

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕ СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

УДК 663.15.002 S(075.8)

На правах рукописи

АГЗАМОВА НОЗИМАХОН АТАБЕКОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА ИЗ
НЕТРАДИЦИОННОГО СЫРЬЯ**

Диссертация на соискание академической степени магистра по
специальность 5А541109- «Технология спирта»

Научный руководитель
д.т.н., проф.

Абдуразакова С.Х.

Консультант
д.б.н., проф.

Ахмедова З.Р.

Работа рассмотрена и рекомендована
к публичной защите на заседании кафедры
«Технология сахара и бродильных производств»
от «_____» _____ 2010 г. № _____
Зав.каф. к.б.н.

Хасанов Х.Т.

Начальник отдела магистратуры
к.т.н.

Абдурахмонов А.К.

Ташкент – 2010

Введение

На протяжении столетий люди эксплуатировали сырьевые ресурсы Земли. Последние десятилетие многие страны столкнулись с реальным дефицитом нефти, природного газа. Проблема ограничения ископаемых видов топлива и стремление многих стран уменьшить свою зависимость от поставок импортной нефти стимулировали возрастающий в мире интерес к возобновляемому и практически не изчерпаемому источнику энергии, Перспективному сырью, продукту фотосинтеза. Целлюлоза является основным по массе органическим веществом биосферы. Вместе с тем целлюлоза растений не полностью используется животными, всего на 20-25%, без специальной дополнительной предобработки [1-4].

Основная проблема, связанная с утилизацией целлюлозы состоит в том, что в отличие от крахмала она не является природным полисахаридом, который по мере потребности может превращаться в глюкозу. Напротив целлюлоза устойчивый к различным воздействиям структурный компонент растений. Устойчивость его обеспечивается другими структурными компонентами-лигнином, который занимает второе место по количеству после целлюлозы. Поэтому одна из основных задач современной биотехнологии научиться использовать это трудно метаболизируемое, но широко распространенное в природе органическое соединение и использовать его более эффективно, чем сжигание и загрязнение биосферы. Для решения стратегических, социальных и экономических проблем сегодняшнего дня представляется целесообразным переработка растительного сырья: - отходы сельского хозяйства - солома, листья, стебли различных растений, кукурузные кочерыжки, подсолнечная лузга, отходы хлопководства, отходы бумажных производств, отходы пищевой промышленности в разнообразные продукты, необходимые народному хозяйству [5-8].

Утилизация отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности с целью получения полноценных кормов, кормовых дрожжей, биоэтанола,

фурфурола, органических кислот и глюкозы по экологически чистой энерго и теплосберегающей биотехнологии должна развиваться по программе целевых проектов по модернизации и техническому обновлению отраслей биотехнологии, внедрению инновационных технологий.

Производство этанола и метана, образующиеся из растительной биомассы наиболее эффективным способом биоконверсии, имеют стратегическое значение, как энергетические источники, доступные человечеству уже сегодня [9].

АКТУАЛЬНОСТЬ.

Производство и потребление этанола растет как в США так и во всем мире. В Соединенных штатах повышение спроса на этанол способствовало принятию в 1990 году поправок к «Акту о чистом воздухе», которое требует использование обогащенного кислородом топлива в районах с недоступно высоким уровнем загрязнения воздуха, особенно в мегаполисах. В Казахстане, Узбекистане уже необходим аналогичный закон, чтобы очистить воздух в крупных городах.

Таким образом, проблема возобновляемого горючего на сегодняшний день достигло сотни млрд. литров, что конечно не может покрыть потребности цивилизации даже 10% Узбекистан богат целлюлоза содержащим сырьем, это отходы сельского хозяйства, отходы хлопчатника (коробочки, стебли и листья) которые в настоящее время используются как топливо. Отходы пищевой промышленности сельского хозяйства и др. отраслей не нашли эффективные применения. В данной работе изучается биоконверсия лигноцеллюлозных субстратов хлопковых коробочек и стеблей с целью подготовки ценных кормов для животноводства и этанола путем биоконверсии термофильными ассоциатами микроорганизмов, культивируемых на среде, содержащих пшеничные отруби и рисовую лузгу. При осахаривании целлюлозы наличие нежелательных компонентов не только лигнина, но и гемицеллюлозы и протопектина и других соединений существенно влияют на эффективность биоконверсии целлюлозы. Лигнин—

это сложный природный полимер растительных материалов, ковалентно связан с гемицеллюлозой. Целлюлозные микрофиллы погружены в лигно - гемицеллюлозный матрикс, образующий прочную надмолекулярную структуру. Поэтому без гидролиза лигнина и гемицеллюлозы целлюлолитические ферменты микроорганизмов не могут достичь субстрата.

Проблема делигнификации целлюлозы решается различными физическими, химическими и биохимическими способами. Делигнификация отходов хлопчатника имеют важное значение в использовании лигноцеллюлозного сырья Узбекистана при производстве биоэтанола (14,21,23).

