

Российская академия наук
Уральское отделение
Институт экологических проблем Севера

На правах рукописи

Бойцова Татьяна Александровна

**БИОКОНВЕРСИЯ ТЕХНИЧЕСКИХ ЛИГНИНОВ
БАЗИДИАЛЬНЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ**

05.21.03. – технология и оборудование химической переработки
биомассы дерева; химия древесины

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
доктор химических наук
Н.И. Афанасьев
кандидат
сельскохозяйственных наук
Т.Б. Мошкова

Архангельск
2006

Работа выполнена в лаборатории химии лигнина Института экологических проблем
Севера УрО РАН, г. Архангельск

Научные руководители	доктор химических наук Афанасьев Н.И. кандидат сельскохозяйственных наук, доцент Мошкова Т.Б.
Официальные оппоненты:	доктор технических наук, профессор Новожилов Е.В. кандидат химических наук Кочева Л.С.
Ведущая организация	ОАО «Архангельский ЦБК»

Защита состоится «3 марта» 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного
совета Д 212.008.02 в Архангельском государственном техническом университете по
адресу: 1630002, г. Архангельск, наб. Северной Двины, 17

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке технического университета

Автореферат разослан «1» февраля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Т. Э. Скребец

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В процессах химической переработки древесины образуется значительное количество отходов, содержащих лигнин, таких как лигносульфонаты (ЛС), гидролизный лигнин (ГЛ) и другие.

Лигнинсодержащие отходы химической переработки труднодоступны для микробного разложения в природных условиях, скапливаются в больших количествах, загрязняют почву, водоемы и поэтому представляют серьезную экологическую проблему.

В последние годы интенсивно разрабатываются новые направления в биотехнологии переработки лигноцеллюлозных материалов. В связи с этим большое внимание уделяется дереворазрушающим базидиальным грибам. Известно, что эти грибы обладают мощной ферментной системой, с помощью которой разлагают полисахаридные и лигниновые компоненты субстрата. Базидиальные грибы вызывающие белую гниль древесины, использующие углерод лигнина как единственный источник питания, имеют наибольшую перспективу для их промышленного использования.

Изучение биodeградации лигнинсодержащих материалов является актуальным в связи с поиском путей внедрения экологически безопасных биотехнологий в процессах делигнификации древесины, отбели и очистки сточных вод.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые различными исследователями по изучению процессов биопревращения лигнинов с участием базидиомицетов, вопросы рационального использования этой группы микромицетов по прежнему остается предметом дискуссии.

Механизм разрушения лигнинов микроорганизмами, в особенности лигносульфонатов и гидролизного лигнина, сложен и до конца не выяснен. Лигносульфонаты в природных условиях находятся в растворенном в воде состоянии, т.е. биохимические процессы с участием этих соединений протекают в растворах, поэтому изучение физико-химических свойств растворов этого класса лигнинов в условиях биопревращения актуально и позволит получить новые данные о процессе биodeградации.

Методы микробиологической переработки позволяют модифицировать структуру технических лигнинов с получением ряда ценных продуктов, например удобрений или стимуляторов роста растений для сельского хозяйства.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Института экологических проблем Севера УрО РАН по темам: «Структура и свойства технических и модифицированных лигнинов» (№ Госрегистрации 01.960.009723) и «Направленное регулирование свойств лигнинов и вторичных продуктов переработки древесины» (№ Госрегистрации 01.200.110742).

Цель и задачи исследования. Целью данной диссертационной работы является изучение биоконверсии технических лигнинов - водорастворимого (технических

лигносульфонатов) и водонерастворимого (гидролизного лигнина) в условиях жидкофазной и твердофазной ферментации базидиальными микромицетами.

Для достижения цели данной работы были поставлены следующие *задачи*:

– выбрать способ ферментации и изучить влияние различных факторов на биоконверсию водных растворов технических лигносульфонатов микромицетом *Coriolus hirsutus*;

– исследовать изменение функционального состава, молекулярных масс, лигносульфонатов в процессе биоконверсии;

– изучить физико-химические свойства технических и диализованных лигносульфонатов до и после микробиологической обработки;

– оценить биологическую активность различных культур базидиальных микромицетов на субстрате из гидролизного лигнина и подобрать оптимальные условия процесса гумификации гидролизного лигнина с целью получения лигногуминового удобрения;

– оценить стимулирующее влияние биоконвертированных лигносульфонатов на всхожесть семян и рост некоторых растений

Научная новизна работы.

Изучено влияние различных факторов на биоконверсию водных растворов технических лигносульфонатов микромицетом *Coriolus hirsutus*, определены оптимальные условия и выбран способ ферментации лигносульфонатов с применением жидкофазного культивирования с использованием твердого пористого носителя для субстрата. Показано, что изменение коллоидно-химических свойств растворов лигносульфонатов (вязкости, электропроводности и поверхностного натяжения) может служить чувствительным индикатором процессов диализа и биоконверсии. Проанализирована связь функционального состава и физико-химических свойств растворов диализованных и биоконвертированных лигносульфонатов с их молекулярными массами. С применением методов высокочувствительной кондуктометрии и потенциометрического титрования исследованы полиэлектролитные свойства диализованных и биоконвертированных лигносульфонатов. Приведены расчеты молярных масс эквивалентов и чисел фенилпропановых звеньев в полимерной цепи лигносульфонатов и связаны со степенью биоконверсии диализованных лигносульфонатов. На основе изучения поверхностно-активных свойств растворов технических и диализованных лигносульфонатов высказана гипотеза о преимущественном протекании биоконверсии с участием базидиомицетов на межфазовой границе.

Показано, что с помощью биоконвертированных лигносульфонатов и гидролизного лигнина можно повысить фитоактивность органоминеральных удобрений.

Практическая значимость работы.

- Показана возможность получения стимуляторов роста растений путем модификации технических лигносульфонатов при биоконверсии.
- Определены оптимальные условия получения лигногуминовых удобрений на основе биоконверсии гидролизного лигнина.
- Проведено опытно-промышленное испытание лигногуминового удобрения в отделе почвоведения института биологии Коми НЦ УрО РАН и выданы рекомендации на закладку долговременных полевых опытов и проведение наблюдений в режиме мониторинга.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались: на международных конференциях в г. Архангельске (1991, 1997, 1998, 2005); на Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар 2000); II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (г. Казань, 2002); на II и III совещаниях по лесохимии и органическому синтезу (Сыктывкар, 1996, 1998 г.); на международной научной конференции «Перспективы развития естественных наук в высшей школе» (Пермь, 2001 г.); VIII Всесоюзном симпозиуме «Актуальные проблемы теории адсорбционных процессов в пористых структурах» (Москва, 2003 г); II интернациональной конференции «Colloid-2003» (Минск, 2003 г); VIII общеевропейском Симпозиуме EWLP-2004 (Riga, Latvia, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 работ

Автором выносятся на защиту следующие основные положения диссертационной работы:

