

К ВОПРОСУ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ РОССИЙСКОГО МИСКАНТУСА

¹С.Е. Пельтек, ¹А.В. Брянская, ¹Т.Н. Горячкова, ¹В.К. Шумный, ¹Н.А. Колчанов, ²В.В. Будаева, ²Р.Ю. Митрофанов, ²В.Н. Золотухин, ²Е.А. Скиба, ²Г.В. Сакович

¹Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

²Учреждение Российской академии наук Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения РАН

В результате проведенных исследований был осуществлен скрининг микробных комплексов, выделенных из природных местообитаний с экстремальными условиями, на наличие способности гидролизовать целлюлозу. Получены активные накопительные культуры, устойчиво работающие в течение продолжительного времени и способные разлагать широкий спектр целлюлозосодержащих субстратов. Эти микробные комплексы пригодны для выделения чистых культур целлюлозолитических микроорганизмов. Показано, что на разных источниках целлюлозы формируются разные комплексы микроорганизмов. В статье приведены результаты исследования ферментативного гидролиза с использованием ферментного комплекса «Целлолюкс-А» мискантуса и продуктов его химической переработки.

Ключевые слова: микроорганизмы, целлюлозолитики, соленые озера, накопительные культуры, ферментативный гидролиз, редуцирующие вещества, мискантус, «Целлолюкс А».

ВВЕДЕНИЕ

Селекция на уровне комплексов целлюлозолитиков, выделенных из природных местообитаний, позволяет целенаправленно отбирать в селективных системах с заданными параметрами стабильные и высоко активные сообщества целлюлозолитиков, которые впоследствии могут быть использованы для выделения отдельных бактериальных культур, активно гидролизующих целлюлозу до конечных продуктов; идентификации, изучения активности и оценки технологической пригодности этих культур; получения базовых культур для компьютерных и геноинженерных исследований с последующим конструированием из них новых штаммов продуцентов; выделения ферментов целлюлазного комплекса и ряда других работ.

Поиск целлюлозолитических микроорганизмов в природных местообитаниях с экстремальными условиями перспективен, поскольку может способствовать нахождению организмов, ферментные комплексы которых будут ценны способностью осуществлять гидролиз целлюлозы в условиях высоких температур, солености или щелочности.

Целью работы являлось выделение микробного консорциума с высокой целлюлозолитической способностью, устойчиво работающего в течение

продолжительного времени и способного гидролизовать широкий спектр целлюлозосодержащих субстратов, в том числе, полученных из мискантуса.

Разновидности мискантуса – Мискантус китайский (*Miscanthus sinensis*) и Мискантус гигантский (*Miscanthus giganteus*) – позиционируют в качестве перспективного целлюлозосодержащего сырья как для производства целлюлозы [5] и продуктов её химической модификации, так и для биотехнологического получения растворимых углеводов и биоспиртов [6].

Целью работы являлось также исследование ферментативного гидролиза биомассы мискантуса и продуктов её химической обработки с использованием ферментного препарата «Целлолюкс-А».

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

На первом этапе выделялись накопительные культуры микроорганизмов, обладающие целлюлозолитической активностью.

Для проведения данных работ были отобраны природные пробы воды и донных осадков озер Баганского и Карасукского районов Новосибирской области (летний период 2008-2009 гг.).

Культивирование целлюлозолитических микроорганизмов проводили на селективных средах Гетчинсона, Имшенецкого и др., куда в

качестве источника целлюлозы вносили фильтровальную бумагу [1, 2]. Модификацией метода являлось дополнительное внесение в часть сред NaCl в концентрации 100 г/л для изучения целлюлозолитической способности микроорганизмов в условиях, близких к природным. Всего было обработано более 350 различных вариантов. Инкубация проводилась при температуре 25°C. Результаты отмечали не ранее чем через 2 недели.

Морфотипы бактерий, размеры и подвижность изучали микроскопированием образцов с помощью световых и люминесцентных микроскопов фирмы «Carl Zeiss» (Германия) в ЦКП «Микроскопии», Новосибирск.

На втором этапе консорциумы с высокой целлюлозолитической активностью были опробованы на способность разлагать следующие субстраты: беленую и микрокристаллическую целлюлозу, лигноцеллюлозу, молотую и цельную биомассу мискантуса.

На третьем этапе исследовался ферментативный гидролиз биомассы мискантуса и продуктов его химической переработки с использованием ферментного комплекса «Целлолюкс-А».