Эта проблема достаточно глубоко исследована в докторской диссертации Ахмедовой З. Р. 1999г (20). Выделенные автором высокоактивные штаммы базидальных грибов будут использованы в данной работе.

В связи с чем дальнейшее исследования в данном направлении являются весьма актуальным.

Цель работы

Целью данного исследования являются биоконверсия лигноцеллюлозных субстратов термофильными ассоциатами **базидиомицетов.**

Задачи исследования

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи исследования:

- аналитический обзор литературы по биоконверсии лигноцеллюлозных субстратов различными термофильными микроорганизмами.
- определение лигноцеллюлозного состава отходов хлопчатника.
- исследование биоконверсии лигноцеллюлозных отходов хлопчатника и других отходов сельского хозяйства.

Научная новизна.

Впервые исследуются деградация лигнина и целлюлозы в обогащенной среде пшеничными отрубями и карбамидом.

Практическая значимость

Практическая значимость данного исследования заключается:

—разработка способа гидролиза лигнина для повышения эффективности энзиматического осахаривания целлюлозы.

—деградация лигноцеллюлозных субстратов сельскохозяйственных отходов и повышение кормовой ценности кормов при осахаривании отходов хлопчатника.

Предмет исследования.

Осахаривание лигноцеллюлозных субстратов сельскохозяйственных отходов базидиомицетами, обладающих большим набором целлюлаз, ксиланаз и лигниназ.

Объект исследования

Хлопковые коробочки, стебли хлопчатника, пшеничные отрубы.

Структура и объем диссертации.

Введение.

Глава 1. Литературный обзор

Глава 2.Способы производства этанола из целлюлозы.

Глава 3.Экспериментальная часть.

4.Результаты и их обсуждение.

5.Заключение.

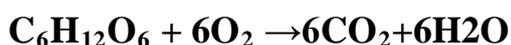
6. Список литературы.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

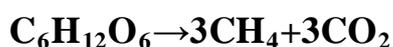
На протяжении тысячелетий люди использовали ресурсы земли, не думая о том, что они конечны. Лишь в последние десятилетия это простая истина стала осязаемой, когда многие страны столкнулись реальным и жестким дефицитом нефти, природного газа, цветных металлов. Открытие новых, в том числе крупных месторождений, смягчило остроту назревающего кризиса в ближайшем будущем, но полученный человечеством урок не прошел бесследно – стало ясно, что не только дальние, но весьма близкие перспективы развития экономики, даже богатых природными ресурсами стран, обуславливают необходимость переориентации на воспроизводимое сырьё т.е на ресурсы биосферы. Спектр этих ресурсов огромен. Биосфера в состоянии дать человеку практически все необходимые для его существования, за исключением, пожалуй только металлов. Однако, последнее обстоятельство может послужить и на благо человечеству, если, например стимулировать использование в качестве вторичного сырья. Важнейшими ресурсами биосферы являются растительная биомасса. Благодаря солнечной энергии и созданному природой механизму фотосинтеза она воспроизводится ежегодно в огромных масштабах естественным путем. Кроме традиционных путей использования растительной биомассы, она может служить также источником жидких и газообразных биотоплива. Экологическая биотехнология, основанная на природных процессах и механизмах конверсии веществ растительной биомассы ферментами целлюлолитических микроорганизмов. Экологическая биотехнология не является источником чужеродных, потенциально опасных для биосферы отходов. Отходы и побочные продукты, являясь продуктами биосферных циклов, сами могут служить сырьем, что позволяет создать полностью безотходные технологии. Вышеизложенное позволяет понять смысл и актуальность постановки проблемы биоконверсии растительного сырья.

1.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ.

Зеленные растения-источник жизни на нашей планете. Они являются посредником между солнцем и всеми живыми организмами, световая энергии солнца поглощается зелеными растениями в процессе фотосинтеза и превращается в химическую энергию органических веществ. Благодаря фотосинтетической деятельности в мире ежегодно улавливается 10^{21} кал солнечной энергии, и образуется $150 \cdot 10^9$ т. сухой растительной биомассы, а ежегодно круговорот углерода составляет $33 \cdot 10^9$ т. не менее трети углерода фиксируется при этом и используется на синтез целлюлозы, основное количество которой находится в древесине. Ее среднегодовая продукция $5 \cdot 10^{10}$ т., общая биомасса древесных растений на планете в пересчете на углерод равна $50 \cdot 10^{11}$ т (1,2) Таким образом, в качестве органического полимера целлюлоза занимает доминирующее положение в надземном и морском растительном мире. В свою очередь по истечении известного времени биомасса расщепляется и окисленная до CO_2 возвращается в атмосферу. Таков цикл круговорота углерода в природе. Полученная в процессе фотосинтеза энергия может быть использована живыми организмами для роста и поддержания метаболизма. Деградация целлюлозы-исключительно микробиологический процесс. Большая часть целлюлозы в природе окисляется аэробными микроорганизмами до CO_2 в соответствии с реакцией:



Около 4-10% целлюлозы конвертируется в метан и углекислый газ.



