На правах рукописи

Прутенская
Екатерина Анатольевна

Микробиологическая конверсия растительных отходов в гуминовые вещества

03.00.07 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и химии Тверского государственного технического университета.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Воробьева Галина Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Градова Нина Борисовна

доктор биологических наук, профессор Смирнова Ирина Павловна

Ведущая организация: Институт Биохимии имени А.Н.Баха РАН

Защита состоится «__» _____ 2008 г. в __ ч на заседании диссертационного совета Д 212.203.05 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования ”Российского университета дружбы народов” по адресу:111798. г.Москва, ул.Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Российского университета дружбы народов” по адресу: 111798. г.Москва, ул.Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан "___" _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент О.Б.Гигани

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время большое внимание уделяется проблеме биоконверсии и, в частности, биодеградации одного из самых устойчивых к химическому и микробиологическому разложению биополимера - лигнина. Большинство почвенных микроорганизмов способны изменять структуру данного полифенольного соединения. Они синтезируют мультиферментный комплекс лигнолитического действия, который принимает участие в процессе деструкции субстрата.

Разработка экологически чистых биотехнологических процессов обработки, биоконверсии и утилизации лигносодержащих материалов, способствовала интенсификации исследований механизма воздействия микроорганизмов на лигнин и роли их ферментов при его деградации. Результаты этих исследований дали возможность оценить роль микроорганизмов в процесс делигнификации и установить корреляцию между эффективностью деградации лигнина, биосинтезом гуминовых кислот и особенностями механизма их образования.

Биотехнологические способы получения биопрепаратов, содержащих гуминовые кислоты, основанные на жизнедеятельности микроорганизмов, являются наиболее перспективными по сравнению с химическими. Они могут обеспечить экологически безопасные процессы делигнификации и низкую себестоимость полученных продуктов [Саловарова В.П.с соавт., 2001; Калунянц К.А. с соавт., 1980]. Среди большого количества биопрепаратов, представленных на российском рынке, особый интерес представляют препараты гуминовой природы.

Одним из наиболее важных свойств гуминовых кислот является их физиологическая активность. В последнее время обнаружены антиоксидантные, антимутагенные и адаптогенные свойства гуминовых кислот. Ранее неоднократно подчеркивалось разнообразие биологической активности гуминовых веществ разного происхождения (различных по составу, зольности, степени конденсированности).

Известно, что в регуляции интенсивности процессов роста растений определяющую роль играет гормональная система. При этом ростстимулирующая активность гуминовых кислот обусловлена их способностью активно воздействовать на гормональный статус проростков. Данные, приведенные в литературе [Нургалиева Н.В., 2007], указывают на стойкое накопление гормонов цитокининовой природы в предобработанных гуминовыми кислотами растениях в сравнении с контролем. Особое место в спектре действия гормонов занимает их способность повышать стрессустойчивость растений.

В связи с этим весьма перспективными являются биотехнологические способы получения гуминовых веществ с заданными свойствами путем их биосинтеза микроорганизмами в более короткие сроки. Поэтому исследования гуминовых кислот и их биологической активности представляют собой задачу научной и практической значимости.

Целью настоящей данной работы было выделение и изучение морфолого-биохимических свойств штаммов микроорганизмов, способных к биоконверсии лигносодержащих субстратов и синтезу гуминовых кислот.

Для проведения исследований по деструкции лигносодержащих субстратов были поставлены и решались следующие задачи:

- произвести скрининг микроорганизмов и выделить штамм, наиболее полно воздействующий на лигносодержащие субстраты и способный синтезировать гуминовые кислоты;

- изучить деструкцию основных компонентов лигноцеллюлозного субстрата при культивировании изучаемого штамма;

- изучить возможность использования ультразвуковой предобработки субстрата в синтезе гуминовых кислот;

- исследовать ростстимулирующую активность синтезируемых гуминовых кислот в нормальных и стрессовых условиях;

- предложить схему получения гуминовых кислот в условиях in vitro.

Научная новизна. Проведен скрининг микроорганизмов, осуществляющих биоконверсию лигноцеллюлозных субстратов. Осуществлен сравнительный анализ их основных морфологических, физиолого-биохимических свойств, субстратной специфичности. Выделен наиболее активный штамм, показавший в условиях in vitro способность синтезировать гуминовые вещества. На основании анализа секвенсов вариабельных участков 16 S рДНК установили, что изучаемый штамм микроорганизмов относится к виду Bacillus subtilis, с вероятностью 98%.

Установлено, что гуминовые вещества, синтезируемые микробиологическим путем, обладают такой же биологической активностью как гуминовые кислоты низинного торфа. Изучен процесс биодеструкции лигноцеллюлозы растительного субстрата. Показано, что гуминовые кислоты образуются через стадию деметоксилирования лигнина.

Впервые проведены исследования по определению ростстимулирующей активности гуминовых веществ, синтезированных в условиях in vitro, при действии на семена льна сортов Новоторжский и Ленок. Установлено, что микробиологические гуминовые вещества обладают биологической активностью, как и гуминовые кислоты низинного торфа. Впервые выявлен положительный эффект действия синтезируемых веществ на семена льна, проявляющийся в стимуляции прорастания семян и повышении устойчивости предобработанных семян к холоду.

Проведенные исследования расширили представления об использовании микроорганизмов рода Bacillus (Bacillus subtilis) в биоконверсии лигносодержащих субстратов и для синтеза гуминовых веществ.

Практическая значимость работы состоит в том, что показана ростстимулирующая активность синтезируемых гуминовых веществ в растениеводстве. Вещества увеличивают дружность всходов проростков льна и повышают образование их биомассы на 30%. Это очень важно в стрессовых условиях: при резком изменении температуры в утреннее и ночное время.

Показано, что применение монокультуры в производстве гуминовых веществ позволяет получать гуминовые препараты с определенными свойствами.

Возможность микробиологического синтеза гуминовых кислот позволит решить проблему утилизации отходов различных отраслей промышленности: деревообрабатывающей, гидролизной и других.

Использование микроорганизмов-продуцентов гуминовых веществ позволит сократить расходы угля и торфа в качестве сырья в производстве удобрений. Показана эффективность предобработки ультразвуком растительного сырья.

Разработана схема получения гуминовых кислот in vitro.

Разработан курс лекций и практических занятий по дисциплинам «Общая биотехнология» и «Основы биотехнологии» для специальностей 070100 – Биотехнология и 072000 – Стандартизация и сертификация в рамках учебного плана Тверского государственного технического университета.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на следующих конференциях и конгрессах: 15-ый Международный конгресс «Chemical and Process Engineering CHISA 2002» (Прага, 2002), IX региональная областная научно-техническая конференция молодых ученых «Каргинские чтения» (Тверь. 2002,2003), II Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003), Всероссийская заочная конференция «Катализ и сорбция в биотехнологии, химии, химических технологиях и экологии» (Тверь, 2003), X региональная областная научно-техническая конференция молодых ученых «Каргинские чтения» (Тверь, 2003), Международная научно-практическая конференция «Вавиловские чтения- 2007» (Саратов, 2007).

