

Укращение лигнина



Многие производства, основанные на переработке природных веществ, получили новые возможности с развитием геной инженерии. Изменяя геном организмов, поставляющих сырье или осуществляющих технологические процессы, можно ускорять в них биохимические реакции, притормаживать другие, синтезировать полезные вещества или блокировать образование нежелательных. Удаляя или добавляя гены, заставляя их работать быстрее или медленнее, геной инженеры регулируют физиологические процессы, строение, внешние признаки и технологические свойства у объектов генетических манипуляций.

Таким образом уже получают тополино и вакцины, лекарства и химические препараты. А несколько лет назад группа европейских биотехнологов провела испытания генетически модифицированных тополей с измененным содержанием и составом лигнина. Успехи пока скромные, однако они обнадеживают не только ученых, но и производителей бумаги.

Нет ничего удивительного в том, что последние заинтересовались биохимией и геной инженерией растений.

Главный компонент бумаги — волокна целлюлозы — получают в основном из древесины, то есть из стволов и веток лиственных и хвойных деревьев. Древесину составляют две ткани: ксилема, проводящая воду и минеральные вещества от корней к листьям (рис. 1), и склеренхима, придающая стволам прочность. Стенки их клеток состоят не только из целлюлозы, но также из гемицеллюлоз и лигнина. Все вместе они образуют композитный материал, сложный трехмерный комплекс, в котором длинные и прочные молекулы целлюлозы собираются в каркас, гемицеллюлозы заполняют промежутки между ними, а гидрофобный лигнин укрепляет стенки клеток и делает их непроницаемыми для воды и соков.

В хвойных деревьях 23–38% лигнина, а в лиственных 14–25%. Это он придает древесине красивый желтоватый, коричневатый или красноватый оттенок, а инкрустированные им клетки создают красивый рисунок на поверхности деревянных изделий (рис. 2). Присутствие лигнина в клеточных стенках легко доказать цветными реакциями, например с флороглюцином, пирокатехином, хлором и сульфитом натрия, гидрохлоридом или сульфатом анилина.

Что хорошо для дерева, украшает мебель и делает прочными деревянные дома, то плохо для потребителей бумаги. Если плохо удалять лигнин, бумага выходит рыхлой, грубой и быстро

желтеет. Из такой бумаги обычно делают газеты и дешевые книги. Поскольку все больше писателей и журналистов, специалистов по рекламе и других мастеров слова и образа считают свои творения достойными долгой жизни и безупречного исполнения, спрос на высочайшую бумагу растет (рис. 3, 4).

Желание печатать книги и писать на белой бумаге возникло давно. В XIX веке бумажную массу начали отбеливать хлором. Тогда же возникли и технологии удаления лигнина, суть которых состоит в том, что измельченную древесину варят со смесью химических реактивов («щелоком») при повышенной температуре и давлении. В результате лигнин разрушается и переходит в раствор, а целлюлоза остается в осадке.

Наиболее распространен сульфатный метод (в зарубежной литературе его обычно называют процессом Крафта), поскольку он позволяет перерабатывать древесину любых пород. Древесную массу варят с NaOH и Na₂S в течение 5–7 часов при 165–170° С и давлении 0,6–0,8 МПа.

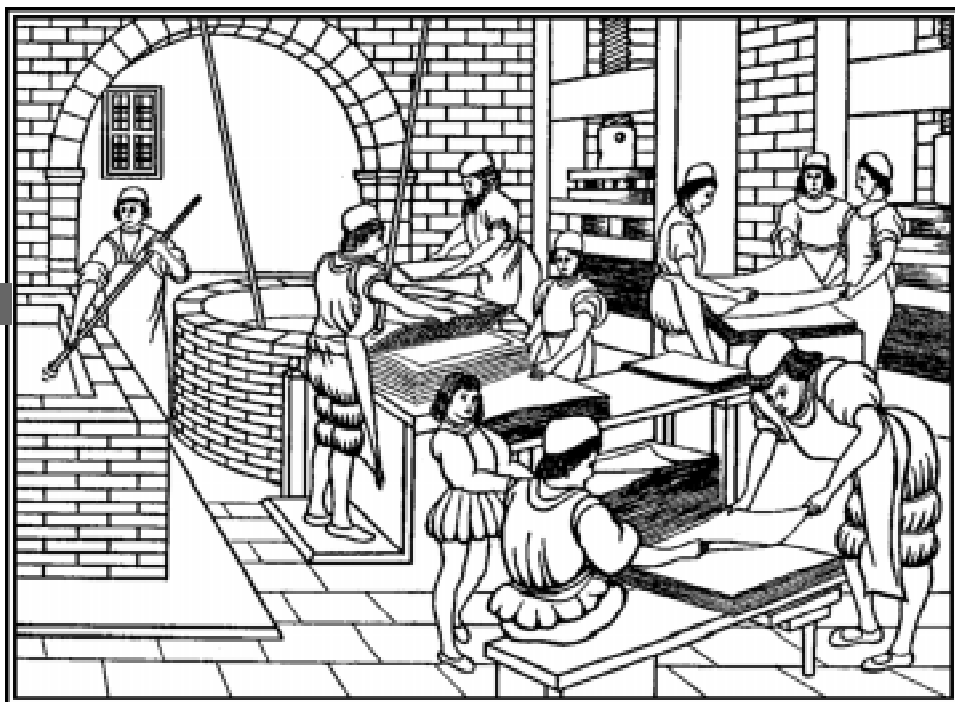
При изготовлении бумаги из древесины хвойных пород применяют сульфитный метод. Опилки кипятят в сульфитном щелоке — растворе, содержащем сернистый газ (5–10%) и гидросульфиты натрия, калия, магния и аммония. Эту операцию проводят в автоклавах 5–12 часов при температуре 130–155°С и давлении 0,5–0,8 МПа.