В анаэробных условиях (экосистемах) из целлюлозы образуется около $(0,55-1,2) \cdot 10^9$ т. метана в год. В атмосфере метан окисляется озоном до CO_2 и воды. Количество целлюлозы практически неограничено, т.к. при рациональном введении хозяйства она полностью восполняется. (Лобанок А.Г, Бабицкая В.Г, Богдановская Ж.Н, 1988г) (1) Целлюлоза содержится не только в древесине, но и в травах, листьях, в чистой целлюлозе в хлопковых и лубенных волокнах, китайской крапиве имеется до 95-98%, в соломе, древесине 40-60% в отходах хлопководства до 45-50% коробочки хлопка и (гузапоя) стебли хлопка.

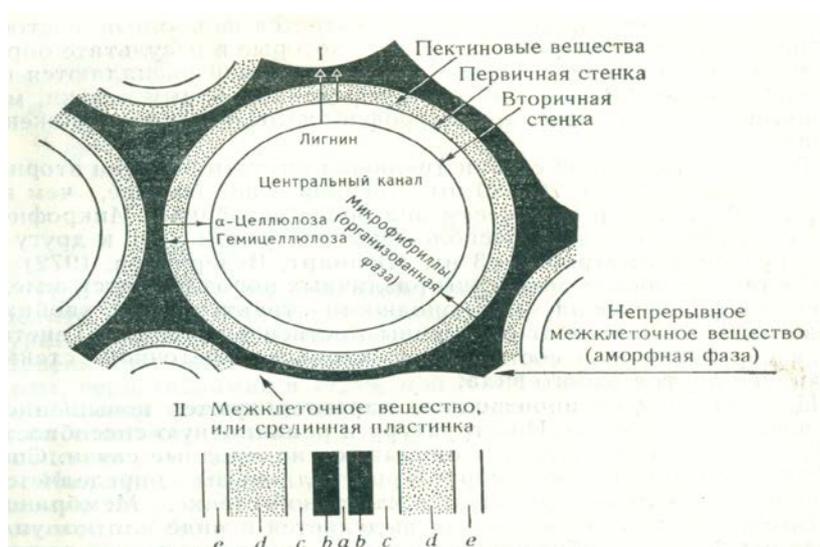


Рис 1.Строение растительной клетки: I- общий вид клетки по Тоуама; II-строение древесной клеточной стенки по Роговину; а - межклеточное вещество; б- стенки двух смежных клеток; с, d – вторичная стенка; е- внутренняя (третичная) стенка.

Как известно основной структурной и функциональной единицей растений является клетка. Она состоит из стенки протопласта и вакуоли. Отличительный признак растительной клетки - целлюлозная стенка. Она хорошо оформлена, очень прочно и сохраняется после отмирания протопласта. Из рис.1 видно, что клеточная стенка включает тонкий внутренний выстилающий слой (третичную стенку), содержащую целлюлозу и гемицеллюлозу, широкую вторичную стенку, состоящую из целлюлозы, лигнина и гемицеллюлоз и первичную стенку. Первичные стенки соседних клеток (волокон) соединены между собой межклеточным веществом, или срединной пластинкой имеются сведения о содержании в ней метилового

эфира полигалактуроновой кислоты, гемицеллюлоз и белков. В период роста клетки срединной пластинки на 2/3 состоят из пектиновых веществ затем происходит сильная лигнинофикация межклеточного вещества и оно приобретает большую устойчивость к различным механическим, химическим и энзиматическим воздействиям, (Бейнарт, Ведеников, 1972)(4) Согласно данным авторов в первичной стенке фибриллы целлюлозы занимают 1/3 объема, они переплетаются между собой, образуя сетчатую систему. Микрофибриллы погружены в аморфный матрикса, который составляет основную массу этой оболочки. В период роста клетки матрикс состоит из гемицеллюлоз, пектиновых веществ. Позднее основная часть вещества матрикса (до 70%) замещается находящимся в аморфном состоянии лигнином.

Далее следует целлюлоза, гемицеллюлоза и пектиновые вещества. В аморфном участке микрофибриллы, лигнин и гемицеллюлозы могут проникать между макромолекулами целлюлозы. Компоненты, входящие в состав первичной клеточной стенки можно условно разделить на четыре группы. (Салматова, 1983г) (6) структурные, представленные целлюлозой, компоненты матрикса стенки — гемицеллюлозы, пектины, белки, липиды. Инкрустирующие стенку — лигнин, суберин; откладывающиеся на ее поверхности — кутин и воска. Кроме того, клеточные стенки могут содержать значительное количество минеральных веществ силикатов и карбонатов кальция. Химический состав целлюлозы соответствует формуле $(C_6H_{12}O_5)_n$. элементарным звеном макромолекулы является β -Д-глюкопираноза, интересно отметить, что целлобиоза является главным промежуточным продуктом расщепления целлюлозы целлюлолитическими и бактериальными ферментными системами. Степень полимеризации целлюлозы около 10000 молекулярная масса 1,5 млн. целлюлозные молекулы со степенью полимеризации 6000 считаются нерастворимыми. Элементарные звенья макромолекулы целлюлозы β -Д-глюкопиранозы соединении между собой β -гликозидной связью. (Тарчевский, Марченко, 1985)(7)