- Особенности трансформации макромолекулярной структуры, функционального состава, молекулярной массы, физико-химических свойств лигносульфонатов в процессе биоконверсии базидиальным микромицетом *Coriolus hirsutus*
- Влияние условий процесса биоконверсии технических лигносульфонатов на утилизацию органического субстрата в условиях жидкофазного культивирования
- Сравнительная характеристика эффективности базидиальных микромицетов *Coriolus hirsutus*, *Frichoderma sp.*, *F. pinikola* и ассоциации микроорганизмов спонтанно развившихся на гидролизном лигнине на процесс гумификации гидролизного лигнина

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; методической части; экспериментальной части, содержащей 4 раздела; общих выводов; приложения; перечня литературы. Работа изложена на страницах машинописного текста, содержит рисунков и таблиц; приложение включает 5 страниц; библиография содержит 182 наименования.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Дано обоснование актуальности диссертационной работы

Литературный обзор. Дана общая характеристика технических лигносульфонатов и гидролизного лигнина, проведено обсуждение современных представлений о строении, общности и различии свойств этих соединений. Показано, что биоконверсия лигнинсодержащих соединений, включая лигносульфонаты и гидролизный лигнин, - это один из современных методов переработки лигнинов, достоинством, которого по сравнению с химическими, термическими, является его безотходность, высокая эффективность, низкая энергоемкость, а при условии правильного выбора культуры микромицета и высокая селективность.

Рассмотрены различные культуры грибов, относящихся к классу базидиомицетов, как микроорганизмов, оказывающих наибольшее влияние на лигнинный комплекс древесины, основные способы ферментации лигнинсодержащих соединений - жидкофазный, твердофазный.

Отмечено, что по своей природе биоконверсия лигнинсодержащих материалов - это окислительно-восстановительный процесс, сопровождающийся деструкцией компонентов, а в некоторых случаях или на некоторых стадиях - процесс полимеризации.

Показано, что исследование путей процесса биоконверсии и получаемых продуктов является актуальной проблемой для создания биотехнологии и для снижения влияния лигнинсодержащих отходов на окружающую среду.

На основе литературных данных сформулированы цели и задачи исследования.

Методическая часть. Даны характеристики объектов и материалов, приведены методы и методики исследования. Объектами исследования служили: водорастворимый лигнин - технические лигносульфонаты (ЛСТ) Архангельского ЦБК, водонерастворимый - гидролизный лигнин (ГЛ) Архангельского гидролизного завода.

Определение компонентного и функционального составов, потенциометрическое титрование, ХПК, определение вязкости, спектральный анализ проводили по общепринятым методикам.

Определение молекулярных масс проводили методом гель - проникающей хроматографии, фракционирование образцов технических лигносульфонатов осуществляли методом ультрафильтрации и диализа.

Поверхностное натяжение измеряли по методу Вильгельми, электропроводность с использованием моста переменного тока – в ячейке капиллярного типа с постоянной ячейки равной 55,82.

Определение активности базидиальных культур, жидкофазной и твердофазной ферментации лигнинов проводили по оригинальным методикам.

Экспериментальная часть состоит из четырех разделов

1. Биоконверсия технических лигносульфонатов

Для исследований биоконверсии была выбрана чистая культура базидиомицета *Coriolus hirsutus*. Из известных способов культивирования использовали: поверхностное жидкофазное культивирование (ЖФ), глубинное жидкофазное культивирование (перемешивание) (ЖФГ) и поверхностное жидкофазное культивирование в присутствии твердого инертного субстрата (ЖФТ). *Поверхностное жидкофазное культивирование* – процесс, при котором мицелий чистой культуры *Coriolus hirsutus* предварительно выращенный на питательном растворе с агар-агаром развивается на поверхности раствора. *Глубинное жидкофазное культивирование* – процесс с перемешиванием, при котором предварительно выращенный мицелий чистой культуры вносят в объемную фазу раствора ЛС. *Поверхностное жидкофазное культивирование в присутствии твердого инертного субстрата* – процесс, при котором мицелий микрогриба предварительно наращивают на твердом инертном субстрате, с использованием питательных растворов и процесс биоконверсии ЛС происходит на поверхности субстрата и в капиллярах верхней части пористого материала.

Культивирование микромицета *Coriolus hirsutus* проводили в присутствии растворов ЛС с концентрацией 5,0 г/л в течение 10 суток в различных условиях ферментации. Активность деятельности микромицета оценивалась по степени биоконверсии т.е. относительной убыли массы ЛС. Динамика действия микромицета *Coriolus hirsutus* в различных условиях культивирования приведена на рисунке 1.

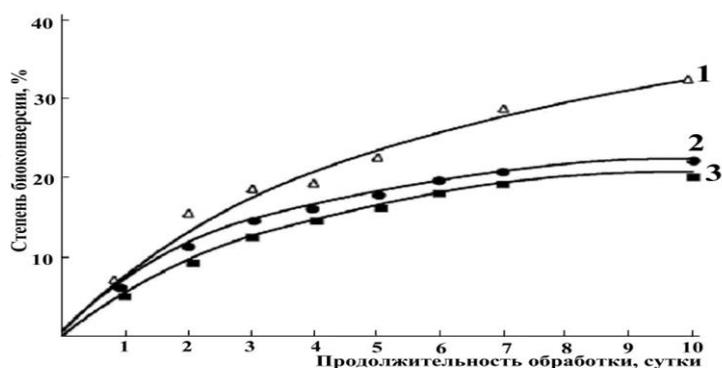


Рисунок 1 – Динамика степени биоконверсии в зависимости от условий культивирования микромицета:
1-Δ ЖФТ; 2- ● ЖФ; 3- ■ ЖФГ

За 10 суток степень биоконверсии составила в варианте глубинной конверсии – 19,6%, в поверхностной культуре – 21,8% и на твердом носителе – 32,5%. В данном варианте развитие гриба происходило на твердом инертном субстрате, при этом мицелий гриба хорошо закреплялся, значительно увеличивалась его поверхность.

Были использованы пористые материалы в качестве носителя для субстрата, с различной природой и характером пор: мелкие закрытые поры (ЖФТ 1), средние по размеру поры (ЖФТ 2) и крупные открытые поры (ЖФТ 3), для сравнения использовали жидкофазное поверхностное культивирование (ЖФ). Активность процесса биоконверсии в данном эксперименте оценивали по относительному изменению концентрации лигносульфонатов в растворе и относительному изменению химического потребления кислорода (ХПК).

Более значительное увеличение относительного изменения ХПК по сравнению с относительным изменением концентрации ЛС свидетельствует о значительной окисленности полученного продукта. Таким образом, по отношению $\Delta\text{ХПК}_{\text{отн.}}/\Delta\text{С}_{\text{отн.}}$, можно судить о степени окисленности биоконвертированных лигносульфонатов. Из рисунка (2) видно, что в биоконверсии с применением материала со средним размером пор (ЖФТ 2) в качестве пористого носителя для субстрата была получена наибольшая степень биоконверсии $\Delta\text{С}_{\text{отн}}$ и наибольшая степень окисленности продукта.

