

УДК 631.147:631.46:663.11

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА И ЭКСПРЕССИИ ВЫЯВЛЕННЫХ
ЛИГНО- И ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ТОРФЕ**

**INVESTIGATION OF GROWTH AND EXPRESSION
OF LIGNED AND CELLULOSOLYTIC MICROORGANISMS IN PEAT**

©**Лакина Н. В.**

канд. хим. наук

Тверской государственной технической университет

г. Тверь, Россия, lakina@yandex.ru

©**Lakina N.**

Ph.D., Tver State Technical University

Tver, Russia, lakina@yandex.ru

©**Головки А. И.**

Тверской государственной технической университет

г. Тверь, Россия, alenkapet08@rambler.ru

©**Golovko A.**

Tver State Technical University

Tver, Russia, alenkapet08@rambler.ru

©**Долуда В. Ю.**

канд. хим. наук, ORCID 0000-0002-2865-9945,

Тверской государственной технической университет

г. Тверь, Россия, doludav@yandex.ru

©**Doluda V.**

Ph.D., ORCID 0000-0002-2865-9945,

Tver State Technical University

Tver, Russia, doludav@yandex.ru

Аннотация. В настоящее время и в ближайшем будущем в качестве основного сырья для микробного биосинтеза предполагается использовать растительные материалы. Это обусловлено тем, что, во-первых, запасы растительной биомассы возобновляются в процессе фотосинтеза. Ежегодная продукция биомассы составляет 184–1010 т. Во-вторых, на сегодняшний день многие части растительной биомассы, являющиеся отходами некоторых производств, используются мало. Сказанное главным образом относится к лигноцеллюлозосодержащим материалам. Увеличение продуктивности процессов микробного синтеза путем повышения коэффициента конверсии субстрата в желаемый продукт — в литературе недостаточно раскрыт.

Цель настоящей работы — рассмотреть возможности повышения конверсии углеводного субстрата в процессах микробного синтеза.

Abstract. At present, and in the near future, plant materials are supposed to be used as the main raw material for microbial biosynthesis. This is due to the fact that, firstly, the stocks of plant biomass are renewed in the process of photosynthesis. The annual production of biomass is 184–

1010 tons. Secondly, today many parts of plant biomass, which are the waste products of some industries, are used little. This applies mainly to lignocellulose-containing materials. The increase in the productivity of microbial synthesis processes by increasing the conversion factor of the substrate into the desired product is not sufficiently disclosed in the literature.

The purpose of this work is to explore the possibilities of increasing the conversion of the carbohydrate substrate in the processes of microbial synthesis.

Ключевые слова: биоэтанол, торф, микроорганизмы, биотрансформация, глюкоза.

Keywords: bioethanol, peat, microorganisms, biotransformation, glucose.

Введение

Во многих лабораториях ведутся исследования, направленные на разработку экономически выгодного способа биоконверсии растительных материалов в ценные продукты. В этих исследованиях вырисовываются два направления. В первом варианте разрабатывается способ прямой биоконверсии растительных полимеров (целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина) в такие продукты, как, например, микробный белок, этанол, биогаз и др. Очевидным преимуществом этого способа является его простота. Недостаток в том, что существующие системы микробной конверсии лигноцеллюлозных материалов пока обладают малой продуктивностью. Удельные активности природных продуцентов пока не обеспечивают рентабельности этих процессов. Прямая конверсия растительных полимеров осложняется также тем, что субстрат трудно поддается стандартизации по своим физико-химическим свойствам. Поэтому эти процессы медленны, характеризуются низкой степенью использования субстрата, трудно управляемы. В меньшей мере эти затруднения относятся к процессам метанового и спиртового брожения. Эти процессы уже используются в промышленном масштабе.