Одним из основных факторов, определяющих свойства целлюлозы и других высокомолекулярных полисахаридов являются надмолекулярная структура. Цепи молекул целлюлозы объединяются в пучки-мицеллы. Элементарные мицеллы объединяются в пучки, называемые микрофибриллами. Такие микрофибриллы имеют ширину 25 Нм и содержат до 2000 молекул целлюлозы. Микрофибриллы объединяются в волокна макрофибриллы шириной 0,4 мкм, они содержат до 500,000 молекул целлюлозы.(Тутаюк,1980)(8) Лигнин- наиболее важный компонент растительной биомассы. Так как лигнин и целлюлоза вместе с гемицеллюлозой являются структурными компонентами высших растений. Проблема биоконверсии их тканей служит источником возобновления биосинтетического углевода на земле. Это сложный природный полимер растительных материалов (древесина, солома и др.) Его запасы на земле занимают второе место после целлюлозы. Лигнин основной компонент срединной пластинки, но его большая часть содержится во вторичной клеточной стенке, где он ковалентно связан с гемицеллюлозой. Целлюлозные фибриллы погружены в лигниногемицеллюлозный матрикс. Работами (Kirk, 1985) (9) установлено, что лигнин делает целлюлозу и гемицеллюлозу плохо перевариваемыми. Лигнин в аморфном состоянии заключен между фибриллами целлюлозы.

Пектиновые вещества - высокомолекулярные соединения углеводной природы, содержатся в большом количестве в стенках молодых растений и связывают не только волокна стенки, но и соседние клетки. Состоят они, главным образом, из линейных полимеров, D- галактуроновой кислоты, соединенных α 1,4- гликозидными связями. Пектиновые вещества сосредоточены обычно в срединной пластинке и образуют группу гетерогенных, частично метоксилированных полисахаридов, основная биологическая роль которых, сводится к цементированию клеточных компонентов. Пектиновые вещества обладают коллоидными свойствами с высоким отрицательным зарядом, и могут связывать большое количество

воды. В свежих фруктах обнаруживается от 0,2 до 4,0% пектиновых веществ, а в растительных тканях —0,7 до 16 %. Средняя молекулярная масса пектинов 20000-400000.

Полагают , что пектины включают L-арабан, β -1,4 галактан, а L-рамноза, L-арабиноза, D-галактоза составными частями пектина. Некоторые гидроксильные группы пектина (C_2 и C_3) ацелированы. Протопектаном называется водонерастворимый пектин, который собственно и цементирует клеточные компоненты. Одной из причин нерастворимости протопектина является связь с другими компонентами клетки, главным образом с гемицеллюлозой, присутствие катионов Ca, Mg и уменьшение способности к набуханию и наконец механическое переплетение пектина с другими компонентами клетки. (Fogarty Ward, 1972, Рустамбекова Г, 2002 г) (10,11)

Одним из неотъемлемых компонентов клеточных стенок растений является гемицеллюлозы. В отличии от целлюлозы они являются полисахаридами с меньшим размером молекул (СП-50-200, Мм-10000-40000) извлекаемые из растительных материалов растворами щелочи и легкогидролизуемые до гексоз и пентоз.(Степаненко,1968)(12) Основные компоненты гемицеллюлаз- ксиланы, уроновые кислоты, маннаны, арабогаллактаны.

В клеточной стенке гемицеллюлозы находятся между микрофибриллами целлюлозы.

Одной из причин нерастворимости протопектина является связь с другими компонентами клетки, в частности с гемицеллюлозой. Присутствие катионов кальция и магния ведет к нерастворимости малоэтерифицированного протопектина и его механическое переплетение с другими компонентами клетки, участвующими в образовании надмолекулярной структуры целлюлозы и срединной пластинки (Rombouts , Pilnik, 1980) (12)

При рассмотрении вопросов биоконверсии лигноцеллюлозных растительных субстратов в белок, биометан, биоэтан и другие продукты, а также ферментативное осахаривание целлюлозы не всегда в должной мере

принимают во внимание особенности строения того или иного субстрата, наличие нежелательных компонентов не только в виде лигнина но и в виде гемицеллюлозы, пектиновых и других веществ. Однако, особенности строения и наличие сопутствующих компонентов лигноцеллюлозных материалов существенно влияют на эффективность биотрансформации.

(Khan A W, 1980)(13)

1.2. Механизмы микробной деградации лигноцеллюлозы.

