На правах рукописи

БЫЧКОВ Алексей Леонидович

Механическая активация ферментативного гидролиза полимеров биомассы дрожжей

02.00.21 – химия твердого тела

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Новосибирск – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН

Научный руководитель доктор химических наук, профессор Ломовский Олег Иванович

Официальные оппоненты доктор химических наук, профессор Аввакумов Евгений Григорьевич

доктор биологических наук, профессор Загребельный Станислав Николаевич

Ведущая организация Учреждение Российской академии наук Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

Защита состоится 29.09.2010 г. в 10-00 на заседании диссертационного совета Д 003.044.01 в Учреждении Российской академии наук Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН по адресу:
630128, Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН.

Автореферат разослан « » августа 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук Шахтшнейдер Т.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Относительная простота механохимических экспериментов и распространённость в производстве операций, связанных с механической обработкой, постоянно привлекали внимание учёных и технологов к механохимии как потенциальному методу решения прикладных задач. Большинство достижений в прикладной механохимии были сделаны на пересечении со смежными областями знаний [1], например, с материаловедением, биотехнологией, химией лекарственных веществ [2, 3], экологией [4] и т.д.

Однако, несмотря на постепенный рост интереса к механохимии, промышленные применения лабораторных разработок немногочисленны. Одним из факторов, сдерживающих промышленное применение лабораторных механохимических разработок, является недостаток фундаментальных знаний о протекании процессов при механическом воздействии.

В 50-70-х годах в нашей стране проведены исследования по изучению процессов механической обработки синтетических полимеров и индивидуальных органических веществ. Было установлено, что при механической обработке полимеров происходит разрыв ковалентных связей с образованием свободных радикалов, установлены многие эмпирические закономерности механокрекинга полимеров [5]. Работы по изучению процессов, происходящих при механической обработке биополимеров и биогенного сырья, являющегося комплексом биополимеров, в основном, направлены на достижение технологических эффектов и не раскрывают механизмов превращений.

Биогенные полимеры и их комплексы широко распространены и обладают огромным промышленным потенциалом. В ряде программ, поддерживаемых правительствами развитых стран, ставится задача расширения использования биовозобновляемого сырья. Например, доля такого сырья в химической промышленности США должна вырасти с 3-5 % в настоящее время до 25 % к 2025 году. Изучение процессов, происходящих при механической обработке биополимеров, а также химических реакций, сопряжённых с механической обработкой, является приоритетной задачей не только с точки зрения фундаментальной науки, но и с точки зрения рационального использования природных ресурсов в химической технологии.

Дрожжевая биомасса *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой супрамолекулярный комплекс полимеров, большинство из которых имеет важное практическое значение [6-8]. Процессы, происходящие при механохимической обработке данного объекта, практически не изучены. В связи с этим изучение механохимических превращений биополимеров дрожжевой клеточной стенки является актуальной задачей.

Цель работы

Экспериментальное изучение физико-химических процессов, протекающих при механически активированном ферментативном гидролизе полимеров биомассы дрожжей, выявление возможности использования этих процессов в химической технологии для получения биологически активных препаратов.

В работе **поставлены следующие задачи:**

- исследование реакционной способности биополимеров клеточной стенки по отношению к гидролизу различными агентами;
- выявление физико-химических процессов, происходящих при механической и химической обработке дрожжевой биомассы;
- изучение изменений супрамолекулярной структуры полимеров клеточной стенки при механической обработке и при гидролизе целлюлозолитическими ферментами и другими реагентами;
- определение оптимальных условий проведения механоферментативного процесса, установление стабильности реагентов и получаемых продуктов;
- определение эффективности применения данного подхода в качестве основы промышленного метода получения биологически активных добавок.

Научная новизна:

- впервые изучено влияние механической обработки на супрамолекулярную структуру биополимеров клеточной стенки дрожжей;
- изучено влияние разупорядочения супрамолекулярной структуры полимеров клеточной стенки на их реакционную способность в реакциях ферментативного гидролиза;
- впервые определены условия совместной механической обработки целлюлозолитических ферментов и целлюлозного субстрата, обеспечивающие устойчивость ферментов и приводящие к образованию реакционноспособных композитов;
- впервые осуществлён механоферментативный гидролиз глюкана клеточных стенок, протекающий в присутствии ограниченного количества воды;
- получен продукт, представляющий собой маннанолигосахариды, прикреплённые к частично гидролизованной клеточной стенке дрожжей, которые являются экологически чистым заменителем антибиотиков для животноводства. По содержанию активного компонента продукт превосходит известные аналоги.

Практическая значимость работы.

На основании проведённых исследований получен продукт, представляющий маннанолигосахариды, прикреплённые к частично гидролизованной клеточной стенке дрожжей. Биологические испытания на живот-

ных показали, что данный продукт можно использовать в качестве экологически чистого заменителя кормовых антибиотиков в птицеводстве. Предложенный способ получения маннанолигосахаридных препаратов защищён патентом РФ (№ заявки 2009122130/15(03090), положительное решение о выдаче патента на изобретение 23.06.2010) «Профилактический антибактериальный препарат и способ его получения».

На защиту выносятся:

- механизм ферментативного гидролиза биополимеров клеточной стенки, приводящий к деполимеризации β-глюкана и повышению доступности маннанолигосахаридов;
- процессы, протекающие при механохимической обработке дрожжевой биомассы со щелочными, кислотными и абразивными добавками;
- особенности механизма активированного ферментативного гидролиза полимеров клеточной стенки, приводящего к увеличению доступности маннанолигосахаридов;
- изменения дефектности структуры полимеров клеточной стенки, протекающие при механически активированном ферментативном гидролизе дрожжевой биомассы;
- оптимальные условия проведения механически активированного ферментативного гидролиза, стабильность реагентов и продуктов реакции;
- антибактериальная эффективность препарата, полученного по предложенной механоферментативной схеме обработки дрожжевой биомассы.

Апробация работы. Результаты, изложенные в диссертационной работе, докладывались и обсуждались на научных семинарах ИХТТМ СО РАН, а также на различных всероссийских и международных форумах, таких как: XLV Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2007), Научно-практическая конференция с международным участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины» (Новосибирск, Россия, 2007), Международная конференция «Техническая химия. От теории к практике» (Пермь, Россия, 2008), V съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, Россия, 2008), XLVI Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2008), Международная конференция «Mechanochemistry and Mechanical Alloying» (Джамшетпур, Индия, 2008), III международная конференция «Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies» (Новосибирск, Россия, 2009), IV Всероссийская конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, Россия, 2009), Международная конференция «Создание новых материалов для эксплуатации в экстремальных условиях» (Якутск,

Россия, 2009), II Российско-Корейская конференция «Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology» (Новосибирск, Россия, 2010), Международная конференция «Catalysis for Renewable Sources» (Санкт-Петербург, Россия 2010).