Другой вариант предполагает проведение конверсии растительных полимеров в две стадии. На первой стадии проводится гидролиз полимеров. Полученные мономеры (в основном углеводы) путем микробной биоконверсии превращают в нужные продукты на последующей стадии. Преимущество этого способа состоит в том, что уже известны и широко применяются эффективные способы ферментативной, химической, термической и других деструкций лигноцеллюлозных материалов, приводящие к быстрому и более полному их гидролизу. Далее из растворимых углеводов в контролируемых условиях ферментации можно получить широкий ассортимент продуктов микробного синтеза. Основным недостатком второго варианта в том, что предобработка увеличивает энергозатраты и требует дополнительных расходов.

Продуктивность любого процесса микробного синтеза определяется в основном тремя составляющими: удельной активностью продуцента, количеством активных клеток в объеме биореактора и коэффициентом конверсии исходного субстрата в целевой продукт. Увеличения продуктивности можно добиться разными путями. Существенными преимуществами по сравнению с другими обладает метод увеличения продуктивности микробного синтеза путем повышения коэффициента конверсии. В этом случае уменьшается себестоимость продукта за счет более рационального использования субстрата. При этом биореактор не требует технического усовершенствования систем перемешивания, аэрации, теплоотвода. Как правило, в этом случае улучшаются свойства конечного продукта, так как в нем содержится меньше баласта [1]

Целлюлоза представляет собой линейный полимер глюкозы. Структура молекулы этого природного полисахарида обеспечивает высокую устойчивость к внешним воздействиям. Ее

деструкцию катализируют ферменты целлюлазного комплекса, которые относятся к О-гликозид-гидролазам (КФ 3.2.1). Целлюлазы широко используются в пищевой, текстильной, деревообрабатывающей, фармацевтической отраслях промышленности, в производстве биоэтанола, моющих средств, в технологиях переработки различных отходов [2].

Естественный способ утилизации целлюлозосодержащих отходов, основанный на разрушении органического субстрата микроорганизмами, называется биодegradация. Она позволяет решить две основные задачи: создание экономически выгодного процесса производства целевого продукта и утилизацию потенциальных экологических загрязнителей.

С помощью биологических катализаторов (ферментов) микроорганизмы расщепляют целлюлозу с образованием целого комплекса ценных технических продуктов. В зависимости от поставленной цели такими продуктами могут быть технические ферменты (целлюлазы), глюкоза или биоэтанол.

Производство биоэтанола является одним из путей сокращения потребления нефти и соблюдения требований по защите окружающей среды. Биоэтанол может использоваться в качестве топлива с такими характеристиками, таким как высокое октановое число, низкое цетановое число и высокая температура испарения. Его главными недостатками являются коррозионная активность, низкая пламенная светимость, пониженное давление пара, смешиваемость с водой и токсичность для экосистем. Одной из важнейших проблем, связанных с биоэтанолом является наличие сырья. Подача сырья для производства биоэтанола может варьироваться от сезона к сезону и зависит от географических местоположений. Лигноцеллюлозная биомасса, такая как древесные материалы, сельскохозяйственные и коммунальные отходы, а также торф, является заметным источником биоэтанола из-за его высокой доступности и низкой стоимости. Кроме того, с использованием микроорганизмов в производстве делают данный процесс весьма своеобразным. Многие конверсионные технологии и технологии для производства этанола на основе биомассы находятся в стадии разработки [3].

Материал и методика

В работе использовался торф верхового типа, привезенный из Старицкого и Нелидовского районов Тверской области летом 2017 года.

Химический состав использованного торфа определялся гравиметрическим способом, основанным на последовательном удалении из биомассы экстрактивных веществ, гемицеллюлоз и лигнина [4].

Объектом исследования также были культуры микроорганизмов, выделенные из образцов торфа в лабораторных условиях.

Аэробные целлюлозоразлагающие микроорганизмы наиболее полно выявляются методом почвенных пластинок. Почву обогащают соединениями калия и азота (2 мл 1,5%-ного раствора KNO_3 на 50–60 г почвы). Обогащенную навеску размешивают, увлажняют и помещают в чашку Петри, на дно которой предварительно кладут стерильные обеззоленные фильтры или фильтровальную бумагу. На поверхность почвенной пластинки также накладывают кружок фильтровальной бумаги и плотно прижимают его к поверхности пластинки. Чашки с пластинками инкубируют во влажной камере. Срок инкубации варьирует в зависимости от свойств почвы. Для дерново-подзолистой почвы этот срок можно ограничить несколькими неделями, в черноземе срок инкубации должен быть увеличен.