Целлюлоза разрушается в природе с участием большого числа различных микроорганизмов – аэробов, анаэробов, мезофилов и термофилов. Их целлюлолитические системы также разнообразны, как и сами организмы. Хотя большая часть целлюлозы в природе разлагаются аэробными микроорганизмами, анаэробные процессы имеют большое экологическое значение. Эффективное разложение целлюлозы в природе происходит в результате симбиотического взаимодействия различных типов микроорганизмов и их сложных целлюлолитических систем. В природе непрерывное разложение растительных остатков происходит под действием сапрофитных микроорганизмов. Однако, разложение древесины в естественных условиях редко происходит под действием монокультуры, имеет место ассоциация микроорганизмов, колонизирующих лигноцеллюлозный субстрат, сапрофитными грибами, которые метаболизируют легкоусвояемые соединения (сахар и др.), преобладание грибов, разлагающих целлюлозу, затем преобладание деструкторов лигнина.(Александров и сотр.1982 г)(14)

Целлюлозосодержащиеся субстраты являются практически неисчерпаемыми источниками сырья, поэтому в последнее время исследователи уделяют большое внимание на биоконверсию с помощью микроорганизмов с целью получения ценных для народного хозяйства продуктов, также как белок, ферменты, витамины, этанол, метан, органические кислоты.

В аэробных условиях значительная роль в разложении целлюлозы принадлежит микроскопическим грибам, синтезирующим активный комплекс целлюлолитических ферментов из родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* и др. В последнее время проводятся широкие исследования с термофильными грибами – продуцентами целлюлаз. Термофильные микроорганизмы представляют большой интерес в следствии высокой скорости их роста, активного обмена и способности продуцировать термостабильные ферменты. Условия образования целлюлаз и других родственных ферментов изучены Логиновой и сотрудниками, выделены **термотолерантные** грибы *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* 17р., (Логинова и сотр., 1983 г) (16-17) образующие целлюлолитические ферменты, исследованы их свойства.

Наиболее активными продуцентами целлюлолитических ферментов являются грибы рода *Trichoderma virens*, в честь доктора Риза, он был переименован в *T. Reesei*. За последнее время из этого организма был получен ряд перспективных мутантов, обладающих способностью к сверх-синтезу целлюлаз. Целлюлоза, как многие другие полимеры оболочек растительных клеток гемицеллюлоза, пектины, лигнины являются нерастворимым субстратом, характеризующимся сильными межмолекулярными связями, затрудняющих проникновение организмов к субстрату, осуществление гидролиза полимеров.

При проникновении гиф гриба в целлюлозные субстраты, первоначально отмечается рост гриба на поверхности целлюлозы, при этом гифы, приобретают форму, напоминающие «сверло» и способствуют механическому проникновению гриба в субстрат. В результате проникновения их в волокно и локализации в целлюлозном субстрате, возникает система гиф, расщепляющих растительную ткань и метаболизирующих целлюлозу. В процессе роста гифы выделяют в окружающую среду сахара, аминокислоты, органические кислоты, витамины и токсины, а также минеральные элементы. В процессе лизиса гиф

происходит деполимеризация их клеточной оболочки. Многие виды бактерий и других организмов поселяясь на гифомицетах целлюлозарасщепляющих грибах, составляют эпифитную флору гиф.

Система развитого мицелия и эпифитной флоры представляют собой гипосферу. (Билай и сотр. 1982 г)(18)

В современных условиях научно-технического прогресса, характеризующегося, в частности, дальнейшим развитием биоконверсии целлюлозосодержащих отходов для производства биоэтанола и производство обогащенных кормов. Продуценты целлюлаз – грибы и бактерии заслуживают разностороннего комплексного изучения их метаболизма, с целью выявления их токсических свойств. Согласно требованиям стандарта ИСО все биотехнологические процессы должны обеспечивать безопасность как для человека, так и для животного организма. Припутина (18) Приводит сведения об образовании токсичных метаболитов микроскопических грибов, применяемых в ферментной промышленности. В данном обзоре обобщены некоторые новые данные о токсичности афлатоксинов, опасность афлатоксинов связана с их резко выраженной канцерогенностью. Учтя данные литературы нами в исследованиях использовались базидальные грибы. Как известно базидомицеты не являются токсичными. Впервые в Узбекистане Ахмедовой З.Р. (20) были выделены местные штаммы базидомицетов - активные продуценты лигниназ, ксиланаз и целлюлаз, отселекционирован новый штамм гриба *Pleurotus ostreatus* Уз БИ-ZAX 105/7.

Универсальный продуцент одновременно действующих целлюлаз, ксиланаз и лигниназ. Изучена их взаимосвязь в разложении лигноцеллюлозы.

Определен полный компонентный состав ферментов и их молекулярные формы из культуральной жидкости и биомассы гриба *P/ostreatus/*

Ранее не предпринимались попытки комплексного изучения всего спектра ферментов, продуцирующей одной культурой.