Личный вклад соискателя. Соискатель лично принимал участие в проведении анализа научно-технической литературы, планировании экспериментов, постановке новых и адаптации, применительно к изучаемым объектам, уже известных методов анализа, приготовлении и исследовании образцов, приготовлении укрупнённой партии образцов для биологических испытаний, обработке и интерпретации полученных экспериментальных данных. Электронно-микроскопическое исследование образцов проводилось совместно с Е.И. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН). Анализы ВЭЖХ проводились совместно с К.Г. Королёвым (ИХТТМ СО РАН). Биологические испытания проводились совместно с Карпачёвой В.В. (СибНИПТИЖ СО РАСХН). Рентгенофазовый анализ проведен Т.А. Чуприковой и Г.С. Гавриловой (ИХТТМ СО РАН). Оптическая микроскопия проводилась Е.В. Киселёвой (ИЦИГ СО РАН). Обсуждение полученных результатов и написание научных статей проводилось совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ: 9 статей, 6 тезисов докладов на российских и международных конференциях, 1 патент.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов (3 главы), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 129 страницах, включает 44 рисунка, 9 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 197 наименований работ отечественных и зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении показана актуальность экспериментального изучения физико-химических процессов, протекающих при механической активированном ферментативном гидролизе полимеров клеточной стенки дрожжей. Сформулированы цели исследования и основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ литературных данных. Обзор литературы состоит из 6-ти разделов. Проанализированы литературные данные как о физико-химических свойствах индивидуальных биополимеров клеточной стенки дрожжей, так и об их супрамолекулярных взаимодействиях, приводящих к образованию сложной структуры – клеточной стенки. Представлены данные о различных типах химических превращений, в

которые могут вступать биополимеры клеточной стенки. Рассмотрены возможные пути увеличения их реакционной способности.

Во второй главе описано приготовление исследуемых образцов исходной (производство ЗАО «Новосибирский дрожжевой завод»), механически и химически обработанной дрожжевой биомассы, описаны методы, используемые для их изучения.

Механическая обработка дрожжевой биомассы и её смесей с различными химическими реагентами проводилась в активаторе АГО-2 и РМС-10 Для обработки в активаторе АГО-2 были выбраны следующие условия: стальные реакторы со стальными сферическими мелющими телами (∅ 5 мм, общим весом 190 г), частота вращения водила составляла 630 об/мин (ускорение мелющих тел – 20 g), реакторы термостатировали проточной водой 10-15 °С. Для обработки в мельнице РМС-10 были выбраны следующие условия: частота вращения 30 Гц, скорость подачи сырья 10 кг/ч, температура внутри реактора 40 ^{o}С.

Ферментативный гидролиз в жидкой фазе проводили в следующих условиях: к навеске гидролизуемого образца добавляли раствор ферментного препарата «Целлолюкс 2000» и выдерживали при температуре 50 ^{o}С в термостатируемом шейкере.

Для осуществления механически активированного ферментативного гидролиза смесь дрожжевой биомассы с ферментным комплексом «Целлолюкс 2000» механически обрабатывали в активаторе АГО-2. Полученный полупродукт запрессовывали в таблетку и прогревали при 50 ^{o}С в течение 20-30 часов.

Моносахаридный состав продуктов определяли при помощи ВЭЖХ. Для этого проводили экстракцию углеводов из полученных продуктов и их кислотный гидролиз. Затем получали производные моносахаридов с этиловым эфиром *n*-аминобензойной кислоты. Разделение производных проводилось на приборе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Россия), оснащенном обращенно-фазовой колонкой «Нуклеосил-С18» (2.0×75 мм, размер частиц 5.0 мкм) и спектрофотометрическим детектором.

Определение содержания глюкозы в образцах проводили с использованием набора реактивов «Новоглюк-К,М-1000» (ЗАО «Вектор Бест», Россия, Новосибирск). Принцип метода основан на селективном ферментативном окислении глюкозы до глюконовой кислоты с выделением перекиси водорода, определяемой спектроскопически (510 нм) по количественной реакции с фенолом и 4-аминоантипирином.

Определение содержания белков в образцах проводили спектроскопически с использованием набора реактивов «Белок-ПГК-Ново» (ЗАО «Вектор Бест», Россия, Новосибирск). Принцип метода основан на взаимодействии аминогрупп белков с сульфогруппами пирогаллолового красного и образовании окрашенного комплекса с поглощением при 598 нм.

Для определения содержания глюкозы и маннозы использовали спектроскопический метод, основанный на получении окрашенных соединений, образующихся при реакции углеводов с карбазолом в концентрированной серной кислоте. УФ-Спектр окрашенных соединений глюкозы имеет один пик (540 нм), а спектр соединений маннозы два пика (440 нм и 540 нм). Концентрация углеводов в реальных образцах рассчитывалась с использованием коэффициентов экстинции, определённых из калибровочных смесей.

Определение молекулярной массы белков проводилось в вертикальной электрофоретической ячейке «Helicon VE-20». Разделяющий гель содержал 20 % акриламида, 3 % бисакриламида. Начальные условия разделения: сила тока 20 мА, падение напряжения 109 В, мощность 2,2 Вт, температура геля 25 ^{o}C.

Определение количества разрушенных клеток. Метод основан на определении падения концентрации метиленового голубого, наблюдаемого из-за сорбции молекул красителя клеточными стенками дрожжевой биомассы. Исходные и разрушенные клетки имеют разные коэффициенты сорбции. Суспензии с известным содержанием разрушенных клеток использованы для построения калибровочных кривых и для исследований экспериментальных образцов биомассы.

Исследование структуры и дефектности клеточной стенки методами электронно-микроскопического анализа. Для исследования структуры клеточных стенок дрожжевой биомассы использовали химические реакции компонентов дрожжевых стенок со специальными реагентами. Такие реакции и соответствующие реагенты традиционно используются в препаративной микроскопии для решения аналитических задач [9]. В результате реакций белковых либо глюкановых компонентов с реагентами структура клетки «декорируется» выделяющимися частицами, которые хорошо различимы при электронно-микроскопическом исследовании. Поскольку эффект базируется на формировании контраста на различных участках электронно-микроскопического изображения, такие реагенты можно назвать «контрастирующими».

Для исследования дефектности белковых участков клеточных стенок использовали декорирование осмиевой кислотой. В результате взаимодействия осмиевой кислоты с аминокислотами белков образовываются электронноплотные комплексы сложного состава. Реакция восстановления комплексных аммиачных солей серебра и образование металлического серебра использована для выявления глюкановых участков клеточной стенки, содержащих концевые альдегидные группы, и, соответственно, оценки степени дефектности таких участков.

