

УДК 541.6

## **Aerobic Bioprocessing of Ethanol Lignin from *Abies Sibirica* Wood**

**Ivan P. Ivanov<sup>\*a</sup>, Margarita I. Teremova<sup>b</sup>,  
Anna O. Eremina<sup>a</sup>, Valentina V. Golovina<sup>a</sup>,  
Irina V. Korol'kova<sup>a</sup> and Nikolay V. Chesnokov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS  
FRC "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"  
50/24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

<sup>b</sup>*Krasnoyarsk Science Center SB RAS  
50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

Received 12.01.2017, received in revised form 11.03.2017, accepted 22.04.2017

---

*The influence of the aerobic impact by microscopic fungi (*Penicillium*, *Actinomicetus* and *Aspergillus*), strains of bacterias (*Pseudomonas* sp.; *Agrobacterium* sp.; *Bacillus subtilis*; *Acinetobacter calcoaceticus* BKPIIM B-4833) and mixed cultures of fungi and bacteria on the bioconversion of ethanol-lignin from *Abies Sibirica* wood was studied. The properties of solid products of aerobic impact by these microorganisms on ethanol-lignin were compared.*

*Keywords: ethanol-lignin, bioprocessing, conversion, Abies Sibirica wood.*

*DOI: 10.17516/1998-2836-0022.*

---

© Siberian Federal University. All rights reserved

\* Corresponding author E-mail address: ivanov@icct.ru

## Аэробная биопереработка этаноллигнина древесины пихты сибирской

**И.П. Иванов<sup>а</sup>, М.И. Теремова<sup>б</sup>, А.О. Еремина<sup>а</sup>,  
В.В. Головина<sup>а</sup>, И.В. Королькова<sup>а</sup>, Н.В. Чесноков<sup>а</sup>**

<sup>а</sup>Институт химии и химической технологии СО РАН  
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/24

<sup>б</sup>Красноярский научный центр СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50

---

*Изучено влияние аэробного воздействия древесноразрушающих микроскопических грибов (*Penicillium*, *Aspergillus* и *Actinomicetus*), бактерий (*Pseudomonas* sp.; *Agrobacterium* sp.; *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833) и смешанных культур грибов и бактерий на биоконверсию этаноллигнина, выделенного из древесины пихты сибирской. Проведено сравнение состава полученных твердых продуктов биопереработки этаноллигнина этими микроорганизмами.*

*Ключевые слова: этаноллигнин, биопереработка, конверсия, древесина пихты сибирской.*

---

### Введение

Красноярский край располагает уникальными лесными запасами: покрытая лесами площадь (105,1 млн га) составляет 45 % от всей территории края [1, 2]. Однако при существующих способах переработки древесного сырья в нашем регионе используется в лучшем случае лишь третья часть биомассы дерева [3]. Значителен объем отходов, которые в настоящее время складывают в отвалы или сжигают, что приводит к значительному загрязнению окружающей среды. Поэтому остро стоит вопрос утилизации древесных отходов. В последние десятилетия большое внимание уделяется поиску путей полного и рационального использования всей органической массы древесины.

Одним из способов переработки отходов лесозаготовительных и деревообрабатывающих предприятий может быть микробиологическая деградация растительных материалов, одной из основных частей которых является лигнин [4-7]. Известно, что по сравнению с другими растительными компонентами древесины биодеструкция лигнина протекает наиболее трудно [8, 9]. Биологическими агентами, разрушающими структуру лигнина, могут служить некоторые бактерии, микроорганизмы почвы и воды, дереворазрушающие грибы [8-22].

В [11] показано, что при культивировании микроорганизмов *Pseudomonas. aeruginosa*, *Serrata marcescens*, *Pandora norimbergensis* LD001, *Pseudomonas* sp. LD002 и *Bacillus* sp. LD003 деградация лигнинсодержащих субстратов случается не раньше чем на 4-6 сут. Была обнаружена способность бактерий *Azospirillum brasilense* sp.7 и *Azospirillum brasilense* sp.245 к деструкции лигнина с помощью внеклеточного фермента лигнинпероксидазы, выделенного в чистом виде [12].

Ускоренное разрушение древесных полимеров (на примере древесных опилок) осуществлено в присутствии микромицета *Fusarium sp.* и *Aspergillus fumigatus var. griseobruneus*. При твердофазном культивировании указанных микроорганизмов в течение 8 сут убыль лигнина составила от 9,4 до 10,2 % абс. [13].

В [9 и 14] показано, что базидиомицеты могут иметь высокую способность к глубокому превращению лигнина. Так, при твердофазном культивировании дереворазрушающих грибов (возбудителей «белой гнили») базидиомицетов *Coriolus hirsutus* и *Cerrena maxima* получены гуминоподобные вещества (с выходом 1,28-2,26 % от массы потребленного растительного субстрата), которые в своем составе имеют ароматические фрагменты и близки к классу почвенных гуминовых кислот [15]. Было выдвинуто предположение о том, что гуминоподобные вещества образуются из разрушенных макромолекул лигнина в присутствии лакказы, активными продуцентами которой являются использованные микроорганизмы [16, 17].

Известен способ биоконверсии лигнина древесины, заключающийся в том, что в древесные опилки вносят инокулят лигноразрушающего гриба *Panus tigrinus* [18]. При культивировании указанного гриба на сосновых и березовых опилках конверсия лигнина в течение 9-14 сут составила 22,5-24,0 % [19].