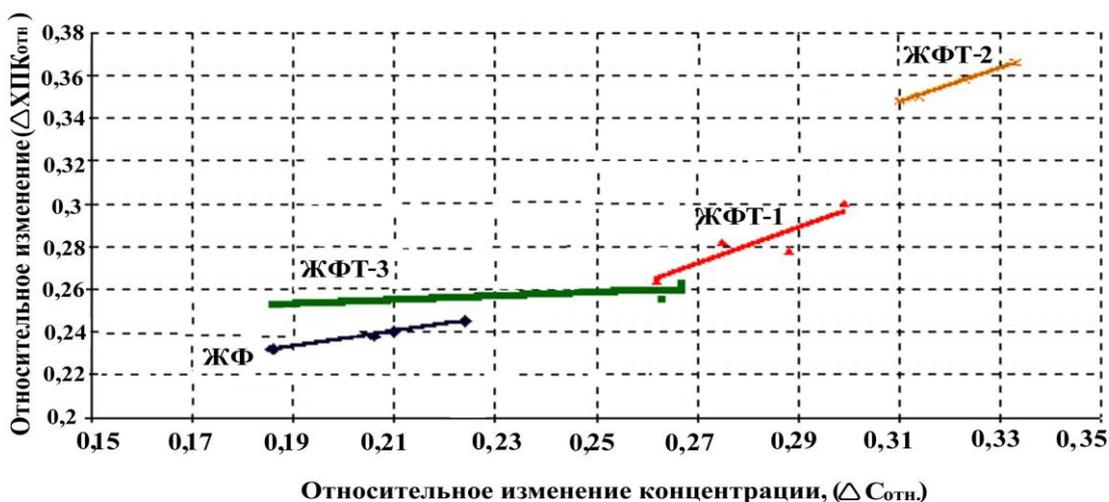


Рисунок 2 - Зависимость относительного изменения ХПК в биоконвертированных ЛС от относительного изменения концентрации ($\Delta C_{отн}$), условий культивирования и вида пористого носителя субстрата

ЖФ	$\Delta XПК_{отн} = 0,342\Delta C_{отн} + 0,168$	$R^2 = 0,995$
ЖФТ 1	$\Delta XПК_{отн} = 0,829\Delta C_{отн} + 0,048$	$R^2 = 0,801$
ЖФТ 2	$\Delta XПК_{отн} = 0,803\Delta C_{отн} + 0,099$	$R^2 = 0,996$
ЖФТ 3	$\Delta XПК_{отн} = 0,096\Delta C_{отн} + 0,205$	$R^2 = 0,527$

В эксперименте по выбору оптимальной концентрации ЛС в растворах исследовали концентрации от 1-200 г/л. Было показано, что микромицет *Coriolus hirsutus* утилизирует лигносульфонаты при всех исследуемых концентрациях (рисунок 3). Однако концентрация выше 50 г/л угнетающе действует на жизнедеятельность микромицета. В растворах с концентрацией 100 и 200 г/л мицелий гриба развивался очень слабо, а иногда совсем погибал. Степень биоконверсии в этих случаях составляла 2,4-1,7%. Таким образом, оптимальными концентрациями для ведения процесса можно считать до 50 г/л.

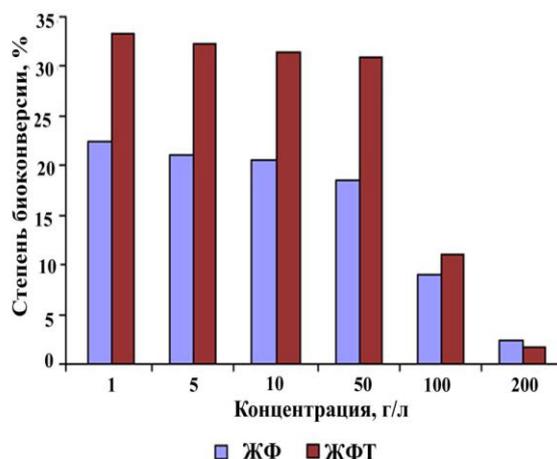


Рисунок 3 - Зависимость степени биоконверсии ЛС от концентрации их в растворах

Также проведены длительные эксперименты биоконверсии (до 50 суток) и было показано, что активное действие микромицета на ЛС наблюдается лишь в первые 10-15 суток процесса (рисунок 4). Дальнейший процесс не приводит к значительной убыли концентрации ЛС.

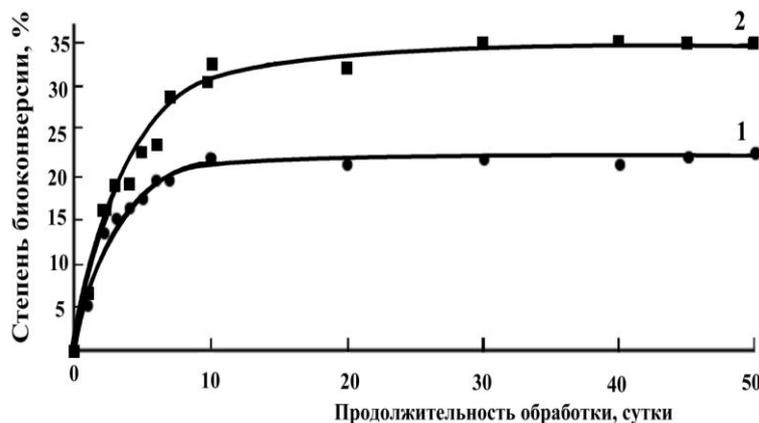


Рисунок 4 - Зависимость степени биоконверсии ЛС от продолжительности микробиологического воздействия 1- ● ЖФ 2- ■ ЖФТ

В эксперименте по определению оптимальных условий биоконверсии, использованы различные рН (2-9) растворов и температуры (4 - 40⁰С). В условиях кислой среды (рН=2) мицелий гриба развивался очень слабо и быстро погибал.

При значениях рН от 4 до 7, степень биоконверсии в температурном интервале 4÷30⁰С повышается, а при 40⁰С наблюдается некоторое снижение. Переход рН среды от слабокислой до слабощелочной приводит к уменьшению степени биоконверсии при всех исследуемых температурах (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние *Coriolus hirsutus* на степень биоконверсии ЛС в ЖФ и ЖФТ от условий культивирования (С=5,0 г/л)

Условия культивирования		Степень биоконверсии, %	
рН	Температура, ⁰ С	ЖФ	ЖФТ
2	4-40	0	0
4	4	13,5	14,7
	20	18,0	23,5
	30	20,2	32,5
	40	17,0	29,6
7	4	10,0	15,1
	20	13,6	23,0
	30	15,8	25,7
	40	12,0	20,9
9	4	8,0	13,2
	20	9,5	15,6
	30	11,0	15,8
	40	9,0	14,6

Оптимальными условиями биоконверсии можно считать условия культивирования микромицета с применением твердого носителя – со средним размером пор, при температуре $\sim 30^{\circ}\text{C}$ в слабокислой среде ($\text{pH}\sim 4$) и концентрации раствора до 50 г/л.

Процесс биоконверсии сопровождается значительным окислением компонентов, с увеличением степени биоконверсии содержание кислородсодержащих функциональных групп закономерно возрастало, наиболее заметным оказалось увеличение содержания ОН-групп при высоких степенях биоконверсии лигносульфонатов (рисунок 5).

