

На правах рукописи

Зябрева Надежда Владимировна

**ПРЯМАЯ БИОКОНВЕРСИЯ
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛОВ
ТЕРМОФИЛЬНЫМИ АНАЭРОБАМИ**

Специальность 03.00.23 – Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
технических наук

Москва – 2001

Работа выполнена на кафедре экологической и промышленной биотехнологии Московского государственного университета инженерной экологии и в Государственном научно-исследовательском институте биосинтеза белковых веществ

Научные руководители: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Исакова Елена Павловна, кандидат технических наук, доцент Поляков Александр Николаевич.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор Градова Нина Борисовна, доктор технических наук, профессор Борисенко Евгений Георгиевич

Ведущая организация: Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Защита состоится « 20 » ноября 2001 г в *12.00* на заседании межведомственного диссертационного совета Д 212.204.13 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И.Менделеева по адресу: 125047, Москва, Миусская пл., 9.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-информационном центре РХТУ им. Д.И.Менделеева.

Автореферат разослан «*12* » *октябрь* 2001 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Гусева И.И.

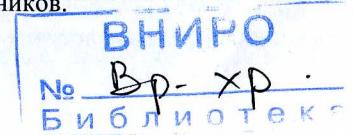
1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Огромное количество целлюлозосодержащих отходов агропромышленного комплекса создает экологически неблагоприятную ситуацию. Обычно целлюлозные материалы поддаются переработке путем кислотного либо ферментативного гидролиза с последующим сбраживанием полученного гидролизата дрожжами в этиловый спирт. Рядом преимуществ обладает процесс прямой биоконверсии целлюлозы с применением смешанной культуры термофильных анаэробных бактерий, в состав которой входят целлюлолитические и сахаролитические микроорганизмы. Основным достоинством данной технологии является одностадийность: стадии ферментативного гидролиза и брожения совмещены в одном аппарате и осуществляются одними и теми же бактериями. Применение смешанных культур позволяет более полно усваивать субстрат, используя как гексозные, так и пентозные фракции. Кроме того, технология может быть практически безотходной – все целевые и побочные продукты, образующиеся при ферментации, могут быть реализованы в качестве самостоятельных товарных форм.

Поэтому исследования в области бактериальной биоконверсии возобновляемых природных ресурсов являются актуальными.

Цели работы. Целью данной работы является разработка технологии утилизации целлюлозосодержащих материалов путем термофильной анаэробной биоконверсии, а также накопление музея бактериальных культур, необходимых для ее осуществления. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выделение и первичная идентификация стабильных ассоциаций термофильных анаэробных бактерий, обладающих целлюлолитической активностью, из различных природных источников.



2. Селекция различными методами бактериальных ассоциаций для осуществления биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

3. Подбор методов хранения, гарантирующих стабильность видового состава ассоциаций и технологических показателей культур.

4. Изучение влияния параметров культивирования на метаболизм бактерий.

5. Анализ возможности утилизации различных видов целлюлозосодержащих отходов.

Научная новизна работы. Собран музей стабильных ассоциаций термофильных анаэробных бактерий, способных ассимилировать целлюлозу, целлобиозу, глюкозу и ксилоzu, выделенных из различных природных источников. Данные ассоциации способны конвертировать различные комплексные целлюлозосодержащие субстраты: опилки хвойные и лиственные, фильтровальную и газетную бумагу, продукты сульфитной варки древесины, отработанную солодовую дробину, подсолнечную лузгу, пшеничные отруби, а также гидролизаты древесины и костры льна. Подобраны методы хранения. Проведена первичная идентификация бактериальных штаммов.

На основе выделенных ассоциаций селекционированы смешанные культуры термофильных анаэробов, способные конвертировать целлюлозосодержащее сырье с получением различных целевых продуктов: этанола, бутанола, уксусной, молочной, масляной кислот.

Исследовано влияние параметров культивирования на метаболизм полученных культур: pH среды, температуры роста, перемешивания культуральной среды и потребность в факторах роста.

Предложен способ организации стадии ферментации с накоплением конденсата паров, позволяющий использовать тепло процесса ферментации и облегчающий выделение летучих продуктов биоконверсии.

Практическое значение работы. 1. Полученные ассоциации термофильных анаэробных бактерий обладают физиологическими свойствами, которые позволяют применять технологию биоконверсии для решения проблем:

- утилизации промышленных целлюлозосодержащих отходов;
- повышения усвоемости и пищевой ценности грубых кормов для скота;
- использования малоценной сырьевой базы для получения ценных продуктов;
- обезвреживания отходов целлюлозно-бумажного производства;
- получения экологически чистого (незакисленного) лигнина — фармацевтического адсорбента, структуриатора почв, а также субстрата для культивирования базидиомицетов.

2. Разработан технологический процесс биоконверсии целлюлозосодержащих отходов с использованием селекционированных бактериальных культур.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на II международном симпозиуме "Техника и технология экологически чистых производств" в 1998г., на международной конференции "Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов" в 2000г., на IV международная конференция и международном симпозиуме «Инженерная защита окружающей среды» в 2001 г., а также на фестивале научно-технического творчества молодежи Москвы и Московской области в 2001 г., ВВЦ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ и подготовлена учебно-методическая работа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, состоящей из 7 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Библиография включает 102 наименования, из них 67 на английском языке. Материал изложен на 130

страницах машинописного текста, иллюстрирован 4 рисунками, 10 фотографиями, 20 графиками и 50 таблицами.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Объекты и методы исследования.