Публикации. По результатам опубликовано печатных 8 работ, в том числе, 1 статья в изданиях центральной печати, рекомендованных ВАК, получено свидетельство на полезную модель. Изобретение может быть использовано в промышленных условиях при решении проблем, связанных с переработкой отходов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Библиография включает 159 наименований, в том числе 27иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами, 38 рисунками.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обобщены имеющиеся в литературе данные о биоконверсии лигносодержащих субстратов микроорганизмами и биосинтезе гуминовых кислот микробиологическим путем. Показано, что эти процессы очень важны при утилизации промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов, загрязняющих окружающую среду, а также в повышении плодородия почв и стимулирования роста растений.

Решение этих вопросов зависит от глубокого изучения морфолого-биохимических, генетических свойств микроорганизмов-деструкторов растительных материалов.

В литературном обзоре представлены механизмы их воздействия на растительные субстраты и влияние условий, при которых происходит это воздействие.

Описаны основные механизмы гумификации растительного сырья.

Показана целесообразность предварительной предобработки растительного материала для ускорения процессов его биоконверсии. Указано, что перспективным способом подготовки сырья является обработка его ультразвуком. Именно применение ультразвука позволяет разрушать кристаллические высокоупорядоченные структуры лигнина и целлюлозы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Микробиологические характеристики, а также выделение и исследование автохтонных культур микроорганизмов осуществляли с использованием стандартных методов [Н.С.Егоров, 1983].

Микробными объектами были штаммы микроорганизмов, способных к деструкции лигноцеллюлозы. Микроорганизмы поддерживали на косяках с сусло-агаром. Культивирование проводили в колбах объемом 100 мл (50 мл среды) на среде Чапека, содержащей 20г/л глюкозы.

Выращивание микроорганизмов в экспериментах по оптимизации условий культивирования проводили на средах Чапека, Гетчинсона, а также на средах с

дрожжевым автолизатом и рыбной мукой, варьируя состав сред. В качестве источника углерода использовали различные лигноцеллюлозные субстраты.

По окончании процесса биоконверсии во всех образцах определяли массу остатка, содержание целлюлозы по методу Кюршнера [Оболенская А.В. с соавт., 1985] и лигнина.

Выделение лигнина осуществляли по методу Комарова [Грушников, 1973]. Ик-спектры полученных препаратов регистрировали на ИК-фурье-спектрометре ИНФРАЛЮМ ФТ- 02 (Россия).

Выделение гуминовых веществ осуществляли по методике Д.С.Орлова [Орлов Д.С., 1985]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-02 (Россия).

Содержание белка определяли в соответствии с ГОСТ 28178-89.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг микроорганизмов, разрушающих лигноцеллюлозу.

Отбор микроорганизмов - трансформаторов представляет собой задачу, специфическую для каждого конкретного случая. Для проведения многих трансформаций могут быть использованы обычные коллекционные культуры. Их исследование – вполне оправданный путь поиска, если речь идет об энзиматических превращениях, осуществляемых ферментами обычного метаболизма, широко распространенных среди микроорганизмов. Однако если трансформируемый субстрат представляет собой специфическое соединение, в норме не атакуемое микроорганизмами, или отношение к нему до конца не выяснено. В этом случае нужную культуру выделяют из природных источников. Поэтому для трансформации лигноцеллюлозного материала был осуществлен отбор микроорганизмов из автохонной микрофлоры опилок территории деревоперерабатывающего предприятия. При изучении естественной микрофлоры исследуемых отходов с территории деревоперерабатывающей промышленности было выяснено, что наиболее активно на среде с опилками развивается один бактериальный и один грибной штамм.

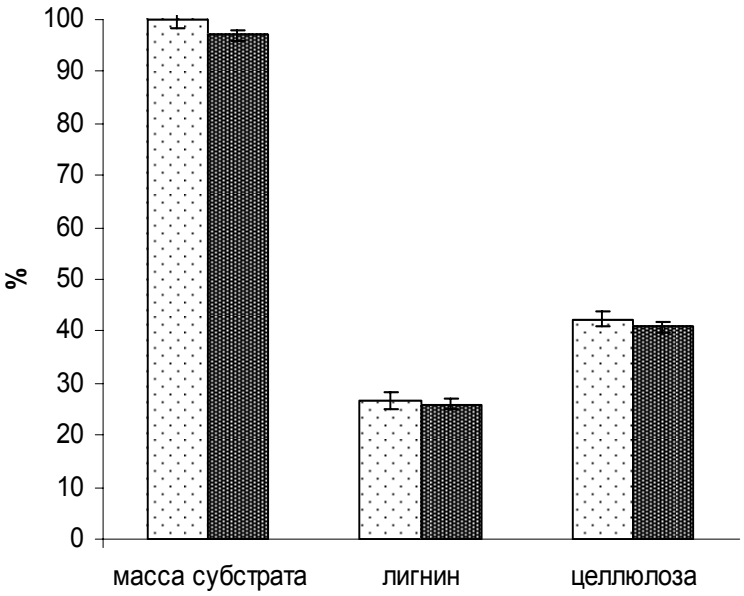

Рисунок 1 – Зависимость остаточного содержания компонентов растительного материала после биоконверсии грибным изолятом
(⬚- контроль, ▩ - после биоконврсии)

Полученные морфологические характеристики автохонной культуры позволили предположить, что данный микроорганизм относится к роду Aspergillius. Из литературных данных [Бабицкая В.Г., 1991; Махова Е.Г., 2001] известно, что Aspergillius sp. усваивают природные растительные субстраты, продуцируя весь комплекс целлюлолитических ферментов. Поскольку исследуемая культура была выделена из древесных отходов, в дальнейшем было проведено изучение характе-

ра потребления лигноцеллюлозы. В качестве основного источника углерода были выбраны опилки (рисунок 1).

Однако высокое содержание целлюлозы и лигнина после биоконверсии показывает, что культурой гриба в субстрате потребляется лишь его легкоусваиваемая часть.

Проведенный анализ показал, что выделенными штамм гриба не представляет особого интереса для дальнейших исследований по биоконверсии им лигноцеллюлозных субстратов. Поэтому дальнейшие исследования были сосредоточены на бактериальном штамме. Следующим этапом работы стало более глубокое изучение морфолого-биохимических свойств этого штамма.

Исследование свойств бактериального изолята.

В ходе изучения культуры, предварительно выращенной на твердой и жидкой питательных средах, установлено, что она изоморфна. Микроаэрофил. Спорообразующая. Грамположительная. Клетки штамма соединены в цепочки. Часто наблюдаются нити, но в большинстве случаев они состоят из цепей клеток, поперечные стенки трудно различимы.

При посеве на свежий питательный субстрат они прорастают и образуют колонии с ризоидным краем. При исследовании отношения выделенной культуры к различным источникам углерода установили, что штамм хорошо усваивает мальтозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, арабинозу. На средах с мальтозой количество биомассы значительно превышало количество количество биомассы, полученные в контроле с глюкозой. Это свидетельствует о том, что она является хорошим источником углерода. На среде с лактозой рост культур практически отсутствует. Хорошо растет она на минеральных (NO_3^-, NO_2^-) и органических (дрожжевой гидролизат) формах азота. Экспериментальные данные показали, что штамм хорошо развивается на средах со спиртами – глицерин, сорбит, инозит. На гликоколе развитие штамма замедлено. Однако он использует ароматические кислоты (бензойная и фталевая) в качестве единственного источника углерода.

