

Применение микроскопических грибов для извлечения гемицеллюлоз из отходов сельского хозяйства и деревоперерабатывающей промышленности

А.Д. Буракаева, к.б.н., А.В. Филиппова, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ, Б.Х. Мухсинова, к.б.н., ФГБОУ ВО Башкирский ГУ; З.А. Ахметова, ООО «Югра-нефтегазпроект»

В настоящее время проблема утилизации сельскохозяйственных отходов стоит наиболее остро в связи с необходимостью предотвращения загрязнения окружающей среды. В то же время известно, что растительные отходы являются источниками биополимеров полисахаридного состава, витаминов, микроэлементов. Одними из основных полисахаридов растительной клеточной стенки являются гемицеллюлозы (ГМЦ). Эта группа полисахаридов отличается от целлюлозы большей гидролизуемостью в кислотах и растворимостью в водных растворах щелочей. В зависимости от моносахаридного состава гемицеллюлозы делят на три группы: ксиланы ($C_5H_8O_4$)_n, галактаны ($C_6H_{10}O_5$)_n и глюкоманнаны, которые состоят из сополимеров, то есть смешанных полисахаридов. Главным источником ксиланов служат злаки, пшеничная и овсяная солома, кукурузные початки и отруби. Источником глюкоманнанов являются голосеменные растения, в меньшей степени древесина покрытосеменных. Арабаногалактаны в наибольшем количестве встречаются в древесине лиственниц и других хвойных растений, причём они растворимы в воде [1].

Гемицеллюлозы являются незаменимым питанием для сапрофитной микрофлоры кишечника. К её основным функциям относятся также связывание воды, катионов, холестерина, желчных кислот, токсических и лекарственных веществ. Полисахариды гемицеллюлозы оказывают влияние на качество фруктовых, виноградных, овощных соков, формируя гели, они способны структурировать пищу. Гемицеллюлозу используют в качестве клеящих материалов, а также существуют лаки и краски на основе гемицеллюлозы или её производных. Многотоннажные растительные отходы в последнее время рассматриваются как перспективное сырьё для получения гемицеллюлоз [2].

Традиционная технология извлечения гемицеллюлоз включает обработку сырья сильными щелочами. Она имеет высокую энергоёмкость. Использование высококонцентрированных щелочей в качестве экстрагентов приводит к омылению сложноэфирных группировок полисахаридов, ведёт к снижению молекулярной массы полимера вследствие его деградации по редуцирующим группам, также создаёт дополнительную нагрузку окружающей среде.

Как известно, ферменты, которые катализируют процесс гидролиза растительных полисахаридов, называют целлюлазами и гемицеллюлазами и относятся к карбогидразам, являются промышленно важными микробными ферментами [3]. В настоя-

щее время большое внимание уделяется проблеме биоконверсии и, в частности, биодegradации одного из самых устойчивых к химическому микробиологическому разложению биополимера – лигнина. Лакказы – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, катализирует ряд реакций окисления ароматических и неароматических соединений, в том числе и лигнина [4]. Ранее нами установлено, что культуры микроскопических грибов рода *Hypomyces* в процессе роста на растительных отходах продуцируют комплекс карбогидраз и лакказ [5, 6].

Цель настоящей работы – изучить возможности использования частичной биодegradации растительных отходов агропромышленного комплекса и деревоперерабатывающей промышленности под воздействием ферментных систем, продуцируемых микофильными грибами рода *Hypomyces*, для дальнейшего выделения гемицеллюлоз, что значительно снижает потребность в использовании более концентрированных щелочей.

Материал и методы исследования. В работе использовали микофильные грибы *Hypomyces rosellus* (ВКПМ F-242) и *Hypomyces aurantius* (Fr), *Hypomyces odoratus* Arnold из коллекции микроорганизмов кафедры низших растений Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Выращивание грибов проводили в пробирках со скошенным сусло-агаром при температуре 24–26°C в течение 7–10 сут. В качестве посевного материала использовали двух-трёхсуточный мицелий грибов, выращенный на жидкой среде с суслем 40 по Баллингу, который вносили в количестве 5% по объёму. В качестве минерального фона использовали компоненты среды Чапека–Докса в присутствии 5–10% древесно-растительного материала. Культивирование грибов вели глубинным и поверхностным способом [7].

