы



БЫЧКОВ Алексей Леонидович – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии твердого тела Института химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск). Победитель «Молодежного Научно-Инновационного Конкурса («У.М.Н.И.К.»)» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (2012) и конкурса молодых ученых «Возобновляемая энергетика: пути повышения энергетической и экономической эффективности» (2013). Автор и соавтор 75 научных работ и 4 патентов

*Ключевые слова:* механическая активация, механоферментативный гидролиз, лигноцеллюлоза, биотопливо.

*Key words:* mechanical activation, mechanoenzymatic hydrolysis, lignocellulose, biofuel



Механическая активация кардинальным образом меняет морфологию растительного сырья. Исходная биомасса кукурузной соломы, измельченной на обычной ножевой мельнице, представляет собой частицы размерами 0,3—1,0 мм с четкой морфологией, свойственной различным тканям растения (а). В процессе механической активации частицы сначала измельчаются и спрессовываются в плотные слоистые агрегаты (б), которые затем разрушаются. Из активатора выходит гомогенный продукт со средним размером частиц около 16 мкм (в). Сканирующая электронная микроскопия. Фото А. Бычкова

исследователям решение задач по переработке природного сырья.

Например, в процессе производства биоэтанола из целлюлозы требуется получить углеводные мономеры, что является непростым делом. Для этих целей используют ферментативный гидролиз, который лучше будет протекать при увеличении площади поверхности, на которой могут сорбироваться гидролизующие ферменты. Кроме того, следует нарушить супрамолекулярную структуру клеточных стенок, и сделать это таким образом, чтобы на поверхности было как можно больше целлюлозы и меньше лигнина, ингибирующего ферменты (Sinityn *et al.*, 1995).

Возвращаясь к нашей «пищеварительной» аналогии, отметим, что даже выделенные из гороха белковые молекулы из-за своего сложного полимерного строения могут не полностью усваиваться у людей с определенными нарушениями в работе желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, для интенсификации процессов переработки растительного сырья необходимо упорядочить структуру клеточных стенок одним из известных в настоящее время методов, таким как обработка перегретым паром, экстракция органическими растворителями, химическая обработка и, наконец, механохимическим способом. И надо сказать, что последний метод обладает рядом неоспоримых преимуществ: экологической чистотой, внешней простотой проводимых операций и относительно быстрым переходом от лабораторных разработок к промышленным технологиям.

### Поел бы репки, да зубы редки

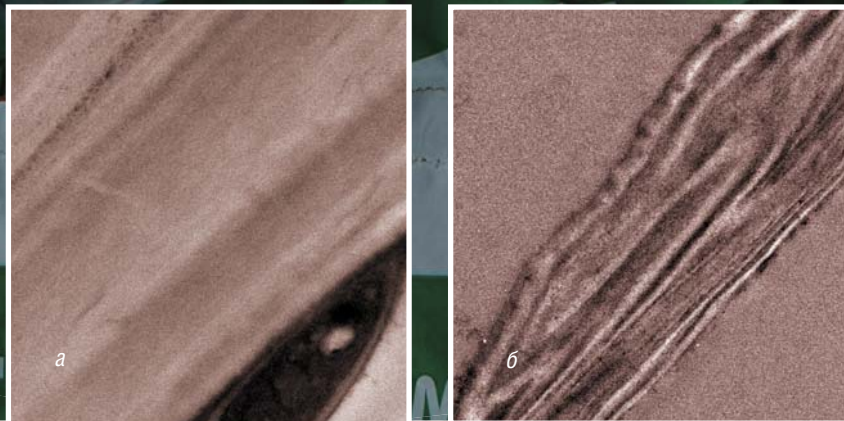
Как известно, исходное растительное сырье чаще всего не может перерабатываться без предварительного измельчения. Для этой функции у животных служат передние зубы – резцы; для технологических же целей имеется широкий спектр специального оборудования: ножевые, молотковые, валковые и щетковые мельницы, рубительные машины и т.п. Некоторые из этих устройств предназначены для хрупких, а некоторые – для волокнистых материалов. Одни являются представителями лабораторного оборудования с продуктивностью несколько килограммов в час, другие же способны за секунды измельчать в щепу стволы деревьев.