Для дальнейшей идентификации проводился анализ 16S РНК на автоматическом секвенаторе AE3000.

При секвенировании вариабельных участков 16SrDNA получена следующая собранная нуклеотидная последовательность для изучаемого штамма:

TGAAAGCCCCCCGCTCAACCTGGGGAGGGGTCAGTGGAAACTGGGGGACTTGA
GTGCAGCAAGAGGAGAGTGGATTCCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGAGGGACACCAGTGGCGAAGGGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTTGCAGCTAACG
CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTC
CCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG-
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
CAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATC.

Первичный скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм микроорганизма принадлежит к Bacillus subtilis, причем гомология с видом составляет 98%. Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду счита-

ется гомология не менее 97%. Таким образом, по этому критерию анализируемый штамм можно отнести к Bacillus subtilis. Культура была депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов РАН, как Bacillus subtilis PrEA под номером В-10040.

Следующим этапом работы было изучение отношения выделенного микроорганизма к фенолу. В процессе разрушения лигнина в культуральной жидкости накапливаются промежуточные продукты (фенолы, хиноны и другие), которые снижают активность микроорганизмов. Однако, некоторые микроорганизмы способны производить детоксикацию данных соединений. При исследовании процесса разрушения лигнина определяли, способен ли микроорганизм включать в свой метаболический путь фенольные соединения в качестве основных или дополнительных источников питания.

С целью подтверждения этого предположения было проведено глубинное культивирование бактериального изолята на питательной среде, содержащей в качестве субстрата фенол в количестве 0,4 г/л. Результаты проведенного эксперимента показали, что культура способна использовать фенол для своего метаболизма (рисунок 2).

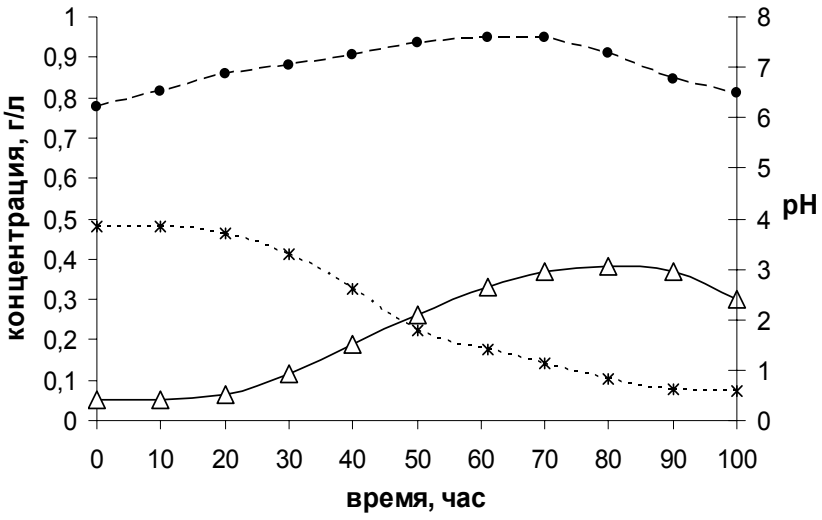

Рисунок 2 – Динамика роста бактериального изолята на среде с фенолом
(Δ-биомасса, ✳ - концентрация фенола, ● – pH)

Культивирование микроорганизмов сопровождалось снижением фенола после 10-часовой лаг-фазы. Период индукции связан с интенсивной деградацией фенола. Она начинается, вероятно, гидроксилированием ароматического кольца с образованием катехола, который далее расщепляется и через ряд промежуточных продуктов дает алифатическую цис-муконовую кислоту. Дальнейшие превращения приводят к сукцинату и ацетил-КоА. По истечении 50-часов раствор окрашивался в коричневый цвет. Это свидетельствует о полимеризации монофенолов под действием фенолоксидазы и образовании веществ гуминовой природы. Интенсивность утилизации фенола снижалась после 70 часов культивирования, что связано с накоплением продуктов метаболизма. По истечение 80 часов культура переходит в стационарную фазу развития и концентрация фенольных соединений остается на постоянном уровне 0,08 г/л.

Оптимизация условий культивирования.

Максимальное накопление биомассы было отмечено при pH 6,0-7,0 и температуре 25-30^0 С.

Поскольку лигноцеллюлозные субстраты включают в свой состав широкий спектр компонентов, некоторые из которых могут подавлять рост культуры микроорганизмов, необходимым этапом исследования являлось определение оптимального

субстрата для деструкции и его начальная концентрация. Для решения данной задачи была поставлена серия экспериментов. В качестве субстрата были выбраны: опилки, костра, шелуха семечек (таблица 1). В таблице 1 представлены показатели степени деструкции при воздействии штаммом бактерий на различные растительные субстраты.

Таблица 1- Химический состав среды до и после деструкции

Показатели, % абсолютно сухого вещества (а.с.в.)	Опилки		Костра		Семечки	
	до деструкции	после деструкции	до деструкции	после деструкции	до деструкции	после деструкции
Убыль массы образца*	0	18,1± 0,1	0	21,5 ±0,8	0	26,8 ± 1,2
Лигнин	28,7 ± 1,3	24,1 ± 0,5	29,4 ± 0,3	25,5 ± 0,4	39,7 ± 0,9	30,8 ± 1,5
Целлюлоза	47,1 ± 1,4	42,4 ± 1,1	39,2 ± 0,7	34,8 ± 0,6	44,9 ± 1,1	38,9 ± 1,0
Зольность	1,9 ± 0,1	0,6 ±0,1	1,8 ±0,1	1,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Биомасса	0,1	9,1± 0,7	0,1	13,4±0,3	0,01	11,3±0,5

Сравнительный анализ показал, что наибольшая убыль субстрата (26,8 % от а.с.в.) наблюдалась при деструкции шелухи семечек, наименьшая – на опилках. Это можно объяснить ингибирующим действием на микроорганизмы смолистых веществ, присутствующих во всех породах деревьев. Несмотря на хороший рост, наблюдаемый на костре, потребление лигнина в этом случае было не очень значительное. Поэтому в качестве оптимального субстрата была выбрана шелуха семечек.

Для проведения эффективной биодеградации лигноцеллюлозы необходимо определение ее достаточной массы для развития микроорганизма и получения максимального выхода гуминовых кислот. Поэтому следующим этапом работы стало определение оптимальной концентрации субстрата (шелухи семечек) для интенсификации процесса биоконверсии.

