



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
•Experimental and Theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 3 (61), 2009

РАЗЛОЖЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО ЛИГНИНА АЛКАЛОФИЛЬНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS SP. A5*

Р.В. ПАРОНЯН

Институт зоологии НАН РА
ЗАО “ НИИ Биотехнологии ”, Ереван

Из почвенного образца, взятого из бассейна оз. Севан (с. Еранос), выделен алкалофильный, лигнинолитический бациллярный штамм, обозначенный как *Bacillus sp. A5*, способный расти на синтетической среде (рН 10,5) с полученным из пшеничной соломы щелочным лигнином (1,2 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Исследовано разложение щелочного лигнина штаммом *Bacillus sp. A5* при двух значениях содержания лигнина в питательной среде - 0,5 и 1,25 г/л. Показано, что при содержании лигнина 0,5 г/л в среде разлагается 50 % лигнина, а при 1,25 г/л - 30 %.

Пшеничная солома - лигнин - разложение - алкалофильный штамм - Bacillus sp. A5

Սևանա լճի ավազանից (գյուղ Երանոս) վերցված հողի նմուշից անջատված է ալկալոֆիլ, լիգնինոլիտիկ բացիլյային շտամ, որը անվանվել է *Bacillus sp. A5*: Շտամը աճում է սինթետիկ միջավայրում (рН 10,5), որը որպես ածխածնի և էներգիայի միակ աղբյուր պարունակում է ցորենի ծղոտից անջատված հիմնային լիգնին (1,2 գ/լ): Հետազոտված է հիմնային լիգնինի (0,5 և 1,25 գ/լ) քայքայումը սննդային միջավայրում *Bacillus sp. A5* շտամի ներգործությամբ: Ցույց է տրված, որ սննդային միջավայրում հիմնային լիգնինի 0,5 և 1,25 գ/լ պարունակության դեպքում վերջինիս քայքայման խորությունը կազմում է համապատասխանաբար 50 և 30 %:

Ցորենի ծղոտ - լիգնին - քայքայում - ալկալոֆիլ շտամ - Bacillus sp. A5

Alkaliphilic, ligninolytic bacillary strain designated as *Bacillus sp. A5*, was isolated from the soil sample taken from Lake Sevan basin (Yeranos village). It is able to grow in the synthetic medium (рН 10.5) with isolated from wheat straw alkaline lignin (1.2 g/l), as sole source of carbon and energy.

Degradation of the alkaline lignin by *Bacillus sp. A5* strain was investigated at two values of lignin content in the nutrient medium: 0.5 and 1.25 g/l. It was shown that 50% of lignin was degraded, at lignin content 0.5 g/l in the medium, and 30 % of it- at that of 1,25 g/l.

Wheat straw - lignin - degradation - alkaliphilic strain - Bacillus sp. A5

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекают проблемы, связанные с глобальным потеплением и ожидаемым истощением ископаемых источников энергоносителей. В связи с этим биотехнологические процессы, направленные на снижение выбросов CO₂, основанные на разложении возобновляемых лигноцеллюлозных субстратов с получением биотоплива, представляют большой интерес [2,14]. Известно, что необходимой стадией в биоконверсии растительной биомассы является её предобработка с целью удаления лигнина, который является серьезным препятствием для эффективного ферментативного гидролиза целлюлозы. Предобработка может осуществляться механическими, химическими и биологическими методами [14]. Механические и химические методы обеспечивают удовлетворительную степень делигнификации, однако дороги и представляют определенную опасность для окружающей среды. В настоящее время внимание исследователей привлекают биологические методы делигнификации с использованием различных микроорганизмов: грибов [17], актиномицетов [13] и бактерий [6,7,11,16]. Предобработка с использованием микроорганизмов отличается высокой эффективностью, низкой стоимостью и экологической безопасностью. Первоначально исследования по биоделигнификации были направлены на использование грибов. Однако грибы не устойчивы к экстремальным условиям, вызванным лимитированием кислорода, высокими значениями температуры и pH. Бактерии отличаются устойчивостью к экстремальным условиям [12,15,18], биохимической многосторонностью и технологичностью в производственных условиях.

