

УДК 577.152; 630.865.2

Т.Б. Мошкова¹, Т.А. Бойцова², Н.А. Макаревич²

¹Архангельский государственный технический университет

²Институт экологических проблем Севера УрО РАН

Мошкова Татьяна Борисовна родилась в 1947 г., окончила в 1971 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры общей и аналитической химии. Имеет более 50 научных трудов в области переработки лигнинсодержащих материалов.

Тел.: (8182) 28-75-83



Бойцова Татьяна Александровна родилась в 1962 г., окончила в 1985 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров ИЭПС УрО РАН. Имеет более 50 научных трудов в области переработки лигнинсодержащих материалов.

E-mail: tboitsova@yandex.ru



Макаревич Николай Анатольевич родился в 1942 г., окончил в 1964 г. Пермский государственный педагогический университет, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии растительных биополимеров ИЭПС УрО РАН. Имеет более 200 научных трудов в области теории ассоциированных растворов и теории ассоциативной адсорбции неионных и ионных поверхностно-активных веществ из растворов в различных модельных приближениях.

E-mail: tboitsova@yandex.ru



УТИЛИЗАЦИЯ ЛИГНОСУЛЬФОНАТОВ В ПРОЦЕССЕ БИОКОНВЕРСИИ

Определены оптимальные условия биоконверсии технических и фракционированных лигносульфонатов (ЛС) микромицетом *Coriolus hirsutus* в водных растворах; выбран способ ферментации ЛС с применением жидкофазного культивирования на твердом мезопористом носителе из керамики; проанализирована связь функционального состава биоконвертированных ЛС с их молярными массами.

Ключевые слова: лигносульфонаты, биоконверсия, базидиальный микромицет, молекулярная масса.

Утилизация технических лигнинов – один из важных вопросов при решении проблем использования растительного сырья. Водорастворимой формой технических лигнинов являются лигносульфонаты (ЛС) – отходы сульфитной варки древесины в процессе получения целлюлозы [12]. Биоконверсию ЛС можно рассматривать как один из возможных способов не только утилизации, но и модификации, позволяющей изменять структуру лигнинов с получением ряда ценных для промышленности и сельского хозяйства продуктов, например удобрений или стимуляторов роста растений.

При создании новых направлений в биотехнологии переработки лигноцеллюлозных материалов большое внимание уделяется дереворазрушающим базидиальным грибам [6–8, 15]. Известно, что эти грибы обладают мощной ферментной системой, с помощью которой разлагают полисахаридные и лигнинные компоненты субстрата. Базидиальные грибы, вызывающие белую гниль древесины и использующие углерод лигнина в качестве единственного источника питания, наиболее перспективны для промышленного использования [4, 9, 11]. Ранее выполненные исследования по биодеградации лигнина выявили основные закономерности процесса. Установлено [8], что при атаке лигносульфонатов грибами белой гнили (*Lentinus tigrinus*) уменьшается число метоксильных групп, фенольных и алифатических гидроксильных; расщепляются ароматические ядра с образованием алифатических карбоксилсодержащих остатков; дополнительно появляются карбонильные и карбоксильные группы; образуются алкокси- и феноксиуксусные кислоты и другие кислородсодержащие соединения, вплоть до конечного продукта окислительных реакций – CO_2 , с максимальным выходом мицелия (24,4 % по отношению к взятому субстрату). Однако исследования по выбору условий биоконвертирования лигносульфонатов другими базидиальными микромицетами, например *Coriolus hirsutus*, также представляют большой интерес.

Целью данной работы является изучение биоконверсии водорастворимого лигнина (технических лигносульфонатов) в условиях жидкофазной ферментации базидиальным микромицетом *Coriolus hirsutus*.

Объектом исследования служили технические лигносульфонаты Архангельского ЦБК от кислой сульфитной варки хвойной древесины (ТУ 13-0281036-029–94), характеристика которых приведена в табл. 1.

Содержание зольности и РВ определяли в соответствии с [12], функциональных групп – по методике [5], общей и органически связанной серы – по [2].

Среднюю молекулярную массу (M_w) ЛС рассчитывали по данным гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-75 [10]. Также были изучены отдельные фракции ЛС, полученные методами ультрафильтрации, в которых содержание РВ составляло менее 0,2 % к абс. сухому веществу (а.с.в.).