Объекты исследования. В работе исследовались природные биоценозы термофильных анаэробных бактерий – продуцентов целлюлолитических ферментов, выделенные из различных природных источников: навоза трапоядных животных (*Equus caballus*, *Equus zebra* и *Camelopardalis giraffa*), ила и воды геотермальных источников Камчатки (Карымское озеро), речного ила из Малайзии (река Тебрау), компоста и разлагающегося растительного материала средней полосы России, а также ассоциации, селекционированные на их основе.

Среды. Для выращивания и селекции целлюлолитических бактерий, а также получения инокулята использовали элективную среду MEDIUM 1 с фильтровальной бумагой в качестве источника углерода (1% вес.) состава (г/л): пептон – 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1.5; KH_2PO_4 – 0.5; K_2HPO_4 – 0.5; MgSO_4 – 0.4; NaCl – 0.1; MnSO_4 и FeSO_4 – следы; CaCl_2 – 0.56. Ферментации проводили на среде CM3 состава (г/л) [65]: KH_2PO_4 – 1.5; K_2HPO_4 – 2.9; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.3; CaCl_2 – 1.5; MgSO_4 – 1.22; FeSO_4 – 1.25×10^{-6} ; резазурин – 2×10^{-6} ; дрожжевой экстракт – 2.0; цистеин-HCl – 0.5; углеводные субстраты и их концентрации указаны в тексте. Для выделения целлюлолитических бактерий рода *Clostridium* использовали твердую среду MEDIUM 2 состава (в г/л 1%-ного МПА): дрожжевой экстракт – 3; глюкоза – 5; крахмал растворимый – 1; ацетат натрия – 3; цистеин-HCl – 0.5; NaCl – 5; целлюлоза – 9.02 и полу жидкую среду (с 0.5%-ным МПА) того же состава с 1% целлюлозы. Разделение штаммов бактерий из ассоциаций и их первичную идентификацию проводили на элективных средах.

Культивирование. Эксперименты проводили на среде CM3 в конических колбах объемом 100-150 мл, пробирках, колбах Эrlenmeyera (объем среды 750 мл) при температуре 60 ± 2 °C, при периодической подтитровке pH до 6.9-7.2 10%-ным NaOH или H_2SO_4 (один раз в сутки) при периодическом встряхивании в анаэробных условиях, достигаемых замещением атмосферы воздуха CO_2 . Также культивирование проводили в ферментере BIOFLO (рабочий объем 0.6 л) при механическом перемешивании в периодическом режиме. Объем среды составлял 80-90% от геометрического объема культиватора. Клетки на посев брали в экспоненциальной фазе. Объем инокулята составлял 10-20% от ферментационного объема. Твердые виды субстратов перед ферментацией запаривали для удаления из пор воздуха путем автоклавирования вместе с питательной средой в течение 30 минут (температура 121 °C), предварительно измельчив до среднего размера частиц: опилки – 0.3×0.1 мм, газетная бумага – 0.2×0.05 мм, бумажная пульпа (продукт сульфитной варки древесины) – 0.2×0.1 мм, солодовая дробина – 2.3×0.2 мм, отруби пшеничные – 0.3×0.1 мм, подсолнечная лузга – 0.5×0.1 мм, кукурузный остаток – 2.0×0.1 мм. Для определения размера частиц субстрата использовали сита соответствующего калибра.

Разделение и идентификация. Для разделения бактериальных штаммов из ассоциаций на монокультуры была проведена серия высеивов образцов культуральной жидкости на жидкие элективные среды в пробирки (объем среды 15 мл) по методу Sudha Rani K. (1996). После появления признаков активного роста, культуральную суспензию высеивали на плотные среды МПА и MEDIUM 2 на чашки Петри под слоем голодного агара. Для оценки морфологии колоний анаэробных культур выращивание проводили в вакуумном эксикаторе в отсутствие кислорода. В этом случае голодный агар не использовался. После прорастания клетки, взятые из отдельных колоний, пересевали на жидкие и плотные элективные среды. Операцию повторяли несколько раз при периодическом микроскопировании.

Для оценки морфологических признаков бактериальные клетки измеряли методом компьютерной морфометрии с помощью системы автоматического анализа KS300 (Kontion Electronic Germany) под световым микроскопом Axiolab (Zeiss, Germany) на базе Учебно-научного центра по компьютерному анализу изображений и автоматической морфометрии Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН и биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Также применяли окраску жгутиков и спор, окраску клеток по Грамму.

Физиологические особенности культур оценивались с помощью тестов на отношение к кислороду, на образование сероводорода, на накапливание гранулезы и гликогена, на каталазу, на целлюлазную активность, а также по способности усваивать различные углеводы, продуцировать полисахариды и по образованию продуктов ферментации.

Селекция культур. Для получения стабильных ассоциаций из природных биоценозов применяли метод многократных пассажей на средах CMZ с 1% целлюлозы и MEDIUM 1 в течение 4-6 месяцев. Стабильность бактериальных ассоциаций обеспечивалась за счет создания условий, оптимальных для целлюлолитических штаммов, составляющих основу всех ассоциаций: 1) единственный источник углерода – целлюлоза, 2) pH питательной среды 6.5-6.8 (для метаногенных и сульфатредуцирующих микроорганизмов предпочтительнее более щелочная среда), 3) температура культивирования 60 ± 2 °C (у метаногенных штаммов температурный оптимум ниже).

Для получения ассоциации целлюлолитических бактерий применяли метод автоселекции (Градова Н. Б., 1973) в ферментере BIOTEC (рабочий объем 3.0 л) с механическим перемешиванием в проточной системе (скорость протока 0.05 ч⁻¹) на среде CMZ с 2% целлюлозы при pH 6.5 в анаэробных условиях в течение 40 суток.