Рентгенографические исследования осуществлялись при комнатной температуре на порошках в кварцевой кювете с помощью дифрактометра ДРОН 4М (излучение Cu Kα).

<u>В третьей главе</u> представлены экспериментальные данные по гидролизу полимеров клеточной стенки различными реагентами. Также, детально рассмотрено влияние механической обработки на реакционную способность целлюлозолитических ферментов, дефектность структуры биополимеров и их реакционную способность в последующем ферментативном гидролизе.

<u>Первый параграф</u> третьей главы содержит результаты экспериментов по жидкофазному гидролизу различными реагентами исходной биомассы *S. cerevisiae* и антибактериального препарата, полученного по известной в литературе схеме. Из приведённых данных можно заключить, что действующим началом маннанолигосахаридных препаратов является поверхность частично гидролизованной клеточной стенки *S. cerevisiae*, содержащая доступные маннанолигосахариды.

Для оценки доступности маннанолигосахаридов и, как следствие, эффективности механической, химической и любой другой обработки следует использовать данные о содержании щёлочерастворимых маннанолигосахаридов, а для достижения максимального выхода маннанолигосахаридов необходимо гидролизовать наиболее реакционноспособную часть структурообразующего β-глюкана, который связывает и организует остальные компоненты клеточной стенки.

Были проведены эксперименты по гидролизу дрожжевой биомассы ферментным препаратом «Целлолюкс 2000». Процессы, происходящие при протекании гидролиза, проиллюстрированы на рис. 1.

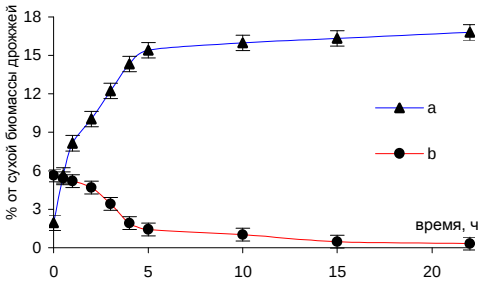


Рис. 1. Накопление глюкозы в результате ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы: *a* – выход мономерной формы глюкозы, *b* – выход глюкоолигосахаридов.

В ходе гидролиза наблюдаются два параллельных процесса: гидролиз β-глюкана клеточной стенки с образованием олигомерных форм глюкосахаридов и гидролиз глюкоолигосахаридов с накоплением мономерной формы глюкозы.

Показано, что при ферментативном гидролизе дрожжевой биомассы в жидкой фазе наиболее эффективно процесс протекает на протяжении первых пяти часов. За пять часов концентрация мономерной формы глюкозы увеличивается до 15,4 %, а концентрация олигомерных форм падает с 5,7 % до 1,4 %. Дальнейшее проведение ферментативного гидролиза позволяет более полно гидролизовать β-глюкан, но не эффективно из экономических соображений.

<u>Во втором параграфе</u> третьей главы рассмотрено влияние механической обработки на дефектность структуры клеточной стенки и выход щёлочерастворимых маннанолигосахаридов.

Методом, основанным на сорбции красителя дрожжевыми клеточными стенками, определена степень разрушения клеток биомассы при механической обработке. За 2 минуты механической обработки разрушаются около 30-40 % дрожжевых клеток (рис. 2). Для разрушения всех клеток биомассы необходимо проводить обработку около 15 минут, что может приводить к перегреву образца и денатурации целевых компонентов и ферментов.

Анализ содержания белка в экстракте механически обработанной биомассы показал, что в результате механической обработки дрожжевой биомассы выход маннопротеинов в раствор значительно увеличивается (рис. 3).

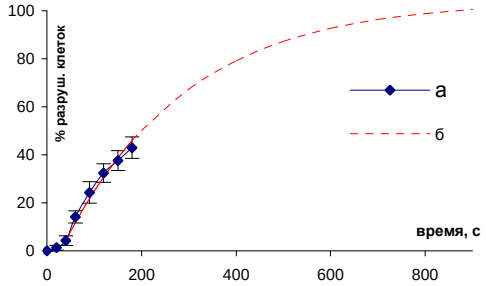


Рис. 2. Зависимость количества разрушенных клеток в зависимости от времени механической обработки: *а* – экспериментальные данные, *б* – теоретическое описание экспоненциальным законом.

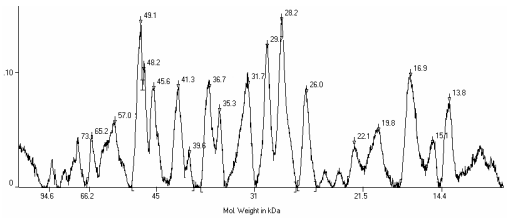


Рис. 3. Профилограмма распределения по молекулярной массе белков экстракта механически обработанной дрожжевой биомассы.

При проведении механической обработки дрожжевой биомассы выход растворимых продуктов зависит от физико-химической природы добавки. Обработка с гидроксидом натрия приводит к образованию композита с повышенной реакционной способностью. Добавление воды к такому композиту приводит к повышенному выходу маннанолигосахаридов, что связано с локальными повышениями концентрации щёлочи при диффузии воды в композит.

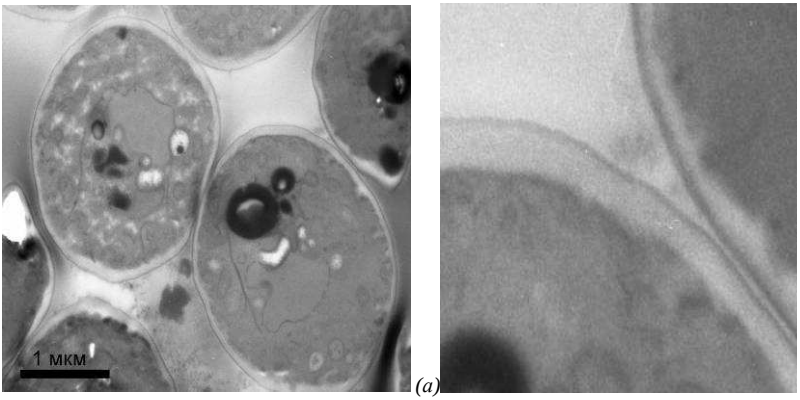


Рис. 4. Морфология дрожжевых клеток до механической обработки. Ультратонкие срезы препаратов, фиксированных осмиевой кислотой. *а* - исходные дрожжевые клетки, *б* – увеличенный фрагмент микрофотографии клеточных стенок.