Таблица 1

Показатель	Значение показателя
Зольность, % а.с.в.	17,5
Редуцирующие вещества, % а.с.в.	4,4
Средняя молекулярная масса M_w , а.е.м.	42 000
Доля функциональных групп, % а.с.в.:	
-OCH ₃	10,3
-SO ₃ H	15,3
Органическая связанная сера, %	6,5
Общая сера, %	7,5

Для приготовления образцов ЛС, имеющих различную молярную массу, проводили фракционирование с помощью полупроницаемых мембран на лабораторной установке ФМО2-1000 с перемешиванием (объем ячейки 1000 см³, площадь мембраны 113 см², температура 20 °С). В работе применяли полисульфонамидные мембраны ПСУ-70 (НПО «Пластмассы», г. Москва) [1].

Для исследований биоконверсии была выбрана чистая культура базидиомицета *Coriolus hirsutus*. Использовали известные способы культивирования: поверхностное жидкофазное (ЖФ), глубинное жидкофазное с перемешиванием (ЖФГ), поверхностное жидкофазное в присутствии твердого инертного носителя (ЖФТ). ЖФ – процесс, при котором мицелий чистой культуры *Coriolus hirsutus*, предварительно выращенный на питательном растворе с агар-агаром, развивается на поверхности раствора; ЖФГ – процесс с перемешиванием, при котором предварительно выращенный мицелий чистой культуры вносят в объемную фазу раствора ЛС; ЖФТ – процесс, при котором мицелий гриба предварительно наращивают на твердом инертном субстрате с использованием питательных растворов, а процесс биоконверсии ЛС происходит на поверхности субстрата и в капиллярах пористого материала.

В качестве твердого носителя использовали измельченную керамику с определенным по методу термической десорбции азота (Sorptometer KELVIN 1042) распределением пор [13] (микропоры (ЖФТ-1, $d \approx 1$ мкм), мезопоры (ЖФТ-2, $d \approx 1 \dots 100$ мкм) и макропоры (ЖФТ-3, $d \approx 100 \dots 1000$ мкм). Различная активность микромицета на твердых носителях объясняется различием их пористой структуры. При погружении в раствор образца ЖФТ-3 в качестве носителя субстрата нарастание мицелия наблюдалось только на его внешней поверхности, при этом материал практически полностью заполнялся раствором. На субстратах образцов ЖФТ-1 и ЖФТ-2 отмечалось более активное нарастание мицелия. Однако образец ЖФТ-1 содержал микропоры, слабо доступные для микромицета. Размер пор образца ЖФТ-2, видимо, в наибольшей степени соответствовал биологическим особенностям микромицета и имел максимально доступную для него поверхность, обеспечивающую снабжение мицелия кислородом. Для дальнейших исследований при поверхностном жидкофазном культивировании микромицета в присутствии твердого инертного носителя был выбран образец ЖФТ-2.

Эксперимент проводили в плоскодонных конических колбах вместимостью 250 мл, в которые помещали слой пористого субстрата толщиной 3...4 см, 100 мл водного раствора ЛС концентрацией 5,0 г/л и предварительно выращенную чистую культуру гриба *Coriolus hirsutus*. Ферментацию вели при различных значениях рН и температуры. Продолжительность ферментации в каждом опыте составляла 10 сут. Концентрацию ЛС в растворе определяли по [14]. Активность деятельности микромицета оценивали по степени биоконверсии γ , т.е. по относительной убыли к исходной концентрации ЛС в растворе $C_{исх.}$, выраженной в процентах: $\gamma = (\Delta C \cdot 100) / C_{исх.}$

Динамика действия микромицета *Coriolus hirsutus* в различных условиях культивирования приведена на рис. 1.

При глубинном культивировании (ЖФГ) за 10 сут степень биоконверсии составила 19,6 %, в поверхностной культуре (ЖФ) – 21,8 %, на твердом носителе (ЖФТ) – 32,5 %. В последнем варианте развитие гриба происходило на твердом инертном субстрате, при этом мицелий гриба хорошо закреплялся, значительно увеличивалась его поверхность. В процессе роста базидиальных грибов происходило нарастание мицелия, его нарушение (при перемешивании раствора или принудительной аэрации) приводило к ослаблению жизнедеятельности мицелиальной культуры, что подтверждают результаты эксперимента. Для культивирования таких микроорганизмов более подходят условия, при которых нарастающий мицелий не повреждается.