Для удаления из природных ассоциаций сопутствующей микрофлоры (сульфатредуцирующих и метаногенных бактерий) применяли метод многократных пассажей с периодической заменой среды культивирования (1 раз в 2 недели) поочередно со среды CMZ с 1% целлюлозы на элективные среды, описанные выше.

Хранение культур. Для хранения ассоциаций и чистых культур использовали следующие методы:

- 1) субкультивирование в жидкой культуре при 60 °C на средах CMZ с 1% целлюлозы или целлобиозы и MEDIUM 1;
- 2) при комнатной температуре в пробирках на твердой (1.5%вес. агара Difco) и полужидкой (0.5%вес. агара Difco) средах CMZ с 1% целлюлозы или целлобиозы и MEDIUM 2 под слоем вазелинового масла и без масла;
- 3) при комнатной температуре на чашках Петри между слоями агаризованной среды и голодного агара;
- 4) при комнатной температуре в пробирках на жидкой среде CMZ с 1% целлюлозы или целлобиозы;
- 5) при 4 °C в холодильнике в пробирках на агаризованных средах;
- 6) замораживанием культуральной жидкости в пробирках при температуре -18°C;
- 7) в лиофильно высушенному состоянии с защитной средой Фабича с последующим хранением при температуре -18°C;
- 8) высушиванием на полосках фильтровальной бумаги после суточного культивирования на среде MEDIUM 1 и последующим хранением при комнатной температуре.

Аналитические методы. Этанол, бутанол и уксусную кислоту определяли газохроматографическим методом.

Редуцирующие сахара определялись без инверсии. Сумму органических кислот определяли титрованием по методике, предложенной Зюковой Л. А. (1984). Углеводы в среде определяли фотоколориметрическим методом. Молочную кислоту определяли качественно по реакции с тиофеном.

Масляную кислоту определяли качественно методом получения масляноэтилового эфира. Общий белок определяли по методу Бредфорда. Целлюлазную активность определяли: 1) фенол-сернокислым методом, 2) вискозиметрическим методом с использованием Na-карбоксиметилцеллюлозы, 3) по методу с использованием реагента Бенедиктина. Диоксид углерода качественно определяли по образованию осадка при реакции газообразных продуктов с 30% раствором $BaCl_2$. Сероводород определяли качественно по реакции газообразных продуктов ферментации с раствором уксуснокислого свинца. Содержание метана в газообразных продуктах ферментации определяли газохроматографически.

Степень конверсии субстратов определяли как отношение разности их начальных и конечных концентраций к начальной концентрации, выраженное в процентах. Конечные концентрации нерастворимых субстратов вычисляли через определение твердого остатка. В случае растворимых субстратов за эту величину принималось содержание редуцирующих веществ.

Кинетические характеристики. Рост культуры определяли по оптической плотности (при $\lambda=540$ нм). Кроме того, концентрацию биомассы определяли весовым методом при использовании мембранных фильтров Synpor (Немарол, Прага) с размером пор 0.40 мкм.

Эксперименты по совмещению процессов ферментации и конденсации паров этанола за счет периодического создания вакуума проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 и 750 мл на среде СМЗ с 1% целлюлозы при температуре 60 °С. Определяли концентрацию этанола в культуральной жидкости до и после вакуумирования, а также концентрацию этанола в

конденсате паров. Кроме того, влияние вакуумирования на рост клеток изучали по результатам микроскопирования культуральной жидкости и высеев на агаризованную среду на чашки Петри.

Как правило, эксперименты проводили в 3 повторностях с 3-мя параллельными определениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2. Выделение биоценозов термофильных анаэробных бактерий из различных природных источников.

Из различных природных источников – навоза травоядных животных, геотермальных источников и разлагающейся растительной биомассы – были выделены биоценозы термофильных бактерий, способные развиваться в отсутствии кислорода при температуре 60 °С. Культуры обладали способностью ассимилировать целлюлозу в качестве единственного источника углерода, продуцируя целый ряд продуктов, в том числе и газообразных. В таблице 1 приведен сравнительный анализ технологических характеристик выделенных биоценозов. Из трех групп выделенных биоценозов было отобрано по одной наиболее активной культуре.

Культура №1, выделенная из навоза травоядных животных. Полученная культура способна ассимилировать целлюлозу, продуцируя этанол, органические кислоты и газообразные продукты - CO_2 , сероводород и метан (содержание метана в газообразной смеси – 40-47%). Результаты первичной идентификации штаммов, составляющих данную ассоциацию, показали присутствие в ней *Cl. thermocellum*, *Cl. thermohydrosulfuricum*, *Bacillus sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Таблица 1

Технологические свойства бактериальных ассоциаций, выделенных из различных природных источников.

№	Источник микрофлоры	Технологические характеристики выделенных культур			
		Концентрация этанола, г/л	Концентрация уксусной кислоты, г/л	Прочие органические кислоты (качественно)	Степень конверсии субстрата, %
1	Навоз зебры	0,72	0,14	молочная	69
2	Навоз жирафа	0,48	0	молочная	65
3	Навоз лошади	0,26	0,53	молочная	61
4	Речной ил	0,44	3,81	молочная, масляная	75
5	Силос	0,62	2,97	молочная, масляная	73
6	Компост	0	4,63	молочная	74
7	Ил геотермальных источников (82^0 С)	0,78	2,20	молочная	71
8	Вода геотермальных источников (82^0 С)	0,83	2,41	молочная	69
9	Ил геотермальных источников (84^0 С)	0,53	3,17	молочная	68
10	Вода геотермальных источников (84^0 С)	0,37	2,17	молочная	57
11	Ил геотермальных источников (85^0 С)	0,74	2,03	молочная	63
12	Вода геотермальных источников (85^0 С)	0,29	2,63	молочная	59

Культура №2, выделенная из геотермальных источников. Культура ассимилирует с образованием этанола, органических кислот, CO₂, сероводорода и следов метана целлюлозу в качестве единственного источника углерода. Результаты первичной идентификации штаммов, составляющих

данную ассоциацию, показали присутствие в ней Cl. thermocellum, Cl. thermoacidophilus, Thermoanaerobium brokii, Thermoanaerobacter ethanolicus, Desulfotomaculum nigrificans.