Использовался Мискантус китайский (*Miscanthus sinensis* Anders), урожай 2008 года, выращенный на плантациях ИЦиГ СО РАН [7] в Новосибирской области (содержание холоцеллюлозы 65 %).

Ферментацию исходной биомассы мискантуса и трех продуктов его химической переработки (беленой целлюлозы, полученной щелочной делигнификацией при атмосферном давлении и отбелкой; лигноцеллюлозного материала; волокнистого продукта, полученного щелочной делигнификацией при атмосферном давлении с последующей обработкой азотной кислотой) [8] проводили в колбах емкостью 1000 мл на перемешивающей платформе марки «ПЭ-6410М» с частотой колебания 50 мин⁻¹ при температуре 50 °C в течение 72 ч. В каждую колбу поместили навеску исследуемого продукта, ацетатный буфер (рН = 4,7), в котором был растворен ферментный комплекс «Целлолюкс-А» (производство: г. Бердск; состав комплекса по паспорту: целлюлаза, β-глюканаза, ксиланаза, глюкоамилаза). Через определенные промежутки времени отбирали пробу объемом 50 мл и в фильтрате определяли концентрацию моносахаридов в пересчете на глюкозу (спектрофотометрическим методом с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты) [9] и

концентрацию редуцирующих веществ после инверсии (по методу Бертрона) [10]. Выходы глюкозы и редуцирующих веществ (РВ) рассчитаны на навеску субстрата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг микробных сообществ, выделенных из соленых озер Новосибирской области, на наличие целлюлозолитической активности

В пробах воды, отобранных в 2008 году, на среде с органическими добавками разрушение целлюлозы шло медленнее, чем на минеральной среде 1, где единственным источником органического вещества являлась целлюлоза в виде фильтровальной бумаги (табл. 1), что свидетельствует о том, что организмов, сочетающих целлюлозолитические и протеолитические свойства, в исследуемых субстратах меньше, чем специфично целлюлозолитических.

Для восьми из одиннадцати исследованных микробных сообществ на среде 1 была отмечена целлюлозолитическая активность. Кроме того, в этом же эксперименте показано, что значительная минерализация среды (100 г/л) не приостанавливает целлюлозолитическую активность. Очевидно, данные консорциумы хорошо адаптированы к деструкции целлюлозы как в условиях, близких к природным, так и в резко опресненных. Консорциум, выделенный из озера 48, в нашем эксперименте во всех случаях проявил целлюлозолитическую активность (в период исследований в этом озере интенсивно и обильно развивались микробные сообщества, состоявшие из водорослей и цианобактерий, которые в экстремальных системах являются субстратом для целлюлозолизаторов). Накопительные культуры озер 41, 42, 47 и 50 проявляли целлюлозолитическую активность в трех экспериментах из четырех. Наименьшая активность отмечена в культурах из озер 46 и 45. При минерализации 100 г/л исследуемая активность отмечена для восьми озер, при минерализации 1 г/л - для десяти. Очевидно, что в условиях низкой минерализации целлюлозолитическая активность сообществ выше.

Таблица 1

Разрушение фильтровальной бумаги
целлюлозолитическими комплексами
микроорганизмов исследованных озер

Пита- тель- ные сре- ды	Озера										
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
2008 год											
1.1 (в)	+	++	+++	-	-	++	++	+	н.п.	++	++
2.1 (в)	-	++	-	++	-	-	-	+	++	++	++
1.100 (в)	+	+	+	+++	+	-	+	+++	-	+++	-
2.100 (в)	++	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
2009 год											
2.1 (в)	+	++	-	-	-	-	-	-	н.п.	н.п.	-
1.100 (в)	+	-	-	+	+	-	-	+	н.п.	н.п.	-
2.100 (в)	-	-	-	-	-	-	-	-	н.п.	н.п.	-
2.1 (д.о.)	-	-	-	+	+	-	-	++	н.п.	н.п.	++
1.1 (д.о.)	-	-	++	-	+	+	+	+	н.п.	н.п.	++

Примечания:

1) 41- оз. «Горькое»; 42- оз. «Горькое»; 43- «пресный» пруд; 44- оз. «Долгое»; 45- оз. «Круглое»; 46- оз. «Разбойное»; 47- оз. «Хорошее»; 48- оз. «Соленое»; 49- оз. «Горькое»; 50- оз. «Соленое»;

2) 1.1 – среда без органических добавок с содержанием NaCl 1 г/л; 1.100 – среда без органических добавок с содержанием NaCl 100 г/л; 2.1. – среда с органическими соединениями с содержанием NaCl 1 г/л;

2.100 – среда с органическими соединениями с содержанием NaCl 100 г/л; (в) – водная проба; (д.о.) – донные осадки; н.п – анализ не проведен;

3) - отсутствие признаков разрушения фильтровальной бумаги; + слабые признаки разрушения; ++ интенсивное разрушение фильтровальной бумаги; +++ полное разрушение фильтровальной бумаги.