Проведена биоконверсия сухих растительных остатков (древесных опилок, щепы, соломы) в присутствии разновидности того же гриба (*Panus tigrinus BKM F-3616D*) при температуре 24-26 °С, аэрации воздуха, продолжительности 9-14 сут [20]. При внесении инокулята из расчета 4 л на 1 кг растительного субстрата конверсия лигнина составила 31-33 и 41-43 % для березовых и сосновых опилок соответственно. Было установлено, что предварительная обработка сырья ультразвуком частотой 22-24 кГц в течение 10-15 мин позволяет увеличить конверсию лигнина на 15-20 %.

В [21] препарат лигнина, полученный из опилок древесно-стружечных плит на основе фенолформальдегидных и карбамидных смол сернокислотным и диоксановым методами, был подвержен деструкции под действием *Aspergillus fumigatus*, а также *Stemphylium verruculosum* и *Paecilomyces carneus*. Отмечено, что наибольшую скорость роста, а значит, и наибольшую скорость деструкции лигнина показал гриб *Aspergillus fumigatus*. Максимальная скорость роста была достигнута на среде с сернокислотным лигнином, полученным из карбамидных древесно-стружечных плит.

В [22] предложена схема окислительной деструкции лигнина коры лиственницы сибирской, луба коры березы повислой и диоксанлигнинов, выделенных из вышеперечисленного сырья. Показано, что при твердофазной ферментации сырья под воздействием штамма «МГ-97/6» *Trichoderma asperellum Samuels BKПМ F-765*, взятого из почвы Маганского лесопитомника, происходит увеличение числа общих гидроксильных групп в 1,2-1,4 раза, а также разрыв ароматического кольца в структурах лигнина в сочетании с окислением первичного гидроксила до карбоксильной группы.

Несомненный научный и практический интерес представляют исследования, направленные на изучение возможности предварительной биотехнологической делигнификации древесины при ее подготовке к дальнейшей переработке, например, для получения целлюлозы.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния аэробной биопереработки этанол-лигнина, выделенного из древесины пихты сибирской, на интенсивность его биоконверсии и характеристики образующихся твердых продуктов.

### Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья для получения этаноллигнина (ЭЛ), который подвергали в дальнейшем аэробной биотехнологической переработке, использовали стволую часть древесины пихты сибирской (*Abies sibirica*), предварительно освобожденную от коры. Подготовленную древесину пихты измельчали первоначально на крупные опилки, а затем в роторной мельнице РМ-120 до частиц размером менее 0,5 мм. Полученные опилки сушили в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы. Содержание основных компонентов древесины пихты составляло (% от массы абсолютно сухой древесины): целлюлоза 49,8; лигнин 29,6; гемицеллюлозы и уроновые кислоты 14,9; экстрактивные вещества 6,0.

Получение ЭЛ проводили методом органосольвентного фракционирования [23, 24] опилок древесины пихты в среде водного раствора этанола с концентрацией 60 % об. в реакторе автоклавного типа объемом 2 л, выполненном из нержавеющей стали.

Для этого 100 г опилок помещали в автоклав, добавляли 1 л водного раствора этанола и тщательно перемешивали. Автоклав герметизировали, троекратно продували потоком аргона для удаления воздуха, нагревали до температуры 200 °С (скорость нагрева 8 °/мин), выдерживали при данной температуре в течение 3 ч. Затем реактор охлаждали до комнатной температуры, содержимое автоклава фильтровали на воронке Бюхнера при пониженном давлении. Твердый остаток на фильтре промывали водным раствором этанола той же концентрации, что и реакционный раствор. Профильтрованный щелок и промывные воды объединяли, охлаждали до 4 °С и выделяли из раствора ЭЛ по методике, описанной в [25]. Для этого в емкость с полученным раствором добавляли дистиллированную воду из соотношения 3 массовые части охлажденной воды (до 4 °С) к 1 части фильтрата с промывными водами. Для укрупнения осаждающегося ЭЛ вышеуказанную емкость выдерживали при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем укрупненный ЭЛ фильтровали на воронке Бюхнера при пониженном давлении, промывая дистиллированной водой, сушили при 50 °С в сушильном шкафу до постоянной массы. Выход ЭЛ составил 9,5 % мас. в расчете на абсолютно сухую древесину.

Для проведения исследований по биотехнологической переработке ЭЛ в аэробных условиях был осуществлен предварительный подбор и выделение смешанных культур микроорганизмов, в состав которых включили как виды дереворазрушающих грибов, так и штаммы бактерий. Образцы для выделения микроорганизмов были отобраны из разложившихся древесных отходов и почвопокровного слоя. Для этого навески (10–20 г) вышеуказанных материалов помещали в 200 мл стерильной воды, перемешивали и через 20 мин жидкую фракцию добавляли в колбы с питательными средами. Культивировали на качалке при температуре 28 °С и 130 об/мин в течение 4 сут для наращивания бактерий и 15 сут для выделения грибов. Инокулят для работы выращивали при перемешивании в течение 5 сут на колбах объемом 500 мл с добавлением 1 г ЭЛ, 10 г глюкозы и 0,1 г танина.

В качестве инокулята были использованы следующие варианты смешанных культур микроорганизмов: микроскопические грибы (*Penicillium* и *Aspergillus*), бактерии (*Pseudomonas*

*sp.*, *Pseudomonas sp.* + *Agrobacterium sp.*; *Pseudomonas sp.* + *Actinomicetus*; *Pseudomonas sp.* + *Bacillus subtilis* + *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833), грибы + бактерии (*Pseudomonas sp.* + *Agrobacterium sp.* + *Penicillium*).