Культура №3, выделенная из разлагающейся растительной биомассы. Выделенная ассоциация способна ассимилировать целлюлозу, продуцируя уксусную и масляную кислоты и газообразные продукты (CO₂, сероводород и следовые количества метана). Результаты первичной идентификации штаммов, составляющих данную ассоциацию, показали присутствие в ней Cl. thermobutiricum, Cl. thermosaccharolyticum, Cl. thermocellulaseum, Cl. thermoacidophilus.

2.3. Селекция смешанных культур термофильных бактерий.

Смешивание ассоциаций, выделенных из различных природных источников. Для селекции ассоциации бактерий с улучшенными характеристиками (выход этанола и уксусной кислоты) была проведена серия экспериментов по совместному культивированию ассоциаций №1 и №2. В результате методом многократных пассажей была получена новая ассоциация бактерий (культура №4).

Таблица 2

Сравнение технологических свойств исходных бактериальных ассоциаций с селекционированной

Ассоциация	№1 (навоз травоядных)	№2 (геотермальные источники)	№4 (селекционированная)
Максимальная концентрация этанола, г/л	0.88	0.78	11.2
Максимальная концентрация уксусной кислоты, г/л	0.4	2.2	6.12
Скорость конверсии субстрата, %/сутки	3.38	2.95	6.83

Селекционированная ассоциация термофильных анаэробных бактерий (культура №4) показала способность более интенсивно конвертировать целлюлозу, чем исходные природные ассоциации, а также обладала более высокой продуктивностью по этанолу и уксусной кислоте (табл. 2).

После разделения данной ассоциации на монокультуры проводилась первичная идентификация полученных штаммов, показавшая наличие следующих микроорганизмов: *Clostridium thermocellum*, *Cl. thermohydrosulfuricum*, *Cl. thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobium brokii*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina* sp.

Удаление сопутствующей микрофлоры из бактериальных ассоциаций. Проведены эксперименты с целью выявления штаммов, снижающих выход этанола и уксусной кислоты в ходе конверсии целлюлозосодержащего сырья.

Таблица 3

Изменение технологических характеристик селекционированных бактериальных ассоциаций по сравнению с исходной ассоциацией

Технологические характеристики	Ассоциация				
	контроль	№ 4.1	№ 4.2	№ 4.3	№ 4.4
Концентрация спирта, г/л	11.04	16.48	0.76	3.52	25.72
Концентрация уксусной кислоты, г/л	6.54	4.48	3.17	4.19	4.65
Относительное изменение концентрации этанола, %	100	149	6.9	32	232
Относительное изменение концентрации уксусной кислоты, %	100	68	48	64	72

В результате длительного культивирования (более 6 месяцев) ассоциации №4 с периодическим изменением среды культивирования (1 раз в 2 недели) поочередно со среды СМ3 с 1% целлюлозы на элективные среды

были селекционированы 4 стабильные ассоциации бактерий, отличающиеся как видовым составом, так и количеством представленных видов. В таблице 3 представлены технологические характеристики культур, полученные в условиях периодического культивирования.

Сопоставляя технологические характеристики ассоциаций с результатами идентификации их видового состава можно заключить, что присутствие в рабочей смешанной культуре бактерий родов *Methanobacterium*, *Methanosarcina* однозначно сокращает выход этанола при конверсии сырья, в то время как об аналогичном влиянии бактерий родов *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* определенно сказать нельзя. Кроме того, следует отметить явную целесообразность совместного использования целлюлолитических и сахаролитических этанологенов родов *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobium*, взаимно дополняющих друг друга. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что наиболее перспективное получение этанола при конверсии целлюлозосодержащих материалов происходит биоценозом, содержащим: *Cl. thermocellum*, *Cl. thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobium brokii*.

Автоселекция ассоциации целлюлолитических бактерий. В результате автоселекции удалось получить новую ассоциацию целлюлолитических бактерий (культура №5), конвертирующих целлюлозу в основном в этанол, бутанол, уксусную и масляную кислоты (табл. 4). Полученная ассоциация обладает высокой целлюлазной активностью — 190 ЕД/мл, сравнимой с грибными культурами, такими как *Aspergillus niger* (250-290 ЕД/мл), применяемыми для промышленного получения ферментных препаратов целлюлаз. Газообразными продуктами являются CO_2 и следы метана. Идентификация штаммов, составляющих ассоциацию №5, показала присутствие: *Cl. thermocellum*, *Cl. thermocellulaseum*, *Cl. thermobutyricum*, *Cl. thermohydrosulfuricum*.

Таблица 4

Характеристика селекционированной ассоциации №5:

Технологическая характеристика	максимальная	средняя
Производительность по этанолу, мг/л·сутки	141	50
Производительность по бутанолу, мг/л·сутки	400	290
Производительность по уксусной кислоте, мг/л·сутки	360	208
Производительность по масляной кислоте, мг/л·сутки	775	503
Скорость конверсии целлюлозы, г/л·сутки (%/сутки)	3 (8.6)	2.6 (7.5)

2.4. Изучение методов хранения полученных ассоциаций.

