

РАЗНОЕ**ВЛИЯНИЕ ГУМАТОВ ОКИСЛЕННЫХ БУРЫХ УГЛЕЙ НА ПРОЦЕСС СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ**

**А.Д. Дашицыренова<sup>1</sup>, Г.А. Калабин<sup>1</sup>, Д.Ф. Кушнарёв<sup>2</sup>,  
А.Г. Пройдаков<sup>2</sup>, А.В. Рохин<sup>2</sup>, Н.В. Кулагина<sup>2</sup>,  
А.Г. Сахабутдинов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Экологический факультет, Российский университет дружбы народов,  
Подольское ш., 8/5, 113093, Москва, Россия

<sup>2</sup>Химический факультет Иркутского государственного университета  
ул. Лермонтова, 126, 664033, Иркутск, Россия

Методом спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>N изучен процесс спиртового брожения глюкозы в присутствии в воде небольших примесей гуминовых веществ (0,0005-0,01%). Установлено, что присутствие гуматов может ускорять течение процесса более чем в два раза путем влияния на жизнедеятельность микроорганизмов. Реакцию ферментативного сбраживания глюкозы можно рекомендовать как экспрессный и экономичный метод биотестирования физиологической активности разнообразных гуминовых препаратов и оптимизации их концентраций в водных растворах, используемых в качестве регуляторов роста микроорганизмов, растений, высших животных.

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой группу природных органических кислот, растущий интерес к которым вызван их специфическими свойствами, прежде всего как природных веществ, обладающих физиологической активностью.

Положительное влияние ГВ на жизнедеятельность микроорганизмов на примере дрожжевых культур (*Saccharomyces cerevisiae*) отмечалось более 60 лет назад. Гумат натрия, выделенный из торфа, при его добавлении в питательную среду в концентрации 0,001% ускоряет процесс их размножения (Глобин, Ронсаль, 1983). Более того, ГВ благотворно влияют не только на жизнедеятельность дрожжей, но и на процессы, ими катализируемые, в частности на процессы спиртового брожения.

Цель настоящей работы — изучение влияния на эти микроорганизмы гуматов натрия, полученных из другого вида сырья — окисленных бурых углей. Последние существенно отличаются от торфа как содержанием ГВ, их элементным составом, молекулярно-массовым распределением, так и своими структурно-фрагментными особенностями (более высокое содержание ароматических фрагментов, низкое — алифатических, практически отсутствие углеводных). Проведены серии экспериментов, в которых использованы гуматы натрия и калия одного окисленного угля с тремя различными технологиями предобработки, гуматы отдельных групп ГВ одного угля, наконец, гуматы окисленных углей различных месторождений и коммерческие препараты.

**Экспериментальная часть.** Предобработка использованных для всех серий экспериментов ГВ Хольболджинского разреза Гусиноозерского месторождения включала в себя либо просеивание через сито с диаметром отверстий 1 мм, либо механообработку в универсальном дезинтеграторе УДА проточного типа или в шаровой мельнице «Пulверизетта-6». Гранулометрический анализ ГВ проводился на седиментографе «Анализетта-20» (табл.1).

Согласно методикам Стивенсона (1985) и Лоуз (1992) (рис. 1) из исходного окисленного угля, не подвергавшегося механообработке, выделены следующие группы ГВ: ГФК (сумма ГК и ФК), ФК (фульвокислоты), ГК (гуминовые кислоты), ГМК (гиматомелановые кислоты), ГК без ГМК, ГК бурые, ГК серые.