Эксперименты по биотехнологической переработке ЭЛ проводили в ферментерах объемом 2 л с постоянным перемешиванием и аэрацией воздухом, поддерживали температуру от 32 до 35 °С; pH среды 6,5-7,0. В ферментер вносили 400 мл солевой среды; 200 мл инокулята; 5 г ЭЛ; 0,1 г пептона; 0,5 г крахмала. Состав солевой среды (г/л): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; 5 мл раствора микроэлементов (состав в г/л): FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 5,4; ZnSO<sub>4</sub> – 1,44; MnSO<sub>4</sub> – 1,11; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O – 0,25; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,28; pH среды 6,7-7,0. Продолжительность биопереработки 8 сут.

Эксперименты по биопереработке этаноллигнина в присутствии смешанной культуры бактерий, состоящей из бактерий рода *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* и штамма *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833: продолжительность процесса варьировали – 24, 48, 60 ч.

После выгрузки из ферментера продукты биомодификации ЭЛ сушили в сушильном шкафу камерного типа с принудительной вентиляцией при температуре 50 °С до постоянной массы.

Конверсию этаноллигнина в процессе аэробной биопереработки осуществляли по стандартной методике, описанной в [26]. Содержание углерода, водорода определяли на автоматическом анализаторе Flash EA-1112, Thermo Quest. Проводили расчет выход ГПВ, содержания углерода и водорода на сухую беззолную массу (daf) исследуемых образцов.

Рассчитывали степень превращения (K, %) и скорость конверсии (X, г/ч) этаноллигнина:

$$K = \frac{(m_o - m_t)}{m_o} \cdot 100, \quad X = \frac{(m_o - m_t)}{t},$$

где  $m_o$  и  $m_t$  – масса ЭЛ исходного и после биообработки соответственно, г;  $t$  – продолжительность биообработки, ч. Определение лигнина в образцах проводили по стандартной методике [27].

Регистрацию ИК-спектров исходного лигнина и продуктов его биопереработки осуществляли на ИК-Фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker, Германия) в области 4000-700 см<sup>-1</sup>. Спектральная информация обработана с использованием пакета программ OPUS, версия 5.5. Образцы для съемки ИК-спектров готовили в виде таблеток в матрице бромистого калия. Условия приготовления образцов (время перемешивания с бромистым калием, давление прессования, время вакуумирования) одинаковы. Концентрация вещества постоянна и составляет 5 мг вещества/1000 мг КВг. Расшифровку ИК-спектров выполняли в соответствии с [28-33].

### Результаты и обсуждение

Этаноллигнин, полученный в результате органосольвентного фракционирования (в среде водного раствора этанола) из пихты сибирской, имел следующие характеристики: C<sup>daf</sup> – 67,9 % масс.; H<sup>daf</sup> – 6,0 % масс.; O<sup>d</sup> – 26,1 масс. %; атомные соотношения: Н/С – 1,07; О/С – 0,29.

При вариации используемых микроорганизмов в процессе аэробной биопереработки этаноллигнина древесины пихты в погружной среде было установлено (табл. 1), что при воздействии смеси микроскопических грибов *Penicillium* и *Aspergillus* (1) в течение 8 сут конверсия ЭЛ оказалась самой низкой – 19,3 масс. %.

Таблица 1. Основные характеристики продуктов аэробной биопереработки этанолигнина

Образец микроорганизмов (номер образца)	C <sup>daf</sup> , %	H <sup>daf</sup> , %	Атомные соотношения		Конверсия ЭЛ, масс. %, на daf	Скорость конверсии ЭЛ, г/ч×10 <sup>-3</sup>
			H/C	O/C		
<i>Penicillium</i> + <i>Aspergillus</i> (1)	70,8	3,8	0,64	0,27	19,3	3,9
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Agrobacterium sp.</i> + + <i>Penicillium</i> (2)	64,9	5,7	1,05	0,34	23,8	4,9
<i>Pseudomonas sp.</i> (3)	57,3	6,1	1,28	0,48	37,4	8,9
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Actinomicetus</i> (4)	51,8	5,8	1,34	0,62	38,4	8,4
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Agrobacterium sp.</i> (5)	67,1	6,1	1,09	0,30	32,1	6,6
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Bacillus subtilis</i> (6)*	58,8	6,2	1,27	0,45	30,8	67,5
+ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (7)*	61,2	5,9	1,16	0,40	31,5	33,8
ВКПМ В-4833 (8)*	64,7	6,2	1,15	0,34	32,7	27,1

\* – продолжительность процесса: 6 – 24 ч; 7 – 48 ч; 8 – 60 ч.

Биопереработка ЭЛ с применением смешанными культурами бактерий и грибов в аналогичных условиях показало, что при использовании инокулята смеси состоящей из бактерий *Pseudomonas sp.* и *Agrobacterium sp.* с добавлением низших грибов *Penicillium* конверсия ЭЛ несколько возросла и составила 23,8 масс. % (образец 2).

Использование инокулята, состоящего из бактерий *Pseudomonas sp.* и *Agrobacterium sp.*, позволило за 8 ч повысить конверсию этанолигнина до 32,1 масс. %.

Под действием инокулята из бактерий *Pseudomonas sp.* и грибов *Actinomicetus* в течение 8 сут конверсия этанолигнина увеличилась и достигла максимального значения – 38,4 масс. % (образец 4).

Следует отметить, что близкая конверсия этанолигнина пихты (37,4 масс. %) была достигнута при использовании для аэробной биопереработке инокулята, содержащего только бактерии *Pseudomonas sp.* При этом для этого образца была определена максимальная скорость конверсии этанолигнина (8,9·10<sup>-3</sup> г/ч) относительно образцов, полученных при продолжительности процесса биопереработки 8 сут (табл. 1).