Интересно, что культура высокоминерализованного озера 51 не проявляет целлюлозолитической активности при солености 100 г/л, а сообщество низкоминерализованного озера 43 активно и при 100 г/л NaCl. В целом из исследуемых сообществ наиболее активно было сообщество озера 41, куда практически постоянно происходит подток органического вещества, поскольку на его берегу находится турбаза и населенный пункт.

В 2009 году максимальной

целлюлозолитической активностью обладали культуры, полученные из проб воды озер 41 и 42. В остальных пробах целлюлозолитическая активность была минимальной. Отмечено, что целлюлозолитическая активность накопительных культур, выделенных из илов озера 51, максимальна при минимальной активности микроорганизмов, обитающих в воде данного озера. В целом, целлюлозолитическая активность в донных осадках была выше, чем в воде, поскольку именно в донных отложениях происходит основная часть деструкции органического вещества, поступающего как с водосборной площади озер, так и с фотической зоны, где органическое вещество производится.



Рисунок 1. Морфотипы целлюлозолитических бактерий, непосредственно ассоциированных с волокнами целлюлозы

Проведенные микроскопические исследования позволили выявить ряд характерных морфотипов бактерий, участвующих в процессе разложения целлюлозы (рисунки 1- 3).



Рисунок 2. Расположение бактерий на волокне целлюлозы

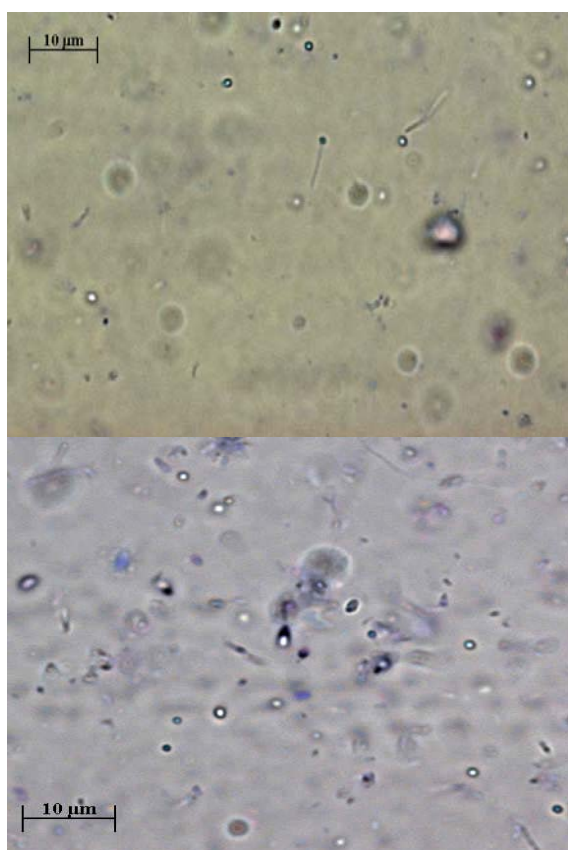


Рисунок 3. Морфотипы целлюлозолитических бактерий в селективной среде.

В каждой из изучаемых накопительных культур на целлюлозе присутствовало несколько морфологически различаемых форм, ассоциированных с волокнами целлюлозы. Чаще всего встречались тонкие прямые споровые палочки и короткие палочки, часть которых была со спорами. По большинству признаков эти организмы были отнесены к роду *Clostridium* [3].

В накопительных культурах на

целлюлозе неизбежен шлейф сопутствующих организмов, которые могут оказывать либо стимулирующее, либо подавляющее действие на процесс разложения [4]. Поэтому в ряде случаев наблюдалось совместное развитие целлюлозолитических и фотосинтетических организмов (рисунок 4).