Автор поставил своей целью, выявление активных продуцентов трех полиферментных систем: целлюлаз, ксиланаз и лигниназ среди местных штаммов, базидомицетов, изучение физико – химических и биохимических свойств и выявление молекулярных механизмов их действие на лигноцеллюлозные субстраты. И установления взаимосвязи между ними, а также изучения компонентного состава ферментов в динамике роста в условиях глубинного и твердофазного культивирования. Изучен элементарный и химический состав лигноцеллюлозных субстратов до и после культивирования грибов. Показано, что в процессе роста грибов происходит утилизация целлюлозы на 23-78%, гемицеллюлозы на 21-80%, лигнина на 21-58%. Наибольшая деградация которых происходит в течение 10 суток. Из лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства пищевой промышленности с использованием ферментных систем базидомицетов, получены ценные физиологически активные вещества – гомо и гетерополисахариды, хитин и хитозановая фракция, обладающие антитоксической, антимикробной, противораковой активностью.(21,22,23)

Целлюлолитические системы бактерий отличны от таковых у грибов. Так, у многих целлюлолитических систем бактерий нет целлобиозы, а если и есть, то в этом случаи они могут усваивать целлодекстрины и целлобиозу с помощью фосфорилаз. В природе целлюлолитические волокна, возможно являются для целлюлолитических бактерий лучшим субстратом, чем продукты разложения. Это создает для бактерий ряд экологических преимуществ. Бактерии, адсорбированные на целлюлозных волокнах, способны лучше потреблять продукты деградации субстрата: Аэробная бактерия *Acetivibrio cellulolytius* продуцирует внеклеточную целлюлазу, сопоставимую по активности с препаратами из *Aspergillus niger* и *Trichoderma viride* (Khan,1984) (15).

1.3. Использование ассоциаций микроорганизмов для биоконверсии целлюлозы

Ряд авторов считают, что технологические процессы получения различных видов жидкого топлива, включая этанол из продуктов гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы наиболее перспективны, так как ферментация углеродного сырья не требует применения сложного оборудования, больших капитальных и энергетических затрат, субстратами могут служить отходы целлюлозно-бумажной, пищевой промышленности, зерновые и целлюлоза содержащие отходы сельского хозяйства. Преимущество совместной культуры для получения этанола из гидролизатов древесины по сравнению с применяемыми в настоящее время дрожжами является способность утилизировать целлюлозу и ксилозу.

Гидролиз целлюлозы можно интенсифицировать путем оптимизации условий культивирования *Clostridium thermocellum*. Так, снижение РН среды до 6,5 приводит к подавлению синтеза уксусной кислоты (Votava et-al 1983г) (24) с целью повышения скорости конверсии целлюлозы в этанол культивирование *Clostridium thermocellum* проводили с подпиткой. В этих условиях концентрацию этанола, согласно данным автора, получали за более короткий период, чем без подпитки. При этом максимальная продуктивность равнялась 1,0г этанола на 1г целлюлозы (Spinnsler 1986)(25) Имеются сообщения о непрерывной ферментации термофильной смешанной культуры *Clostridium thermocellum* в реакторе с восходящим потоком при Рн 6,8-7,2 и температуре 62°C. (Keeijntjens etal 1986г) (26)

Анализ получения этанола из целлюлозосодержащих субстратов, при использовании термофильных бактерий в процессе получения этанола имеет следующие преимущества: термофильные культуры меньше подвержены вытеснению, их ферменты термостабильны, не требуется жесткая стерилизация среды и оборудования, снижаются затраты на охлаждение. При 50-60° осуществляется самопроизвольная дистилляция этанола.

Применение термофильных смешанных культур анаэробных бактерий позволит снизить себестоимость этанола на 25%. В настоящее время более 2/3 расходов на производство этанола составляют затраты на сырье, потому в ряде стран наметились тенденции к расширению переработки дешевых видов сырья, в частности отходов деревообрабатывающей промышленности, сельского хозяйства и отходов пищевой промышленности.

В США после 2-летнего изучения способа получения энергии пришли к выводу, что производство этанола будут получать за счет отходов древесины и других видов растительного сырья. Наиболее целесообразно, по мнению экспертов использовать для получения этанола из лигноцеллюлозных материалов - отходов сельского хозяйства. В связи с этим внимание исследователей должно быть направлено на разработку более эффективного способа делигнификации целлюлозы. Деграция лигноцеллюлозы высокоэффективными микроорганизмами позволит рационально использовать целлюлозосодержащие источники. (Douglas 1985г)(27) В последнее время уделяется внимание обработке древесины острым паром с последующим резким снижением давления. Такая обработка позволит получить свободную целлюлозу, пентозаны и лигнин (Khan 1984г)(28) Свободный от примесей лигнин обладает высокой реакционной способностью, низкой молекулярной массой и является источником получения различных химических веществ, например: ароматических кислот, альдегидов, полимеров (Jotech 1986г)(29)

Знание физиологии бактерий в ассоциациях, превращающих целлюлозу до CO_2 , позволило понять, что это конверсия обеспечивается определенной метаболической группой бактерий. Если, например, в ассоциации целлюлолитических бактерий представлена *Clostridium thermocellum*, то она гидролизует целлюлозу до целлобиозы и глюкозы с помощью внеклеточных целлюлолитических ферментов. Однако, если *Clostridium thermocellum* не имеет спутников, глюкоза и целлобиоза накапливается в среде и наконец достигают концентрации, когда они

ингибируют целлюлолитическую систему. Если в среде имеется другая бактерия способная метаболизировать глюкозу и целлобиозу, она потребляет эти сахара и продуцирует соответствующие метаболиты.