Для выбора оптимальной концентрации ЛС при культивировании микромицета в жидкой фазе с твердым носителем исследовали растворы концентрацией от 1,0 до 200,0 г/л. Установлено, что микромицетом *Coriolus hirsutus* утилизирует ЛС при всех исследуемых концентрациях, однако концентрация выше 50,0 г/л ингибирующе действует на жизнедеятельность микромицета. В растворах концентрацией 5,0 г/л степень биоконверсии составляла около 35 %, в диапазоне 50...200 г/л мицелий гриба развивался очень слабо, а иногда даже погибал ($\gamma = 2,4...1,7$ %). Длительными экспериментами (до 50 сут) биоконверсии ЛС было показано, что активное действие микромицета на ЛС наблюдается лишь первые 10...15 сут процесса.

В эксперименте по определению оптимальных условий биоконверсии микромицетом *Coriolus hirsutus* использовали растворы ЛС с различными значениями рН (2,0...9,0) и температуры (4...40 °С). В кислой среде (рН 2,0) мицелий гриба развивался очень слабо и быстро погибал; при рН 4,0...7,0 в температурном интервале 4...30 °С степень биоконверсии повышалась, а при 40 °С наблюдалось некоторое ее снижение. Переход из слабокислой к слабощелочной среде приводит к уменьшению степени биоконверсии при всех исследуемых значениях температуры (табл. 2).

Оптимальными условиями биоконверсии можно считать поверхностное жидкофазное культивирование микромицета в присутствии твердого инертного носителя при температуре около 30 °С и концентрации раствора 5,0 г/л в слабокислой среде (рН~4).

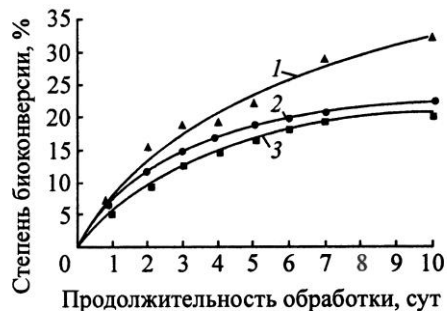


Рис. 1. Динамика степени биоконверсии в зависимости от условий культивирования микромицета: 1 – ЖФТ; 2 – ЖФ; 3 – ЖФГ

Таблица 2

Условия культивирования*		Степень биоконверсии ЛС, %	
рН	Температура, °С	ЖФ	ЖФТ
2	4...40	0	0
4	4	13,5	14,7
	20	18,0	23,5
	30	20,2	32,5
	40	17,0	29,6
7	4	10,0	15,1
	20	13,6	23,0
	30	15,8	25,7
	40	12,0	20,9
9	4	8,0	13,2
	20	9,5	15,6
	30	11,0	15,8
	40	9,0	14,6

* Концентрация раствора ЛС – 5,0 г/л.

Так как процесс биоконверсии сопровождается значительным окислением компонентов ЛС, с увеличением степени биоконверсии содержание кислородсодержащих функциональных групп закономерно возрастает. Наиболее заметно увеличивалось содержание ОН-групп при высоких степенях биоконверсии ЛС (рис. 2).

Для качественной характеристики молекулярно-массового распределения ЛС использовали метод гель-хроматографии [10]. На гель-хроматограммах (рис. 3) исходных (до биоконверсии) ЛС наблюдались два выраженных максимума в высоко- и низкомолекулярной областях, после биоконверсии максимум в области низкомолекулярной фракции ЛС исчезал, при этом увеличивалась доля высокомолекулярной фракции, т.е. в процессе биоконверсии микромицет *Coriolus hirsutus* преимущественно утилизировал низкомолекулярную фракцию ЛС.

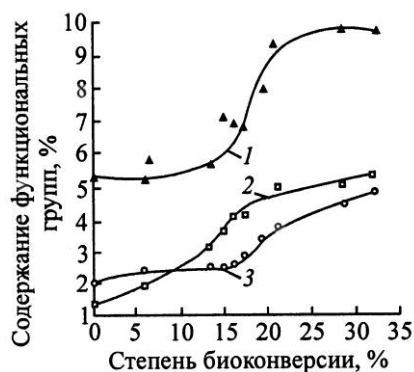


Рис. 2. Зависимость содержания функциональных групп в ЛС от степени биоконверсии микромицетом *Coriolus hirsutus*: 1 – ОН, 2 – >C=O, 3 – COOH

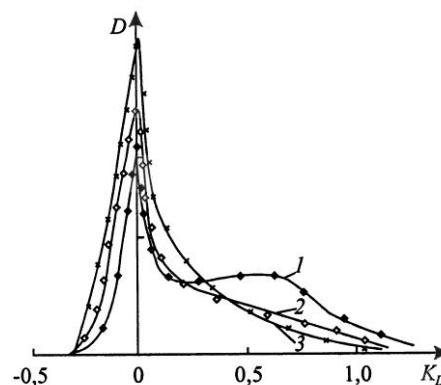


Рис. 3. Гель-хроматограммы ЛС до (1) и после (2, 3) биоконверсии при различных значениях γ : 2 – 20,2 %; 3 – 32,5 %