Реакционная способность продукта, полученного после обработки в подобных мельницах, как правило, не сильно отличается от реакционной способности исходного сырья: основной целью измельчения является получение материала с размерами частиц

Энергонапряженные активаторы можно назвать «коренными зубами» механохимии. На фото – АГО-2 (справа) производства ЗАО «Новиц» (Новосибирск). Фото А. Гуляева



Макет технологической линии на базе мельницы-активатора ЦЭМ (ЗАО «Новиц», Новосибирск) и тарелка с супом-пюре из гидролизованной гороховой муки, полученной по механоферментативной технологии. Фото Е. Бычковой (НГТУ, Новосибирск)



Супрамолекулярная структура растительной клеточной стенки представлена упорядоченным набором слоев, обогащенных целлюлозой (светлые слои) и лигнином (темные электроплотные слои) (а). После механической активации слои смещаются и деформируются (б). Это приводит к аморфизации целлюлозных кристаллитов согласно теории деформации полимеров (Casale & Porter, 1979) и повышает эффективность гидролиза целлюлозы. Просвечивающая электронная микроскопия. Фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН)

0,5–5,0 мм, подходящего для дальнейшего разупорядочения супрамолекулярной структуры клеточных стенок при помощи других устройств – энергонапряженных активаторов, этих «коренных зубов» механохимии.

Известно, что реакционная способность лигноцеллюлозного материала – главного «участника» ферментативного гидролиза, зависит от множества параметров: химического состава (главным образом содержания лигнина), удельной площади поверхности, степени кристалличности полимеризации целлюлозы. Изменить эти характеристики позволяет правильно подобранное механическое воздействие, реализуемое в активаторах.

Не стоит забывать и про второго участника ферментативного гидролиза – комплекс целлюлозолитических ферментов, который необходимо каким-то образом распределить по субстрату. Разумеется, к активированному лигноцеллюлозному материалу можно добавить заранее приготовленный раствор ферментов. Однако делать так вовсе не обязательно.

Оказалось, что существует узкий оптимум условий механического воздействия, при котором фермент (вещество белковой природы) не меняет свою структуру и сохраняет каталитическую активность (Buchkov *et al.*, 2011). В результате такой обработки получается продукт, в котором частицы ферментного препарата достаточно равномерно распределены среди частиц субстрата. После этого для запуска гидролиза только и остается, что добавить воды и задать нужную температуру.

Казалось бы, все просто, однако надо заметить, что вышеупомянутый оптимум действительно очень узок: в большинстве случаев механическое воздействие приводит к необратимой денатурации ферментов. Чтобы избежать этого, необходимо строго контролировать энергию, подводимую к веществу в процессе обработки, и соответствующим образом подготовить сам субстрат.

Ситуация, как в агротехнологии: можно рассыпать сколько угодно семян по поверхности плотной, неподготовленной почвы – и из них взойдут единицы, но стоит эту же почву должным образом вспахать, прорыхлить и удобрить – из меньшего количества семян получится замечательный урожай.

### Кто как жует, тот так и живет

Как же следует готовить лигноцеллюлозные материалы к ферментативному гидролизу? Важным помощником в этом деле служит комплекс физико-химических методов, позволяющих описать процесс механической активации и определить степень и качество измельчения, в том числе и микроскопия.

В результате механической активации получается гомогенный продукт со средним размером частиц около 16 мкм. С уменьшением размера частиц закономерно возрастает удельная площадь поверхности. Это особо важный параметр, так как сначала ферменты эндоглюканызы должны сорбироваться на поверхности полимерных углеводов и катализировать реакцию деполимеризации, и лишь затем получившиеся олигомерные углеводы будут реагировать с экзо-глюканызами в растворе. Методом тепловой десорбции азота удалось показать, что механическая активация приводит практически к пятикратному увеличению удельной площади поверхности материала!

Следующий важный фактор, влияющий на эффективность ферментативного гидролиза, – степень кристалличности целлюлозы. Механическая активация приводит к двукратному уменьшению доли кристаллических участков целлюлозы, которые мало подвержены действию ферментов. Аморфизация этих неактивных участков является прямым следствием разупорядочения супрамолекулярной структуры клеточной стенки (Buchkov *et al.*, 2012).

Дополнительное увеличение доли аморфных участков позволяет проводить ферментативный гидролиз с большими выходами конечного продукта.

Еще одним удачным примером влияния механической активации на последующий ферментативный гидролиз является технология получения маннанолигосахаридных заменителей антибиотиков для животноводства из дрожжевой биомассы (Buchkov *et al.*, 2012).