Результаты свидетельствуют о том, что использование смесей инокулятов грибов и бактерий в сочетании с бактериями *Pseudomonas sp.* в условиях погружной среды не приводит к существенному повышению конверсии этанолигнина относительно образцов, полученных при использовании инокулята, содержащего только бактерии *Pseudomonas sp.*

Изучение возможности использования инокулята смешанной культуры бактерий, состоящего из *Pseudomonas sp.* + *Bacillus subtilis* + *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833, позволило достигнуть сопоставимую конверсию этанолигнина 30,8, 31,5 и 32,7 масс. % (табл. 1, образцы 6, 7 и 8). Однако следует отметить, что эти показатели были выявлены при существенном уменьшении продолжительности процесса аэробной биопереработки от 8 сут до 24-60 ч. Полученные данные показали, что скорость конверсии ЭЛ в присутствии вышеуказанных микроорганизмов достигает своего максимального значения (67,5·10<sup>-3</sup> г/ч) в первые 24 ч и при дальнейшем увеличении продолжительности процесса 48 и 60 ч снижается до 33,8 и 27,1·10<sup>-3</sup> г/ч соответственно.

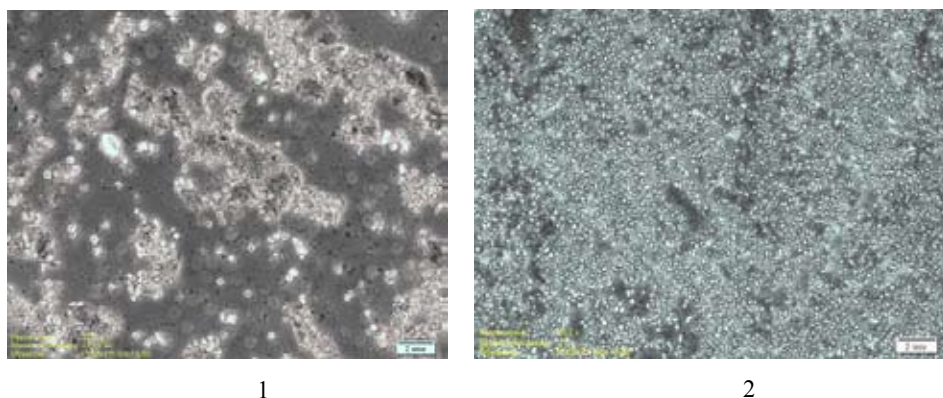


Рис. 1. Микрофотографии образца этанолигнина: 1 – начальный период обработки смешанной бактериальной культурой бактерий *Pseudomonas sp.* + *Bacillus subtilis* + *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833; 2 – после биообработки в течение 24 ч

На рис. 1 представлены микрофотографии начального и конечного периодов аэробной биопереработки ЭЛ смешанной бактериальной культурой, относящейся к родам *Pseudomonas sp.* + *Bacillus subtilis* + *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833 (образец 6). Наблюдаемая высокая плотность микроорганизмов и появление мелкодисперсной фракции ЭЛ наглядно иллюстрируют, что в процессе жизнедеятельности микроорганизмов идет активная деструкция ЭЛ, одновременно с которой происходит рост количества белковой массы за счет увеличения численности бактерий.

Результаты определения элементного состава (табл. 1) продуктов аэробной биопереработки ЭЛ в течение 8 сут свидетельствуют о том, что наибольшее содержание углерода (70,8 масс. %) отмечено для продукта, подвергнутого аэробной биопереработке смесью микроскопических грибов *Penicillium* + *Aspergillus* (образец 1). Для указанного образца наблюдали также наименьшие значения конверсии и скорости конверсии ЭЛ.

Наиболее значительное уменьшение содержания углерода в продуктах биопереработки ЭЛ определено для образца 4 (инокулят *Pseudomonas sp.* + *Actinomicetus*), для которого установлена максимальная конверсия ЭЛ (38,4 % масс.), что сопровождается достижением наиболее высокого содержания кислородсодержащих веществ и характеризуется величиной атомного соотношения Н/С 1,34 и О/С 0,62.

Для образцов 6, 7 и 8, полученных в процессе аэробной биопереработки этанолигнина инокулятом, состоящем из смеси бактерий *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833, характерно снижение содержание кислородсодержащих соединений (снижение атомного соотношения О/С от 0,45 до 0,34) при увеличении продолжительности процесса от 24 до 48 и 60 ч. При этом конверсия ЭЛ увеличивается незначительно и достигает значений 30,8, 31,5 и 32,7 масс. % соответственно (табл. 1).

Результаты проведенных ИК-спектроскопических исследований (рис. 2-4) согласуются с данными изменения элементного анализа продуктов аэробной биопереработки этанолигнина древесины пихты. Полученные спектры исходного этанолигнина и продуктов его аэробной биопереработки содержат интенсивные широкие п.п. в области 3600–2500 см<sup>-1</sup>, обусловленные валентными колебаниями связанной воды и различными типами ОН-групп; в области

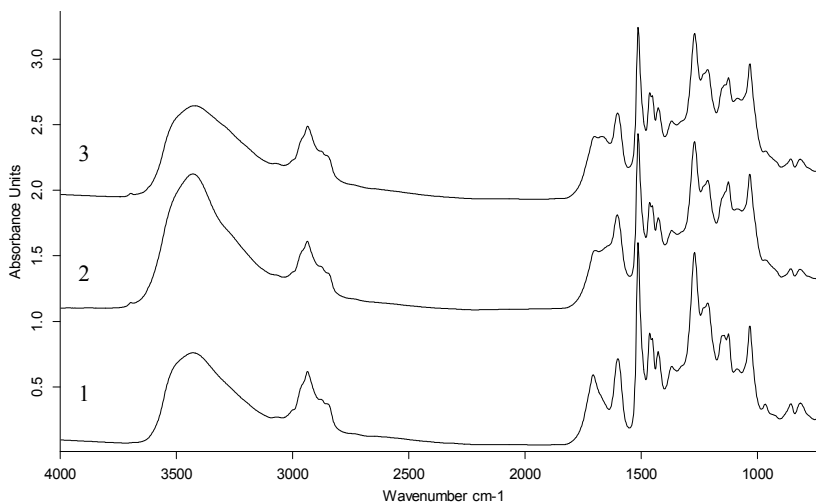


Рис. 2. ИК-спектры продуктов аэробной переработки этанолигнина: 1 – исходный ЭЛ; 2 – микроскопическими грибами *Penicillium* + *Aspergillus* (образец 1); 3 – смешанной культурой бактерий и грибов *Pseudomonas sp.* + *Agrobacterium sp.* + *Penicillium* (образец 2)