Рисунок 4. Развитие фотосинтезирующих организмов (зеленых протококковых водорослей и цианобактерий) на среде для целлюлозолитиков

В результате проведенных исследований был осуществлен скрининг микробных комплексов целлюлозолитиков, выделенных из природных местообитаний с экстремальными условиями. Следует отметить, что ярко выраженной целлюлозолитической активностью обладали микробные комплексы, выделенные из озер, в которых было отмечено развитие планктонной флоры либо прибрежной растительности, а комплексы озер, где в период отбора проб не было отмечено развития какой-либо фитомассы, выраженной целлюлозолитической активностью не обладали. Этот факт крайне интересен как яркая демонстрация эволюционной адаптации микробиоты исследованных озер к доминирующим источникам субстратов и энергии.

Апробация накопительных культур на различных целлюлозосодержащих субстратах

Культуры, проявившие высокую целлюлозолитическую активность в эксперименте с целлюлозой фильтровальной бумаги, были опробованы на способность разлагать следующие субстраты: беленую и микрокристаллическую целлюлозу, лигноцеллюлозу, молотую и цельную биомассу мискантуса. Было отмечено, что накопительные культуры, полученные на

определенном субстрате, например МКЦ, при последующем их пересеве продолжали более активно разлагать тот же субстрат (МКЦ), но практически не разлагали другие субстраты. Из чего можно заключить, что в природном сообществе имеется комплекс микроорганизмов с набором генов и ферментов, обладающий универсальной способностью разлагать любой из целлюлозосодержащих субстратов. Затем, в случае попадания в данную микробную систему определенного источника целлюлозы, формируется сообщество, способное разлагать только этот субстрат, а «ненужные» способности утрачиваются и, вместе с тем утрачивается универсальность. Таким образом, можно заключить, что с большой вероятностью сообщество, способное разлагать, например целлюлозу мискантуса, отличается от сообщества, способного разлагать микрокристаллическую целлюлозу.

Многие накопительные культуры, для которых была зафиксирована целлюлозолитическая активность на начальном этапе, впоследствии утрачивали это свойство. Так, большая часть культур, ранее разлагавшая целлюлозу фильтровальной бумаги, впоследствии это свойство не проявляет. Такую картину мы наблюдали среди сообществ соленых озер Новосибирской области. Сообщества Кулундинской степи целлюлозолитически были более активны: накопительные культуры нескольких озер Кулундинской степи уже на протяжении нескольких лет сохраняют стабильно высокую целлюлозолитическую активность. Три культуры при этом активны по отношению ко всем опробованным субстратам, кроме неразрушенной биомассы мискантуса. По отношению к неразрушенной биомассе мискантуса активность была отмечена только в одном случае: наблюдалось расслоение части стебля мискантуса на отдельные составляющие и их последующее размягчение. В итоге, из более чем 100 накопительных культур, проявивших на начальном этапе целлюлозолитическую активность, впоследствии было отобрано около 20 культур, сохраняющих активность по отношению к различным целлюлозосодержащим субстратам.

Исследование гидролиза мискантуса и продуктов его химической переработки под действием препарата «Целлолюкс-А»

Концентрация субстрата для гидролиза 30 г/л.

Зависимости выхода глюкозы в

гидролизате от продолжительности ферментации для беленой целлюлозы, лигноцеллюлозного материала, волокнистого продукта и исходного мискантуса приведены на рисунке 5.

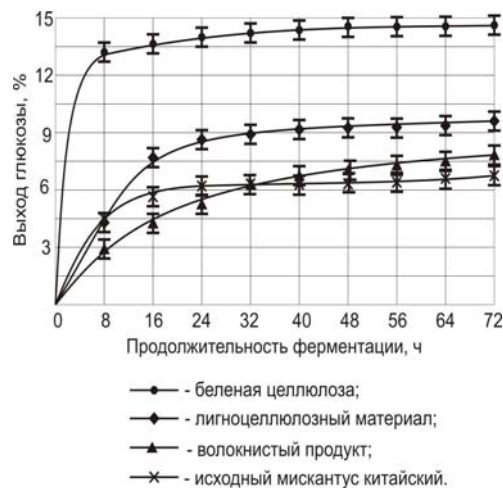


Рисунок 5. Зависимость выхода глюкозы в гидролизате от продолжительности ферментации беленой целлюлозы, лигноцеллюлозного материала, волокнистого продукта, исходного мискантуса

Беленая целлюлоза характеризуется самой высокой начальной скоростью ферментации, в то время как исходное сырье, лигноцеллюлозный материал и волокнистый продукт имеют близкие и низкие начальные скорости. Через 32 ч выход глюкозы в гидролизате лигноцеллюлозного материала на 30 % выше равных между собой выходов для волокнистого материала и исходного сырья. Максимальный выход глюкозы достигнут при гидролизе беленой целлюлозы и не превышает 15 %. Следует отметить, что сравнительный характер полученных зависимостей выхода глюкозы от времени отличается от ранее исследованных ферментаций для соломы и плодовых оболочек овса [11].