Результаты опыта оценивают по степени разложения бумаги. В дерновоподзолистой почве целлюлозоразлагающие микроорганизмы представлены обычно грибами, в черноземе — миксобактериями. Для выделения миксобактерий из почвы используется следующий

метод. Чашка Петри наполняется почвой, которая увлажняется до полной влагоемкости. В почву вносят автоклавированный кроличий помет. Инкубируют при 30°. Через 10 дней на комочках помета под микроскопом видны колонии и клетки микроорганизмов [5, 6].

Далее определяли целлюлолитическую активность микромицетов, используя качественный метод, включающий визуальную оценку изменения субстрата при росте гриба на целлюлозе (фильтровальной бумаге). Оценка вели по балльной шкале Билай: 1–2 балла — слабый рост мицелия гриба, отсутствие спорообразования, отсутствие разрушенных участков целлюлозы, 3–4 балла — обильный и хорошо развитый мицелий, обволакивающий целлюлозный субстрат, деградация субстрата [7, 8].

Для исследования возможности ферментативного гидролиза целлюлозы, создания и контроля оптимальных условий процесса был использован биоферментер, предназначенный для глубинного культивирования микроорганизмов, в том числе мицелиальных грибов, участвующих в биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов. В биоферментере был реализован путь контроля и поддержания температуры, pH, оборотов мешалки, аэрации, пеногашения и подпитки субстратом. Почвенные микроорганизмы ферментировали на торфяном субстрате 24 часа при температуре 50°C и pH=5.

Количественный анализ реакционной массы проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В ходе анализа была использована хроматографическая система «Хроматэк–Кристалл», снабженная вакуумным дегазатором, изократическим насосом, термостатом колонок и рефрактометрическим детектором. В качестве подвижной фазы использовались вода, подкисленная серной кислотой. Скорость подачи элюента 0.5 мл/мин. Определение концентрации сахаров проводилось по стандартным веществам и соответствующим калибровочным зависимостям.

Результаты и их обсуждение

В ходе работы были исследованы образцы торфа, содержащие почвенные микроорганизмы, а именно микромицеты рода *Penicillium* и *Trichoderma*, а также актиномицеты рода *Actinomyces* и бактерии рода *Bacillus*.

При исследовании активности почвенных микроорганизмов было выявлено, что они обладают разной степенью активности. Исследования процесса ферментации с сокращенным инкубационным периодом дали возможность определить наиболее благоприятную температуру роста микроорганизмов и установить количественное соотношение почвенных организмов в образцах, представленное на диаграмме на Рисунке 1.

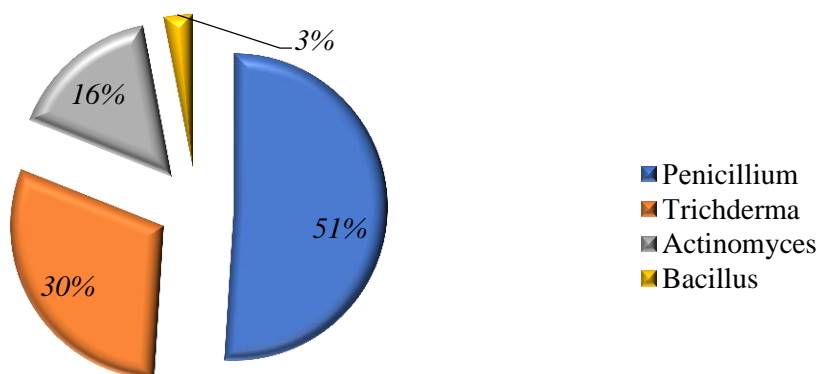


Рисунок 1. Диаграмма количественного соотношения почвенных организмов в образцах

Суммарная целлюлазная активность проявлялась уже на 5-е сутки. По мере роста грибов уровень активности целлюлазы повышался.