Сырьём для выделения гемицеллюлоз, как химическим способом, так и после предварительной обработки культурами микроскопических грибов, служили свекловичный жом, кукурузные стержни, хвойные и берёзовые опилки. Извлечение гемицеллюлозы вели традиционным способом [8]. Полноту извлечения проверяли путём осаждения фракций А и Б соответственно, уксусной кислотой и этанолом. ГМЦ А осаждали подкислением экстракта уксусной кислотой до pH=4,4. Для более полного осаждения раствор с осадком оставляли в холодильнике на 3–4 часа. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием. ГМЦ Б осаждали этиловым спиртом 96% в соотношении 1:2. Гемицеллюлозы А и Б промывали несколько раз 70- и 96-процентным этанолом. После этого проводили диализ в течение двух суток и препараты высушивали в эксикаторе. Исследуемые фракции гидролизovali 2-процентным HCl при модуле 1:100 и температуре кипения этого раствора. Моносахаридный состав определяли с помощью бумажной и тонкослойной хроматографии, используя систему растворителей: бутанол – пиридин – вода (6:4:3) [9, 10].

Результаты исследования. Из свекловичного жома гемицеллюлозы выделяли до и после предварительной обработки культурами микроскопических грибов. Как видно по рисунку 1, для полной экстракции гемицеллюлоз химическим способом из свекловичного жома оказалось недостаточно 10-процентной концентрации щёлочи. После ферментативной обработки и последующей экстракции щёлочью основная масса гемицеллюлоз извлекалась уже под воздействием низких концентраций щелочей, например 1- и 5-процентным NaOH. Выход гемицеллюлоз достигал 22–23%.

На рисунках 2–4 представлены результаты по суммарному выходу трудноизвлекаемых гемицеллюлоз из кукурузных стержней, берёзовых и хвойных опилок после культивирования на них микроскопических грибов. Согласно литературным данным, из кукурузных кочерыжек извлекается до 35% гемицеллюлоз, причём в стержнях початка кукурузы преобладают трудноизвлекаемые гемицеллюлозы и экстракцию рекомендуют вести 18-процентной щёлочью. В результате предварительной обработки биомассой грибов нам удалось извлечь значительное количество трудноизвлекаемых гемицеллюлоз под воздействием 1-процентного NaOH, а максимальное количество получить 5-процентным раствором щёлочи.

В результате модификации традиционного метода извлечения гемицеллюлоз путём предварительной обработки берёзовых опилок биомассой микроскопических грибов выделили до 6,6% гемицеллюлоз 1-процентным щелочным раствором, до 36% – 5-процентным и около 4,9% – 10-процентным раствором NaOH. Общий выход гемицеллюлоз из берёзовых опилок составил 40,2%. Выделение гемицеллюлоз из хвойных опилок вели аналогично выделению из берёзовых опилок. Суммарный выход гемицеллюлоз из хвойных опилок составлял не более 22%, что подтверждается данными ряда исследователей.

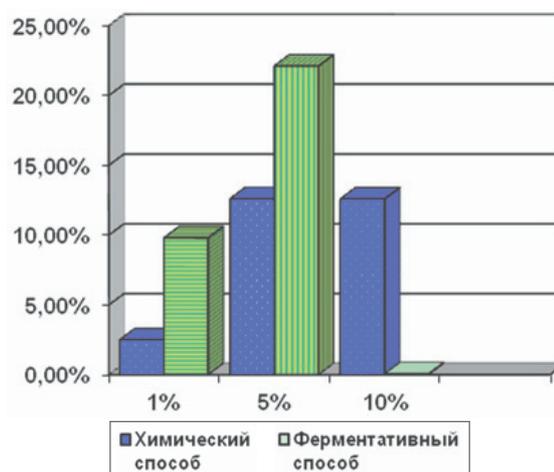


Рис. 1 – Сравнительный анализ выхода ГМЦ из свекловичного жома химическим способом до и после ферментативной обработки