Среди наиболее значимых лигноцеллюлозных субстратов выделяется пшеничная солома, ежегодное мировое производство которой составляет свыше 1,4 млрд. т. [10]. Пшеничная солома сортов “Армянка – 60”, “Лютеценс”, “Вагаршапат” и “Безостоя”, производимых в Армении, по нашим данным, содержит в среднем целлюлозы – 41,5 %, гемицеллюлозы – 28,4% и лигнина – 17,6 % .

Поскольку в делигнификации соломы с успехом применяется щелочная предобработка [17], представляет интерес биодегградация лигнина соломы с использованием алкалофильных микроорганизмов, что может повысить степень деградации лигнина. Однако деградация лигнина алкалофильными микроорганизмами пока мало исследована [12,15,18].

Цель настоящей работы – выделение из почвенных образцов алкалофильной лигнинолитической бактерии и исследование биоразложения щелочного лигнина, выделенного из пшеничной соломы.

Материал и методика. Из почвенного образца, взятого из бассейна оз. Севан (с. Еранос), непосредственным высевом на агаризованные среды и методом накопительных культур был выделен алкалофильный штамм, способный расти на синтетической среде (pH 10,5) со щелочным лигнином (1,25 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Штамм обозначен как *Bacillus sp.* A5.

Культивирование *Bacillus sp.* A5 проводили в 250 мл колбах Эрленмейера с 50 мл среды перемешиванием на лабораторной качалке (200 об/мин), при температуре 28-30⁰ и pH 10-11. Состав питательной среды (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 0,75; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,2; NaCl – 2,0; Na₂CO₃ – 2,0; пептон – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,05; лигнин – 0,5 и 1,25. Посевной материал выращивали на среде состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 0,75; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄ и 7H₂O – 0,2; NaCl – 2,0; Na₂CO₃ – 2,0; пептон – 0,1; дрожжевой экстракт – 0,1; глюкоза – 5,0. Посевной материал добавляли к питательной среде (ПС) в количестве 5 мл.

Концентрацию биомассы определяли весовым методом. Культуральную жидкость (КЖ) фильтровали под вакуумом через микрофильтрационную мембрану марки МФФК-4. Мембрану с биомассой высушивали до постоянного веса при 105° .

Лигнин для использования в качестве источника углерода получали щелочной обработкой измельченной пшеничной соломы [4].

Содержание лигнина в КЖ определяли при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра СФ-46. Для этого использовали фильтрат КЖ. Анализ проводили следующим образом. Сначала соляной кислотой из фильтрата осаждали лигнин для освобождения от феноловых соединений, образующихся при разложении лигнина [7] и мешающих анализу. Для этого 1мл фильтрата переносили в пробирку, добавляли 1мл 1N HCl. Далее пробирку с раствором выдерживали в течение 10 мин в кипящей воде, в результате чего лигнин выпадал в осадок. Осадок лигнина отделяли от раствора вакуум-фильтрованием через мембранный фильтр марки МФФК-4, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции фильтрата, затем растворяли в 10 мл горячего раствора 1N NaOH. После растворения осадка и фильтрации фильтр промывали 10 мл 0,1N раствора NaOH. Полученный раствор лигнина и промывные воды переносили в мерную колбу объемом 50 мл и дистиллированной водой доводили до метки. Для калибровки использовали стандартный раствор щелочного лигнина, обработанный аналогичным способом.

Результаты и обсуждение. Штамм *Bacillus sp. A5*, выращенный на агаризованных средах Horikoshi [5] и модифицированной среде Horikoshi с лигнином (1,25 г/л) в качестве единственного источника углерода, характеризуется обильным ростом с желтым блестящим цветом. Культура представляет собой грамположительные, спорообразующие подвижные палочки. *Bacillus sp. A5* растет в интервале значений pH 7–11 и температур 22–42 $^{\circ}$ с оптимальным ростом при pH 10,5 и 30 $^{\circ}$. Каталазный тест у штамма A5 положительный.