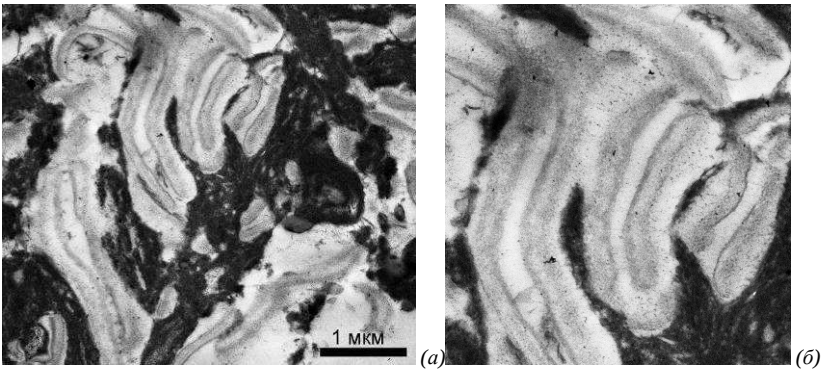


Рис. 5. Морфология дрожжевых клеток после механической обработки. Ультратонкие срезы препаратов, фиксированных осмиевой кислотой. *а* - дрожжевые клетки после механической обработки, *б* – увеличенный фрагмент микрофотографии клеточных стенок.

Электронномикроскопические исследования клеточной стенки показали, что при механической обработке нарушается сплошность дрожжевых клеток, а также изменяется супрамолекулярная структура полимеров клеточной стенки. Для определения дефектности маннопротеиновых компонентов было использовано «декорирование» осмиевой кислотой (рис. 4-5). По сравнению с клетками исходного препарата структура клеточной стенки разупорядочена, стенка выглядит гомогенной. Чётко разделявшиеся в исходных клеточных стенках слои маннопротеинов и β-глюкана (рис. 4) становятся размытыми и частично проникают друг в друга (рис. 5). Эти данные свидетельствуют о нарушении супрамолекулярной структуры полимеров и позволяют прогнозировать у механически обработанной био-

массы повышенную реакционную способность при последующем ферментативном гидролизе.

Для декорирования дефектов углеводных компонентов была использована реакция с аммиачными комплексами нитрата серебра. Показано, что стенка исходных, а также механически обработанных клеток, не взаимодействует с комплексами серебра ввиду низкой концентрации восстанавливающих альдегидных групп (рис. 6). Таким образом, видно, что механическая обработка в отсутствие реагентов не приводит к существенному повышению реакционной способности глюкана клеточной стенки.

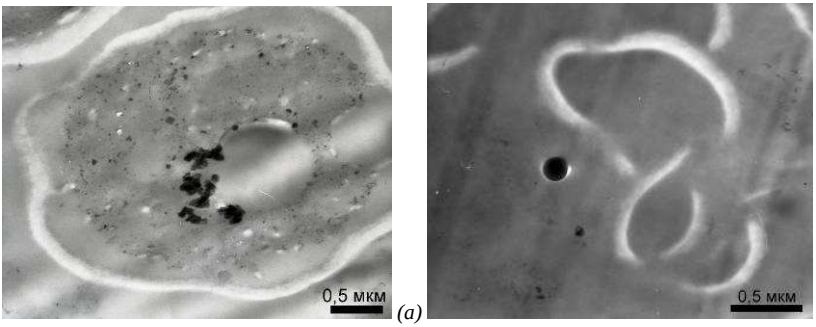


Рис. 6. Декорирование дефектов углеводных компонентов: *а* – ультратонкий срез исходной клетки, *а* – ультратонкий срез механически обработанных клеток.

Для подтверждения данных электронной микроскопии об устойчивости компонентов клеточных стенок при механической обработке без реагентов, проведён эксперимент, в котором компоненты клеточной стенки (таб. 1) были выделены, очищены, охарактеризованы методами физико-химического анализа и подвергнуты механической обработке в активаторе АГО-2. Измерены активности целлюлозолитического препарата «Целлолюкс 2000» по отношению к исходным и механически обработанным компонентам клеточной стенки.

Все глюкановые полимеры клеточной стенки способны гидролизоваться ферментами препарата «Целлолюкс 2000». Однако реакционная способность супрамолекулярных комплексов, состоящих из этих полимеров, гораздо ниже реакционной способности индивидуальных компонентов. Например, комплекс щёлоченерастворимого β-глюкана ферментами практически не гидролизуется, несмотря на довольно высокую реакционную способность входящих в его состав кислоторастворимого β-1,6-глюкана и кислотонерастворимого β-1,3-глюкана.

Активность комплекса щёлоченерастворимого глюкана может быть увеличена при помощи механического разупорядочения его супрамолекулярной структуры. Из данных, приведённых в таб. 1, видно, что механическая обработка на протяжении 5 минут (активатор АГО-2, при 20 g)

приводит к увеличению реакционной способности щёлоченерастворимого β-глюкана.

Таб. 1. Активность ферментативного комплекса "Целлолюкс 2000" по отношению к глюкановым полимерам.

Полимер	Активность «Целлолюкс-а 2000», ед./г
Щёлочерастворимый β-1,3-глюкан	250
Щёлоченерастворимый β-глюкан	14
- кислоторастворимый β-1,6-глюкан	220
- кислотонерастворимый β-1,3-глюкан	114
Щёлоченерастворимый β-глюкан после 5 минут механической обработки	26

Сравнение результатов экспериментов по взаимодействию с аммиачными комплексами серебра и экспериментов по определению активностей растворов ферментов показывает, что наблюдаемая в данном случае степень разупорядочения слабо отражается на электронно-микроскопических снимках, но заметна при проведении кинетических исследований.

Представленные данные позволяют сделать вывод, что механическая обработка дрожжевой биомассы приводит к разрушению части клеток, разупорядочению супрамолекулярной структуры клеточной стенки, а в ряде случаев и к образованию реакционноспособных механокомпозитов. Полученная информация необходима для дальнейшего планирования и проведения механоферментативного гидролиза дрожжевой биомассы.

В третьем параграфе приведены результаты экспериментов, иллюстрирующих влияние механической обработки на реакционную способность целлюлозолитических ферментов. Изучено влияние механических свойств субстрата на целлюлозолитическую активность ферментов. Для проведения экспериментов использовали лабораторный активатор АГО-2, а в качестве субстрата использовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ). Механические свойства МКЦ варьировали путём предварительной механической обработки.

Результаты измерения активности механически обработанного ферментного комплекса «Целлолюкс 2000» представлены на рис. 7-а. Исходя из представленных данных, можно предположить, что во время механического воздействия могут протекать следующие процессы: недиффузионное распределение ферментов по микрокристаллической целлюлозе, увеличение реакционной способности МКЦ за счёт снижения степени кристалличности и снижение целлюлозолитической активности ферментативного препарата вследствие денатурации составляющих его белков.