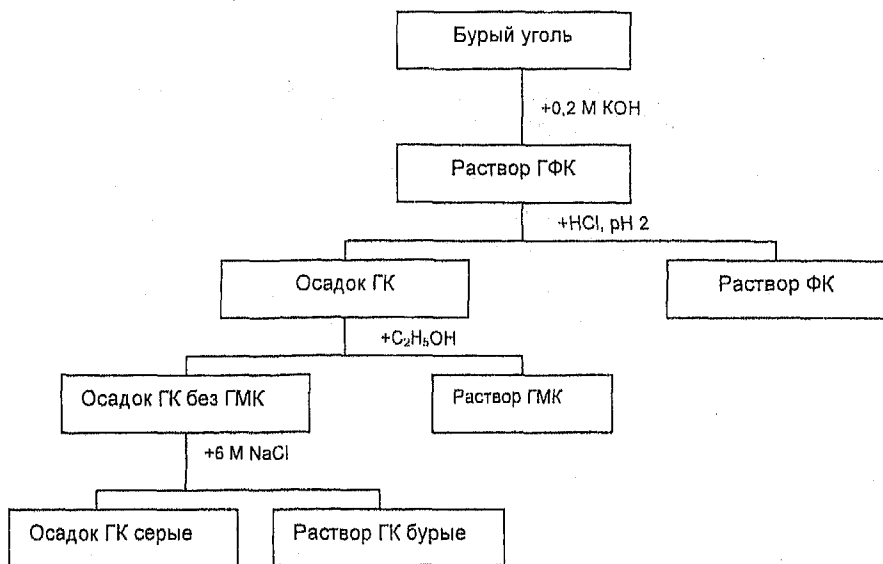


Рис.1. Схема выделения ГВ Хольболджинского разреза Гусиноозерского месторождения

В экспериментах по ферментативному сбраживанию использованы следующие соотношения реактивов: D- глюкоза (ГОСТ 6038-79) — 10 г, дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) — 1,5 г, дистиллированная вода — 35 мл, гумат натрия — 0,0005 %-0,01 % от массы воды. Температура проведения процесса 20°C.

Концентрация этанола в реакционной смеси, характеризующая эффективность действия дрожжей, определялась методом спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H (спектрометр «Varian» VXR-500S, 500МГц) путем регистрации количественных спектров реакционной смеси на протонах и расчета относительного содержания в ней этанола по сигналу метильной группы.

**Результаты и обсуждение.** Первоначально, для установления факта влияния ГВ на процесс биоконверсии глюкозы и выбора наиболее действенной для ускорения процесса концентрации, нами использован гумат окисленного угля Хольболджинского разреза Гусиноозерского месторождения с различными технологиями его предобработки:

- гумат без предобработки (Гумат исх);
- гумат механообработанный в «Пulверизетте-б» в течение 2 часов (Гумат м/о);
- гумат механообработанный в УДА (Гумат дез).

В качестве реакционной среды использовали дистиллированную воду или растворы гумата натрия с концентрациями 0,0005, 0,001, 0,005 и 0,01% вес. Реакционную смесь оставляют сбраживаться в течение 120 ч. Относительное содержание в ней этанола (рис. 2) свидетельствует, что гумат натрия наиболее ускоряет биоконверсию глюкозы в этанол при его концентрации 0,001%, для которой содержание этанола вдвое превышает таковое в контроле. Характерно, что концентрации ГВ 0,0005% и 0,005%, т.е. всего в два раза ниже или в пять раз выше оптимальной оказались практически неэффективными для всех трех препаратов. Из рис. 2 также следует, что предобработка мало влияет на стимулирующее действие ГВ в случае Гумат дез и даже понижает его в случае Гумат м/о.

Эффективность воздействия предобработки на размеры частиц ГВ можно оценить по их гранулометрическому составу ГВ (табл.1): они уменьшаются в среднем в 5 и 10 раз для Гумата дез и Гумата м/о, соответственно.

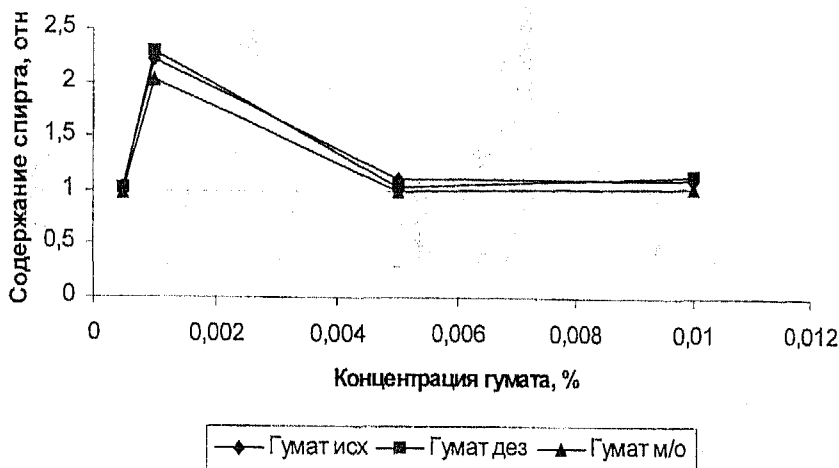


Рис.2. Зависимость относительного содержания этанола в реакционной смеси от концентрации гуматов через 120 часов