Таблица 3

Фракция	Способ ферментации	Степень биоконверсии, %	M_w , а.е.м.	Содержание функциональных групп, % а.с.в.		
				-ОН	>C=O	-COOH
НМФ	–	–	22 000	1,6	1,4	1,4
	ЖФ	22,5	48 000	2,8	2,2	2,8
	ЖФТ	34,5	60 000	3,2	2,5	3,4
ВМФ	–	–	116 000	5,8	1,8	2,2
	ЖФ	15,9	145 000	6,8	3,1	4,5
	ЖФТ	26,7	160 000	7,3	3,9	4,8

Это подтверждают данные биоконверсии фракционированных ЛС с $M_w = 22\ 000$ (низкомолекулярная фракция (НМФ) со степенью полидисперсности $\sim 5,0$) и $M_w = 116\ 000$ (высокомолекулярная фракция (ВМФ) со степенью полидисперсности $\sim 14,0$). В эксперименте использовали растворы ЛС концентрацией 5,0 г/л. Культивирование микромицета проводили в условиях поверхностной культуры (ЖФ) и с применением пористого носителя (ЖФТ) при температуре 30 °С, рН 4 в течение 15 сут. Характеристики процесса биоконверсии фракционированных ЛС приведены в табл. 3.

Исследования показали, что обе фракции ЛС достаточно активно подвергались утилизации микромицетом *Coriolus hirsutus*. Однако в большей степени утилизируются ЛС в условиях поверхностного жидкофазного культивирования в присутствии твердого носителя ЖФТ (для НМФ и ВМФ степень биоконверсии составляет соответственно 34,5 и 26,7 %). В процессе биоконверсии содержание карбоксильных, карбонильных и гидроксильных групп возрастает по сравнению с исходным соответствующим значением в 1,6–2,0 раза. Во всех случаях наблюдалось увеличение молекулярных масс ЛС.

По данным исследований можно представить направление химических превращений ЛС в процессе биоконверсии микромицетом. Действие гриба направлено на низкомолекулярные компоненты ЛС. При этом происходит их значительное окисление, в большей степени до конечных продуктов CO_2 и H_2O , оставшаяся часть ЛС преобразуется в окисленные продукты с высоким содержанием кислородсодержащих групп. Процесс окисления сопровождается возрастанием доли ВМФ компонентов ЛС. Предполагается, что на данной стадии, наряду с деструкцией компонентов ЛС, протекают конденсационные процессы.

Проведенные исследования показали, что полная утилизация ЛС микромицетом *Coriolus hirsutus* значительно снижается после 20...30 %-й биоконверсии, независимо от времени воздействия гриба и условий процесса. В экспериментах, проводившихся другими авторами [3, 4, 6, 11], отмечается нерегулярность действия микроорганизмов на растительные субстраты. Не объясняется и тот факт, что процесс биоконверсии, протекающий вначале активно, далее замедляется или заканчивается задолго до полного исчерпания субстрата. Отмечают несколько причин, в том числе: старение мицелия, присутствие труднодоступных компонентов в субстрате или накопление ингибиторов.

Для выяснения этих причин был поставлен эксперимент повторного действия микромицета *Coriolus hirsutus* на растворы ЛС. Биоконвертированные ЛС были выделены из растворов, высушены и из них вновь приготовлены растворы с концентрацией 5,0 г/л. В этом случае, кроме нефракционированных ЛС ($M_w = 42\ 000$), использовали фракционированные ЛС с молекулярной массой 22 000 и 116 000. Повторное действие микромицета определяли в условиях ферментации с твердым пористым носителем для субстрата в течение 15 сут биоконверсии, использовали свежий мицелий гриба.

При первичной обработке степень биоконверсии ЛС для нефракционированных ЛС составляла 32,5 %, для фракционированных ВМФ и НМФ – соответственно 26,7 и 34,5 %. При вторичной биоконверсии утилизация была значительно ниже и доходила до 4,6...4,9 для НМФ и 7,3 % для ВМФ.