В первые часы ферментации почвенных микромицетов идет интенсивный рост грибов, а активное разрушение органического вещества субстрата наступает позднее (Рисунок 2). Это означает, что накопление биомассы грибов в начале культивирования идет в основном за счет питательных веществ торфа, а именно гемицеллюлозного компонента.

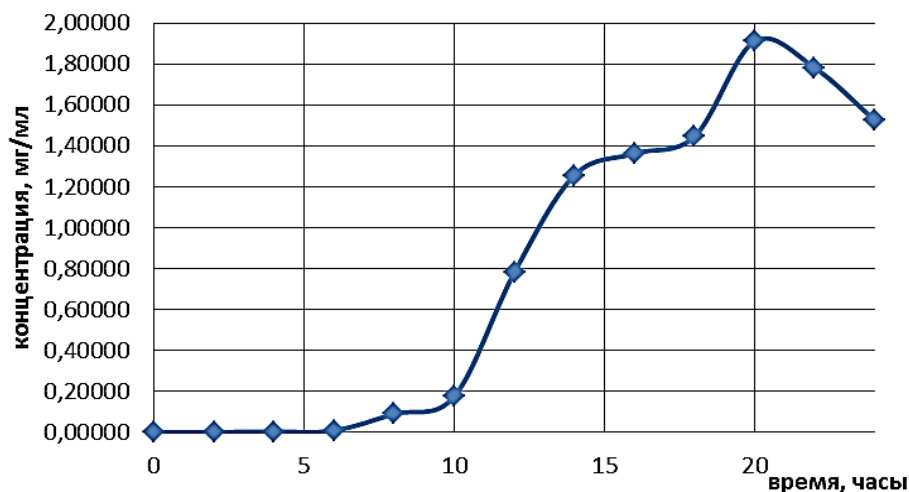


Рисунок 2. Зависимость концентрации глюкозы в гидролизате от времени ферментации

Экспериментальное варьирования pH решалось путем внесения в торф ацетатных буферов. В наших предварительных опытах задача решалась путем внесения в торф растворов HCl и NaOH, или применения ацетатного буфера (pH 4–6), или CaCO₃ в виде мела. Буфер приводил к еще большему подкислению торфа до значений pH 3,3.–3,7 вследствие обменных реакций с протонами. Применение щелочей и кислот также представлялось нежелательным из-за побочных эффектов. Более удачным оказалось использование CaCO₃ в виде мела, который позволил варьировать реакцию среды без изменения ионной силы торфяного раствора. Единственным недостатком этого подхода, с которым приходится мириться, остается прямое влияние ионов Ca на микробную активность, несвязанное с влиянием pH.