1
Сосуд осины (тополя дрожащего) — основной элемент ксилемы. Окрашен флуоресцентным красителем



2
Древесина тополя





3

Изготовление бумаги

Натронный метод используют для получения целлюлозы из лиственной древесины. Варку проводят в щелоке, содержащем 3–10% NaOH, 1–6 часов при 140–170°C и давлении 0,6–0,8 МПа.

В любом случае для получения высших сортов бумаги полученную массу обесцвечивают (отбеливают) окислителями: Cl_2 , ClO_2 , $NaClO$, O_2 .

Все эти операции в какой-то степени повреждают и целлюлозу, так что проводить их в еще более жестких условиях нельзя. Приходится идти на компромисс, и небольшие примеси лигнина остаются в бумаге.

Мы дорого платим за прихоть пользоваться белой бумагой. Процессы очистки и отбеливания целлюлозы вредны для окружающей среды, особенно для водоемов, поскольку для отмывки бумажной массы от остатка реагентов приходится использовать много воды (вспомним споры из-за целлюлозно-бумажного комбината на Байкале).

Лигнин приходится удалять и в гидролизном производстве, в котором целлюлозу гидролизуют до олиго- и моносахаридов, чтобы сделать корм для полезных микроорганизмов и использовать его в биотехнологических процессах. Сейчас во многих странах рассматриваются проекты преобразования растительной биомассы в топливо и сырье для химической промышленности (см. статью академика В.Г.Дебабова «Химия без нефти» в № 4 «Химии и жизни» за 2005 год). Ключевая проблема в этих проектах — освобождение целлюлозы от лигнина.

Часть лигнина используется в хозяйстве. Из отработанного щелока, содержащего продукты его взаимодействия с сернистым газом (соли лигносульфонокислот), получают дубильные вещества, ванилин, технический этиловый спирт. Однако лигнина в производстве бумаги выделяется слишком много, чтобы использовать его целиком, и, если бы удалось уменьшить его количество в сырье, то есть в деревьях, выиграли бы и промышленность, и окружающая среда.

4

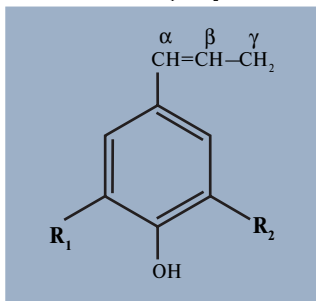
И сегодня бумагу делают вручную



В последние годы в производство бумаги вмешалась биотехнология. Т.Кирк и М.Ахтар предложили использовать для удаления лигнина ферменты грибов, разлагающих древесину в природе, однако повсеместного применения этот способ не получил.

Биохимики много изучали лигнин, его строение, химические свойства и реакции, в которых он образуется и связывается с другими компонентами клеточных стенок. Д.И.Менделеев и П.П.Рубцов в статье «Инкрустирующие вещества», написанной для словаря Брокгауза и Ефрона, замечали: «Будучи чрезвычайно распространена в растениях и составляя массу такого технически важного материала, как дерево, лигноклетчатка представляет преимущество перед всеми другими видами инкрустированных клетчаток, и поэтому она уже издавна весьма много и подробно изучалась. Но особенно существенные шаги были сделаны в самое новейшее время, чему немало содействовали успехи в изучении глюкозы и важные усовершенствования в способе исследования...»