Зависимости выхода редуцирующих веществ (РВ) после инверсии (далее просто выход РВ) в гидролизате от продолжительности ферментации для беленой целлюлозы, лигноцеллюлозного материала, волокнистого продукта и исходной биомассы мискантуса приведены на рисунке 6.

Зависимость выхода РВ от продолжительности ферментации имеет одинаковый характер для двух продуктов переработки мискантуса: беленой целлюлозы и волокнистого продукта.

К ВОПРОСУ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ РОССИЙСКОГО МИСКАНТУСА

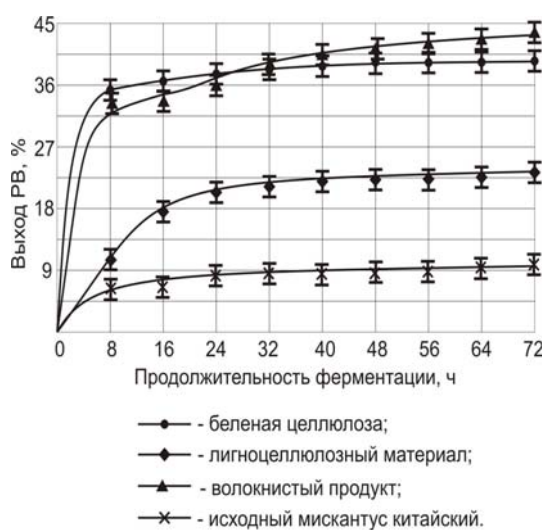


Рисунок 6. Зависимость выхода редуцирующих веществ (РВ) после инверсии в гидролизате от продолжительности ферментации белой целлюлозы, лигноцеллюлозного материала, волокнистого продукта, исходной биомассы мискантуса

Выход РВ достигает более высоких значений даже через 8 ч ферментации и находится в пределах 34-36 %, затем продолжает расти до 38-45 %. В интервале продолжительности гидролиза 24-32 ч волокнистый продукт становится более реакционноспособным, чем белая целлюлоза, и разрыв между ними значительно нарастает. Это явление можно объяснить более высокой степенью кристалличности белой целлюлозы и наличием доступной для ферментации аморфной части целлюлозы в волокнистом продукте. Скорость гидролиза лигноцеллюлозного материала и исходного мискантуса более медленная, через 32 ч ферментации выходы РВ достигают 22 % и 9 %, соответственно, после чего практически выходят на плато до конца эксперимента.

По результатам, представленным на рисунках 6 и 7, очевидны ряды реакционной способности субстратов:

- по выходу глюкозы: белая целлюлоза > лигноцеллюлозный материал > волокнистый продукт > исходная биомасса мискантуса;

- по выходу РВ после инверсии: волокнистый продукт > белая целлюлоза > лигноцеллюлозный материал > исходная биомасса мискантуса. Обнаруженные закономерности в рядах реакционной способности субстратов в большинстве опытов аналогичны полученным ранее для соломы и плодовых оболочек овса.

Сравнение полученных значений реакционной способности к ферментации трех видов сырья: соломы овса, плодовых оболочек овса и мискантуса позволяет выявить мискантус как самый активный субстрат [12, 13].

ВЫВОДЫ

Получены активные накопительные культуры микроорганизмов, устойчиво работающие в течение продолжительного времени и способные к гидролизу широкого спектра целлюлозосодержащих субстратов.

Показано, что на разных источниках целлюлозы формируются разные комплексы микроорганизмов.