Динамика накопления биомассы и разложения лигнина при его содержании в ПС 0,5 г/л приведена на рис.1.

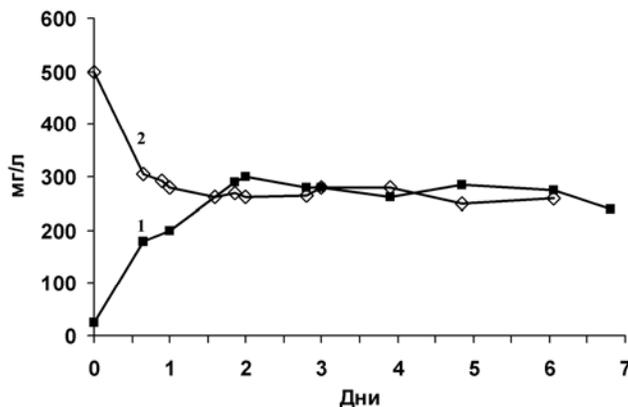


Рис. 1. Динамика разложения лигнина (2) и накопления биомассы (1): Представлены средние значения результатов трех измерений.

Как видно из рисунка, после первого дня разложение лигнина значительно замедляется, а через 1,5 дня содержание лигнина в КЖ доходит до уровня, который до конца опыта практически не меняется. К концу второго дня культура переходит в стационарную фазу, а после шестого дня - в фазу отмирания. Соотношение биомасса/субстрат достигает значения 0,6. В этих условиях штамм *Bacillus sp. A5* разлагает 50% щелочного лигнина.

Штамм *Bacillus sp. (ITRC-S8)*, выделенный из отходов бумажной фабрики [7], разлагает 65,58 % крафт-лигнина (КЛ), при его содержании в ПС 500 мг/л¹ вместе с 1 % глюкозы и 0,5 % пептона, в течение 144 ч при температуре 30⁰, pH 7,6 и перемешивании 120 об/мин. Однако в отсутствие глюкозы и пептона штамм не способен утилизировать КЛ. Можно полагать, что добавление глюкозы и пептона в ПС штамма *Bacillus sp. A5* повысит его эффективность, однако для сравнения со штаммом ITRC-S8 необходимо заменить в ПС штамма A5 щелочной лигнин на КЛ твердого отхода производства бумаги сульфатным методом [9].

В работах [12,18] сообщается о биодegradации лигнина пшеничной соломы алкалофильным, лигнинолитическим, неидентифицированным штаммом No 6. При температуре 37⁰ и pH 10,5 в течение 10 дней разлагается 49,84 % лигнина. Однако из приведенных данных неясно, какая часть лигнина разлагается микробиологически и какая химически, поскольку щелочная обработка пшеничной соломы один из методов выделения лигнина из соломы. Исходя из изложенного, проведение работ по биодegradации лигнина пшеничной соломы штаммом *Bacillus sp. A5* представляет интерес.

На рис.2 приведены динамика накопления биомассы при содержании лигнина в ПС 1,25 г/л, а также расчетная кривая разложения лигнина. Текущие концентрации лигнина рассчитаны с учетом литературных данных, согласно которым усредненное содержание углерода в биомассе микроорганизмов и в лигнине составляет 50 % и 62% соответственно [1,3]. В данном случае культура переходит в стационарную фазу к концу третьего дня. Соотношение биомасса/субстрат достигает значения 0,4. Это соответствует 30% разложенного лигнина, что на 20 % ниже, чем в случае содержания щелочного лигнина в ПС 0,5 г/л. Это может быть связано с неполноценностью ПС.

Очевидно, что на следующем этапе работы необходимо проводить оптимизацию ПС, выбор косубстратов и оптимальных условий ферментации.