Таблица 2– Влияние концентрации лигноцеллюлозного материала на процесс гумификации

Масса субстрата, г	Сухой остаток субстрата, %	Белок, % а.с.в.	Гуминовые вещества, г/л
1	82,7±1,4	3,4±0,5	0,06±0,04
2	83,9±1,3	4,5±0,6	0,10±0,06
3	85,0±0,9	5,3±0,3	0,22±0,03
4	86,6±0,8	6,0±0,6	0,39±0,01
5	87,4±0,3	6,1±0,2	0,48±0,05
6	88,2±0,5	6,8±0,4	0,60±0,04
7	89,0±0,6	6,4±0,3	0,61±0,02
8	89,1±0,5	5,4±0,7	0,59±0,03

Как показано в таблице 2 более значительное разложение субстрата (17,3 %) достигалось при его минимальной массе (1г.) в опыте, но накопление гуминовых кислот в культуральной жидкости было минимальным. Вероятно, небольшая масса субстрата была использована микроорганизмами для построения своей структуры. Интенсивность утилизации по мере увеличения массы снижалась и достигла 11%. Это связано в первую очередь с отсутствием перемеши-

вания и, следовательно, с меньшей доступностью компонентов растительного материала ферментам микроорганизмов. Максимальное накопление биомассы микроорганизмов наблюдали при культивировании микроорганизмов на субстрате, используемом в количестве 6г. При увеличении массы субстрата развитие микроорганизмов замедляется, что, вероятно, связано с механизмом ингибирования культуры.

Полученные результаты и выход гуминовых кислот позволяют говорить, что оптимальной массой для проведения процесса биоконверсии является 6г.

Изучение структурных и функциональных изменений в лигнине при культивировании бактериального штамма Bacillus subtiliis проводили методом ИК-фурье-спектроскопии.

В ИК-фурье-спектрах изучаемых препаратов (рисунок 3), несмотря на их большое сходство, отражаются структурные различия в строении лигнина, обусловленные воздействием штамма бактерий. На всех спектрах наблюдается широкая интенсивная полоса поглощения в области 3400 – 3000см$^{-1}$, что соответствует валентным колебаниям ОН - связи фенольных и спиртовых гидроксилов. Для лигнина, полученного после ферментации, характерно расщепление спектра с образованием максимумов 3396см$^{-1}$,3347 см$^{-1}$.

Смещение линии валентных колебаний О-Н связи (3200 см$^{-1}$) в высокоэнергетическую часть спектра (3390 см$^{-1}$) указывает на появление свободных гидроксильных групп в этом препарате. Пики в области 2953 см$^{-1}$ и 2848 см$^{-1}$ могут вызываться валентными колебаниями С-Н метильных и метиленовых групп. Согласно работам [Пилипчук, Грушников, 1998], проведенных на модельных веществах, интенсивность этой полосы возрастает при деметилировании лигнина и уменьшается при его метилировании, что, вероятно, и наблюдается у образца после ферментации. Четкий пик в области 1715-1670 см$^{-1}$, соответствующий валентным колебаниям карбонильных групп, несопряженных кетонов и карбоксильных групп отчетливо представлен на спектрах всех образцов. При этом максимальная интенсивность наблюдается у сульфолигнина, полученного из ферментированного сырья. Пики поглощения 1370-1365 см$^{-1}$, 1220-1170 см$^{-1}$ относятся к колебаниям гваяцильного кольца, 1315-1312 см$^{-1}$ - сирингильного кольца. В соответствии с данными некоторых исследователей [Орлов Д.С.,1990], полоса в области 870см$^{-1}$ свидетельствует о преобладании в составе необработанного субстрата сирингилпропановых структурных единиц.

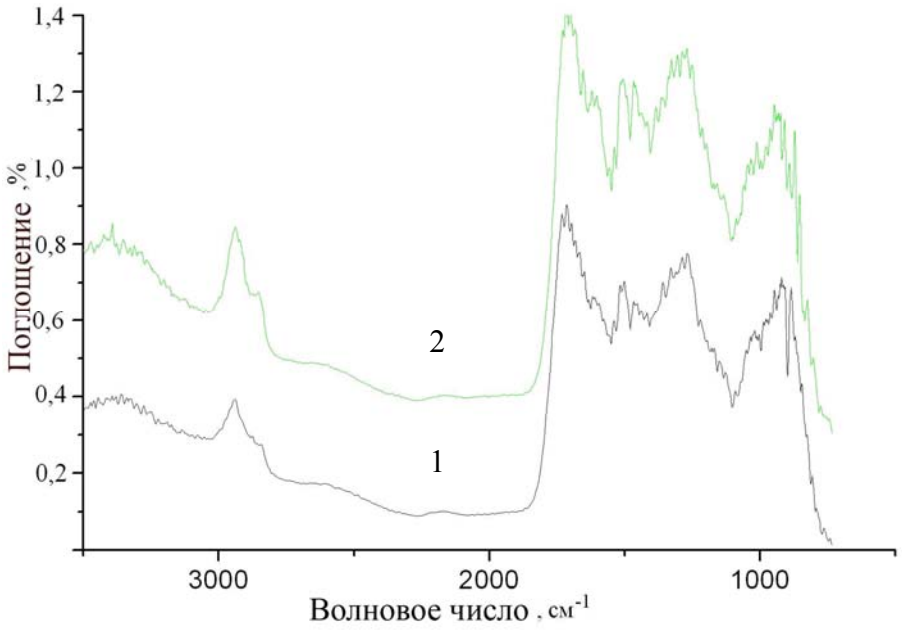

Рисунок 3 –ИК-спектры сульфолигнина субстрата, извлеченного до-1 и после ферментации -2

Таким образом, микроорганизмы, воздействуя на субстрат, модифицируют качественно и количественно его состав, а в молекуле лигнина происходят изменения в содержании гидроксильных, метоксильных, метильных и карбоксильных групп. По уменьшению метоксильных групп можно судить, что процесс гумификации лигнина проходит через стадию деметоксилирования.

Исследование влияния ультразвукового воздействия на лигноцеллюлозный материал.

Биодеградация лигноцеллюлозных материалов в значительной степени зависит от их реакционной способности. Для ее увеличения предложено много способов предобработки, которые влияют на выход целевого продукта (например: белка, гуминовых кислот). В связи с тем, что в шелухе семечек имеется низкое содержание сахаров, необходимо, чтобы в процессе предобработки этого субстрата произошла деградация лигниновой сетки.

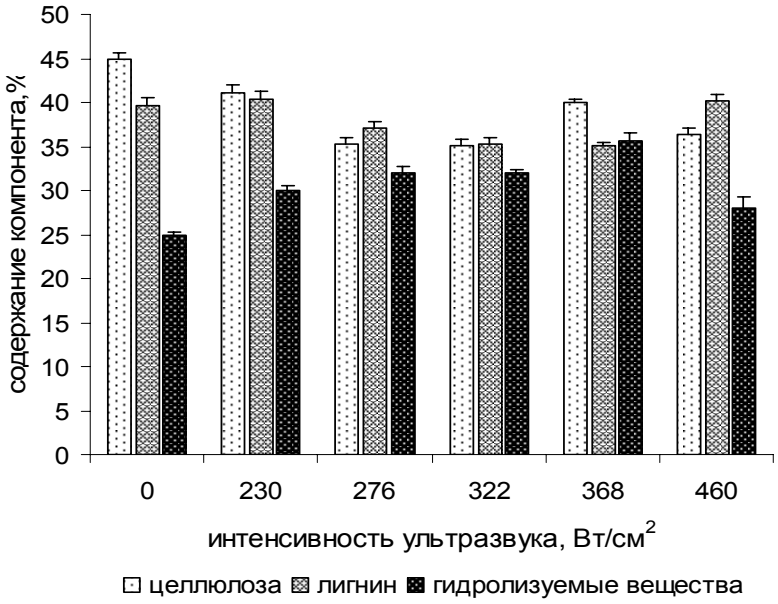

Рисунок 4 - Зависимость остаточного содержания компонентов растительного материала от интенсивности ультразвука

Предобработка осуществлялась с использованием ультразвукового генератора IKASONIC U 50 control с рабочей частотой 30 кГц. Данный прибор выбран в связи с тем, что большинство промышленно производимого оборудования работает в диапазоне 20-50кГц.