По выходам глюкозы и РВ после инверсии определена реакционная способность к гидролизу с использованием «Целлолюкс-А» исходной биомассы мискантуса и продуктов его химической переработки. Показано, что использование нецелевого ферментного комплекса позволяет получить гидролизаты с выходом редуцирующих веществ 18-45 %, достаточным для дальнейшего сбраживания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 73.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачев Н.А., Манучарова Н.А., Практикум по биологии почв. Изд. Московского университета, 2002. – 120 с.
2. Практикум по микробиологии, под ред. Нетрусова А.И. Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
3. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Под ред. Дж. Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж. Стейли, С.Уильямса. М.: Мир, 1997. – 800 с.
4. Жилина Т.Н. // Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского. – М.: Наука, 2007. – Вып. 14. – С. 158-225.
5. Miscanthus: For Energy and Fibre. By Michael B. Jones, Mary Walsh. Published by Earthscan, 2001. – 192 p.
6. Makoto Yoshida, Yuan Liu and et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2008. – 72. – P. 805-810.
7. Vladimir K. Shumny, Sergey G.Veprev, Nikolay N. Nechiporenko, Tatiana N. Goryachkovskaya, Nikolay M. Slynko, Nikolay A. Kolchanov, Sergey E. Peltek. // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2010. – Vol. 1. – P.167-170.
8. В.В. Будаева, Р.Ю. Митрофанов, В.Н. Золотухин, Г.В. Сакович // Ползуновский вестник. – 2009. – №

3 – С. 328-335.

9. Коренман, И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И.М. Коренман. – М.: Химия, 1970. – 334 с.

10. ГОСТ 13192 – 73. Вина, виноматериалы и коньяки. Метод определения сахаров. Введ. 1975-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1973. – 14 с.

11. Бурцева Е.А., Гора А.А., Будаева В.В. // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы IV Всерос. конф., Барнаул, 21-23 апреля 2009 г.: в 2 кн. / под. ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2009. – Кн. 1. – С. 148–151.

12. Будаева В.В., Бурцева Е.А., Митрофанов Р.Ю., Золотухин В.Н. // Химия XXI век: новые технологии, новые продукты: материалы XII науч.-практ. конф., Кемерово, 21-24 апреля 2009 года. – Кемерово: КузГТУ, 2009 – С. 30-33.

13. Бурцева Е.А., Будаева В.В. // Технологии и оборудование химической, биологической и пищевой промышленности: материалы 2-й Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых, Бийск, 14-15 мая 2009 года. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-т, 2009. – С 129-135.

СВОЙСТВА МИСКАНТУСА ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ В РЕАКТОРЕ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ-2009

В.В. Будаева, Н.В. Бычин, Г.В. Сакович

Учреждение Российской академии наук Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения РАН (ИПХЭТ СО РАН)

В статье приведены результаты исследования свойств российского мискантуса в реакторе высокого давления-2009 (РВД-09). Установлено, что мискантус после обработки в РВД-09 и промывки щелочью представляет собой волокнистый продукт со свойствами, близкими к технической целлюлозе. Определена реакционная способность к ферментации образцов мискантуса после РВД-09 и различных приемов обработки в сравнении с исходным сырьем.

Ключевые слова: мискантус, реактор высокого давления, техническая целлюлоза, ферментный гидролиз, Целлолюкс-А.

ВВЕДЕНИЕ

Существует достаточное количество примеров исследования физико-химического превращения растительного сырья в жестких условиях: при высоких температурах и высоких давлениях. Одной из ярких в этой области работ, выполненных в Сибири, была экспериментальная работа по исследованию поведения основных компонентов древесины в условиях взрывного автогидролиза с обеспечением полного анализа твердых и жидких продуктов [1]. Авторами были установлены основные реакции: отщепление метоксильных, ацетильных и пропиловых групп с образованием метанола, уксусной кислоты, изопропанола; гидролитическое расщепление легкогидролизуемых углеводов древесины с образованием сахаров; дегидратация и термическое разложение сахаров с образованием летучих органических продуктов, в первую очередь фурфурола; деполимеризация исходного лигнина с образованием низкомолекулярных фрагментов; реакции конденсации

имеющихся продуктов с лигнином с образованием дополнительного количества так называемого «псевдолигнина». Логическим завершением проведенных исследований стало внедрение разработанного оборудования в промышленности для получения волокнистых плит.

Исследование воздействия высоких температур и давления на недревесное растительное сырье активно проводится за рубежом. При исследовании зависимости ферментативного гидролиза продукта предобработки горячей водой люцерны от способов предобработки обнаружены фракция гемицеллюлозы (87 %), фракция целлюлозы (24 %) и лигнин (6 %), сумма которых больше, чем в опыте без предобработки. Однако при этом не доказано, что такой вид обработки приводит к большему общему количеству ферментативных сахаров для ферментативного осахаривания или к большему количеству этанола после соответствующего сбраживания [2].