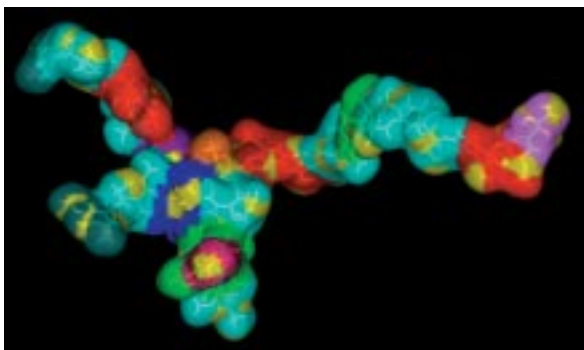
Мономеры лигнина, спирты:
кониферильный ($R_1 = H, R_2 = OCH_3$);
синаповый ($R_1 = R_2 = OCH_3$);
***p*-кумаровый** ($R_1 = R_2 = H$)



Примерно те же слова (кроме разве что упоминания глюкозы, вернее, моносахаров) можно прочитать и в последних статьях, посвященных лигнину. Неудивительно, что работа с этим веществом растянулась на столетия. Изучать его трудно. Это нерегулярный полимер, состав которого зависит от вида растения, типа клетки и даже от места в клеточной стенке. При выделении лигнин частично разрушается, поэтому состав и свойства препарата определяются еще и способом выделения. Химики XIX века исследовали лигнин, воздействуя на древесину различными реагентами (например, минеральными кислотами, щелочами, смесью азотной кислоты и бертолетовой соли, бромной водой и аммиаком), разрушая лигноцеллюлозный комплекс и определяя молекулы-обломки. Позже к химическим методам добавились гистохимические (окраска и микроскопия клеток растений), спектроскопические и биохимические методы, а в последние годы — генно-инженерные. Сейчас не менее двадцати пяти исследовательских групп в разных странах изучают, как лигнин образуется, какая у него структура и как его характеристики влияют на свойства бумаги при разных технологиях ее получения. Примерно половина из них использует генную инженерию.

Установлено, что лигнин — это полимер трех фенольных спиртов (монолигнолов): кумарилового, кониферильного и синапилового, производных ароматического коричневого спирта (рис. 5). Есть в нем в небольших количествах и другие мономеры. Пути биосинтеза этих веществ удобно проследить от аминокислоты фенилаланина. С десятков ферментов осуществляют реакции образования монолигнолов, однако до сих пор не все эти реакции известны, и тем более неясен их количественный вклад, поэтому каждое новое исследование что-то уточняет в имеющихся схемах. Большинство генов, кодирующих фер-

6
Модель *O*-метилтрансферазы кофейной кислоты (COMT)



менты биосинтеза, в последние годы удалось определить и клонировать.

Образовавшись в клетке, мономеры выводятся наружу и там полимеризуются. Для этого используется двойная связь в боковом радикале, а также гидроксильные группы. Состав, структура и свойства всего лигноцеллюлозного комплекса определяются соотношением мономеров и способами их соединения. У голосеменных и покрытосеменных растений, у деревьев и трав они различны. Вероятно, это определяется различной активностью одних и тех же базовых ферментов. Как реакции сборки протекают в пространстве, как строится трехмерный комплекс целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, по-прежнему остается большим секретом растений.

7

Этот тополь еще растет в пробирке...



8

...а эти уже в теплице



9

Опытные площадки с трансгенными тополями



10
Тополя со снятой корой готовы для отправки на фабрику:
а) линия со сниженной активностью COMT;
б) линия со сниженной активностью CAD;
в) обычные деревья

му их в большом количестве высаживали в наших городах полвека назад. Во-вторых, тополя легко трансформировать (вводить в их клетки новые гены) с помощью агробактерий. В-третьих, все тридцать видов деревьев из рода *Populus* (тополь) хорошо скрещиваются с образованием внутривидовых и межвидовых гибридов. Геном тополя недавно был расшифрован. Для дерева он невелик — всего около 500 млн. пар оснований. Это в 50 раз меньше, чем у сосны, хотя и в четыре раза больше, чем у травянистого арабидопсиса (резушки Таля). Наконец, эти деревья вполне годятся для производства бумаги.