Таким образом, старение мицелия не является основной причиной уменьшения активности утилизации ЛС микромицетом при его длительном действии. При вторичной биоконверсии ЛС наблюдалось некоторое снижение доли кислородсодержащих функциональных групп. Вероятно, в этот период глубокому окислению подвергаются частично окисленные компоненты ЛС. В данном эксперименте наблюдалось уменьшение молекулярных масс ЛС, что указывает на их возможную деструкцию.

По результатам исследований можно предположить, что биоконверсию ЛС микромицетом *Coriolus hirsutus* во времени можно условно разделить на две стадии:

первая – активная утилизация, связанная с глубоким окислением ЛС до CO_2 и H_2O ; в этот период в большей степени утилизируется низкомолекулярная фракция ЛС;

вторая – неполное окисление компонентов ЛС с возможными процессами поликонденсации и заметным уменьшением скорости утилизации ЛС микромицетом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойцова, Т.А. Биоконверсия технических лигнинов базидиальными микромицетами [Текст]: дис. ... канд. хим. наук / Т.А. Бойцова. – Архангельск, 2006. – 164 с.
2. Гельман, И.Э. Методы количественного органического микроанализа [Текст] / И.Э. Гельман. – Москва: Химия, 1988. – 276 с.
3. Головлева, Л.А. Разложение лигнина грибными культурами [Текст] / Л.А. Головлева, Г.К. Скрябин, Х.Г. Ганбаров // Микробиология. – 1982. – Т. 51, № 3. – С. 543–547.
4. Емельянова, Е.В. Эффективность роста дереворазрушающего базидиомицета *Coriolus hirsutus* [Текст] / Е.В. Емельянова // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 3. – С. 313–317.
5. Закус, Г.Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных [Текст] / Г.Ф. Закус. – Рига: Зинатне, 1987. – 230 с.

6. *Медведева, С.А.* Перспективы и трудности использования микроорганизмов в целлюлозно-бумажной промышленности [Текст] / С.А. Медведева, Г.П. Александрова, В.А. Бабкин // *Химия древесины*. – 1991. – №1. – С. 3–7.

7. *Медведева, С.А.* Экологическое преобразование производства целлюлозы на основе биотехнологий [Текст] / С.А. Медведева, Г.П. Александрова, В.А. Бабкин // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 1996. – № 4. – С. 313–320.

8. *Озолия, Н.Р.* Биотрансформация технических лигносульфонатов грибом белой гнили *Lentinus tigrinus* 82-4 [Текст] / Н.Р. Озолия, Ц.Л. Абрамович, А.В. Новиков // *Химия древесины*. – 1991. – № 6. – С. 51–56.

9. *Сергеева, В.Н.* Возможности использования отходов химической переработки древесины – лигносульфонатов и гидролизного лигнина. Перспективы использования древесины в качестве органического сырья [Текст] / В.Н. Сергеева. – Рига, 1982. – С. 105–125.

10. *Соколов, О.М.* Определение молекулярных масс лигнинов на ультрацентрифуге и методом гель-фильтрации. [Текст]: учеб. пособие / О.М. Соколов. – Л.: ЛТА, 1987. – 76 с.

11. Структурные изменения компонентов древесины при воздействии грибов белой гнили [Текст] / М.Я. Иолович [и др.] // *Химия древесины*. – 1989. – № 3. – С. 96–100.

12. ТУ 13-0281036-029–94. Лигносульфонаты технические [Текст] – М., 1994.

13. *Фенелонов, В.Б.* Введение в физическую химию формирования супрамолекулярной структуры адсорбентов и катализаторов [Текст] / В.Б. Фенелонов. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2004. – 442 с.

14. *Хабаров, Ю.Г.* Аналитическая химия лигнина [Текст] / Ю.Г. Хабаров, Л.А. Песьякова. – Архангельск, 2008. – 171 с.

15. *Шлегель, Г.* Общая биология [Текст] / Г. Шлегель. – Москва: Мир, 1987. – 560 с.

Поступила 26.08.09

T. B. Moshkova¹, T.A. Boitsova², N.A. Makarevich²

¹Arkhangelsk State Technical University

²Institute of Ecological Problems of the North, Ural Branch, Russian Academy of Sciences

Utilization of Lignosulphonates in Bioconversion

The optimal bioconversion conditions of technical and fractional lignosulphonates by micromycete *Coriolus hirsutus* in water solutions are determined. The fermentation method of lignosulphonates is chosen by using liquid-phase cultivation on solid mesoporous carrier made of ceramics. The relation between the functional composition of bioconvertible lignosulphonates with their molar mass is analyzed.

Keywords: lignosulphonates, bioconversion, basidial micromycete, molecular weight.