В таблице 5 представлены результаты проверки различных методов хранения бактериальных ассоциаций.

Таблица 5

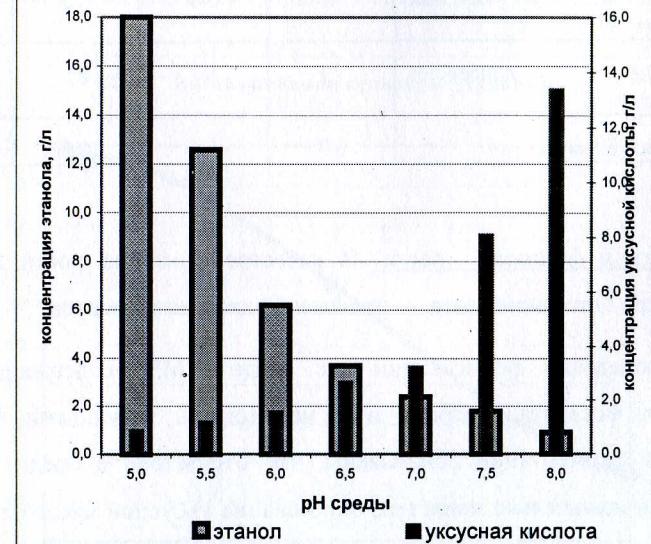
Методы хранения бактериальных ассоциаций

Метод хранения	Допустимое время хранения	Время активизации, сутки	Сохранение видового состава, %
Субкультивирование в жидкой культуре	10-15 дней без пересева	1	100
При комнатной температуре в агаризованной среде	1,5-2 месяца	2-3	80-90
При комнатной температуре в жидкой среде	2-3 недели	5-6	80-90
Под слоем вазелинового масла на агаризованной среде	5-6 месяцев	5-6	95-97
При температуре +4°C в полужидкой среде	1-2 месяца	2-3	98-100
В замороженной агаризованной среде	9-10 месяцев	2-3	90-95
В лиофильно высушенном состоянии	1-2 года	1-2	100
На высушенных полосках бумаги	3-4 месяца	1-2	40-50

2.5. Влияние параметров культивирования на метаболизм бактерий.

pH питательной среды. Влияние pH ферментационной среды изучали в диапазоне значений от 5 до 8 в условиях периодических ферментаций на среде СМЗ с 1% целлюлозы. Было установлено, что при понижении pH до 5.0 интенсифицируется этанолгенез, а при повышении pH — ацетогенез. На 5-ые сутки ферментации наиболее интенсивное образование этанола при одновременном максимальном ингибировании синтеза уксусной кислоты наблюдалось при pH 5.0: концентрация этанола по сравнению с контрольным образцом выше в 6.7 раза, а концентрация уксусной кислоты ниже в 3.6 раза (рис. 1). Наиболее интенсивное образование уксусной кислоты при одновременном максимальном ингибировании синтеза этанола наблюдалось при pH 8: концентрация этанола по сравнению с контрольным образцом ниже в 3.5 раза, а концентрация уксусной кислоты выше в 4.1 раза.

РИС. 1. Влияние pH среды на образование продуктов конверсии



Следовательно, изменяя начальное значение pH питательной среды, можно регулировать соотношение компонентов в целевом продукте.

Температура культивирования. Проведено культивирование на среде СМ3 с 1% целлюлозы при температурах 55, 60, 65 и 70 °C. Результаты опытов, представленные в таблице 6, показывают, что температурный оптимум для роста целлюлолитических и этанолегенных бактерий составляет 60 °C. Однако, максимальный выход уксусной кислоты наблюдается при более низкой температуре 55 °C. Для культивирования описанных ассоциаций бактерий была принята температура 60 °C, оптимальная для целлюлолитических видов.

Таблица 6

Определение температурного оптимума для выделенных ассоциаций

Технологические характеристики	Температура культивирования, °C			
	55	60	65	70
Концентрация этанола, г/л	8.6	9.4	8.8	8.1
Концентрация уксусной кислоты, г/л	7.0	6.8	6.5	6.1
Степень конверсии субстрата, %	79	84	81	72
Прирост биомассы, г	6.3	6.6	6.5	6.2

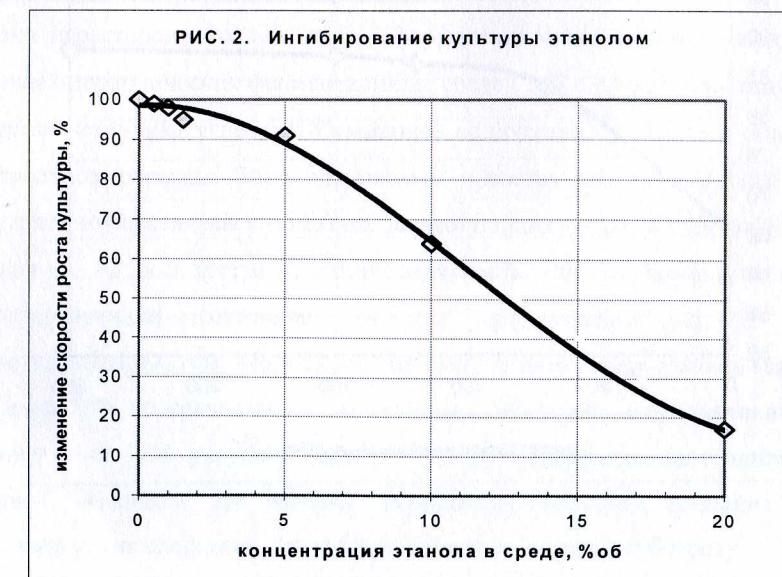
Потребность в факторах роста. В качестве факторов роста проверялись органические источники азота — дрожжевой экстракт и пептон.