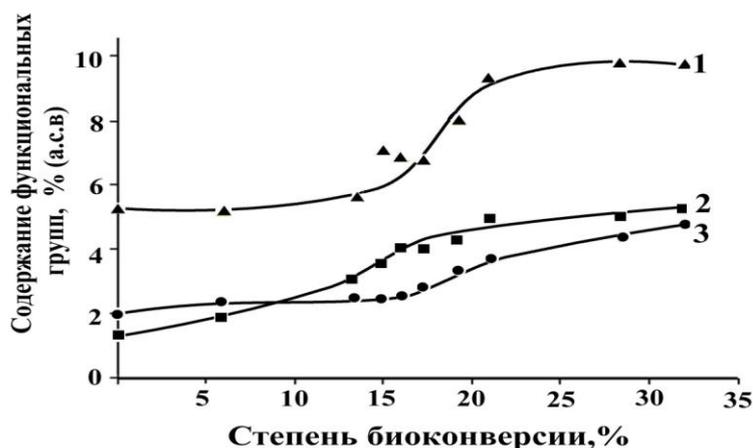


Рисунок 5 - Зависимость содержания функциональных групп в лигносульфонатах от степени биоконверсии микромицетом *Coriolus hirsutus*

1-▲-ОН; 2-■>C=O; 3-●-COOH

Для качественной характеристики полимолекулярного состава лигносульфонатов использовали метод гель – хроматографии. На рисунке 6 представлены гель-хроматограммы исследуемых образцов лигносульфонатов до и после микробиологической обработки. Гель - хроматограмма исходных ЛС имеет два выраженных максимума в высоко- и низкомолекулярной областях. После процесса биоконверсии на гель - хроматограмме максимум в области низкомолекулярной фракции ЛС исчезает. При этом увеличивается доля высокомолекулярной фракции. Т.е., в процессе биоконверсии микромицет преимущественно утилизирует низкомолекулярную фракцию ЛС.

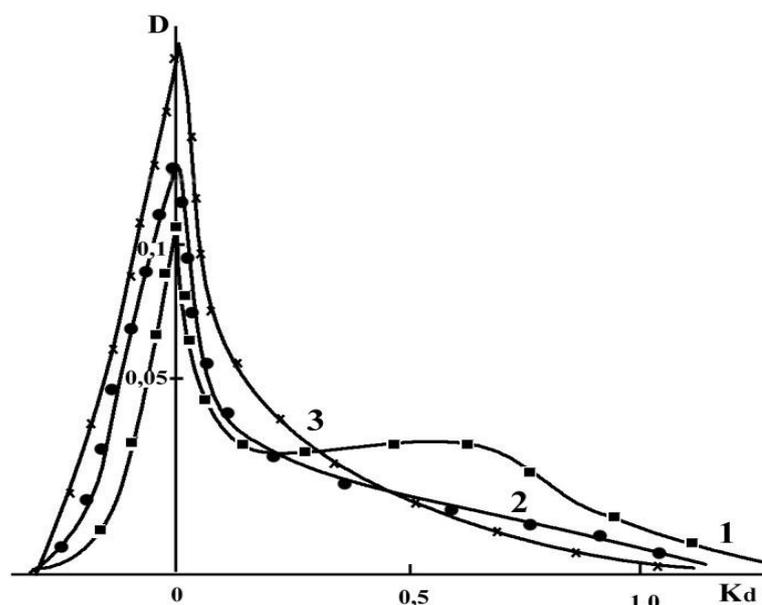


Рисунок 6 – Гель - хроматограммы лигносульфонатов до биоконверсии 1-■;
 после биоконверсии 2- ● ($\gamma = 20,2 \%$); 3- × ($\gamma = 32,5 \%$)

Полученные данные подтверждает эксперимент биоконверсии фракционированных лигносульфонатов с ММ - 116000 - высокомолекулярная и 22000 – низкомолекулярная фракция (таблица 2). Степень биоконверсии образцов низкомолекулярной фракции лигносульфонатов была более значительной. Таким образом, показано, что процесс биоконверсии это окислительный процесс, который сопровождается увеличением среднемассовых молекулярных масс.

Таблица 2. - Характеристика процесса биоконверсии фракционированных лигносульфонатов (продолжительность биоконверсии 15 суток)

Фракция	Способ ферментации	Степень биоконверсии, %	Среднемассовая молекулярная масса
Низкомолекулярная фракция	-	-	22000
	ЖФ	22,5	48000
	ЖФТ	34,5	60000
Высокомолекулярная фракция	-	-	116000
	ЖФ	15,9	145000
	ЖФТ	26,7	160000

2. Исследование биоконверсии диализованных лигносульфонатов

Были исследованы наиболее характерные физико-химические свойства ЛС. Корректное изучение физико-химических свойств возможно на хорошо квалифицированных образцах ЛС. Одним из наиболее эффективных способов подготовки образца (освобождения ЛС от низкомолекулярных составляющих) является диализ. В таблице 3 представлены характеристики образцов технических ЛС и лигносульфонатов подвергнутых диализу (ДЛС).

Таблица 3- Характеристика образцов ЛСТ и ДЛС

Образец	рН	Содержание, %				M _w	РВ, %	Зольность %
		COOH	>C=O	ОН	Общие кислородсодержащие группы			
ЛСТ	4,8	2,0	1,4	5,5	8,9	42000	4,3	17,5
ДЛС	4,2	2,8	1,5	5,4	9,7	60000	0	12,3

В процессе диализа наблюдалось возрастание среднемассовой молекулярной массы, изменение функционального состава, незначительное возрастание содержания кислородсодержащих соединений и снижение рН среды.

Сравнение процесса биоконверсии технических и диализованных лигносульфонатов в сопоставимых условиях показывает (рисунок 7), что они протекают в одинаковом направлении.

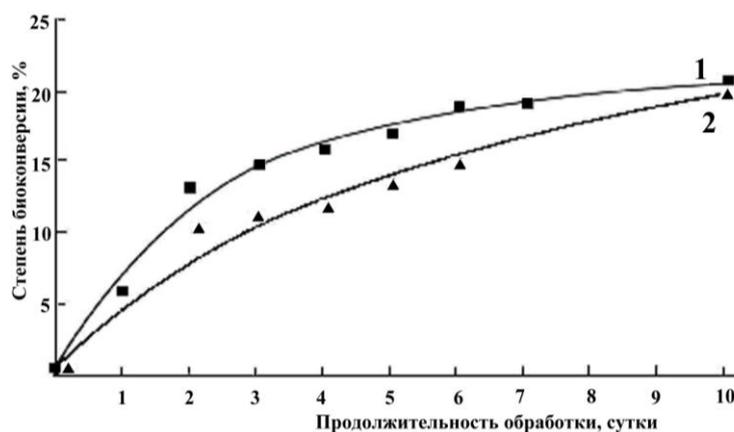
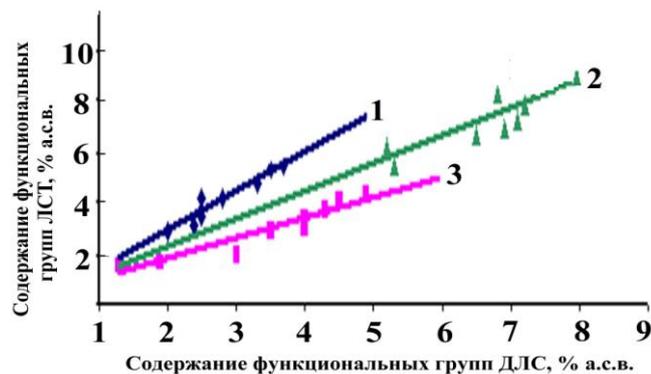


Рисунок 7 - Влияние продолжительности воздействия микромицета *Coriolus hirsutus* на степень биоконверсии лигносульфонатов в условиях жидкофазного культивирования:

1- ■ ЛСТ; 2-▲ ДЛС

Для доказательства этого положения была выявлена корреляция по функциональному составу (рисунок 8) для технических и диализованных лигносульфонатов в процессе биоконверсии.