Для установления вклада процесса аморфизации субстрата проведён эксперимент, в котором механически аморфизованную МКЦ гидролизовали при помощи необработанного ферментативного препарата (рис. 7-б, кривая 2). Показано, что в результате механической обработки реакци-

онная способность целлюлозы по отношению к ферментативному гидролизу увеличивается более чем в 2 раза. Увеличением реакционной способности МКЦ, по-видимому, можно объяснить более высокие значения активности и более медленное падение активности (рис. 7-а кривая 2) по сравнению с кривой 1 (рис. 7-а).

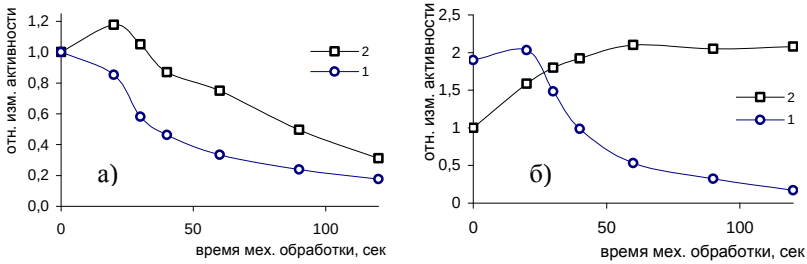


Рис. 7. Изменение активности ферментативного препарата «Целлолюкс 2000» при механической обработке:

***1* – обработка препарата без субстрата, *2* – совместная обработка препарата и МКЦ,**

***1* – совместная обработка фермента и предварительно аморфизованной МКЦ, *2* – ферментативный гидролиз предварительно аморфизованной МКЦ.**

Показано, что инактивация ферментов происходит при всех значениях начальной кристалличности целлюлозы. МКЦ частично аморфизовали обработкой в АГО-2 в течение 4 минут (20 g). К частично аморфизованной МКЦ добавляли навеску препарата и проводили дальнейшую обработку в тех же условиях. По кривой 1 (рис. 7-б) видно, что при малых временах обработки (порядка 40 секунд) активность ферментов превышает активность модельной системы, по-видимому, благодаря тому, что в качестве субстрата используется уже аморфизованная реакционноспособная МКЦ. При дальнейшей механической обработке активность резко падает вследствие денатурации ферментов.

Таким образом, определены условия совместной механической обработки целлюлозолитических ферментов и целлюлозного субстрата, обеспечивающие устойчивость ферментов и приводящие к образованию реакционноспособных композитов. Применение данных условий при переработке дрожжевой биомассы позволяет более эффективно осуществлять предложенный механоферментативный гидролиз полимеров.

<u>В четвёртом параграфе</u> обсуждается влияние механической обработки клеточной стенки на эффективность ферментативного гидролиза составляющих её полимеров.

На основании полученных результатов для повышения эффективности ферментативного гидролиза β-глюкана была предложена следующая схема, названная механоферментативной обработкой, в которой ста-

дии ферментативного гидролиза предшествует стадия механической обработки смеси субстрата и фермента.

С целью увеличить реакционную способность, изменить свойства образца на первой стадии дрожжевая биомасса *S. cerevisiae* подвергается механической обработке совместно с ферментативным препаратом «Целлолюкс 2000». В ходе этой стадии осуществляется распределение ферментов по объёму образца, механическое разрушение некоторой части клеток, а также разупорядочение супрамолекулярной структуры полимеров клеточной стенки, приводящее к повышению их реакционной способности.

Вторая стадия включает в себя компактирование полученного порошка. Это позволяет повысить объёмную концентрацию фермента, а также предотвратить потерю воды, которая необходима для гидролиза.

Третья стадия – прогрев компакта при оптимальной температуре действия ферментов (50 ^{o}C) необходима для протекания гидролиза β-глюкана. Образовавшиеся на первой стадии разрушенные клетки служат центрами локализации последующего гидролиза. Вода из состава биомассы (влажность дрожжей около 5 %) растворяет фермент. Ферменты сорбируются на субстрате и катализируют реакцию гидролиза.

На рис. 8 приведена микрофотография компакта клеток после механической обработки с ферментом. Часть разрушенных клеток играют роль центров локализации реакции гидролиза при прогреве компакта.

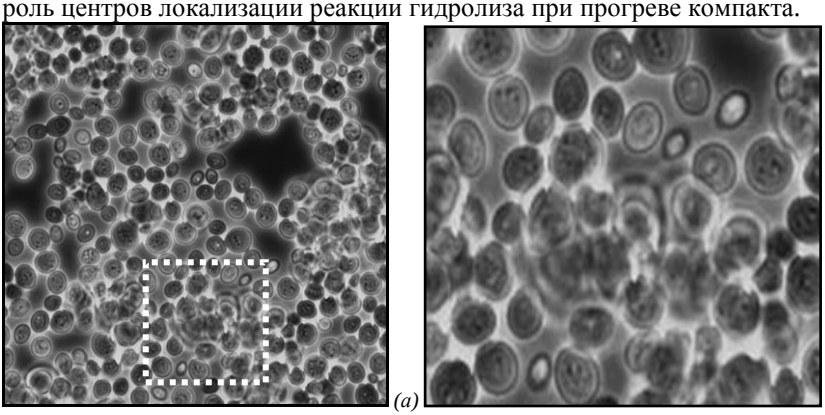


Рис. 8. Микрофотография дрожжевой биомассы после механической обработки: *а* – клетки обработанной биомассы, *б* – увеличенный фрагмент «*а*» с центром локализации реакции на месте разрушенных клеток.

Протекание ферментативного гидролиза иллюстрируется рис. 9. Видно, что реакция протекает в объёме автолокализованно, то есть путём образования и постепенного продвижения зоны превращения. На микрофотографии отчётливо виден фронт реакции, центральная зона погибших клеток с вытекшим содержимым, а также периферическая зона клеток, до которых реакционный фронт ещё не дошёл. Центральная часть представ-

ляет собой клетки, которые подверглись гидролизу (рис. 9-*а*). Клеточное содержимое находится вне клеток, которые потеряли форму. Клетки, которые не участвовали в реакции (рис. 9-*б*), не отличаются от исходных.

Химический анализ щелочного экстракта продукта механоферментативного гидролиза показал, что выход глюкана равен 22 %, а выход маннанолигосахаридов – 3,8 % (1,1 % в виде маннанолигосахаридов и 2,7 % в виде маннопротеинов) от массы исходной биомассы *S. cerevisiae* (рис. 10). Выход маннанолигосахаридов выше, чем при одностадийной механической обработке с ферментами (2,1 %) и выше, чем при двухстадийной жидкофазной обработке «фермент – щелочная экстракция» (2,0 %).