Проведены ферментации на среде СМ3, содержащей 0.2 % дрожжевого экстракта (контроль) и без него (опыт). Результаты эксперимента на 5 сутки ферментации показывают, что отсутствие в среде дрожжевого экстракта незначительно влияет на образование уксусной кислоты — 2.01 г/л, по сравнению с контрольным образцом — 2.53 г/л. Однако, отмечено

значительное влияние на образование этанола: в случае использования среды, не содержащей дрожжевой экстракт, образовалось в 8 раз меньше этанола, чем на среде с дрожжевым экстрактом. Отсутствие в среде фактора роста (дрожжевого экстракта) повлияло и на рост культуры — по сравнению с контрольным образцом рост клеток на среде, не обогащенной дрожжевым экстрактом, сократился в среднем на 30 %.

Установлено, что пептон стимулирует процесс развития клеток, в то время как дрожжевой экстракт является, по всей видимости, индуктором ферментов, участвующих в процессе брожения, - в значительной степени алкогольдегидрогеназы и меньшей степени ацетилкиназы.

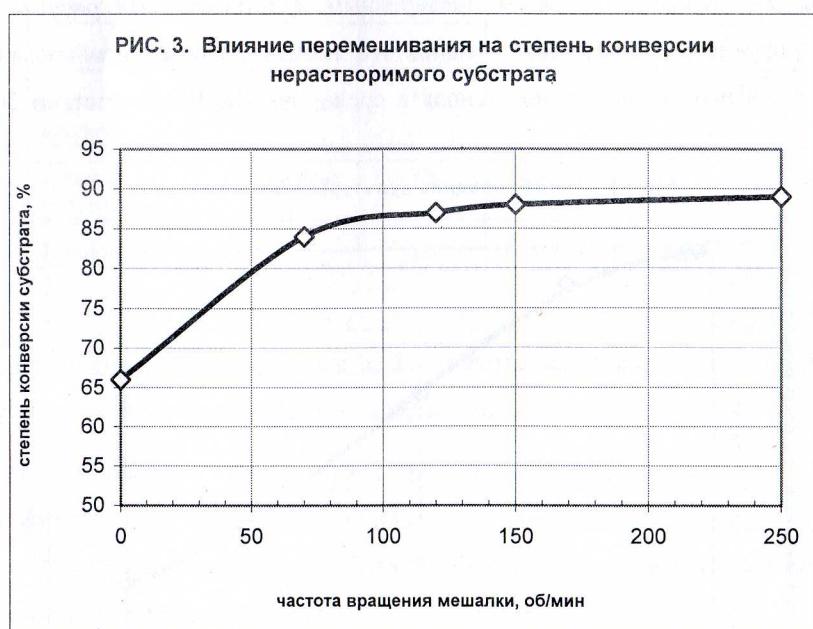
Ингибиование метаболитами. Установлено, что уксусная кислота практически не оказывает ингибирующего действия на рост бактерий, в то время как этанол в значительной степени ингибирует развитие бактериальных клеток. Это относится ко всем проверенным культурам. Из рисунка 2, иллюстрирующего эксперимент, видно, что незначительное ингибирование проявляется при концентрации этанола в среде до 5%. В присутствии 20%



этанола скорость роста клеток снижается более чем на 80%.

Перемешивание. Проведены эксперименты по изучению влияния перемешивания на интенсивность процесса биоконверсии нерастворимых целлюлозосодержащих субстратов в условиях периодической ферментации. В ходе эксперимента вели наблюдение за степенью конверсии субстрата при различных режимах перемешивания: 70, 120, 150, 250 об/мин, в контрольном образце культивирование проводилось в стационарном режиме. Использовалось перемешивающее устройство турбинного типа диаметром 66 мм.

Из графика на рисунке 3 видно, что для культивирования бактерий необходимо только суспендирование культуральной жидкости, обеспечивающее доступ клеток к субстрату.



2.6. Разработка технологической схемы процесса биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

Предложена технологическая схема процесса биоконверсии целлюлозосодержащего сырья с получением этанола и уксусной смеси включающая следующие стадии: 1) подготовка сырья, 2) подготовка инокулята, 3) ферментация сырья бактериальным консорциумом и 4) выделение продуктов брожения из культуральной жидкости. Длительность процесса ферментации обычно довольно велика и составляет от 10-12 до 20-25 суток в зависимости от типа субстрата, при этом накапливается 10-20 г/л этанола и 7-12 г/л органических кислот.

Отходом биоконверсии целлюлозосодержащего сырья является лигнин — недеградированный компонент сырья, составляющий от 10 до 40 % его исходного количества, который может быть использован в качестве твердого топлива, структуратора почв, субстрата для культивирования некоторых базидиальных грибов, а также в качестве сырья для производства экологически чистого (незакисленного) фармацевтического адсорбента. Дробная подача субстрата в ферментер. Эксперименты по изучению способа подачи нерастворимого субстрата в ферментационный объем проводились в условиях периодических ферментаций на среде СМ3 с древесными опилками в качестве источника углерода. Суммарное количество субстрата в опытном и контролльном образцах было одинаковым и составляло 5%. Дробная подача субстрата осуществлялась по схеме: первая порция — 20 % субстрата, вторая порция — 40 % и третья — оставшаяся часть (40 %). Результаты опытов, характеризующих состояние процесса ферментации на 25 сутки, свидетельствуют о том, что в случае дробной подачи сырья степень конверсии выше на 50% по сравнению с контрольным образцом, а продуктивности по этанолу — на 17%, уксусной кислоте — на 25% по сравнению с однократной подачей. Очевидно, это явление объясняется эффектом слипания частиц субстрата и, как следствие, малой доступностью клеток к субстрату.