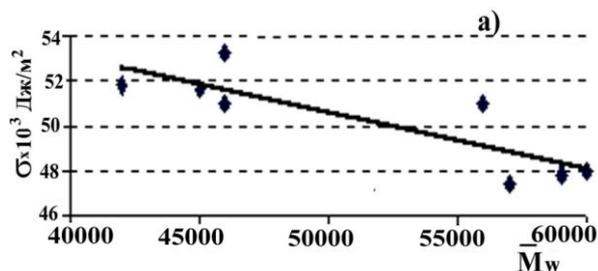
1 -COOH	$C_{\text{ЛСТ}}=1,533C_{\text{ДЛС}}-0,212$	$R^2=0,928$
2 -OH	$C_{\text{ЛСТ}}=1,075C_{\text{ДЛС}}+0,068$	$R^2=0,811$
3 -C=O	$C_{\text{ЛСТ}}=0,807C_{\text{ДЛС}}+0,079$	$R^2=0,921$

Рисунок 8- Корреляция по функциональному составу биоконвертированных технических и диализованных лигносульфонатов

Тот факт, что коэффициенты регрессии корреляционных связей около 0,9, подтверждают мысль, что все сведения о свойствах и закономерностях, получаемые нами по биоконверсии диализованных ЛС могут быть распространены и на закономерности, наблюдаемые с участием технических лигносульфонатов.

Для более полной характеристики процесса биоконверсии были детально изучены электропроводность растворов и поверхностно-активные свойства диализованных и недиализованных лигносульфонатов.

Характер зависимости поверхностного натяжения от молекулярных масс биоконвертированных ЛСТ и ДЛС наглядно прослеживается на рисунке 9 (а, б). С увеличением молекулярных масс для технических и диализованных поверхностное натяжение снижается. Объективной характеристикой определяющей поверхностную активность исследуемых ЛС является содержание сульфогрупп в их составе: чем выше степень сульфирования ЛС, тем выше их поверхностная активность (рисунок 9 в).



$$\sigma = -0,0003M_w + 63,16 \quad R^2=0,71$$

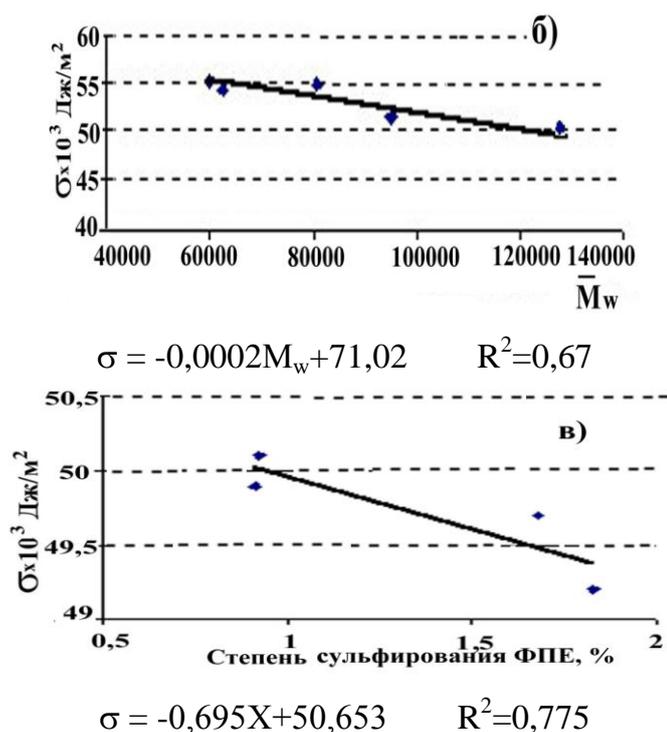


Рисунок 9 - Зависимость поверхностного натяжения биоконвертированных (а) ЛСТ, (б) ДЛС от молекулярных масс, (в) от степени сульфирования ФПЕ

На основании экспериментальных данных рассчитаны коллоидно-химические характеристики адсорбционного слоя (таблица 4) Наиболее наглядной из них является поверхностная активность. Результаты определения показывают, что биоконверсия приводит к росту поверхностной активности ЛС.

Таблица 4 – Коллоидно - химические характеристики адсорбционного слоя водных растворов ЛСТ, ДЛС и БЛС на границе раствор – воздух

Образец	$\sigma \cdot 10^3$ Дж/м ²	$G_m \cdot 10^{-3}$, Дж·м/моль	$\Gamma_m \cdot 10^7$, кмоль/м ²	$C_m \cdot 10^4$, кмоль/л	$S_m \cdot 10^{20}$, м ²	$\delta \cdot 10^{10}$, м
БЛС(М=80000)	39,8	0,71	1,17	0,52	90,4	12,0
ДЛС(М=60000)	42,2	0,58	1,08	0,45	93,0	14,2
ТЛС(М=42000)	46,0	0,54	0,95	0,34	106,0	16,9

σ – равновесное значение поверхностного натяжения, измеренное через 1 сутки;

G_m поверхностная активность;

Γ_m - максимальное значение адсорбции;

C_m .- концентрация насыщения адсорбционного слоя;

S_m - площадь, занимаемая одной молекулой ЛС в адсорбционном слое;

δ -толщина адсорбционного слоя

Лигносультфонаты относят к классу полиэлектролитов. При изучении электропроводности диализованных лигносультфонатов была выбрана чувствительная рабочая ячейка капиллярного типа с высоким значением постоянной ($K=55,82$) и соблюдены все необходимые для эксперимента условия: перевод в H^+ форму; исследование в области низких концентраций раствора; термостатирование.

Доказано, что диализованные макромолекулы ЛС в области средних и высоких концентраций диссоциируют слабо (около 0,05), т.е. находятся преимущественно в молекулярной форме и только при бесконечно высоком разведении растворов степень диссоциации достигает 0,85.

Метод электропроводности был использован для прямого кондуктометрического титрования диализованной лигносультфоновой кислоты. По результатам кондуктометрического титрования растворов биоконвертированных лигносультфонатов (рисунок 10) выделены три сильнокислые ($-SO_3H_{\text{сил}}$) и три слабокислые группы, характерные для $-SO_3H_{\text{слаб.}}$, $COOH$ и $OH_{\text{фен.}}$ функциональных групп. По литературным данным три сильные сультфогруппы относят к α , β , γ - положениям в фенилпропановом звене лигносультфонатов.