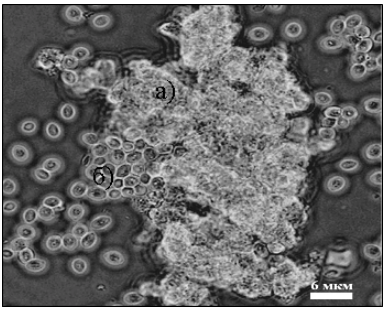


Рис. 9. Микрофотография автолокализованной реакционной зоны гидролиза β-глюкана S. cerevisiae: *а* – гидролизованные клетки, *б* – исходные клетки

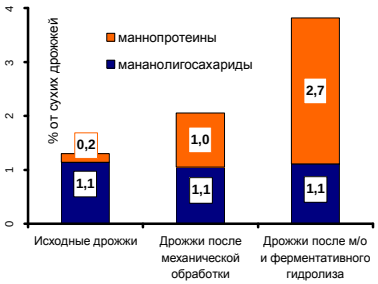


Рис. 10. Выход маннанолигосахаридов и маннопротеинов в результате механической и механоферментативной обработки.

Для исследования изменений супрамолекулярной структуры компонентов клеточной стенки использован способ декорирования дефектов белков и β-глюкана клеточной стенки с помощью реакций с осмиевой кислотой и солями серебра, соответственно.

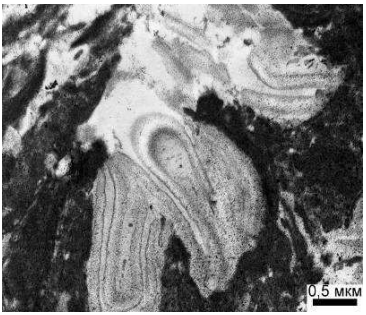
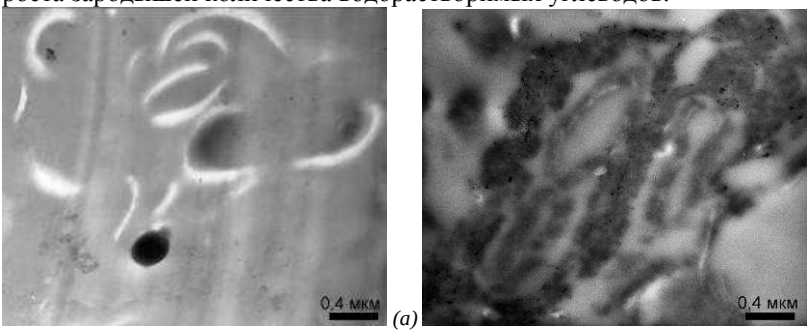


Рис. 11. Морфология дрожжевых клеток после механической и ферментативной обработки.

На рис. 11 приведена микрофотография ультратонкого среза дрожжевой биомассы, подвергнутой механоферментативной обработке (ср. с рис. 5). Клеточные стенки повреждены, цитоплазма и органеллы разрушены и образуют электроноплотную массу, локализованную между клеточными стенками. В клеточных стенках обнаружены зернистые структуры размером 12-25 нм, которые, предположительно, являются комплексами гликопротеинов с осмиевой кислотой [10].

Таким образом, ферментативный гидролиз глюкана приводит к снятию диффузионных ограничений, в результате чего появляется возможность образования осмиофильных зернистых структур.

Обработка образцов комплексами серебра показала (рис. 12-б), что внутри и на поверхности клеточных стенок отмечается накопление наночастиц серебра, очевидно, обусловленное наличием центров зародышеобразования, а также благодаря накоплению в системе достаточного для роста зародышей количества водорастворимых углеводов.



(а) *(б)*

Рис. 12. Препарат дрожжевой биомассы, подвергнутой механоферментативной обработке. а – клеточные стенки после механической обработки, б – фрагменты мембраноподобных структур после механической обработки и ферментативного гидролиза.

Приведённые данные свидетельствуют в пользу того, что в ходе ферментативного гидролиза происходит деполимеризация β-глюкана, приводящая к разупорядочению супрамолекулярной структуры полимеров клеточной стенки. В результате наблюдаемого разупорядочения клеточная стенка практически не теряет своей сплошности, но происходит уменьшение её плотности. Следствием этого является увеличение коэффициентов диффузии для реагентов или экстрагентов.

В результате реакции образуются олигосахариды, которые переходят в водную фазу. Эти обстоятельства позволяют создать на основе предложенной механоферментативной обработки технологические схемы получения из *S. cerevisiae* антибактериальных препаратов, сорбентов с развитой поверхностью, продуктов, содержащих компоненты макромолекул её клеточной стенки.

Сопоставление данных электронной микроскопии и данных химического анализа говорит о том, что предложенная механоферментативная обработка дрожжевой биомассы позволяет достичь основной цели – разупорядочения структуры полимеров клеточной стенки, а также увеличения доступности маннанолигосахаридов. Наличие в полученном препарате водорастворимых маннанолигосахаридов и маннанолигосахаридов, связанных с поверхностью клеточной стенки, позволяет использовать его как гетерогенный сорбент патогенных микроорганизмов, а также как источ-

ник растворимых маннанолигосахаридов. При этом уровень извлечения маннанолигосахаридов превосходит их уровень извлечения из препаратов, полученных по классической жидкофазной технологии.

Исходя из представленных данных, можно сформулировать основные положения физико-химической модели, описывающей процесс механоферментативной обработки:

- На стадии механической обработки происходит разрушение клеток и увеличение реакционной способности полимеров клеточной стенки, связанное с разупорядочением их супрамолекулярной структуры.
- На стадии компактирования происходит уплотнение образца, что позволяет повысить концентрацию фермента в зоне реакции, обеспечивает постоянный тесный контакт между реагентами и способствует быстрому продвижению реакционного фронта.
- На стадии прогрева происходит ферментативный гидролиз клеточной стенки *S. cerevisiae*, причём реакция протекает в режиме автолокализации. Разрушенные при механической обработке клетки служат центрами автолокализации гидролиза.
- В результате протекания механически активированного ферментативного гидролиза образуется продукт, представляющий собой частично гидролизованные клеточные стенки, содержащие доступные маннанолигосахариды.

<u>В пятом параграфе</u> третьей главы приведена технологическая схема механоферментативного способа получения препаратов с повышенным содержанием маннанолигосахаридов и результаты их биологических испытаний.