Таким образом, из почвенного образца выделен алкалофильный, лигнинолитический бациллярный штамм, обозначенный нами *Bacillus sp. A5*. Штамм способен расти на синтетической среде (pH 10,5) со щелочным лигнином в качестве единственного источника углерода и энергии.

Исследовано разложение щелочного лигнина штаммом *Bacillus sp. A5* при двух значениях содержания лигнина в питательной среде: 0,5 и 1,25 г/л. Показано, что при содержании лигнина 0,5 г/л в среде разлагается 50 % лигнина, а при 1,25 г/л – 30 %. Соотношение биомасса /субстрат достигает значения 0,6 и 0,4 соответственно.

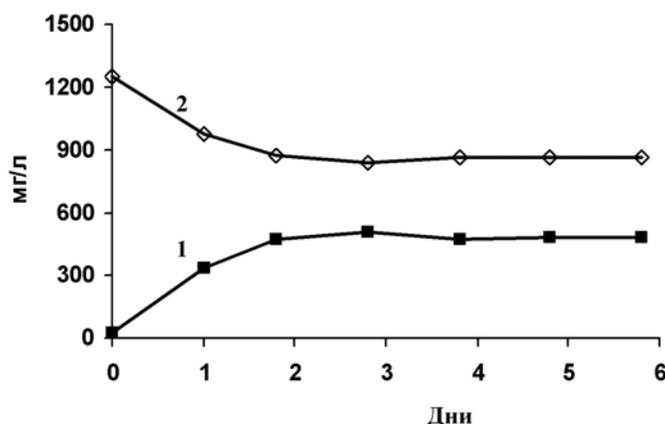


Рис. 2. Динамика накопления биомассы (1) и расчетная кривая разложения лигнина (2).

Автор выражает искреннюю благодарность кандидату биологических наук О. А. Паносяну за ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние условий культивирования на активность продуцентов. Рига, «Зинатне», 37, 1980.
2. Дебабов В.Г. Биотехнология.1, 3-14, 2008.
3. Никитин В.М., Оболенская А.В., Щеголев В.П. Химия древесины и целлюлозы. М., «Лесная промышленность», 443, 1978.
4. Роговин З.А. и Шорыгина Н.Н. Химия целлюлозы и ее спутников. М., «Лесная промышленность», 571, 1953.
5. Каталог культур микроорганизмов. Ереван, «Гитутюн», 204, 1996.
6. Abd-Elsalam H. E. and El-Hanafy A. A. American–Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5, 1, 39 – 44, 2009.
7. Chandra R., Sing Sh., Reddy M.M. Kr., Patel D. K., Purohit H. J. and Kaplay A. J. Gen. Appl. Mikrobiol., 54, 399 – 407, 2008.
8. Donnison A.M., Brockelsby C.M., Morgan H.W, Daniel R.M. Biotechnology and Bioengineering. 33, 1495–1499, 1989.
9. <http://www.compuart.ru>
10. <http://www.csl.gov.uk/ienica/data/wheat.htm>
11. Kumar L., Rathore V., Srivastava H. Indian J. Exp Biol, 39, 6, 584–589, 2001.
12. Luo Y., Zhang I., Gong L., Guan X. Huan Jing Ke Xue, 22, 5, 95–98, 2001.
13. McCarthy A. J., FEMS Microbiology Letters, 46, 2, 145–163, 2006.
14. Szczodrak J. Biotechnology and Bioengineering. 32, 771–776, 1988.
15. Toky Noko. J. Biotechnology. 31, 93-98, 1993.
16. Yang J-s., Liu W., Ni J-r., Chinese J. Environ. Sci., 27, 5, 981-985, 2006.
17. Zayed G., Meyer O. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 551-555, 1999.
18. Zhang J., Gong L., Luo Y., Xu W., Ling J. Chinese J. Environ. Sci. 23, 1, 70-73, 2002.

Поступила 03.04.2009.