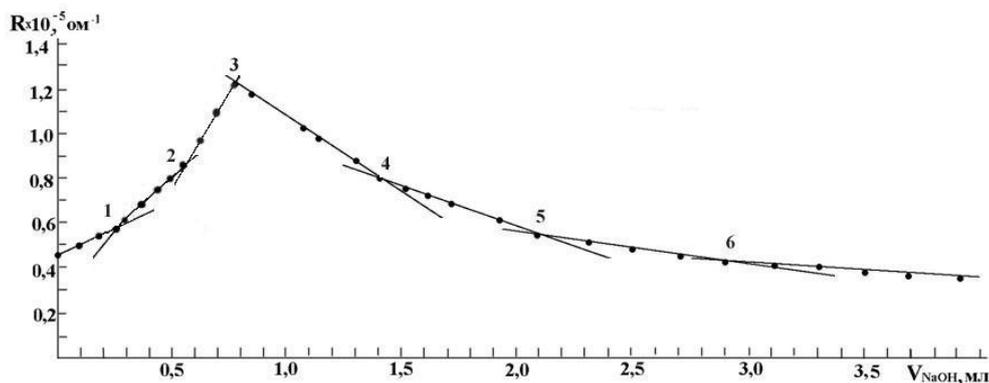


Рисунок 10 - Кондуктометрическое титрование диализованной лигносультфоновой кислоты (из ЛС биоконверсии 5 суток, $M=95000$) раствором 0,1 н NaOH

1,2,3 - $SO_3H_{\text{сильн.}}$; 4 - $SO_3H_{\text{сл.}}$; 5 - $COOH$; 6 - $OH_{\text{фен.}}$

Из полученных расчетных данных следует, что процесс биоконверсии – сложный процесс. В процессе биоконверсии происходит изменение функционального состава ЛС и не только по кислород - углеродсодержащим группам, как это отмечается большинством исследователей этого процесса, но и по серосодержащим группам. Ранее выявленная зависимость содержания органически связанной серы (по данным химического анализа) и содержания сильнокислых $-SO_3H_{\text{сил}}$ (по данным прямого кондуктометрического титрования) от степени биоконверсии лигносультфонатов (рисунок 11) показала, что, по-видимому, сера, как и углерод, выполняет важную функцию в жизнедеятельности микромицета *Coriolus hirsutus*.

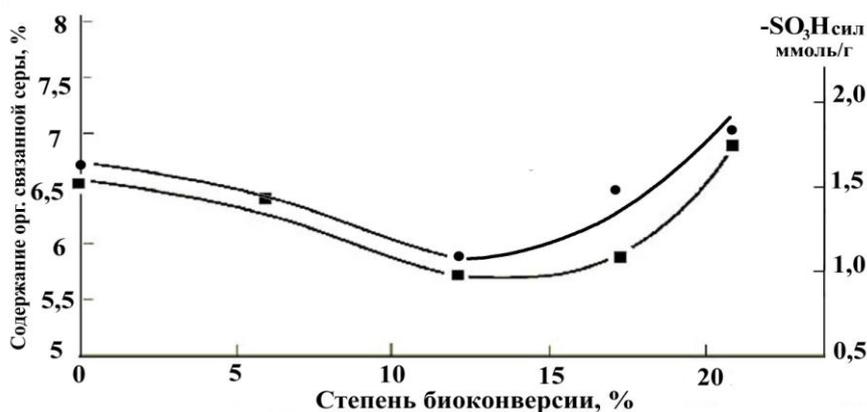


Рисунок 11 – Зависимость содержания органически связанной серы и сильноокислых $-\text{SO}_3\text{H}_{\text{силл}}$ от степени биоконверсии лигносульфонатов:

● - органически связанная сера; ■ $-\text{SO}_3\text{H}_{\text{силл}}$

Проведены расчеты молярных масс эквивалентов относительно суммы сульфогрупп а также количества фенилпропановых звеньев в полимерной цепи лигносульфонатов.

Сопоставление результатов биоконверсии и расчетных значений молярных масс эквивалентов и чисел ФПЕ биоконвертированных диализованных ЛС (таблица 5) показывает, что между ними просматривается связь: с увеличением степени биоконверсии лигносульфонатов значения молярных масс эквивалентов относительно сильноокислых ($\Sigma-\text{SO}_3\text{H}$) групп в молекулах биоконвертированных ЛС уменьшается, соответственно количество фенилпропановых звеньев в макромолекулах возрастает. То есть, биоконверсия лигносульфонатов приводит к кардинальному изменению, как функционального состава, так и к изменению молекулярно - массового распределения.

Таблица 5 - Зависимость значений молярных масс эквивалентов и чисел ФПЕ от степени биоконверсии диализованных ЛС (переведенных в H^+ - форму) по данным прямого кондуктометрического титрования сильноокислых и слабоокислых групп

Продолжительность обработки, сутки	Степень биоконверсии, %	$M_{\text{экв.}}$ -отнесенная к $\Sigma R-\text{SO}_3\text{H}$	Число ФПЕ $_{-\text{SO}_3\text{H}}$	$-\text{SO}_3\text{H}/\text{ФПЕ} \cdot 10^2$ –ммоль
0	0	625	96	1,6
3	12,0	880	91	1,0
5	13,6	540	176	0,9
7	20,2	440	296	0,6
10	20,9	420	300	0,5

На основании изучения поверхностных и объемных свойств растворов можно предположить, что процесс биоконверсии в растворах лигносульфонатов необходимо рассматривать как преимущественно межфазовый процесс.

3. Биоконверсия гидролизного лигнина базидиальными микромицетами

Как отмечалось, вторым, но уже водонерастворимым объектом для изучения возможности биоконверсии отходов выбран – гидролизный лигнин.

Для биоконверсии гидролизного лигнина были выбраны чистые культуры базидиомицетов: *Coriolus hirsutus*, *F. Pinicola*, *Frichoderma* и ассоциация микроорганизмов, спонтанно образующаяся на ГЛ при компостировании (смешанная культура). В качестве контрольного опыта использовали субстрат без засева микроорганизмов.

Активное выделение CO_2 начинается сразу после засева культур. Это показывает наличие в ГЛ компонентов, которые микроорганизмы могут утилизировать без предварительной деградации. Максимальная активность микроорганизмов наблюдалась через 5-6 суток (рисунок 12). В дальнейшем кинетика образования CO_2 приобретает вид затухающих колебаний. Наибольшая активность в исследуемый период отмечалась при действии микромицета *Coriolus hirsutus*. Смешанная культура также активно развивалась и по выделению CO_2 мало отставала от чистых культур. Активность субстрата без засева (контрольный опыт) значительно отставала, по выделению CO_2 и достигала максимума на 10 сутки.