Предложенный в данной работе способ механоферментативного гидролиза дрожжевой биомассы может быть положен в основу новой механохимической технологии получения маннанолигосахаридных препаратов. Схема механохимической технологии представлена на рис. 13.

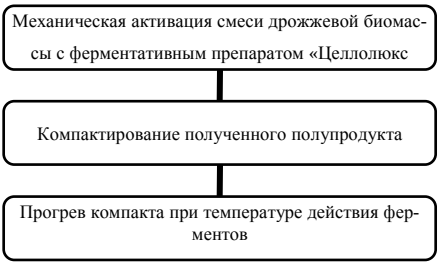


Рис. 13. Схема механохимической технологии получения маннанолигосахаридных препаратов.

Применение современного проточного механохимического оборудования, такого как мельница типа РМС, позволяет достигать на технологических участках производительности до 100 кг/час, а отсутствие в технологической цепочке жидкофазных стадий и экстракции органическими растворителями позволяет

говорить об экологической безопасности технологии и об её экономической эффективности. К тому же технология обладает рядом других достоинств, таких как: простота в эксплуатации и обслуживании производства, применение в технологическом процессе только экологически чистых и биовозобновляемых компонентов, доступность и низкая цена используемого сырья (биомасса дрожжей – отход спиртовой промышленности), возможность использования оборудования в составе технологических линий в кормопроизводстве.

Эффективность препаратов, полученных по предложенной технологии, проверена экспериментально. Испытания, проведённые на гусях мясного направления продуктивности в период их откорма, показали, что применение маннанолигосахаридных препаратов наиболее эффективно в качестве профилактического средства. Результаты испытаний представлены в таб. 2.

Таб. 2. Динамика среднесуточного прироста живой массы, падежа и сохранности подопытных гусей.

Показатель	Группа	
	Контрольная	опытная
В начале эксперимента (возраст гусей – 2 мес.)		
Средняя живая масса, кг	1,17	1,04
Через 30 дней		
Средняя живая масса, кг	2,18	2,16
Среднесуточный прирост, г	33,5	37,6
Падёж, гол.	1	-
Сохранность, %	98,0	100
Через 55 дней		
Средняя живая масса, кг	2,58	2,64
Среднесуточный прирост, г	16,0	19,1
Падёж, гол.	-	1
Сохранность, %	98,0	98,0
Валовой прирост, кг	1,41	1,61
Потреблено корма на 1 голову, кг	11,36	10,94
Затраты корма на 1 г прироста, г	8,07	6,82

Отобранные средние пробы образцов печени и мышечной массы не показали существенных изменений в химическом составе печени и мышечной массы. Однако в печени контрольных животных больше содержалось практически всех изучаемых микроэлементов. Это объясняется тем, что питательные вещества, поступившие с кормом, хуже усваивались в кишечнике и током крови транспортировались в печень.

Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии изучаемых добавок. Они обладают антибактериальными свойствами, стимулируют обмен веществ и улучшают использование питательных веществ корма.

Оценена прибыль, получаемая предприятием при применении в рационе гусей маннанолигосахаридной кормовой добавки в количестве 1%. Оценка показала, что внедрение добавки позволит дополнительно получить около 26 рублей прибыли на каждую голову.

Основные результаты работы и выводы

1. Обработка клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* ферментами, обладающими целлюлазной активностью, в жидкой фазе приводит к нарушению целостности структурообразующего элемента клеточной стенки – β-глюкана и, как следствие, увеличению выхода ковалентно связанных с ним маннанолигосахаридов примерно в 6 раз.
2. Механическая обработка клеточной стенки в течение 2 минут (активатор АГО-2, ускорение 20 g) увеличивает эффективность щелочной экстракции маннанолигосахаридов в 1,7 раза вследствие нарушения структуры β-глюкана.
3. На основе полученных данных по ферментативному гидролизу и механической обработке впервые предложена механоферментативная схема получения препаратов с повышенным содержанием биологически доступных маннанолигосахаридов. Схема включает механическую обработку дрожжевой биомассы в присутствии ферментов, компактирование полученного композита и прогрев компакта (ферментативный гидролиз).
4. Механическая обработка клеток *S. cerevisiae* в смеси с ферментами обеспечивает образование реакционноспособного композита, в котором фермент недиффузионным образом распределяется среди клеточных стенок. Показано увеличение реакционной способности полимеров клеточных стенок в процессе механической обработки. При механической обработке часть клеток разрушается и в ходе последующего прогрева служит центрами локализации ферментативного гидролиза. Компактирование композита обеспечивает тесный контакт между клетками и протекание реакции гидролиза β-глюкана клеточных стенок в режиме автолокализации.
5. В процессе ферментативного гидролиза глюкосахариды отщепляются от глюкановых полимеров и глюкопротеинов. В результате возрастает выход маннанолигосахридов, а также уменьшается степень полимеризации глюкановых полимеров и доля глюкосахаридов, связанных с белками.
6. Благодаря проведению механоферментативного гидролиза выход при экстракции суммы доступных маннанолигосахаридов увеличивается в 2,9 раза с 1,3 % до 3,8 %.

Список цитируемой литературы

1. Болдырев, В.В. Механохимия и механическая активация твёрдых веществ // Успехи химии. – 2006. – Т. 75, № 3. – С. 203-216.
2. Дубинская, А.М. Механохимия лекарственных веществ // Хим. фарм. журнал. – 1989. – №. 23. – С. 754-764.
3. Сухие технологические процессы, базирующиеся на химических реакциях в твердой фазе. 1. Получение быстрорастворимых дисперсных форм лекарственных веществ методом механической активации / В.В. Болдырев, Т.П. Шахтшнейдер, Л.П. Бурлева, М.А. Васильченко, В.А. Северцев // Химия в интересах устойчивого развития. – 1994. – № 2. – С. 455-459.
4. Ломовский О.И., Болдырев В.В. Механохимия в решении экологических проблем. – Новосибирск: ГПНПБ СО РАН, 2006. – 221 с.
5. Барамбойм, Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений. – М.: Химия, 1971. – 364 с.
6. Бабаян, Т.Л. Выделение физиологически активного маннана и других полисахаридов из автолизатов пекарских дрожжей / Т.Л. Бабаян, В.К. Латов // Биотехнология. – 1992. – № 2. – С. 23-26.
7. Product based o polysaccharides from baker’s yeast and its use as a technological coadjuvant for bakery products : pat. 6.060.089 USA : C12N 1/06, C12N 1/18 / Lazzari F. – appl. 1998; publ. 09.05.2000.
8. Liu, X.Y. A new method of β-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae* / X.Y. Liu, Q. Wang, S.W. Cui, H.Z. Liu // Food Hydrocolloids. – 2008. – № 22. – P. 239-247.
9. Барыкина, Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы метода. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
10. Nielson, A. Tissue fixation by osmium tetroxide. A possible role for proteins / A. Nielson, W. Griffith // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 1979. – V. 27, № 5. – P. 997-999.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

Статьи в журналах

1. Бычков, А.Л. Изменение супрамолекулярной структуры клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* при механоферментативной обработке / А.Л. Бычков, Е.И. Рябчикова, К.Г. Королев, О.И. Ломовский // Химия в интересах устойчивого развития. – 2009. – № 5. – С. 479-486.