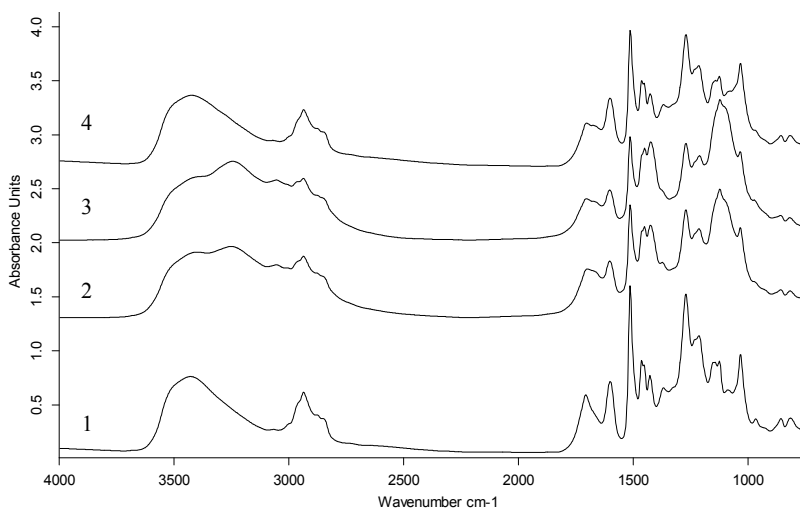


Рис. 3. ИК-спектры продуктов аэробной переработки этанолигнина бактериями: 1 – исходный ЭЛ; 2 – *Pseudomonas sp.* (образец 3); 3 – *Pseudomonas sp.* + *Actinomicetus* (образец 4); 4 – *Pseudomonas sp.* + *Agrobacterium sp.* (образец 5);

2940-2850  $\text{cm}^{-1}$  – валентными колебаниями С-Н связей в  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -группах (их интенсивность уменьшается при аэробной обработке ЭЛ), в области 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$  – деформационными колебаниями С-Н связей и валентными колебаниями С-О-связи.

В области 1710-1400  $\text{cm}^{-1}$  п.п. характеризуют валентные колебания групп с кратными связями: С=О (кетонов, сложных эфиров, ароматических карбоновых кислот), С=C,  $\text{C}_{\text{ar}}-\text{C}_{\text{ar}}$ ; здесь же располагаются п.п., обусловленные деформационными колебаниями С-Н-связи. Наличие п.п. 3030  $\text{cm}^{-1}$ , 1605  $\text{cm}^{-1}$ , 1510  $\text{cm}^{-1}$ , 1425  $\pm$  5  $\text{cm}^{-1}$  свидетельствует о присутствии ароматических структур в составе изучаемых образцов.



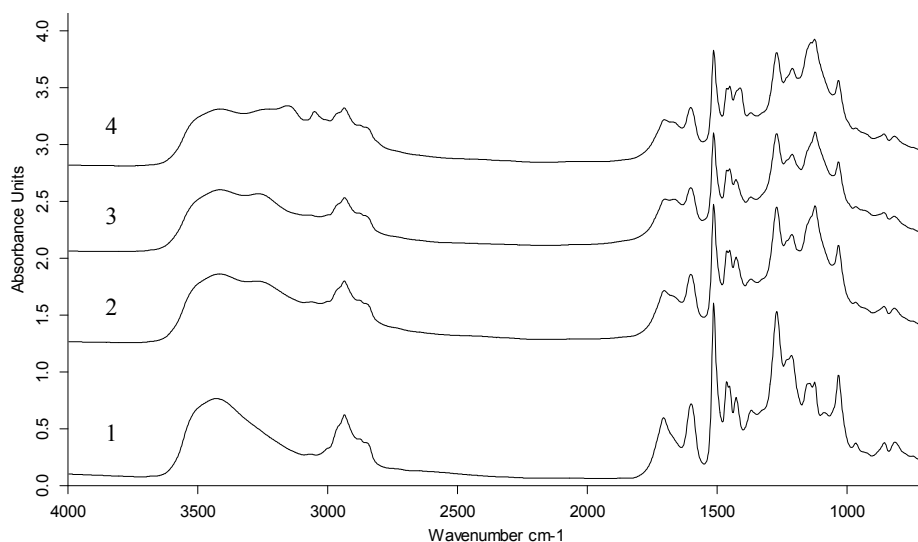


Рис. 4. ИК-спектры продуктов аэробной переработки этанолигнина бактериями *Pseudomonas sp.* + *Bacillus subtilis* + *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833 при различной продолжительности процесса: 1 – исходный ЭЛ; 2 – 24 ч (образец 6); 3 – 48 ч (образец 7); 4 – 60 ч (образец 8)

Таблица 2. Соотношение интегральной интенсивности полос поглощения структурных фрагментов\* в образцах этанолигнина