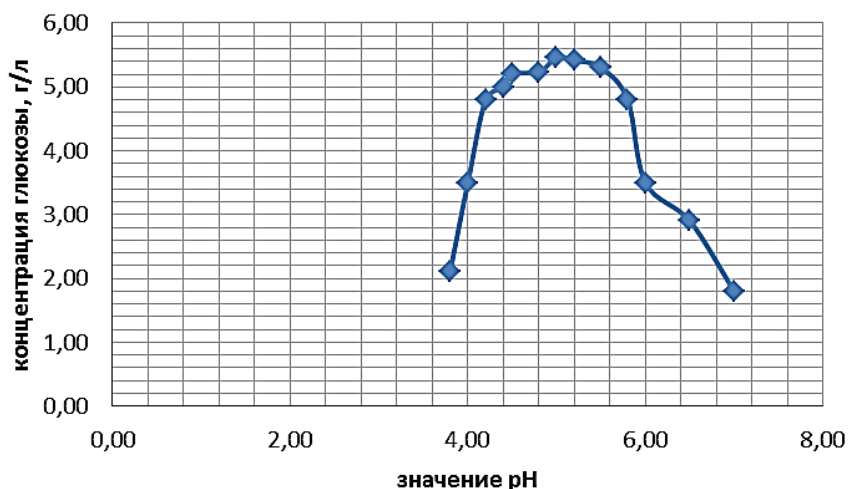


Рисунок 3. Зависимость образования глюкозы, г/л,

от значения pH при ферментативном гидролизе торфа

Результаты эксперимента представлены на Рисунке 3. Зависимость ферментативной активности торфа от pH носила характер куполообразной кривой с максимумом при pH 5,0–5,5, что близко к показателю кислотности болотной воды *in situ*. Достоверное потребление целлюлозного сырья прослеживалось при подкислении среды вплоть до pH 3.5. В нейтральной среде активность резко снижалась. Скорость ферментации нативных образцов торфа с pH 5.2 превышала таковую при pH 7 в 3 раза. Последний факт однозначно свидетельствует о том, что актиномицеты и микромицеты торфяных болот являются умеренными ацидофилами, т.е. слабо кислая среда соответствует норме их физиологической реакции.

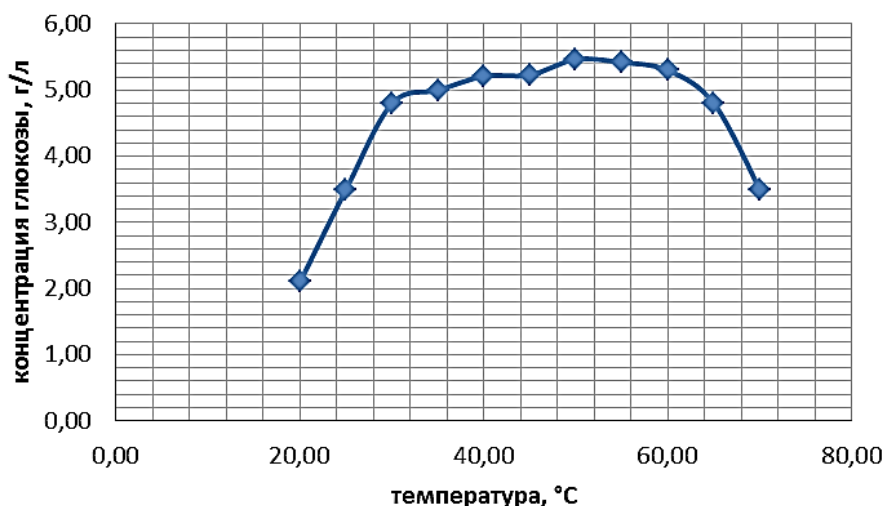


Рисунок 4. Зависимость образования глюкозы, г/л, от температуры, °C, при ферментативном гидролизе торфа

Температура, так же как и pH, весьма значимо влияла на ферментативную активность образца торфа (Рисунок 4). Оптимальным оказался диапазон температур от 30 до 55 °C. При повышении температуры до 65 °C скорость разложения целлюлозы снижалась в 2 раза. В то же время даже при 25°C регистрировалась, хотя и менее высокая, но значительная скорость разложения торфа. Таким образом, целлюлозолитические микроорганизмы сфагновых болот оказались мезофильными организмами.

Выводы

В данной работе проводилось исследование целлюлазной активности микроорганизмов торфа. Было исследовано влияние кислотности среды на разложение микроорганизмами целлюлозы, а также влияние температуры.

Было установлено, что наиболее благоприятными условиями для проведения ферментализации являются pH, равный 5,0–5,5 и температура 45–50 °C.

Исследования процесса ферментации с сокращенным инкубационным периодом 24 часа показали, что такая продолжительность не приводит к глубокому преобразованию органических веществ и активному биосинтезу метаболитов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-08-00158.