Ультразвуковое воздействие относится к физическим способам предобработки питательной среды. В качестве параметров, позволяющих считать условия процесса оптимальными, были выбраны: содержание лигнина, целлюлозы и гидролизуемых веществ. В качестве критериев оценки условий оптимизации роста на предобработанном лигноцеллюлозном субстрате были выбраны интенсивность и продолжительность ультразвукового воздействия.

Проведенные исследования показали, что при изменении интенсивности обработки минимальная концентрация лигнина и целлюлозы составили 35,1% и 37,4% соответственно. Повысился выход гидролизуемых полисахаридов до 35,7 % в образцах в пересчете на а.с.в. (рисунок 4).

Как это видно из рисунка 5, в течение 15 минут происходит деструкция лигнина, после чего содержание его постепенно увеличивается. Это вероятно связано с инициирующим действием ультразвука на полимеризацию лигнина. При этом инициирующими частицами могут быть образующиеся при кавитации радикалы $H^{\bullet}$ или $OH^{\bullet}$ (порознь или вместе), либо радикалы, образующиеся при деструкции полимера.

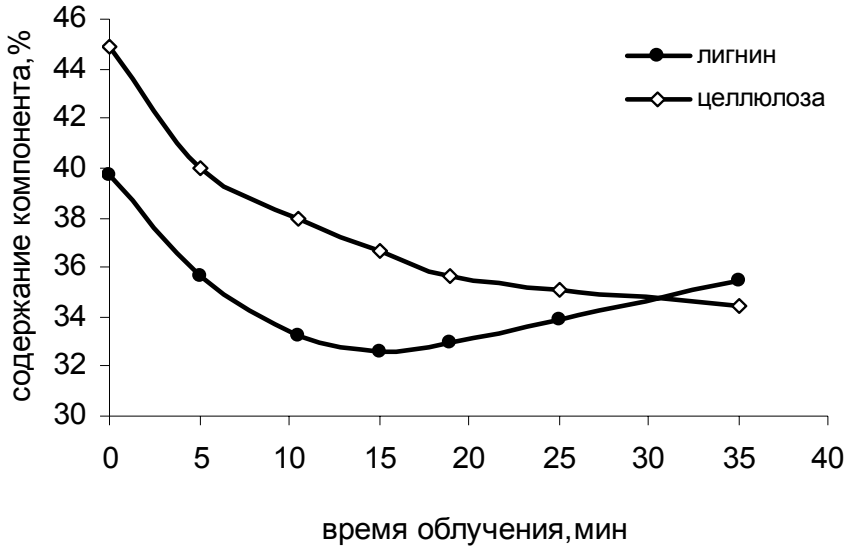

Рисунок 5 - Влияние ультразвука интенсивностью 368 Вт/см^2 на содержание основных компонентов в растительном материале

Одновременно происходит и уменьшение выхода твердого лигноцеллюлозного остатка до 92,6%.

Полученные результаты позволяют считать оптимальными условиями предварительной обработки субстрата, те при которых достигается наилучшая деструкция растительного материала (интенсивность 368 Вт/см^2 и продолжительность не более 15 мин.).

Биоконверсия растительного материала.

Анализ данных по изменению содержания основных компонентов субстрата (шелухи семечек) до и после ферментации позволяет рассчитать потери целлюлозы и лигнина. Наиболее интенсивная утилизация целлюлозы 9,8% микроорганизмами имела место в течение первых 3-х дней (рисунок 6). Обращает на себя внимание и то, что ферментативный гидролиз целлюлозы прекратился или замедлился в те сроки, когда соотношение целлюлоза - лигнин в субстрате приближалась к 1. Скорее всего, разрушению подлежит периферическая часть целлюлозы, которая доступна действию микробиологических целлюлаз. Остальная часть, по всей видимости, экранируется молекулами лигнина, вследствие чего ее гидролиз оказывается затруднен. Максимальное потребление целлюлозы при росте на 21 сутки составило 26,5% на модифицированном (обработанном ультразвуком) субстрате. Доступность целлюлозы в данном субстрате можно объяснить сильным разрушением связей между лигнином и целлюлозой.

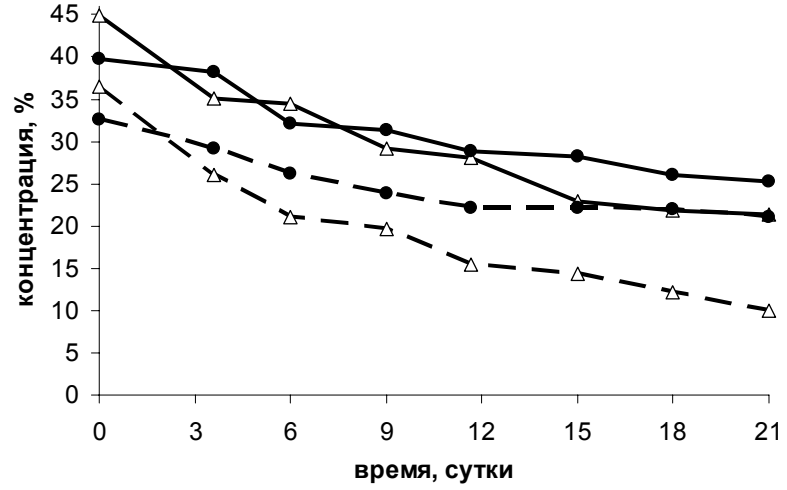

Рисунок 6 - Изменение содержания лигнина (●), целлюлозы (Δ) при культивировании микроорганизмов на необработанном (-) и обработанном (---) ультразвуком субстрате

Процесс ферментативного гидролиза целлюлозы осложняется наличием в нативной древесине лигнина, который заполняет пространство между структурами, состоящими из целлюлозы и гемицеллюлозы. К микробной деградации, как показывают результаты экспериментов, лигнин более устойчив, чем целлюлоза. Он механически скрепляет и одновременно защищает целлюлозу от прямых внешних воздействий. В связи с этим были проведены исследования по измерению объема пор лигнина в процессе биоконверсии. Полученные экспериментальные данные характерны для микропористых материалов со слоистой структурой.