Образец	H/G	H/S	G/S
Исходный ЭЛ	0,9	12,2	13,3
<i>Penicillium</i> + <i>Aspergillus</i> (1)	0,8	6,5	8,0
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Agrobacterium sp.</i> + <i>Penicillium</i> (2)	0,8	8,6	10,7
<i>Pseudomonas sp.</i> (3)	0,7	6,0	8,3
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Actinomicetus</i> (4)	0,7	6,5	9,4
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Agrobacterium sp.</i> (5)	1,0	12,5	12,7
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ВКПМ В-4833, 24 ч (6)	0,8	6,8	8,1
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ВКПМ В-4833, 48 ч (7)	0,6	4,8	7,9
<i>Pseudomonas sp.</i> + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ВКПМ В-4833, 60 ч (8)	0,7	5,2	7,3

\* – структурные фрагменты: H-типа – 1605 см<sup>-1</sup>; G-типа – 1270 см<sup>-1</sup>; S-типа – 1125 см<sup>-1</sup>.

Этанолигнин и продукты его аэробной переработки имеют в своем составе три типа мономерных арилпропановых структур: гидроксифенил- (H) (п.п. средней интенсивности при  $\approx 1600$  см<sup>-1</sup>), гваяцил- (G) (п.п. при 1033 и 1270 см<sup>-1</sup>) и сиригилпропановых (S) (п.п.  $\approx 1125$  см<sup>-1</sup>). Поскольку в ИК-спектрах всех образцов интенсивность п.п. 1600 см<sup>-1</sup> значительно ниже интенсивности п.п. 1513 см<sup>-1</sup>, то исследуемые объекты можно отнести к несопряженным моделям гваяцильного типа. Содержание структурных фрагментов H-, G- и S-типа меняется при аэробной переработке (табл. 2).

В области 900-800  $\text{cm}^{-1}$  проявляются внеплоскостные деформационные колебания C–H-связей ароматического кольца различной степени и характера замещения. В гваяцильных соединениях видны две полосы, характеризующие колебания одного или двух атомов водорода – п.п. с максимумами 856 и 815  $\text{cm}^{-1}$ .

Сравнительный анализ ИК-спектров исходного этанолигнина и продуктов его аэробной переработки микроскопическими грибами *Penicillium* + *Aspergillus* (образец 1) и смешанной культурой бактерий и грибов *Pseudomonas sp.* + *Agrobacterium sp.* + *Penicillium* (образец 2) (рис. 2) показывает, что в результате воздействия грибов и бактерий происходит уменьшение интенсивности п.п. валентных колебаний C=O-группы в несопряженных кетонах, альдегидах и карбоновых кислотах при 1707  $\text{cm}^{-1}$ . В то же время в этих спектрах появляется новая полоса п.п. при 1650 и 1670  $\text{cm}^{-1}$  соответственно, которую можно отнести к валентным колебаниям C=O-группы в различных сопряженных кетонах.

В образцах 3-5 уменьшается содержание алифатических  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -групп, об этом свидетельствует снижение интенсивности п.п. в области 2980-2780  $\text{cm}^{-1}$ .

Как и в случае образцов 1 и 2, наблюдается уменьшение интенсивности п.п. валентных колебаний C=O-группы для несопряженных кетонов, альдегидов и карбоновых кислот при 1704  $\text{cm}^{-1}$  и появляется новая полоса п.п. при 1670  $\text{cm}^{-1}$ , которая свидетельствует о наличии C=O в сопряженных кетонах.

В ИК-спектрах образцов 3 и 4 области валентных колебаний OH-групп наблюдается усложнение спектра – возникают новые п.п. с максимумами 3246, 3054  $\text{cm}^{-1}$ , характеризующие появление OH-групп, вовлеченных в водородную связь. Увеличение поглощения в области 1200-1050  $\text{cm}^{-1}$  может свидетельствовать о появлении C–O-связей.

Обработка ЭЛ бактериями *Pseudomonas sp.* и смесью бактерий *Pseudomonas sp.* и *Actinomicetus* (образцы 3 и 4) приводит к изменению содержания гидроксифенильных, гваяцильных и сирингильных фрагментов (табл. 2). Для образца 5 соотношение этих фрагментов почти не меняется по сравнению с исходным ЭЛ.

На рис. 4 приведены ИК-спектры исходного ЭЛ и его продуктов, получаемых под воздействием смешанной культуры бактерий *Pseudomonas sp.* + *Bacillus subtilis* + *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833 в течение 24-60 ч.

Наибольшие изменения образца исходного этанолигнина происходят в первые 24 ч. С течением времени под действием смеси бактерий происходит уменьшение содержания  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -групп в образцах, появляются новые п.п. в области 4000-3000  $\text{cm}^{-1}$ , которые можно отнести к валентным колебаниям OH-групп, вовлеченных в водородную связь. Наблюдается также увеличение поглощения в области 1200-1050  $\text{cm}^{-1}$  – области валентных колебаний C–O-связей. В области поглощения связей C=O происходят такие же изменения, как и для образцов 1-5.

## Выводы

Проведены исследования по аэробной биопереработке в погружной среде этанолигнина, выделенного из пихты сибирской, различными микроорганизмами. Установлено, что в процессе аэробного воздействия микроорганизмами происходит активная деструкция этанолигнина. При продолжительности процесса аэробной биопереработки в течение 8 сут максималь-

ной активностью при биоконверсии этанолигнина обладает инокулят, состоящий из бактерий рода *Pseudomonas sp.* и микроскопических грибов *Actinomicetus*, для которого конверсия этанолигнина составила 38,4 масс. % и скорости конверсии  $8,9 \text{ г/ч} \cdot 10^{-3}$ .