Гранулометрический состав гуминовых веществ, мкм

Таблица 1

Препарат	Содержание частиц %									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Гумат исх.	17,5	28,0	42,0	57,0	72,0	97,0	122,5	185,0	230,0	270,0
Гумат дез.	9,0	13,0	14,5	15,9	17,5	21,0	24,0	28,0	36,0	48,0
Гумат м/о.	-	-	-	-	-	6,0	10,0	15,0	19,5	25,0

В последнем случае практически весь препарат представлен частицами размером менее 20 мкм. Нельзя не отметить, что столь незначительное влияние предобработки на физиологическую активность гуматов в рассматриваемом процессе нетипично для изученной ранее их рост-стимулирующей активности (Калабин и др., 2000) и требует поэтому более тщательного рассмотрения на основе сопоставления параметров фрагментарного состава и иных характеристик этих ГВ.

Проведено сопоставление активирующего действия на процесс ферментативного сбраживания глюкозы гуматов, выделенных из различных окисленных углей, при найденной выше их оптимальной концентрации 0,001%. Для этого использованы гуматы натрия Щеткинського месторождения (без или с механообработкой в «Пульверизетте-6»), гуматы калия Глинкинського месторождения, коммерческий препарат «Гумат+» и Гуматы исх Хольболджинського разреза. Отбор проб осуществлялся через 72, 120 и 168 ч (рис.3). Для всех препаратов максимум эффекта, оцениваемого по содержанию этанола в реакционной смеси, проявляется на пятые сутки. Высокое значение эффекта у коммерческого препарата «Гумат+» на третьи сутки, возможно, связано с наличием в нем макро- и микроэлементов, выступающих катализаторами процесса биоконверсии. Харак-

терно, что через 168 часов глубина превращения глюкозы в этанол становится почти одинаковой для всех опытов и равной таковой в контроле.

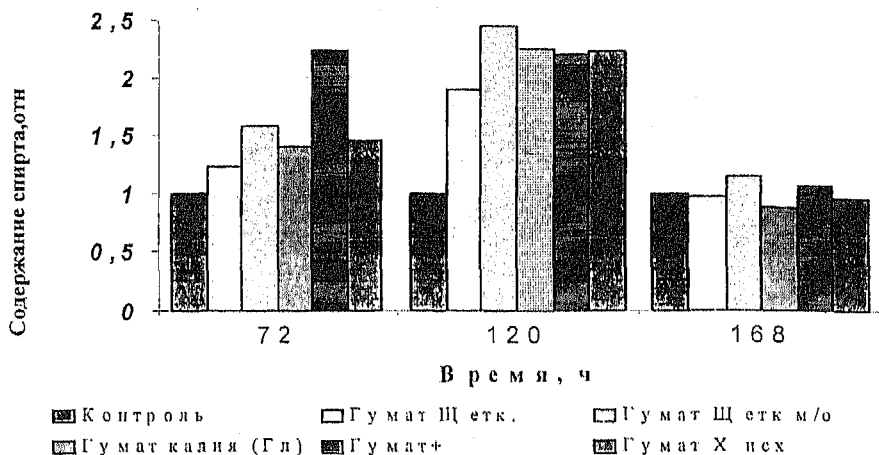


Рис.3. Влияние гуматов различного происхождения на динамику спиртового брожения

Это естественно, поскольку выход этанола определяется, в первую очередь, количеством взятой в нее глюкозы.

Независимо от природы использованных в эксперименте ГВ, их присутствие в концентрации 0,001% всегда увеличивает выход этанола при 20°C и экспозиции 120 часов в среднем в два раза.