В процессе биоконверсии растительного сырья под действием ферментов происходит разрушение лигнинуглеводного комплекса. В результате этого при выделении лигнина из ферментированного субстрата вымывается кристаллическая составляющая гемицеллюлозы, что приводит к возрастанию объема пор на 10-30%. Возрастает также и общая площадь поверхности сульфолигнина с 3,393 $м^2/г$ до 5,142 $м^2/г$, наблюдается увеличение количества микропор с 9,5 до 11% и макропор с 14% до 16%. Таким образом, во время ферментации субстрата происходит изменение лигнинуглеводного матрикса. Под действием ферментов увеличивается размер пор и лигнин становится доступным для деметоксилирования и разрушения сетчатой структуры.

Известно также, что биосинтез лигнолитических ферментов микроорганизмов происходит на стадии вторичного метаболизма в ответ на недостаток углерода, азота или серы в питательной среде. По мере исчерпания доступной целлюлозы усиливается биосинтез лигнолитических ферментов и деградация лигнина, что в свою очередь приводит к увеличению доступности целлюлозы. Как следствие, происходит чередование целлюлозо- и лигнолитической активностей. Можно полагать, что деструкция отдельных компонентов растительного материала определяется физико-химическими свойствами субстрата: соотношением основных компонентов, содержанием смолистых веществ, степенью кристалличности.

Из полученных результатов следует, что использованные в работе микроорганизмы в равной степени разрушали как лигнин, так и целлюлозу, вызывая при этом значительную минерализацию растительного сырья. Минеральные вещества необходимы микроорганизмам для роста, построения ферментативных систем. Присутствие или отсутствие отдельных микроэлементов может оказать стимулирующее действие на накопление в среде ферментов. Стимулирующее действие на синтез целлюлаз оказывают ионы железа и алюминия, способные формировать положительно заряженные частицы в водных растворах. Синтез лигнинразрушающих ферментов во многом определяется содержанием в среде Mn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} и другими. Некоторые из минеральных элементов входят в состав ферментов, повышают их устойчивость, активируют и стабилизируют ферменты. В результате биоконверсии содержание Cu снизилось с 0,05 до 0,033 % от а.с.в., Fe – с 0,01 до 0,005 % от а.с.в., что свидетельствует о вероятности использования этих элементов в метаболизме микроорганизмов.

Все вышеуказанное свидетельствует о том, что предварительная обработка субстрата ультразвуком изменяет скорость и глубину разложения сырья в процессе культивирования и может быть применена для ускорения биоконверсии лигноцеллюлозных субстратов микроорганизмами.

Выделение и исследование свойств гуминовых кислот.

Известно, что продукты деградации как лигнина, так и целлюлозы могут рассматриваться как предшественники гуминовых веществ, поэтому исследовалось образование гуминоподобных веществ при разрушении микроорганизмами лигноуглеводного комплекса.

При выращивании микроорганизмов на лигноцеллюлозных субстратах образовывались темноокрашенные высокомолекулярные соединения предположительно гуминовой природы. По окончании процесса из культуральной жидкости выделяли фракцию гуминовых кислот. Для этой цели исходный раствор подкисляли до pH 2,0 и выпавший осадок отделяли. Описанная процедура аналогична традиционной схеме выделения гуминовых кислот и основана на их классификационном признаке – нерастворимость при pH < 2,0. Выделенные препараты гуминовые кислоты характеризовались по следующим признакам: растворимость в щелочах и кислотах, а также спектральным характеристикам.

При проведении анализов гуминовые кислоты полностью растворялись в слабых щелочных растворах (0,1М) при pH 12,0, а также осаждались из раствора при его подкислении до pH 2,0. При этом выпадали в виде осадков бурого цвета. Надосадочная жидкость имела светло-желтую окраску.

Максимальное образование гуминовых веществ наблюдали при культивировании на предобработанном ультразвуке субстрате 1,3г. Меньший выход гуминовых кислот в случае немодифицированного субстрата, вероятно, связан с невысокой способностью микроорганизмов деметоксилировать и конденсировать лигнин по сравнению с другим. Следует отметить также, что pH среды культивирования на протяжении всего роста не превышал 5,5, что исключает возможность автоокисления пропилфенольных метаболитов, образующихся при деградации лигнина. Кроме того, это значение pH оптимально для многих лигнолитических ферментов.

Изучаемые микроорганизмы способны ассимилировать различные углеродсодержащие соединения и развиваться на средах с различными формами азота (органическими и неорганическими). Гуминовые кислоты не являются для микроорганизмов лучшими источниками углерода и азота. Однако, когда в среде нет других доступных источников, кроме гуминовой кислоты, микроорганизмы окисляют ее [Туев Н.А., 1982]. Вероятнее всего с этим и связано снижение концентрации гуминовых кислот на 18-е сутки.

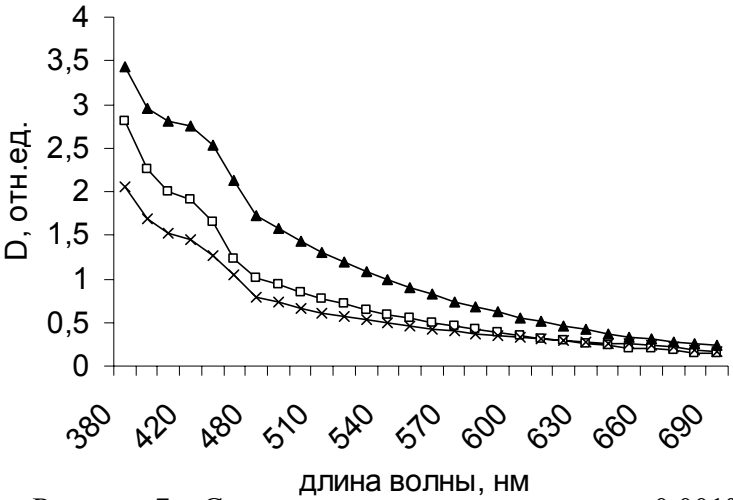

Рисунок 7 – Спектры поглощения щелочных 0,001% растворов гуминовых кислот
▲-из торфа месторождения Васильевский мох,
□ – из торфа Лихославльского месторождения,
∗- синтезируемые в условиях in vitro.

Спектры щелочных растворов изучаемых гуминовых кислот в видимой области представляют собой ниспадающие кривые без характерных полос поглощения (рисунок 7). Значительное поглощение в УФ-области, ослабевающее с увеличением длины волны, и небольшое

«плечо» на отрезке 400-440 нм характерно для всех исследуемых препаратов. На основании полученных экспериментальных данных коэффициенты цветности гуминовых кислот торфа месторождений Лихославльского, Васильевского мха и синтезированных микроорганизмами соответственно составили 6,3, 6,9 и 4,5. Аналогичный показатель для гуминовых кислот почв по данным некоторых исследователей [Орлов Д.С., 1985] варьирует в диапазоне 3,18-7,5. Наиболее интенсивное поглощение в видимой области синтезированных гуминовых кислот свидетельствует о высокой степени конденсированности ароматического ядра и о сравнительно меньшем участии периферийных цепей. Спектры синтезированных гуминовых кислот более близки к спектрам кислот из торфа Лихославльского месторождения, поэтому для дальнейшей идентификации были выбраны они.