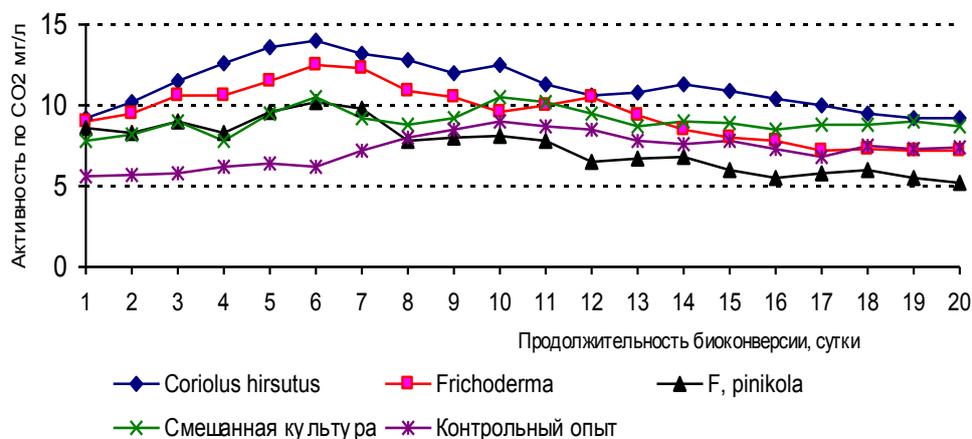


Рисунок 12 – Активность микроорганизмов на субстрате из ГЛ

Активность воздействия микроорганизмов на субстрат подтверждается результатами определения степени биоконверсии образцов. Данные представлены на рисунке 13. За 20 суток степень биоконверсии гидролизного лигнина составила 15,0-22,0%, что значительно выше контрольного опыта (8,0%).

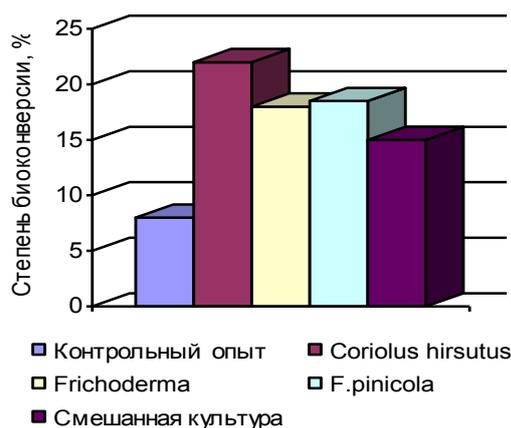


Рисунок 13 – Степень биоконверсии образцов гидролизного лигнина (20 суток) с различными культурами микроорганизмов

Исследовали групповой состав гидролизного лигнина после воздействия микроорганизмов (таблица 6). Различные виды дереворазрушающих микромицетов по-разному влияли на компонентный состав ГЛ.

Таблица 6 – Влияние различных микроорганизмов на компонентный состав гидролизного лигнина в процессе биоконверсии (в течение 20 суток)

Образец	Массовая доля, % (к а. с. в.)				
	Водорастворимые вещества	Смолистые вещества	Целлюлоза	Лигнин	Щелочерастворимые вещества
Исходный ГЛ	1,6	3,2	18,5	74,2	7,4
Контрольный	6,4	3,0	13,5	73,1	15,0
Действие микроорганизмов на субстрат ГЛ					
Смешанная культура	8,9	2,9	11,2	70,4	32,0
<i>Coriolus hirsutus</i>	10,4	2,2	9,8	58,2	29,5
<i>Frichoderma</i>	8,1	2,8	8,5	62,0	28,6
<i>F. Pinicola</i>	8,9	2,8	8,2	68,0	29,5

Наблюдалось увеличение водорастворимых веществ, уменьшение смолистых, лигнина и целлюлозы по сравнению с контрольным опытом. Было установлено, что содержание веществ растворимых в щелочи достигало 32%. Гуминовые вещества определяли как часть щелочерастворимых, во всех образцах наблюдалось значительное увеличение по сравнению с контрольным опытом рисунок 14.

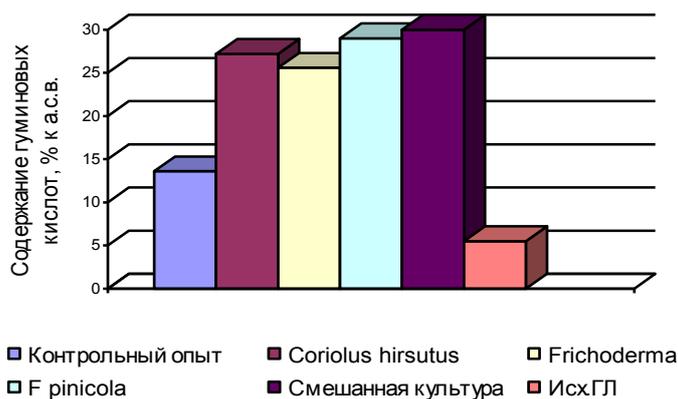


Рисунок 14 - Содержание гуминовых веществ в биоконвертированных образцах ГЛ с различными культурами

Известно что, критерием эффективности органических удобрений из ГЛ является содержание гуминовых веществ.

Для успешного проведения процесса культивирования микроорганизмов на субстрате из гидролизного лигнина в условиях твердофазной ферментации очень важно подобрать оптимальные условия процесса.

Было исследовано влияние температуры, влажности субстрата, количество заправки микроорганизмов и добавки биоэлементов (N, P, K) на процесс гумификации ГЛ.

В проведенных исследованиях было показано, что заправка микроорганизмов из компоста на ГЛ по активности гумификации не уступают чистым культурам дереворазрушающих микроорганизмов, кроме того, в условиях производства поддержание чистой культуры микроорганизмов требует больших затрат и специальных условий процесса, включающих стерилизацию субстрата, аппаратуры и т.д. Были определены оптимальные параметры: влажность субстрата ~ 60-65%, температура 25-30 °С срок выдержки 10 суток, при добавке питательных элементов 1,5-2% N, 0,5% P, 0,5 K % и смешанной культуры 10% к а.с.в.

Разработан способ получения лигногуминового удобрения (ЛГУ), который включает: 1) нейтрализацию гидролизного лигнина; 2) добавление питательных элементов N,P,K; 3) добавку ассоциаций микроорганизмов из компостированного гидролизного лигнина, 4) термостатирование при $t \sim 30^{\circ}\text{C}$.

Полученные ЛГУ содержали 25-30% гуминовых веществ, обладали хорошей однородностью, включали в себя N, P, K в необходимых количествах. Этот способ имеет преимущество перед другими способами получения органических удобрений на основе гидролизного лигнина: более высокое качество продукта (однородность, повышенное содержание гуминовых веществ 25-30%); кратковременность процесса; отсутствие сточных вод.

4. Получение и свойства агрохимических удобрений на основе биоконвертированных технических лигнинов

Установили что наибольший стимулирующий эффект оказывают растворы биоконвертированных ЛС с концентрацией 0,1 г/л, который предположительно объяснили высоким содержанием активных кислородсодержащих групп в ЛС, которые способствовали более быстрому распаду питательных веществ семян и приведению их в формы, необходимые для роста растений и дружного прорастания семян.

Полученное лигногуминовое удобрение содержит 25-30% гуминовых веществ, обладали хорошей однородностью, содержали N, P, K в необходимых количествах. Способ имеет преимущество перед другими способами получения органических удобрений на основе гидролизного лигнина: более высокое качество продукта (однородность, повышенное содержание гуминовых веществ); кратковременность процесса; отсутствие сточных вод.

Проведены лабораторные и полевые опытные испытания лигногуминового удобрения в отделе химии Коми НЦ УрО РАН и получены следующие результаты: предпосевная обработка водной вытяжкой ЛГУ семян овса и гороха увеличивала всхожесть семян овса и гороха на 10-15%. В полевых опытах была установлена эффективность применения ЛГУ на легкосуглинистых почвах. Биомасса гороха и овса существенно увеличивалась на 46-60% по отношению к контролю.