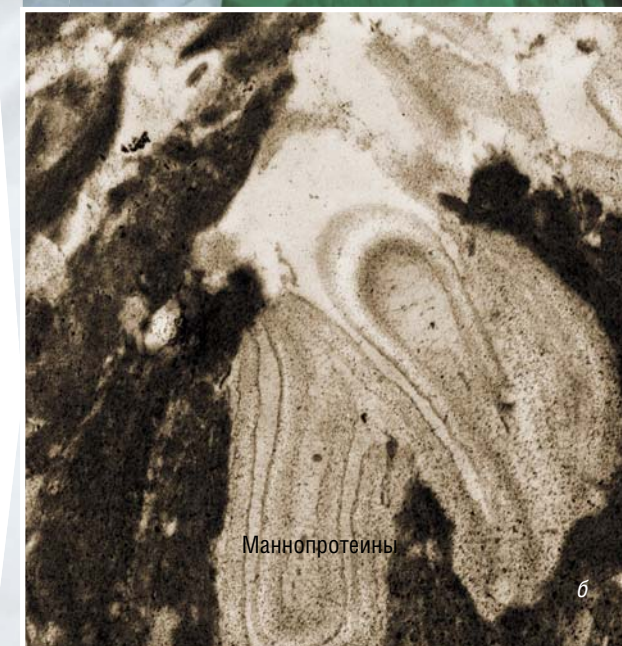
Клеточные стенки дрожжей состоят из нескольких слоев, поэтому чтобы маннанолигосахариды в составе маннопротеинов смогли взаимодействовать с патогенными микроорганизмами, необходимо частично гидролизовать β-глюкан, с которым они связаны в единый супрамолекулярный ансамбль. Механическое воздействие разупорядочивает структуру β-глюкана, обеспечивая протекание ферментативного процесса.

Пример с дрожжами показывает, как результаты работы, начатой десять лет назад в ИХТГМ СО РАН для решения фундаментальных задач «механохимической разборки» супрамолекулярных структур, легли в основу технологии получения экологически чистых антибиотиков для сельского хозяйства. Сегодня эта технология отрабатывается на ПО «Сиббиофарм» (Бердск), лидирующем предприятии биотехнологического производства России.

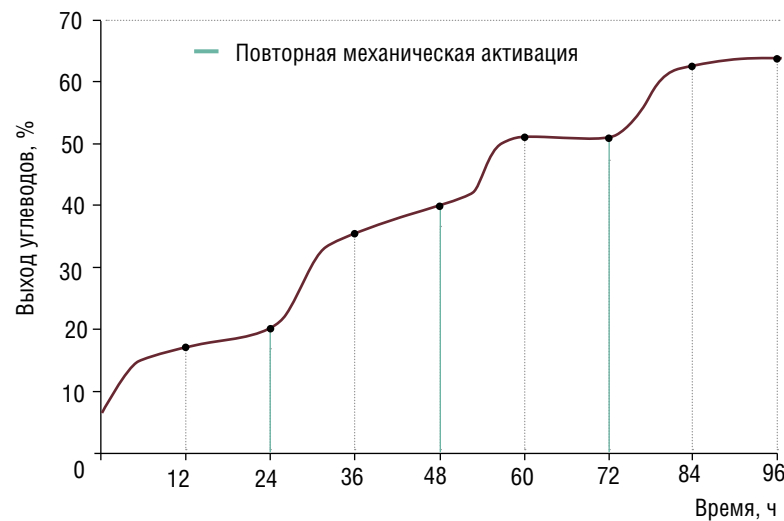
Использование предварительной механической активации позволяет эффективно проводить и ферментативный гидролиз белков, входящих в состав гороха, получая новый продукт, в котором содержание свободных аминокислот повышается в десятки раз по сравнению с исходным (Самошкин и др., 2013). Супы-пюре на основе такого гидролизата можно использовать для лечебно-профилактического питания людей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, а также питания спортсменов, нуждающихся в большом количестве быстроусвояемого белка.

### Без жвачки корова хворает, без цели человек погибает

Возвращаясь к ферментативному гидролизу лигноцеллюлозы, вспомним, что этот процесс постепенно замедляется из-за расходования части целлюлозы, доступной для действия ферментов. Остается твердый осадок, представляющий собой в основном кристаллические фрагменты целлюлозы. В принципе и этот остаток может быть утилизирован в виде экологически чистого твердого топлива. В Институте теплофизики СО РАН даже разработаны энергетические установки, позволяющие сжигать мелкодисперсную лигноцеллюлозу в самоподдерживающемся факеле. Подобные установки могут быть востребованы предприятиями, производящими биотопливо из растительного сырья,



Структура клеточных стенок дрожжей (а) после механической активации и ферментативного гидролиза заметно разупорядочивается: их частично гидролизованная поверхность «взъерошивается» маннопротеинами (на фото – темные точки) (б). Просвечивающая электронная микроскопия. Фото Е. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск)



Эффективность ферментативного гидролиза соломы кукурузы, проведенного с механическим «перезапуском» процесса, оказывается намного выше обычного механохимического гидролиза, при котором выход углеводов не превышает 20%

для создания замкнутого энергетического цикла и утилизации отходов переработки.