Методом антисмысловых мРНК воздействовали на несколько ферментов в клетках тополей. Среди них дегидрогеназа коричневого спирта (в транслитерации с английского — циннамил-алкоголь дегидрогеназа, сокращенно CAD). Она проводит один из ключевых этапов, конечную реакцию образования мономеров — восстановление альдегидов до спиртов. Генетики работали и с другими ферментами. COMT (О-метилтрансфераза кофейной кислоты, рис. 6) переносит на мономеры метильные остатки; 4CL (4-кумарат-КоА лигаза) связывает кумаровую кислоту с донором энергии — ацетил-КоА; CCR (циннамоил-КоА редуктаза) превращает КоА-производные кофейной, кумаровой и других кислот в соответствующие альдегиды.

Были получены интересные результаты. Так, у тополей со сниженной активностью CAD древесина стала красной или красно-коричневой, а при уменьшении количества COMT падало содержание одной из форм лигнина (S-лигнина). Угнетение 4CL снижало содержание лигнина на 40% и при этом не влияло на структуру клеточной стенки, а блокирование CCR уменьшало содержание лигнина, но сказывалось на строении комплекса лигнина с целлюлозой.

Большинство экспериментов с тополями проходило в теплицах (рис. 7, 8). Главные совместные работы биотехнологов, биохимиков и технологов по производству бумаги были проведены в Европейском Союзе, где уделяют больше внимания междисциплинарным исследованиям и выделяют деньги на такие проекты. Десять лет назад европейские ученые из Бельгии, Великобритании, Франции и Швеции наконец начали испытания подопытных тополей на открытых площадках. Эксперименты координировал Ву Борджан, руководитель группы биотехнологии деревьев из отдела молекулярной генетики Гентского университета — того самого, в котором работает профессор Марк ван Монтагю,



11
Деревья, пострадавшие от идиотских вандалов

один из создателей первых трансгенных растений. Сотрудники университета и французского Национального института сельскохозяйственных исследований (INRA) трансформировали тополя, биохимики из французского Национального агрономического института (INA-PG) определили состав и содержание лигнина, INRA и компания «Zepesa» (она теперь входит в состав корпорации «Syngenta») провели полевые испытания, а Центр технологии бумаги (Франция) проверил, как измененная древесина ведет себя при изготовлении бумажной массы (рис. 10).

В Великобритании опыты окончились преждевременно, и не все намеченные исследования удалось провести: в июле 1999 года посадки разорили «зеленые» хулиганы, спилив и покалечив деревья (рис. 11). Пресса не упустила случая отметить, что «эко-активисты» напали на технологию, которая может, если довести ее до промышленного применения, уменьшить загрязнение природы химическими веществами. Однако ученым удалось взять образцы древесины, чтобы измерить активность ферментов. Во Франции дела пошли успешнее. Тополя выросли до четырехлетнего возраста, их спилили, исследовали состав лигнина и активность ферментов, а затем отправили на переработку в бумагу.

В испытаниях участвовали четыре линии деревьев, не считая контрольной: у двух была снижена активность гена CAD, у двух — COMT. Деревца росли как положено и не отличались от обычных сверстников ни высотой, ни диаметром ствола.



ТЕХНОЛОГИЯ И ПРИРОДА

Активность обоих ферментов в трансгенных тополях на четвертом году их жизни оставалась сниженной, хотя и не в такой степени, как у молодых саженцев в теплицах. Древесина тополей со сниженной активностью CAD была красной, а со сниженной активностью COMT — бледно-розовой. В одной из линий со сниженной активностью CAD лигнина было немного меньше, чем у контрольных деревьев, а его структура изменилась.

Наиболее важно было узнать, как скажется изменение лигнина на получении бумаги из древесины трансгенных тополей. Опыты подтвердили предварительно полученные данные о том, что при переработке сульфатным способом CAD-линий нужно меньше реагентов, а бумажная масса получается более высокого качества. Однако снижение активности COMT ухудшало качество древесины как сырья для получения бумаги. Таким образом, ответ на главный вопрос исследования был отчасти положительным.

Ученые опасались, что насекомые, патогенные грибы и бактерии будут больше повреждать деревья с уменьшенным содержанием лигнина, однако этого не произошло. Изменение лигнина не повлияло на скорость разложения растительных остатков в почве и состав сообщества микроорганизмов.

Кстати, предотвратить бесконтрольное распространение трансгенных тополей легко — их можно сделать бесплодными, заблокировав гены цветения, а вегетативно без помощи человека они не размножаются.

Европейские ученые сделали только первые шаги в укрощении лигнина. Исследования будут продолжаться. Можно ожидать, что в ближайшие годы станет ясно, как образуется трехмерный комплекс лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз, как регулировать его строение и свойства. А это даст ключ к инженерии любых растительных волокон, нужных для изготовления нитей, канатов, тканей и множества других вещей.