На примере отдельных групп ГВ из одного окисленного угля (рис. 1), охарактеризованных фрагментным и элементным составом, молекулярно-массовым распределением проведено исследование их влияния на биоконверсию глюкозы. Результаты для изученных групп ГВ и трех экспозиций приведены в табл. 2. В ней также указаны значения ауксиноподобной активности этих групп ГВ для этой же концентрации (0,001%) в воде в отношении колеоптилей пшеницы, измеренные нами ранее относительно контроля — воды без добавок ГВ (Дашицыренова и др., 2003). Сопоставление физиологической активности (ФА) групп ГВ в отношении дрожжевой культуры (ФА<sub>1</sub>) для установленной выше оптимальной экспозиции 120 часов и в отношении роста колеоптилей пшеницы (ФА<sub>2</sub>) показало, что между ними наблюдается линейная связь, формально описываемая следующим уравнением:

$$ФА_2 = 0,48 + 0,56 ФА_1^{120}, r = 0,83, s = 0,17 \quad (1)$$

Наиболее значительно от линии регрессии отклоняется точка для ГК без ГМК. Ее исключение приводит к надежной формальной связи ФА групп в существенно разных процессах.

$$ФА_2 = 0,34 + 0,66 ФА_1^{120}, r = 0,95, s = 0,10 \quad (2)$$

Между ФА<sub>2</sub> (ФА<sub>2</sub> — прирост колеоптилей по сравнению с контролем, %) и фрагментным составом групп ГВ из спектров ЯМР <sup>13</sup>C, также представленным в табл. 2, ранее нами (Дашицыренова и др., 2003) была выявлена связь, выражаемая формально следующим линейным шестипараметровым уравнением:

$$ФА_2 = 3,6(C=O) + 4,1(COOH) + 32,2(C_{ар}O) - 5,6(C_{ар}C,H) - 8,5(C_{алк}O) - 2,3(C_{алк}) \quad (3)$$

Подобное формальное описание связи эффекта этих групп ГВ на ФА дрожжей приводит к виду:

$$\Phi A_1 = 3,0(C=O) + 15,6(COOH) + 69,7(C_{ар}O) - 15,6(C_{ар}C,H) - 21,8(C_{алк}O) + 1,1(C_{алк}). \quad (4)$$

Между соответствующими коэффициентами при шести аргументах уравнений (3) и (4) ( $a_i$  и  $b_i$ , соответственно) обнаружена строгая линейная связь:

$$a_i = 0,09 + 0,45b_i, \quad r = 0,99, \quad s = 2,39. \quad (5)$$

Уравнения (3-5) позволяют предполагать, что, несмотря на существенно разные объекты, методики и условия выбранных вариантов биотестирования различных групп ГВ, в обоих случаях основное влияние на ФА оказывает степень присутствия в ГВ одних и тех же структурных фрагментов (карбоксильные, ароматические и алкокси-группы), а присутствие кетонных и алифатических атомов малозначимо. Кроме того, из уравнений (2) и (5) также видно, что дрожжевой тест более чувствителен к особенностям фрагментного состава групп ГВ. Установленный неожиданный факт надежной связи между ФА в отношении совершенно разных процессов, общей для которых является только среда его проведения — вода с добавкой всего 0,001% различных групп ГВ, позволяет также предполагать, что основную роль в физиологической активности играет какое-то специфическое структурирование водной матрицы под действием очень незначительных добавок ГВ, обеспечивающее ее положительное влияние на рассматриваемые процессы. Это уже отмечалось нами ранее (Калабин и др., 2000).

Таблица 2

Относительная физиологическая активность в спиртовом брожении (ФА, дрожжи)\*, ауксиноподобная активность (ФА, колеоптили)\*\* и содержание атомов углерода в различных структурных фрагментах групп ГВ, %

Группа ГВ	ФА <sub>1</sub> , ч			ФА <sub>2</sub>	Содержание углерода в структурных фрагментах, %					
	72	120	168		C=O	COOH	C <sub>ар</sub> O	C <sub>ар</sub> C,H	C <sub>алк</sub> O	C <sub>алк</sub>
ГФК	1,59	1,29	0,92	1,20	4.5	11.2	10.2	46.0	8.0	20.1
ГК	1,93	1,58	0,93	1,43	4.1	14.0	10.3	53.0	3.6	15.0
ГМК	1,68	1,69	0,95	1,34	5.1	15.7	9.5	46.1	6.9	16.7
ГК без ГМК	1,74	1,76	1,00	1,26	5.5	13.8	9.1	45.1	5.0	21.5
ГК бур	1,53	1,58	0,91	1,46	5.4	14.8	10.2	49.3	6.6	13.6
ГК сер	1,60	1,84	0,98	1,60	5.6	10.1	11.9	42.5	12.4	17.5