Основные выводы

1. Изучение биоконверсии технических лигнинов позволило установить, что максимальная степень утилизации технических лигносульфонатов в условиях жидкофазного культивирования с использованием пористого носителя достигает 34,5%, гидролизного лигнина в условиях твердофазной ферментации - до 22%.

2. Экспериментально показано, что оптимальными условиями для биоконверсии лигносульфонатов являются: жидкофазное культивирование с использованием пористого носителя для субстрата со средним размером пор, температура 30⁰С, концентрация до 50 г/л, рН =4, продолжительность 10 суток.

3. Установлено, что в процессе биодеструкции наблюдается увеличение содержания кислородсодержащих функциональных групп (карбонильных, карбоксильных, общих гидроксильных групп), серосодержащих групп, повышение молекулярной массы.

4. Биоконверсия лигносульфонатов сопровождается окислительно-восстановительными процессами. Источником питания микромицета *Coriolus hirsutus* является как углерод, так и сера входящая в структурную формулу лигносульфонатов.

5. Показано, что процесс биоконверсии лигносульфонатов протекает на межфазовых границах. При этом биоконвертированные лигносульфонаты характеризуется более высокой поверхностной активностью по сравнению с исходными лигносульфонатами.

6. Выявлена различная биологическая активность базидиальных микромицетов: *Coriolus hirsutus*, *Frichoderma*, *F. pinikola* и ассоциации микроорганизмов, спонтанно развившихся на лигнине, на субстрат из гидролизного лигнина. Показано, что оптимальными условиями гумификации гидролизного лигнина при получении лигногуминового удобрения являются: влажность субстрата ~ 60-65%, температура 25-30⁰С срок выдержки 10 суток, при добавке питательных элементов 1,5-2% N, 0,5% P, 0,5 K % и затравки из биоконвертированного гидролизного лигнина в количестве 10% к а.с. массе.

7. При изучении стимулирующего влияния биоконвертированных лигносульфонатов и гидролизного лигнина на всхожесть семян и рост некоторых культур растений (горох, овес) установлено, что всхожесть семян овса с участием биоконвертированных ЛС улучшается на 20%, гороха на 10%, с участием гидролизного лигнина - для овса на 15%, для гороха на 10%, а возрастание зеленой массы гороха и овса приблизительно на 60% по сравнению с контрольными опытами.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А., Гусакова М.А. Влияние дереворазрушающих микроорганизмов на гидролизный лигнин // В сб. Актуальные проблемы рационального использования природных и энергетических ресурсов Европейского Севера Архангельск 1994.
2. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А. Афанасьев Н.И., Биодеструкция лигносульфонатов / Тезисы докл. науч.-практ. Конф. «Лесохимия и органический синтез». - Сыктывкар, 1996. – С.107.
3. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А., Афанасьев Н.И., / Исследование влияния микромицета *Coriolus hirsutus* на технические лигносульфонаты / Тез. докл. III Международной конф. «Поморье в Баренц регионе» Архангельск, - 1997. С.86.
4. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А., Афанасьев Н.И. Исследование биостимулирующего влияния растворов лигносульфонатов после микробиологической обработки / Тез. докл. конф. Молодых ученых и специалистов «Экология-98», Архангельск, 1998. С.14.
5. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А., Афанасьев Н.И. Влияние различных условий культивирования микромицета *Coriolus hirsutus* на утилизацию лигносульфонатов в водных растворах / Тезисы докл. науч. - практ. Конф. «Лесохимия и органический синтез». - Сыктывкар, 1998. – С.

6. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А. Биотрансформация лигнинсодержащих отходов химической переработки древесины под влиянием дереворазрушающих базидиомицетов // Север: экология. Сб. науч. Труд. Изд. УрО РАН, Екатеринбург, 2000. С.117.
7. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А. Исследование молекулярно-массовых характеристик в процессе биоконверсии микромицетом *Coriolus hirsutus*/ Тез. докл. Всеросс. конф. «Химия и технология растительных веществ», Сыктывкар, 2000 С. 236.
8. Мошкова Т.Б., Макаревич Н.А., Бойцова Т.А. Изменение поверхностно-активных свойств лигносульфонатов в результате биоконверсии / Труд. межд. науч. конф. «Перспективы развития естественных наук в высшей школе» Пермь 2001. С.218.
9. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А. Исследование процесса биоконверсии технических лигносульфонатов базидиомицетом *Coriolus hirsutus* / Материалы II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» Казань 24-27 июня 2002. С.169.
10. Бойцова Т.А., Мошкова Т.Б., Макаревич Н.А., Афанасьев Н.И. /Поверхностно-активные свойства биоконвертированных лигносульфонатов /Экологические проблемы промышленных районов. Сб. матер. Конф. Екатеринбург 2003. С.419.
11. Мошкова Т.Б., Бойцова Т.А., Афанасьев Н.И. Биотехнологические процессы утилизации лигнинсодержащих отходов химической переработки древесины / Экологические проблемы промышленных районов. Сб. матер. конф. Екатеринбург 2003. С.426.
12. Бойцова Т.А., Макаревич Н.А., Афанасьев Н.И., Мошкова Т.Б., Селянина С.Б., Личутина Т.Ф. Адсорбция лигносульфонатов на границе раздела фаз. Матер. VIII Всероссийского симпозиума с участием иностранных ученых. Актуальные проблемы теории адсорбционных процессов в пористых структурах. Москва 2003, С.99.
13. Makarevich N.A., Afanasiev N.I., Boitsova T.A. Colloid-chemical properties of dialyzed lignosulphonates. Short Notes to 11 International Conference "Colloid-2003". /The advances in Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics. Minsk, 2003, S.182.
14. Makarevich N.A., Afanasiev N.I., Boitsova T.A. Surface and Polyelectrolytic Properties of Dialyzed Lignosulphonates / Proceeding of Eighth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp. Riga, Latvia, 2004. P.397-399.
15. Moshkova T.B., Boitsova T.A., Makarevich N.A., Afanasiev N.I. Bioconversion of Lignincontaining Substances by Basidiomycete *Coriolus hirsutus* / Proceeding of Eighth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp. Riga, Latvia, 2004. P.473-476.
16. Makarevich N.A., Afanasiev N.I., Boitsova T.A. Properties of Solutions of dialyzed lignosulphonates / Proceeding of IX International Conference. The Problems of Solvation and Complex Formation in Solutions. Plyos, Russia. 2004. p. 378.

17. Бойцова Т.А., Мошкова Т.Б, Афанасьев Н.И., Макаревич Н.А. Выбор условий культивирования базидиомицета *Coriolus hirsutus* в процессе биоконверсии лигносульфонатов / Междун. Конф. Физико-химия лигнинов. Архангельск 2005 С.142-.
18. Бойцова Т.А., Мошкова Т.Б, Макаревич Н.А., Афанасьев Н.И. Физико-химические свойства растворов технических и биоконвертированных лигносульфонатов / Междун. Конф. Физико-химия лигнинов. Архангельск 2005. С.147-.