2. Бычков, А.Л. Изменения клеточной стенки при механической активации растительной и дрожжевой биомассы / А.Л. Бычков, К.Г. Королев, Е.И. Рябчикова, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2010. – № 1. – С. 49-56.

3. Бычков, А.Л. Влияние механической обработки на активность целлюлозолитического препарата / А.Л. Бычков, О.И. Ломовский // Журнал прикладной химии. – 2010. – Т. 83, № 6. – С. 1051-1053.

4. Bychkov, A.L. Obtaining mannanoligosaccharide preparations by means of the mechanoenzymatic hydrolysis of yeast biomass / A.L. Bychkov, K.G. Korolev, O.I. Lomovsky // Applied Biochemistry and Biotechnology. Принята к печати 18.04.2010. Полный текст доступен с 29.04.2010 по электронному адресу
www.springerlink.com/content/k094xq7r11572p25/?p=a30a78eb83724f3b8337765d91c6f321&pi=62

Статьи в сборниках трудов конференций

5. Бычков, А.Л. Получение наночастиц серебра восстановлением гетерофазными продуктами ферментативного гидролиза клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* / А.Л. Бычков, К.Г. Королёв, Е.И. Рябчикова, О.И. Ломовский // Науч.-практич. конф. с международ. участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины» (Новосибирск, 11-12 окт. 2007 г.) : сб. материалов. – Новосибирск, 2007. – Т. 1. – С. 41-48.

6. Королёв, К.Г. Изменение морфологии клеточной стенки в ходе механохимической обработки / К.Г. Королёв, А.Л. Бычков, Е.И. Рябчикова, О.И. Ломовский // Междунар. конф. «Техническая химия. От теории к практике» (Пермь, 8-12 сент. 2008 г.) : сб. материалов. – Пермь, 2008. – Т.1. – С. 244-248.

7. Бычков, А.Л. Активация ферментативного гидролиза полисахаридов клеточной стенки *S. cerevisiae* с целью получения антибактериальных препаратов // V Съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, 2-4 дек. 2008 г.) : сб. материалов. – М.: ИАЦ, 2008. – С. 314-319.

8. Бычков А.Л. Изменение морфологии клеточной стенки при механической активации дрожжевых и растительных клеток / А.Л. Бычков, К.Г. Королёв, Е.И. Рябчикова, О.И. Ломовский // IV Всерос. конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 21-23 апр. 2009 г.) : сборник материалов. – Барнаул, 2009. – С. 63-65.

9. Бычков А.Л. Получение композитного препарата, содержащего стабилизированные наночастицы серебра // Междунар. конф. «Создание новых материалов для эксплуатации в экстремальных условиях» (Якутск, 16-19 ноября 2009 г.) : сб. материалов. – Якутск, 2009. – С. 183-185.

Тезисы в сборниках трудов конференций

10. Бычков, А.Л. Механохимическое получение манноолигосахаридных препаратов из клеточной стенки дрожжей // XLV Междунар. науч.

студенч. конф. «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 10-12 апр. 2007) : тез. докл. – Новосибирск, 2007. – С. 6.

11. Бычков, А.Л., Королёв, К.Г Наночастицы металлов в контрастировании механических нарушений надмолекулярных структур клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* / А.Л. Бычков, К.Г Королёв // XLVI Междунар. науч. студенч. конф. «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 26-30 апр. 2008 г.) : - Новосибирск, 2008. – С. 12.

12. Koroliov, K.G. Cell wall transformation during mechanical activation / K.G. Koroliov, A.L. Bychkov, E.I. Ryabchikova, O.I. Lomovsky // International conf. “Mechanochemistry and Mechanical Alloying” (Jamshedpur, India, Dec. 1-4, 2008) : book abstr. – Jamshedpur, 2008. – P. 22.

13. Bychkov, A.L. The changes of yeast cell under action mechanoenzymatical treatment / A.L. Bychkov, E.I. Ryabchikova, K.G. Korolev, O.I. Lomovsky // III International Conf. “Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies” (Novosibirsk, Russia, May 27-30, 2009) : book abstr. – Novosibirsk, 2009. – P. 194.

14. Bychkov, A.L. Obtaining mannanoligosaccharide additive by means of the mechanoenzymatic hydrolysis of yeast biomass / A.L. Bychkov, E.I. Ryabchikova, K.G. Korolev, O.I. Lomovsky // 2nd Annual Russian-Korean Conf. “Current Issues of Natural Products. Chemistry and Biotechnology” (Novosibirsk, Russia, March 15-18, 2010) : book abstr. – Novosibirsk, 2009. – P. 57.

15. Bychkov A.L. The practical application of mechanically activated enzymatic hydrolysis / Bychkov A.L., Lomovsky O.I. // International Conf. “Catalysis for Renewable Sources: Fuel, Energy, Chemicals” (Tsars Village (St. Petersburg), Russia, June 28 – July 2, 2010) : book abstr. – St. Petersburg, 2010. – P. 83.

Патенты

16. Профилактический антибактериальный препарат и способ его получения :пат. РФ : МКП^6 А61К 36/064, А61Р 1/00 / О.И. Ломовский, К.Г. Королёв, А.Л. Бычков, С.Г. Колдыбаев. – № заявки 2009122130/15(030590); заявл. 09.06.2009; положит. решение. 23.06.2010.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.х.н., О.И. Ломовскому за руководство и неоценимую помощь в обсуждении полученных результатов, к.х.н. К.Г. Королёву, д.х.н. Е.И. Рябчиковой, к.х.н. Политову, к.х.н. М.А. Михайленко за помощь в проведении экспериментальных работ.

Автор признателен всем сотрудникам Лаборатории химии твёрдого тела ИХТТМ СО РАН за помощь и поддержку.

Изд. Лиц. ИД № 04060 от 20.02.2001

Подписано к печати и в свет 20.11.2009
Формат 60×84/16. Бумага № 1. Гарнитура “Times New Roman”.

Печать оперативная. Печ. л. 1,3. Уч.-изд. л. 1,1. Тираж 120. Заказ № 176.
Учреждение Российской академии наук
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
Просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090