Примечания: \*указано увеличение выхода этанола по сравнению с контролем (ФА<sub>1</sub>=1,00); \*\*указано увеличение длины колеоптиля по сравнению с контролем (ФА<sub>2</sub>=1,00)

Между ФА групп ГВ в отношении биоконверсии глюкозы и результатами измерения их элементного состава и молекулярно-массового распределения связь не обнаружена. Это вновь согласуется с результатами наших исследований ФА на примере колеоптилей пшеницы.

Итак, все изученные гуматы оказывают однозначное положительное влияние на процесс биоконверсии глюкозы в этанол. Оптимальная концентрация гуматов — 0,001 %, а оптимальная продолжительность эксперимента при 20°C — 120 часов. В этих условиях относительный рост биоконверсии достигает максимального значения около двух раз. Следует отметить, что найденное оптимальное весовое содержание ГВ в воде в настоящем случае, как и в случае наших разнообразных лабораторных и полевых испытаний (Калабин и др., 2000), тесте на их ауксиноподобную активность ГВ (Дашицыренова и др., 2003), как и в многочисленных результатах других авторов всегда имеет величину порядка 0,001%.

Разработанный экспериментальный подход мы рассматриваем как один из наиболее чувствительных и экспрессных потенциальных тест-методов определения ФА различных ГВ. Экспозицию реакции возможно заметно сократить путем повышения температуры до 30°C и более тщательным подбором соотношения «глюкоза-дрожжи-вода». Вместо спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H для контроля глубины конверсии глюкозы в этанол целесообразно использовать измерение пропорционального выходу этанола объема выделяющегося CO<sub>2</sub>, что сделает предлагаемый экспрессный метод биотестирования ГВ не только очень экономичным, но и адаптируемым к полевым условиям.

## ЛИТЕРАТУРА

- Глобин П.Д., Ронсаль Г.А. Влияние гуминовой кислоты на жизнедеятельность дрожжей // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. - Днепропетровск. - 1983. - Т8. - с.354-357.
- Stevenson F.J. Geochemistry of Soil Humic Substances. In: Humic substances in soil, sediment and water. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), N.Y., John Wiley & Sons, 1985.- P. 13-52
- Lowe L.E. Studies on the nature of sulfur in peat humic acids from Fraser River delta, British Columbia. //Sci. Total Environ.- 1992.-V.113- P. 133-145,
- Дашицыренова А.Д., Куликова Н.А., Кушнарёв Д.Ф., Калабин Г.А. Оценка физиологической активности гуминовых веществ из окисленных бурых углей Гусиноозерских месторождения. – Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра.- 2003.-№7., С. 47-48
- Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарёв Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. – 408 с.

## EFFECT OF OXIDIZED BROWN COAL HUMATES ON THE ALCOHOLIC FERMENTATION

A.D. Dashitsyrenova<sup>1</sup>, G.A. Kalabin<sup>1</sup>, D.F. Kushnarev<sup>2</sup>,  
A.G. Proydakov<sup>2</sup>, A.V. Rohin<sup>2</sup>, N.V. Kulagina<sup>2</sup>, A.G Sahabutdinov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ecological Faculty, Russian Peoples' Friendship University,

Podolskoye shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Irkutsk State University

ul. Lermontova, 126, 664033, Irkutsk, Russia

Process of the alcoholic fermentation in the presence of humic substances (0,0005-0,01%) in aqua has been studied by <sup>1</sup>H NMR-spectroscopy. Humates presence can double speed of the fermentation process by impact on vital activity of microorganisms. Reaction of the alcoholic fermentation can be recommended as express and economical blotest of physiological activity for different humic substances and optimization its concentration in aqueous solutions used as growth regulator of microorganisms, plants, higher animals.