Однако существует другой путь, повышающий суммарную степень конверсии лигноцеллюлозы. Известно, что некоторые травоядные, например коровы, для повышения усвоения корма проводят его повторную механическую обработку в процессе переваривания – жуют жвачку. Это приводит к дополнительному разупорядочению частиц корма и повышению доступности питательных веществ, прежде всего целлюлозы.

Исследования, проведенные сотрудниками ИХТТМ СО РАН, доказали, что повторная механическая активация гидролизного остатка позволяет дать уже гидролизованному субстрату «второе дыхание» (Korolev *et al.*, 2011). Обработка в бисерных мельницах, роторно-пульсационных аппаратах позволяет разупорядочить структуру оставшейся целлюлозы и запустить реакцию гидролиза с прежней скоростью.

С одной стороны, этот подход позволяет получить из лигноцеллюлозного сырья дополнительное количество биоэтанола, а также повысить долю лигнина в конечном остатке, что повышает теплотворную способность твердого биотоплива. С другой стороны, этот выигрыш может не компенсировать энергетические затраты на проведение повторной механической активации. Поэтому для отработки подобной технологии для

каждого вида сырья необходима слаженная работа специалистов из двух разных областей: химика, который сможет оценить количество энергии, тратящееся на увеличение реакционной способности, и экономиста, отвечающего за рентабельность производства дополнительной порции биотоплива.

Работа выполнена при финансовой поддержке Стипендии Президента РФ молодым ученым, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (грант № СП-724.2012.1)

**Ф**ундаментальные знания о процессах, происходящих при механической ферментативной обработке растительного сырья, полученные в результате многолетних исследований, проводимых сотрудниками лаборатории химии твердого тела ИХТТМХ СО РАН, сегодня легли в основу множества эффективных производственных технологий.

Более того, применение этих технологий позволяет повысить рентабельность соответствующих производственных предприятий, ведь очень часто бездумное закивание энергии в материал заканчивается разложением целевых компонентов, как в известной еврейской поговорке: «когда везенье отворачивается, зубы ломаются даже от творога». В то же время грамотное изменение свойств природных полимеров приводит к увеличению реакционной способности исходного сырья и в итоге – повышению выхода полезных продуктов.

Сотрудники лаборатории химии твердого тела буквально попирают ногами лигноцеллюлозное сырье – солому пшеницы, заготовленную для экспериментов по «биотопливому» государственному контракту.

Слева направо: верхний ряд – Е. М. Подгорбунских, В. И. Березин, Г. Н. Нестерова, Т. С. Уразова, Д. В. Дудина, заведующий лабораторией О. И. Ломовский, Е. Г. Шаполова, О. В. Голязимова, С. Ю. Абрамов; нижний ряд – А. Л. Бычков, В. А. Бухтояров, И. О. Ломовский, Д. В. Орлов

**Литература**

Самошкин С. П., Бычкова Е. С., Бычков А. Л. и др. Сушители лечебно-профилактического назначения с питательными веществами в легкоусвояемой форме // Пищевая промышленность. 2013. № 8. С. 26–27.

Bychkov A. L., Buchtayarov V. A., Lomovsky O. I. Thermal and mechanical denaturation of cellulase in solution and in solid phase // Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technologies. 2011. V. 5(1). P. 4–10.

Bychkov A. L., Ryabchikova E. I., Korolev K. G., Lomovsky O. I. Ultrastructural changes of cell walls under intense mechanical treatment of selective plant raw material // Biomass and Bioenergy. 2012. V. 47. P. 260–267.

Bychkov A. L., Ryabchikova E. I., Lomovsky O. I. Mechanoenzymatic hydrolysis of yeast biomass // Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety. 2012. V. 6(1). P. 25–36.

Korolev K. G., Lomovsky O. I., Politov A. A. et al. Method for preparation of oil palm waste to enzymatic hydrolysis for production of water-soluble carbohydrates. Patent N WO 2011/002329. A1. 06.01.2011.

Автор благодарит д. б. н. Е. И. Рябчикову (ИХБФМ СО РАН) и Т. Ф. Ломовскую (ПО «Сиббиофарм») за помощь в подготовке статьи; А. Ю. Гуляева (ЗАО «НОВИЦ», Новосибирск) – за помощь в подготовке иллюстраций



Несмотря на свои масштабы, это не производственная, а лабораторная установка, в которой проводится механически активированный ферментативный гидролиз кукурузной соломы. Фото А. Бычкова