Общий вид полученных ИК-фурье-спектров гуминовых кислот характерен для спектров приводимых в литературе [Орлов Д.С., 1985]. Ароматическая природа гуминовых кислот выявляется благодаря максимуму поглощения, вызванному валентными колебаниями сопряженных углеродных связей при 1600 $см^{-1}$. Смещение этой полосы к коротковолновой области 1660-1650 $см^{-1}$ объясняется наличием хинонов. Это смещение по мнению многих авторов [Орлов Д.С.,1985; Кротова И.В., 1987] характерно для многоядерных соединений. Полоса в области около 1710 $см^{-1}$ относится к колебаниям связей -С=О (в карбоксильных и карбонильных группах), полоса в области 1250 $см^{-1}$ - к валентным колебаниям С-О фенольных и карбоксильных групп, полосы в области 1050-1150 $см^{-1}$ соответствуют колебаниям связи С-О спиртовых групп. Наличие этих полос указывает на присутствие различных кислородсодержащих функциональных групп в гуминовых кислотах, а также о присутствии лигнинной составляющей (атом углерода в α-О-4- и α-О-4- связях). Наименьшая интенсивность поглощения в области 1710 $см^{-1}$ указывает на более высокую степень трансформации исходных веществ, чем у полученных кислот в условиях in vitro при малом доступе кислорода в процессе гумификации субстрата. Пики в области 1130 $см^{-1}$, 1030$см^{-1}$, плечо в 860 см-1 свидетельствуют о наличии в структуре изучаемых препаратов гваяцилсирингильного кольца, а пики в спектре гуминовых кислот торфа в области 1454 $см^{-1}$, 1035 $см^{-1}$, 855 $см^{-1}$ о присутствии гваяцильного кольца. Это подтверждает то, что гуминовые кислоты торфа образуются в основном из лигнинов, присутствующих в древесных породах и папоротниках, а синтезированные in vitro из лигнинов - травянистых растений.

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что по поведению в щелочах и кислотах, спектрофотометрическим и спектроскопическим характеристикам гуминовые кислоты, синтезируемые выделенными микроорганизмами при росте на растительном субстрате, близки классу гуминовых кислот торфа. Кроме того, синтез гуминовых кислот был осуществлен монокультурой, а не в результате жизнедеятельности группы микроорганизмов, как это происходит в природе. Достаточно высокий уровень деструкции, обнаружение в ИК-фурье-спектрах основных сирингил- и гваяцилпропановых единиц лигнина, подтверждает его ведущую роль в формировании гуминовых веществ. Образование высокомолекулярных гуминовых кислот, вероятно, связано с активной деградацией лигниноуглеводного комплекса и сополимеризацией высвободившихся пропилфенольных радикалов и аминокислот в высокомолекулярные соединения. Можно предположить, что таким способом культура пытается защитить себя от негативного воздействия многочисленных низкомолекулярных пропилфенольных метаболитов.

Исследование биологической активности гуминовых кислот.

С точки зрения оценки оптимальных параметров воздействия регуляторов роста на агрокультуру, важнейшим этапом представляется процесс прорастания семян, который определяется суммой их посевных качеств. Следовательно, большинство изменений происходящих в семени после их предпосевной обработки, должно интегрироваться и фокусироваться в процесс прорастания [Скорбина Е.А., 2006]. Это обуславливает целесообразность разработки эффективных регуляторов роста, с последующим применением их в технологиях возделывания сельскохозяйственных культур.

Целью данного исследования являлось изучение влияния препаратов гуминовых кислот торфа и синтезированных в условиях in vitro на ростостимулирующую активность семян растений. В качестве объекта исследований были взяты семена льна. Лен – ценная сельскохозяйственная культура, дающая одновременно два вида продукции: волокно и масло. В данный момент это - возрождающаяся культура, поэтому требует большого внимания при внедрении ее в производство.

Экспериментальные работы проводили на семенах льна-долгунца сортов Новоторжский и Ленок. Обработку посевного материала осуществляли гуматами калия низинного торфа Лихославльского и Васильевского мха происхождения и гуматами, выделенных из культуральной жидкости Bacillus subtilis.

В ходе многочисленных лабораторных опытов с различными по происхождению гуминовыми кислотами и разнообразными сортами льна было выяснено, что гуминовые вещества обладают стимулирующим и адаптогенным действием.

В экспериментах определяли диапазон концентраций, оказывающих стимулирующее действие на рост растений, а также изучали влияние концентраций гуминовых кислот на продуктивность растений.

Исследования показали, что концентрация гуминовых кислот 0,18 мг/л не дает существенных результатов для сорта льна Новоторжский. Показатели соответствовали уровню контроля. Повышение концентрации кислот улучшали основные показатели.

Установлено, что стимулирующий эффект гуминовых кислот, синтезированных в условиях in vitro (при концентрации 0,86 г/л) выше, чем эффект от гуминовых веществ содержащихся в торфе. Стимулирующей концентрацией для этих кислот стал предел от 0,86 до 1,58 мг/л для сорта Ленок, 1,58-2,71 мг/л – для сорта Новоторжский. У гуминовых кислот, полученных из торфа Васильевского месторождения, стимулирующий эффект был наиболее активно проявлен при концентрациях 0,45 г/л. При обработке семян льна гуминовыми кислотами, синтезированных культурой Bacillus subtilis (концентрация 0,86 г/л) показатели превышали контроль для сорта Ленок по всхожести на 9,4%, по биомассе на 40% , для сорта Новоторжский 37,7% и 3,2% соответственно. При использовании гуминовых кислот, выделенных из торфа месторождения Васильевский мох, с концентрацией 0,45 г/л всхожесть семян для сорта Ленок увеличилась на 1,2%, для сорта Новоторжский - 0,3%, а количество биомассы возрастало на 39,5% и 33,8 % для каждого сорта соответственно. Высокие дозы гуминовых кислот (от 6,3 мг/л) угнетают рост надземной и корневой систем проростков льна.

Дружность всходов при использовании гуминовых кислот, полученных микробиологическим способом, составила для сорта Ленок- 60-80%,а в контроле 28%.

На основании теоретических обоснований [Нургалиева Р.В., 2007] и полученных результатов можно предположить, что наличие в удобрениях больших количеств субстанций хиноидной природы (гуминовых кислот из торфа) оказывает стимулирующее влияние на растения в меньших концентрациях. Способность гуминовых субстанций к мелкодисперсному состоянию в водных растворах приводит к повышенной способности их проникновения в клетки растений.

Проблема устойчивости растений в стрессовых условиях находится под пристальным вниманием исследователей всего мира и относится к числу важнейших проблем растениеводства, поскольку знание цепи реакций, развиваемых в растениях в ответ на экстремальные условия внешней среды, может реально способствовать не только развитию селекции семян на устойчивость к этим условиям, но позволит целенаправленно управлять механизмами адаптации растений и повышению устойчивости к ним и продуктивности растений [Нургалиева Р.В,2007].

Поэтому далее было проведено изучение влияния предпосевной обработки гуминовых кислот на устойчивость семян льна к стрессовым воздействиям. Проращивание семян проводили при температуре 4^0С, в темноте.