В смещенной культуре *Clostridium thermocellum* и *Thermoanaerobacter*, продуцирующей этанол и CO_2 основными продуктами разложения целлюлозы является этанол и CO_2 (Ljungdahl, Eriksson, 198г) (30).

При совместном культивировании двух видов анаэробных бактерий расщепление целлюлозы происходит интенсивно с образованием большого количества сахаров, чем при выращивании чистых культур (Andrianarisoa et al, 1984г)(35)

В течение ряда лет исследования механизма действия целлюлолитических ферментов шло медленно, так как не были известны микроорганизмы, продуцирующие внеклеточные ферментные комплексы, способные осахаривать такие высокоорганизованные формы целлюлозы, как отходы хлопкоочистительных предприятий. Важным фактором, определяющим расщепление высокоорганизованных целлюлозных субстратов является их надмолекулярная структура.

Ещё в 1961г. Selby отмечал, что по сравнению с кислотным гидролизом действие целлюлаз на хлопок сопровождается большими потерями субстрата.(35)

Для того, чтобы целлюлозные микрофибриллы с очень сложной структурной организацией деполимеризовались целлюлазами до образования растворимых легкоусвояемых продуктов, необходимы условия, обеспечивающие диффузию ферментов в структурный матрикс целлюлозы и возникновение комплекса фермент – субстрат. При воздействии на целлюлозу в отличие от других типов ферментативных реакций, протекающих в растворе, действие фермента осуществляется на разделе фаз раствора фермента и нерастворимой поверхности субстрата – целлюлозы.

Под действием целлюлолитических ферментов природная целлюлоза изменяет свои физические свойства еще до появления редуцирующих

сахаров. Это выражается в потере прочности, степени полимеризации, повышения адсорбции влаги, щелочи и других факторов. К целлюлолитическим ферментам относят целый комплекс ферментов; эндоглюконаза, экзоглюкогидролаза β -1,4 глюкозидаза, целлобиоза осуществляет неупорядоченный гидролиз любую глюкозидную связь в молекуле целлюлозы. (В -1,4-Д- гликозидные связи). Целлобиоза расщепляет целлобиозу до глюкозы. Экзоглюкогидролаза – осуществляет упорядоченной концевой гидролиз с образованием глюкозы.

Производственные опыты показали, что совместное использование *Clostridium Thermoanaerobacter ethanolicus* позволяет полностью исключить стадию предобработки целлюлозы кислотами или щелочью. Наряду с этанолом образуется CO_2 , H_2 , лактат и формиат. Доказана возможность получения этанола, из кукурузной и пшеничной соломы, различных сельскохозяйственных остатков. Максимальный выход этанола при ферментации целлюлозы смещенной культурой достигалось при pH 6,8 -7,8 и температуре 45 -70⁰С. При времени ферментации 7-21 суток, выход этанола равен 8,3 -31,8 % от общего количества целлюлозы.

Разработан способ избирательной делигнификации лигноцеллюлозных материалов системой растворителей NaOH, этанол-вода, в условиях, приводящих к минимальной потере ферментируемых углеводов в целлюлозной биомассе. Делигнифицированную целлюлозную массу отделяют центрифугированием, промывают водным этанолом и высушивают при 50⁰ С. Полученная целлюлоза освобожденная от надмолекулярных веществ и лигнина, служит основным субстратом для синтеза этанола с участием *Clostridium thermoactillum* *Clostridium thermosaccharolyticum*. Скорость деградации делигнифицированной еловой древесины при последовательном добавлении культур составляет 0,6 г/л, с выходом этанола через 120 час в концентрации 26 г/л. Заметно увеличивается скорость деградации субстрата и образование спирта при помощи двух культур, использующих делигнифицированные кукурузную и пшеничную солому: в

спирт превращается 85% субстрата (Avgerinos, Wang, 198г) (31). Древесную щепу, пшеничную солому а также субстраты после предобработке острым паром, водой и NaOH применяли для культивирования *Clostridium thermocellum* в монокультуре и сокультуре с *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Скорость образования этанола и конечная концентрация его заметно возрастает в варианте с предобработкой (Saddler et al., 1984г) (32). Мутант *Clostridium thermosaccharolyticum* образует незначительное количество побочных продуктов брожению (молочную и уксусную кислоту). Он более устойчив к высоким концентрациям этанола по сравнению с исходным штаммом.

Выход этанола равен 0,43 г/л ксилозы, максимальная концентрация уксусной кислоты не превышает 4 г/л. Эти хорошие показатели, особенно если учесть, что при получении спирта из гидролизатов целлюлозосодержащих субстратов с помощью дрожжей, ректификации подвергают бражку с содержанием этанола 15 г/л. (Цирлин, 1984г) (33).