Вакуумная отгонка этанола из культуральной жидкости. Поскольку культивирование проводится при температуре 60 °С, при создании небольшого вакуума жидкость закипает, что позволяет накапливать конденсат паров этанола непосредственно в ходе культивирования.

Проведенные расчеты двухкомпонентной системы этанол-вода показали, что при накоплении в культуральной жидкости 10-20 % этанола достаточно осуществлять вакуумирование однократно в течение 3-5 минут в сутки.

Проведены эксперименты по проверке выживаемости бактерий в жидкой культуре в состоянии кипения питательной среды под вакуумом при 60 °С и вакууме 96.9 кПа. Эксперимент показал, что бактерии, подвергшиеся в течение 2 часов жесткой вакуумной обработке, оставались активными как сразу по окончании обработки, так и через сутки после нее. При содержании этанола в культуральной жидкости около 1.5% конденсат паров содержал до 18 % этанола.

2.7. Перспективы реализации технологии биоконверсии.

Потенциальная сырьевая база для процесса биоконверсии как способа утилизации промышленных целлюлозосодержащих отходов весьма разнообразна. Проведены эксперименты по определению возможности использования в качестве субстратов для конверсии в этанол и органические кислоты различных целлюлозосодержащих отходов. Результаты экспериментов приведены в таблице 7.

Проведенные эксперименты позволяют утверждать, что вышеперечисленные виды целлюлозосодержащих отходов в той или иной мере могут быть использованы в качестве сырья для процесса бактериальной конверсии в этанол и органические кислоты.

Таблица 7

Результаты ферментаций на различных субстратах с использованием ассоциации бактерий №4

Субстрат	Содержание целлюлозы в среде, %	Этанол, г/л	Уксусная кислота, г/л
2%-ный гидролизат древесины	до 0.10	12.8	5.5
2%-ные древесные опилки	1.12	11.2	6.1
3%-ная бумажная пульпа	2.83	1.0	2.8
1%-ная льняная костра	до 0.07	следы	5.0
2%-ная солодовая дробина	до 0.5	6.6	4.2
2%-ная газетная бумага	1.89	0.5	1.4
2%-ная подсолнечная лузга	0.69	-	3.7
2%-ные пшеничные отруби	0.97	3.9	2.6

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.

1. Выделены из различных природных источников и охарактеризованы смешанные и монокультуры термофильных бактерий, способные конвертировать целлюлозосодержащие материалы. Проведена первичная идентификация бактериальных штаммов.
2. На основе выделенных природных бактериальных культур селекционированы ассоциации с улучшенными технологическими свойствами для конвертирования целлюлозосодержащих отходов, а также получения различных продуктов (этанола и органических кислот). Это позволило увеличить концентрацию этанола в культуральной жидкости до 11-20 г/л, а уксусной кислоты – до 6-7 г/л.

Для искусственного формирования ассоциации термофильных анаэробов из монокультур предложено соединять культуры родов *Clostridium*, *Thermoanaerobium* и *Thermoanaerobacter* для обеспечения стабильности новой ассоциации.

3. Предложены методы хранения как смешанных культур, так и монокультур, гарантирующие стабильность ассоциаций и сохранение физиологических свойств бактерий при хранении.

4. Изучено влияние условий культивирования – температуры, pH среды, факторов роста, перемешивания – на рост культур и их метаболическую активность. Показана возможность регулирования синтеза этанола и уксусной кислоты путем изменения величины pH питательной среды и температуры культивирования. Даны рекомендации по выбору питательной среды в зависимости от целевого назначения процесса культивирования.

Установлено, что этанол ингибирует выделенные бактериальные ассоциации. Уже при содержании более 5 % этилового спирта рост клеток снижается на 8-9 %. В то же время уксусная кислота в изученном диапазоне концентраций не оказывает ингибирующего действия на бактерии.

Показано, что для процесса ферментации перемешивание не обязательно должно быть непрерывным, достаточно периодического включения мешалки, обеспечивающей супензирование твердой фазы.

5. Показано, что дробная подача нерастворимого субстрата в ферментационный объем повышает степень конверсии сырья на 50 %.

Предложен способ осуществления ферментации с промежуточным накоплением конденсата паров этанола путем кратковременного вакуумирования среды, обеспечивающий повышение концентрации этанола в выходном продукте в 10-15 раз.