В целом, сопоставляя данные анализа биологической эффективности и степени накопления биомассы растениями, предобработка гуминовыми кислотами оказала благоприятное действие на семена, что лежит в основе реализации их защитного эффекта на растения в отношении стрессовых факторов. Это связано с уменьшением времени прорастания и увеличением дружности всходов.

В опытах с семенами льна наибольшую биологическую активность проявляли гуминовые кислоты, синтезированные Bacillus subtilis и выделенные из торфа Лихославльского месторождения. Существенное влияние вышеуказанные препараты оказали на всхожесть, по сравнению с контролем и гуминовые кислоты из торфа месторождения Васильевский мох. Они ускорили прорастание семян на сутки, увеличили биомассу ростков сорта Новоторжский на 85% и 64,7% , сорта Ленок – на 27% и 38,8% соответственно. При этом оптимальная стимулирующая концентрация гуминовых кислот сдвинулась в сторону увеличения концентрации – 1,58 г/л – для большинства опытов. Концентрация 6,33 г/л и в стрессовых условиях оказала ингибирующее действие на семена льна, экспериментальные значения биомассы оказались ниже на 20-47% контроля, что говорит об отрицательном влиянии на растение.

Таким образом, препараты гуминовых кислот характеризуются ростстимулирующей активностью и способностью повышать устойчивость, что определяет их большую практическую значимость для увеличения продуктивности различных сельскохозяйственных культур [Скорбина Е.А., 2006]. В пользу этого свидетельствуют также результаты наших опытов по влиянию гуминовых веществ при предпосевной обработки на семяна льна.

Разработка технологии получения комплексных препаратов гуминовой природы.

Основными этапами получения биосредств гуминовой природы являются: получение посевного материала; приемка сырья; ультразвуковая обработка субстрата; основная ферментация на лигноцеллюлозном материале; отделение жидкой фазы от твердой; стерилизация твердой фазы и частичный возврат на основную ферментацию; концентрирование жидкой фазы; стандартизация; фасовка.

Разработанная технология позволит получить биологически активный препарат для нужд сельского хозяйства. Основываясь на данных модельных экспериментов по

изучения влияния гуминовых кислот на семена льна, следует вывод об их благоприятном использовании в предпосевной обработке.

Выводы:

1. Проведен системный скрининг микроорганизмов, способных к биоконверсии растительных отходов, содержащих лигноцеллюлозу.
2. Установлено, что некоторые из них осуществляют трансформацию лигноцеллюлозы в гуминовые вещества.
3. В результате скрининга выделен активный штамм бактерий, осуществляющий деструкцию растительного субстрата.
4. Изучены морфолого-биохимические свойства выделенного бактериального штамма. На основании анализа 16S РНК этот штамм идентифицирован как Bacillus subtilis и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов РАН, как Bacillus subtilis PrEA под номером В-10040.
5. Определены оптимальные параметры роста Bacillus subtilis PrEA на субстратах, содержащих лигноцеллюлозу.
6. Разработан способ предобработки растительного сырья, повышающий эффективность синтеза гуминовых кислот в условиях in vitro. Способ основан на ультразвуковой деструкции растительного материала, в результате чего увеличивается его биодоступность. Подобраны оптимальные условия ультразвуковой обработки лигноцеллюлозного материала в водной среде: интенсивность звуковых колебаний 368 Вт/см^2, продолжительность - 15минут. При выбранных параметрах деструкция целлюлозы составляет 6,4 % от а.с.в., а лигнина до 12,8% от а.с.в.
7. При проведении ферментации на предобработанном ультразвуком сырье возрастает количество гуминовых веществ с 0,6 до 1,3 г/л.
8. На основании сравнительных анализов с использованием физико-химических методов УФ-, ИК-Фурье спектроскопии показано, что по функциональному составу синтезируемые гуминовые вещества близки к гуминовым кислотам низинного торфа.
9. Выявлено, что гуминовые вещества, синтезированные в условиях in vitro, являются стимуляторами роста семян льна при нормальных условиях (20 ± 2^0C) и в стрессовых условиях ($4^0 \pm 1$C), что отражается на увеличении массы и дружности всходов.
10. Разработана и представлена блок-схема получения гуминовых веществ в условиях in vitro микробиологическим путем.

Практические рекомендации.

Полученные данные могут служить основанием для рекомендации по использованию предварительной ультразвуковой обработки лигноцеллюлозного субстрата для интенсификации процессов биоконверсии и синтеза гуминовых кислот на производстве.

В технологии обработки семян льна рекомендуем использовать препарат гуминовой природы, полученный микробиологическим способом в условиях *in vitro,* концентрацией 1,58 г/л, что позволяет увеличить биомассу проростков в стрессовых условиях у сорта Новоторжский на 33%, у Ленок – на 64%.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Прутенская Е.А. Технология получения кормовых добавок и удобрений /Е.А.Прутенская, Э.А.Тактаров, Э.М.Сульман// IX региональные каргинские чтения, областная научно-техническая конференция молодых учёных «Химия и химическая технология», тезисы докладов.- Тверь 2002.- стр. 37.
2. Prutenskaya E.A. Timber industry waste processing by means of bioconversion/ E.A.Prutenskaya, E.M.Sulman//15th Int. Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2002, 25-29 August 2002, Praha, Czech Republic. Vol. 5, K1.7-P. 98.
3. Прутенская Е.А. Выделение и идентификация микроорганизмов-природных деструкторов с целью дальнейшего их использования в качестве продуцентов целлюлозолитических ферментов/ Е.А. Прутенская, А.В.Степанов// X Региональные Каргинские чтения. Областная научно-техническая конференция молодых ученых "Химия, технология и экология".-Тверь, 2003.- с. 48.
4. Прутенская Е.А. Изучение ферментативной активности грибов P. Aspergillius при культивировании на растительных отходах/ Е.А.Прутенская, А.В.Степанов, Э.М.Сульман// II Московский международный Конгресс: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы конгресса.2003.-Часть 2.- стр. 38.
5. Prutenskaya E.A. Study on biodestruction of the wood wastes lignin as an initial stage of the humus-like substances production/ E.A.Prutenskaya, E.M.Sulman//3-d Russia-China Seminar on Catalysis, Novosibirsk, April. 17-19, 2004. p. 40-41.
6. Свидетельство на полезную модель №21322. Система измерения параметров и автоматизации построения кинетических моделей процессов биоконверсии/ Е.А.Прутенская [и др]// Приоритет 31.07.2001. Опубл.: №1, 10.01.2002.
7. Прутенская Е.А.Ультразвуковая модификация – основная стадия предобработки растительного сырья / Е.А.Прутенская [и др.]// Материалы Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения- 2007», 26-30 ноября.- Саратов,2007.-с.311-313.
8. Прутенская Е.А. Влияние ультразвуковой предобработки на состав лигноцеллюлозного материала / Е.А.Прутенская [и др.] // Изв. вузов. Химия и хим. технология. – 2008. - Т.51, вып. 6. - С.97-98.
9. Прутенская Е.А. Исследование биологических свойств гуминовых кислот различного происхождения/ Е.А.Прутенская, Быстрова Г.И.// Материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».-Москва 2008.- с.11-12.