Показано, что использование смешанной культуры бактерий *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4833 позволило обеспечить близкую степень превращения этанолигнина, но при уменьшении продолжительности процесса до 24-60 ч. При этом максимальная скорость конверсии этанолигнина ( $67,5 \text{ г/ч} \cdot 10^{-3}$ ) была достигнута в первые 24 ч.

Определено, что аэробное воздействие использованных микроорганизмов приводит к существенному изменению содержания гидроксифенильных, гваяцильных и сиригильных фрагментов в структуре этанолигнина. Исключение составляет лишь продукт аэробной переработки этанолигнина смешанной культурой бактерий *Pseudomonas sp.* и *Agrobacterium sp.*, в котором менее выражены изменения указанных структурных фрагментов.

***Этанолигнин и продукты его аэробной переработки изучены с использованием приборов Красноярского регионального центра коллективного пользования СО РАН.***

#### Список литературы

1. Алексеева М.А. Запас лесосырьевых ресурсов в Красноярском крае увеличивается. *ЛесПромИнформ* 2013. № 5(95). С. 26-29. [Alekseeva M.A. In Krasnoyarsk region the stock of timber resources increases. *LesPromInform* 2013. № 5(95). P. 26-32. (In Russ.)]
2. Берлянт А.М., Дронов В.П., Душина И.В. и др. География: Справ. материалы; Под ред. В.П. Максаковского. М.: Просвещение, 2004. 400 с. [Berlyant A.M., Dronov V.P., Dushina I.V. et al. Geography: Handbook. Moscow: Prosveshchenie, 2004. 400 p. (In Russ.)]
3. Степень Р.А., Репях С.М. Альтернативные пути рациональной переработки древесных отходов. Инвестиционный потенциал лесопромышленного комплекса Красноярского края. Сб. статей научно-практической конференции. 5-6 сентября 2001 г. Красноярск: СибГТУ, 2001. С. 116-120. [Stepen' R.A., Ropyakh S.M. Alternative routes of rational processing of wood waste. Investment potential of a timber industry complex of the Krasnoyarsk region. Book of articles of scientific-practical conference. 5-6 September 2001. Krasnoyarsk: SibGTU, 2001. P. 116-120. (In Russ.)]
4. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Кузнецова С.А. Химические продукты из древесной коры. М-во образования и науки Рос. Федерации, Сиб. федер. ун-т. Красноярск: СФУ, 2012. 259 с. [Kuznetsov B.N., Levdansky V.A., Kuznetsova S.A. *Chemical products from wood bark*. Department of Education and Science, Siberian federal university. Krasnoyarsk: SFU, 2012. 259 p. (In Russ.)]
5. Фенгел Д., Вегнер Г. *Древесина, химия, ультраструктура, реакции*. М.: Лесная промышленность, 1988. 512 с. [Fengel D., Vegner G. Wood, chemistry, ultra-structure, reactions. Moscow.: Forest industry, 1988. 512 p. (In Russ.)]
6. Азаров В.И., Буров А.В., Оболенская А.В. Химия древесины и синтетических полимеров. СПб.: Издательство «Лань», 2010. 624 с. [Azarov V.I., Burov A.V., Obolenskaya A.V. Wood and synthetic polymers chemistry. SPb: "Lan" Publishing House. 2010. 624 p. (In Russ.)]

7. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Исаева Е.В. Химия древесины. Красноярск: СибГТУ, 2011. 389 с. [Ryazanjva T.V., Chuprova N.A., Isaeva E.V. Wood chemistry. Krasnoyarsk: SibGTU. 2011. 389 p. (In Russ)]
8. Грушников О.П., Антропова О.Н. Микробиологическая деградация лигнина. *Успехи химии* 1975. Т. XLIV. Вып. 5. С. 935-967. [Grushnikov O.P., Antropova O.N. Microbiological degradation of lignin. *Russian Chemical Reviews* 1975. V. XLIV. Is. 5. P. 935-967. (In Russ.)]
9. Рабинович М.Л., Болотова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с. [Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Kondrashchenko V.I. Theoretical basis of wood composite biotechnology. Book 1. Wood and destroy it fungi. Moscow: Nauka, 2001. 264 p. (In Russ.)]
10. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. М.: Мир, 2006. 504 с. [Kuznetsov A.E., Gradova N.B. Scientific basis of ecobiotechnology. Moscow: Mir, 2006. 504 p. (In Russ.)]
11. Bholay A.D., Bokhataria Bravna V., Jadhav Priyanka U. et al. Bacterial lignin peroxidase: A tool for biobleaching and biodegradation of industrial effluents. *Univ. J. Environ. Res. Technol.* 2012. V. 2. № 1. P. 58-64.
12. Петров С.В., Купряшина М.А., Глинская Е.В., Никитина В.Е. Лигнин-пероксидаза фенолоксидазного комплекса ассоциативных бактерий *Azospirillum Brasilense*. *Вестник Оренбургского государственного университета* 2014. Вып. 13(174). № 12. С. 75-77. [Petrov S.V., Kupryashina M.A., Glin'skaya E.V., Nikitina V.E. Lignin peroxidase of phenoloxidase complex of associated bacteria. *Bulletin of Orenburg State University* 2014. Is. 13(174). No. 12. P. 75-77. (In Russ.)]
13. Мокрушина Н.С., Тарасова Т.С., Дармов И.В. Выделение микромицетов, перспективных для разработки на их основе биопрепарата для ускоренной переработки древесных отходов в удобрения. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2010. № 2(2). С. 430-434. [Mokrushina N.S., Tarasjva T.S., Darmov I.V. Isolation of micromycetes which are promising in developing a biopreparation for speeding up the composting of wood wastes into fertilizers. *Bulletin of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod* 2010. No. 2(2). P. 430-434 (In Russ.)]
14. Kersten P., Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading *Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology* 2007. V. 44. P. 77-87.
15. Явметдинов И.С., Степанова Е.В., Гаврилова В.П. и др. Получение и характеристика гуминоподобных веществ, синтезируемых дереворазрушающими грибами, возбудителями «белой гнили». *Прикладная биохимия и микробиология* 2003. Т. 39. № 3. С. 293-301. [Yavmetdinov I.S., Stepanova E.V., Gavrilova V.P. et al. Isolation and characterization of humin-like substances produced by wood-degrading fungi causing white rot. *Applied Biochemistry and microbiology* 2003. V. 39. No. 3. P. 293-301. (In Russ.)]
16. Koroleva O.V., Gavrilova V.P., Stepanova E.V. et al. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated white rot *Cerrena maxima* and *Coriollus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. *Enzyme and Microbiol. Technology* 2002. V. 30. No. 4. P. 573-580.
17. Koroleva O.V., Stepanova E.V., Gavrilova V.P. et al. Laccase and Mn-peroxidase production by *Coriollus hirsutus* strain 075 in jar fermenter. *J. Bioscience and Bioengineering* 2002. V. 93. No. 5. P. 449-455.