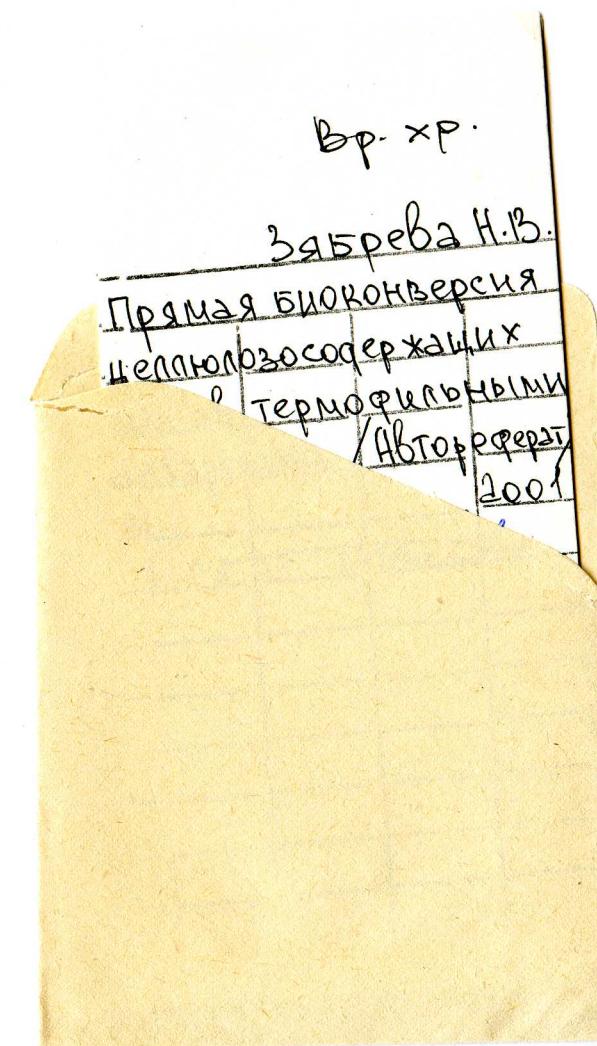
6. Изучены направления применения процесса биоконверсии для получения ряда продуктов: этанола, органических кислот, кормов повышенной усвояемости, препарата целлюлолитических ферментов. Предложены возможные схемы процессов утилизации различных промышленных, сельскохозяйственных и муниципальных целлюлозосодержащих отходов.

Даны рекомендации по выбору рабочей смешанной культуры бактерий в зависимости от вида целлюлозосодержащего сырья, а также от типа целевого продукта.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Н. В. Зябрева, Е. П. Исакова, В. В. Бирюков. Селекция смешанной культуры целлюлолитических термофильных анаэробов из разных природных источников. / Прикладная биохимия и микробиология, 2001 – Том 37, № 4, с. 424-428.
2. Н. В. Зябрева, Е. П. Исакова, В. В. Бирюков. Некоторые технологические параметры, влияющие на этанологенез в ходе биоконверсии целлюлозосодержащего сырья. / Прикладная биохимия и микробиология, 2001 – Том 37, № 5, с. 1-6.
3. Н. В. Зябрева. Технологические параметры, влияющие на этанологенез в ходе биоконверсии целлюлозосодержащего сырья. / Труды МГУИЭ: Сборник статей аспирантов и студентов. - М.: МГУИЭ, 1998-Том II.-с. 278-286.
4. Н. В. Зябрева, Е. П. Исакова, А. Н. Поляков, В. В. Бирюков. Выделение монокультур целлюлолитических термофильных анаэробных бактерий из природных биоценозов. / Труды МГУИЭ: Сборник статей аспирантов и студентов. - М.: МГУИЭ, 1999-Том IV.-с. 15-21.
5. Н. В. Зябрева, Н. А. Кустова. Утилизация целлюлозы в анаэробных условиях методом биоконверсии. Методическое указание к лабораторной работе по курсу “Техническая микробиология”. М., МГУИЭ, 1999 – 10с.
6. Н. В. Зябрева, Е. П. Исакова, А. Н. Поляков, В. В. Бирюков. Получение жидкого топлива из возобновляемого сырья - растительной биомассы - с помощью термофильных анаэробных бактерий. / Техника и технология экологически чистых производств. II международный симпозиум молодых ученых, аспирантов и студентов: Тезисы докладов. -М.: МГУИЭ, 1998-с. 38.

7. Н. В. Зябрева, А. Н. Поляков, В. В. Бирюков, Е. П. Исакова. Пути повышения эффективности процесса биоконверсии целлюлозосодержащих отходов в этанол. / Техника и технология экологически чистых производств. II международный симпозиум молодых ученых, аспирантов и студентов: Тезисы докладов. -М.: МГУИЭ, 1998 - с. 39.
8. Н. В. Зябрева, А. Н. Поляков, В. В. Бирюков. Утилизация промышленных отходов, содержащих целлюлозу. / Техника и технология экологически чистых производств. II международный симпозиум молодых ученых, аспирантов и студентов: Тезисы докладов. -М.: МГУИЭ, 1998 - с. 39-40.
9. Н. В. Зябрева, А. Н. Поляков, Е. П. Исакова, В. В. Бирюков. Утилизация целлюлозосодержащих отходов в экологически чистом процессе биоконверсии термофильными анаэробами. / Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов. Международная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов: Тезисы докладов. - М.: РХТУ, 2000 – с. 119-120.
10. Н. В. Зябрева, Е. П. Исакова, А. Н. Поляков, В. В. Бирюков. Совершенствование технологии прямой биоконверсии целлюлозосодержащих отходов в этанол. / Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов. Международная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов: Тезисы докладов. - М.: РХТУ, 2000 – с. 129-130.
11. Н. В. Зябрева, Е. П. Исакова, А. Н. Поляков, В. В. Бирюков. Рациональное использование возобновляемых ресурсов для получения ценных продуктов в экологически чистом процессе. / Инженерная защита окружающей среды. IV международная конференция и международный симпозиум молодых ученых, аспирантов и студентов: Тезисы докладов. -М.: МГУИЭ, 2001 - с. 87-89.



Зябрева Н.В. Прямая биоконверсия целлюлозосодержащих материалов термофильными анаэробами.

Автореф. дисс. канд. тех. наук: 03.00.23;-М., 2001.- 24-стр.

Подписано к печати 02.10.2001г. Формат А5. Зак. 209

Бумага тип. Печать ризогр. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии ООО «Континенталь - М»

111394, г. Москва, ул Перовская, 65.