Список литературы:

1. Fillat U., Ibarra D., Eugenio M. E., Moreno A. D., Tomas-Pejo E., Martin-Sampedro R. Laccases as a Potential Tool for the Efficient Conversion of Lignocellulosic Biomass: A Review // *Fermentation*. 2017. V. 3. №17. DOI: 10.3390/fermentation3020017.
2. Мороз И. В., Михайлова Р. В., Лобанок А. Г., Капустина Ю. М. Влияние компонентов питательной среды на образование целлюлазы *Trichoderma viride* // IX Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 7-11 сентября 2015 г.): тезисы докладов. Минск: Беларуская навука, 2015. С. 36-38.
3. Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002. V. 66. №3. P. 506-577. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.
4. Лыков И. Н., Шестакова Г. А., Назаров С. А. Биодegradация целлюлозосодержащих отходов для получения технических продуктов // База данных tnu.podelise.ru. Режим доступа: <http://tnu.podelise.ru/docs/index-286916.html> (дата обращения 12.09.2017).
5. Ruiz E., Cara C., Manzanares P., Ballesteros M., Castro E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks // *Enzyme and Microbial Technology*. 2008. V. 42. №2. P. 160-166. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.09.002.
6. Бурдуков А. П., Попов В. А., Чернецкий М. Ю., Дектерев А. А., Ломовский О. И., Бычков О. И. Использование мелкодисперсного лигноцеллюлозного сырья в качестве твердого топлива // *Ползуновский вестник*. 2013. №4-3. С. 16-27.
7. Зенова Г. М., Степанов А. Л., Лихачева А. А., Манучарова Н. А. Практикум по биологии почв: учеб. пособие. М.: Издательство МГУ, 2002. 120 с.
8. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / пер. с англ. К. Л. Тарасова и Ю. Н. Ковалева; под ред. И. Р. Дорожковой. М.: Мир, 2001. 468 с.

References:

1. Fillat, U., Ibarra, D., Eugenio, M. E., Moreno, A. D., Tomas-Pejo, E., & Martin-Sampedro, R. (2017). Laccases as a Potential Tool for the Efficient Conversion of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Fermentation*, 3, (17). doi:10.3390/fermentation3020017
2. Moroz, I. V., Mikhailova, R. V., Lobanok, A. G., & Kapustina, Yu. M. (2015). Influence of nutrient medium components on the formation of cellulase *Trichoderma viride*. IX International Scientific Conference “Microbial Biotechnologies: Fundamental and Applied Aspects”, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, September 7-11). Minsk, Belaruskaya navuka, 36-38. (in Russian)
3. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (Sept. 2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, (3), 506-577. doi:10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.
4. Lykov, I. N., Shestakova, G. A., & Nazarov, S. A. Biodegradation of cellulose-containing wastes for obtaining technical products. Baza dannykh tnu.podelise.ru. Available at: <http://tnu.podelise.ru/docs/index-286916.html>, accessed 12.09.2017. (in Russian)
5. Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., & Castro, E. (2008). Evaluation of steam explosion of a sunflower stalks for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, (2), 160-166. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.002
6. Burdukov, A. P., Popov, V. A., Chernetskii, M. Yu., Dekterev, A. A., Lomovskii, O. I., & Bychkov, O. I. (2013). Use of finely dispersed lignocellulosic raw material as solid fuel. *Polzunovskii vestnik*, (4-3), 16-27. (in Russian)

7. Zenova, G. M., Stepanov, A. L., Likhacheva, A. A., Manucharova, N. A. (2002). Workshop on Soil Biology. Moscow, Izdatelstvo MGU, 120. (in Russian)

8. Satton, D., Fotergill, A., & Rinaldi, M. (2001). The determinant of pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Trans. from English. K. L. Tarasov and Yu. N. Kovalev; Ed. I. R. Dorozhkova. Moscow, Mir, 468. (in Russian)

*Работа поступила
в редакцию 23.11.2017 г.*

*Принята к публикации
28.11.2017 г.*

Ссылка для цитирования:

Лакина Н. В., Головко А. И., Долуда В. Ю. Исследование роста и экспрессии выявленных лигно и целлюлозолитических микроорганизмов в торфе // Бюллетень науки и практики. Электрон. журн. 2017. №12 (25). С. 42-49. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/lakina-golovko> (дата обращения 15.12.2017).

Cite as (APA):

Lakina, N., Golovko, A., & Doluda, V. Yu. (2017). Investigation of growth and expression of ligned and cellulolytic microorganisms in peat. *Bulletin of Science and Practice*, (12), 42-49