18. Zadrazil F., Brunnert H. The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 1980. V. 9. P. 37-44.
19. Головлева Л.А., Мальцева О.В., Мясоедова Н.М. и др. Оценка влияния различных способов предобработки растительных субстратов на лигнолитическую активность гриба *Panus tigrinus* 144. *Химия древесины* 1988. № 2. С. 66-71. [Golovleva L.A., Maltseva O.V., Myasoedova N.M. et al. The impact estimation of different methods of pre-treatment plant substrates lignolitic fungus activity *Panus tigrinus* 144. *Wood chemistry* 1988. No. 2. P. 66-71. (In Russ.)]
20. Ревин В.В., Атыкян Н.А., Кадималиев Д.А. Способ биоконверсии отходов растительного сырья. Пат. 2255979 РФ. 2003. [Revin V.V., Atakyan N.A., Kadimaliev D.A. The process of bioconversion of waste plant raw materials. Pat. 2255979 RU (In Russ.)]
21. Княгина Ю.П., Смирнов В.Ф., Стручкова И.В. и др. Биодеструкция лигнина из древесно-стружечных плит микроскопическими грибами. *Химия растительного сырья* 2005. № 4. С. 41-44. [Knyagina Yu.P., Smirnov V.F., Struchkova I.V. et al. Biodegradation of lignin from wood chipboard microscopic fungi. *Chemistry of plant raw materials* 2005. No. 4. P. 41-44. (In Russ.)]
22. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Лунева Т.А. Воздействие гриба рода *Trichoderma* на лигнин коры древесных пород. *Катализ в промышленности* 2014. № 6. С. 64-70. [Ryazanova T.V., Chuprova N.A., Luneva T.A. Effect on *Trichoderma* fungi on bark lignin. *Catalysis in industry* 2014. No. 6. P. 64-70. (In Russ.)]
23. Kim D.E., Pan X. Preliminary study on converting hybrid poplar to high-value and lignin using ethanol process. *Ind.Eng. Chem. Res.* 2010. V. 49. P. 12156-12163.
24. Pan X., Xie D., Yu R.W., Lam D., Saddler J.N. Pretreatment of lodgepole pine killed by mountain beetle using the ethanol organosolv process: fractionation and process optimisation. *Ind.Eng. Chem. Res.* 2007. V. 46. P. 2609-2617.
25. Wildschut J., Smit A., Reith J., Huijgen W.J. Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. *Bioresource Technology*. 2013. V-135, May. P. 58-66.
26. Орлов Д.С. Химия почв. М.: МГУ, 1985. 376 с. [Orlov D.S. Chemistry of soils. Moscow: MGU, 1985. 376 p. (In Russ.)]
27. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с. [Obolenskaya A.V., El'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. Laboratory works on chemistry of wood and cellulose. Moscow: Ecology, 1991. 320 p. (In Russ.)]
28. Беллами Л. Новые данные по ИК-спектроскопии сложных молекул. М.: Мир, 1971. 365 с. [Bellamy L. New data on IR spectroscopy of complex molecules. Moscow: Mir, 1975. 365 p. (In Russ.)]
29. Conley R.T. Infrared spectroscopy. Boston: Allyn and Bacon, 1972. 355 p.
30. Faix O. Investigation of lignin polymer models (DHP's) by FTIR spectroscopy. *Holzforschung*, 1986. V. 40. No. 46. P. 273-280.
31. Lin S.Y., Dence C.W. Methods in lignin chemistry. Springer-Verlag, 1992. 578 p.
32. Хергерт Г.Л. ИК-спектры лигнина. Лигнины; Под ред. К.В. Сарканена и К.Х. Людвиг. М.: ИЛ, 1975. 632 с. [Khergert G.L. IR spectrums of lignin. Lignins; Ed. by K.V.Sarkanen and K.Kh.Lyudvig. Moscow: IL, 1975. 632 p. (In Russ.)]

33. Евстафьев С.Н., Чечикова Е.В. Состав продуктов делигнификации соломы пшеницы в условиях субкритического автогидролиза. *Вестник Иркутского государственного технического университета*. 2015. № 11 (106). С. 111-118 [Evstafiev S.N., Chechikova E.V. The composition of the products of delignification of wheat straw under conditions of subcritical autohydrolysis. *Vestnik of Irkutsk state technical University* 2015. No. 11 (106). P. 111-118 (In Russ.)]