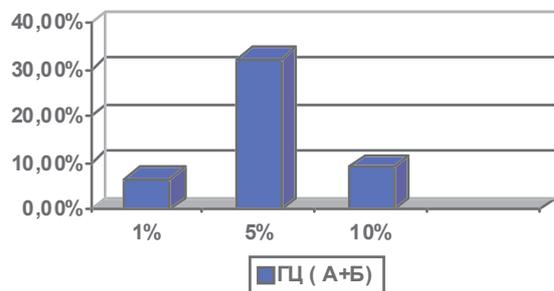


Рис. 2 – Выход ГМЦ из стержней кукурузы после сокультивирования

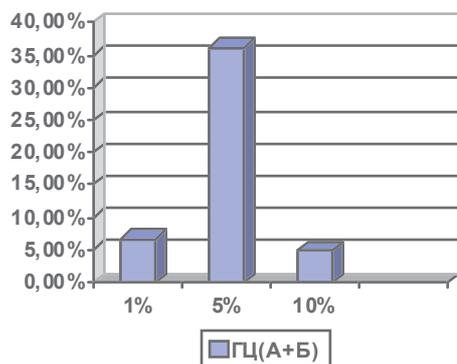


Рис. 3 – Выход ГМЦ из берёзовых опилок после сокультивирования

В дальнейшей работе мы исследовали моносахаридный состав выделенных гемицеллюлоз и выявили, что во всех фракциях присутствует ксилоза (табл.). Простые сахара, в частности гексозы и пентозы, имеют практическую значимость и могут использоваться для производства кормовых белковых препаратов в кормопроизводстве, для получения ксилита, фурфурола, этанола, биогаза и других продуктов микробиологического синтеза.

Вывод. В результате нашего исследования был модифицирован метод извлечения гемицеллюлоз и простых сахаров из растительного сырья путём предварительной обработки микроскопическими грибами рода *Hypomyces* – продуцентами карбогидраз и лакказ. В результате выделения гемицеллюлоз по данной методике не происходит деструкции макромолекулы, что характерно при химическом выделении. Проведённое нами исследование может представлять практический интерес для создания не только экологически безопасных способов утилизации растительных отходов, но и для более эффективного извлечения гемицеллюлоз для промышленных нужд.

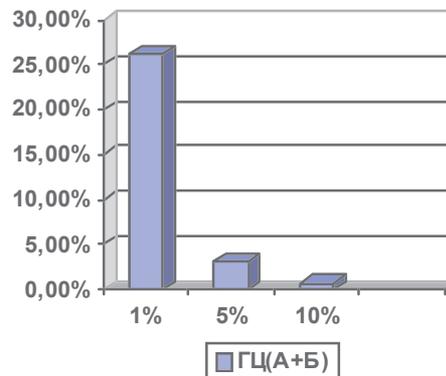


Рис. 4 – Выход ГМЦ из хвойных опилок после сокультивирования

Моносахаридный состав гемицеллюлоз из кукурузных стержней

Субстрат	Бумажная хроматография	Тонкослойная хроматография
Кукурузные стержни 1-процентного раствора NaOH	ксилоза, глюкоза	ксилоза, глюкоза,
Кукурузные стержни 5-процентного раствора NaOH	ксилоза	ксилоза, арабиноза,
Кукурузные стержни 10-процентного раствора NaOH	арабиноза, ксилоза	арабиноза, ксилоза

Литература

1. Азаров В.И., Буров А.В., Оболенская А.В. Химия древесины и синтетических полимеров: учебник для вузов. СПб.: СПбЛТА, 1999. 628 с.
2. Фенгел Д., Вегнер Г. Древесина: химия, ультраструктура, реакции. М.: Лесная промышленность, 1988. 512 с.
3. Соловьёва И.В., Окунев О.Н., Вельков В.В. и др. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 172–178.
4. Никитина О.В., Шлеев С.В. Горшина Е.С. и др. Выделение и очистка ферментов лигнолитического комплекса базидиального гриба *Trametes Pubescens* и исследование их свойств // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 11. С. 1548–1555.
5. Буракаева А.Д. Скрининг микофильных грибов с гидралазной и лакказной активностью // Образовательная среда сегодня и завтра: матер. VIII Междунар. науч.-практич. конф. М., 2013. С. 317–319.
6. Буракаева А.Д., Левин Е.В. Использование микофильного гриба *Hypomyces rosellus* для получения гидролитических ферментов на углеводсодержащих средах // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 1 (1761). С. 124–126.
7. Грачёва И.М., Грачёв Ю.П., Мосичев М.С. и др. Лабораторные работы по технологии ферментных препаратов. М.: Лесн. и пищ. промышл., 1982. 240 с.
8. Шарков В.И., Куйбина И.И. Химия гемицеллюлоз. М.: Лесн. и пищ. промышл., 1972. 440 с.
9. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение. 1982. 311 с.
10. Дроздова И.Л. Выделение и химическое изучение полисахаридов травы донника рослого (*Melilotus altissimus thuil*) // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2004. № 1. С. 173–175.