Zeikus и сотр. (1981г) (34) при рассмотрении последних достижений в области этанольной ферментации с участием термофильных бактерий представляющих практический интерес с точки зрения непрерывных технологических схем получения этанола прямой биоконверсией биомассы растительного происхождения, пришли к заключению, что по сравнению с дрожжами и мезофильными бактериями ферментация с участием термофильных бактерий позволяет более эффективно превращать в этанол целлюлозные и гемицеллюлозные компоненты делигнифицированной биомассы. При этом исключается предварительная деполимеризация этих субстратов, что значительно снижает стоимость этанола и упрощает технологи спиртового производства. В настоящее время более 2/3 расходов производства этанола составляют расходы на сырья, потому в ряде стран наметились тенденции к расширению переработки дешевых видов сырья, в частности отходов деревообрабатывающей промышленности и сельского хозяйства.

Если учесть, что только в США количество целлюлозолосодержащих отходов достигает $940 \cdot 10^6$ т. в год, при этом на долю целлюлозы приходится $478 \cdot 10^6$ т, то получение этанола представляется вполне реальным. В США после двухлетнего изучения способов получения энергии пришли к выводу, что производство энергии будут получать за счет отходов деревоперерабатывающих предприятий и различных видов отходов сельского хозяйства. Наиболее целесообразно считают эксперты, использование для получения этанола лигноцеллюлозных материалов и отходов сельского и лесного хозяйства. Процессы делигнификации и осаживания, предшествующих получению этанола требуют дальнейших исследований в производственном масштабе в реакторах непрерывного действия.

В связи с этим внимание исследователей сосредоточено на разработке способов делигнификации целлюлозолосодержащих растительных субстратов.

Особое внимание уделяется способу обработки древесины острым паром с последующим резким снижением давления. Такая обработка позволяет получить чистую целлюлозу, пентозаны и лигнин (Khan, 1984г) (15). Свободный от примесей лигнин обладает высокой реакционной, низкой молекулярной массой и является источником ароматических спиртов, альдегидов, химических веществ.

Большую перспективу имеет деградация лигноцеллюлозы высокоэффективными микроорганизмами, которая позволит рационально использовать целлюлозолосодержащие источники. Согласно данным ряда авторов установлено влияние автоклавирования отходов сельского хозяйства при $180-210^{\circ}\text{C}$ на повышение чувствительности последующему ферментативному гидролизу целлюлозы. После такой обработки гидролизуется до 80% целлюлозы, соответственно повышается выход этанола. Особенно эффективно последующее удаление экстракцией горячей водой, растворимые компоненты лигнина, которые являются ингибиторами

целлюлаз (Linden et al, 1981 г, Poutanen et al 1986 г, Mandels, 1984г, Караткевич, 1981г)(37,38,39) Проводимые во всем мире исследования по биоконверсии лигноцеллюлозы в конечном счете направлены на удешевление технологии получения биотоплива из целлюлолозосодержащего сырья и экологически чистых, обогащенных кормов для животноводства.

Выводы.

Запасы природных источников энергии: нефти, газа, угля и торфа ощутимого истощаются. Рост потребности в энергии с одной стороны и уменьшение ресурсов ископаемого топлива с другой, побуждают ученых всех стран активные вести поиск новых источников энергии. Одним из возможных путей решения энергетической проблемы на длительный период является превращение возобновляющихся источников органического вещества, таких как отходы в продукты, которые могут быть использованы в качестве топлива.

Основными положениями энергетической программы всех стран планеты предусмотрены на первом этапе ее реализации создать материально – техническую базу для широкого применения нетрадиционных источников энергии.

Существует несколько путей вовлечения растительных отходов в целевые процессы биоконверсии. Так, возможно более полное усвоение жвачными животными грубых целлюлозолосодержащих кормов. В результате их соответствующей физической, химической или ферментативной предобработки. Получение легкоусвояемых сахаров из лигноцеллюлозных отходов. Этот путь утилизации растительных полимеров предполагает разработку эффективной технологии непрерывного получения глюкозы из целлюлозы. В дальнейшем возможна конверсия глюкозы во фруктозу. И использования ее в пищевой промышленности или в качестве сырья для микробиологического синтеза различных целевых продуктов. Особое внимание, по мнению специалистов, заслуживает получение из ферментативных гидролизатов целлюлозы биоэтанола.

Основное сырьё для производства биоэтанола до последнего времени использовали кукурузу и сахарный тростник. Традиционно эти культуры более распространены в США и Бразилии, поэтому именно эти страны производят в настоящее время биоэтанол.

По физико – химическим показателям биоэтанол является безупречным топливом. Не смотря на то, что при горении он выделяет тепловой энергии меньше, чем высокооктановый бензин, тот факт что спирт сгорает практически без остатка не оставляя копоти и сажи, позволяет значительно экономит на периодическом обслуживании двигателя, отсутствия вредных продуктов сгорания позволяют обходиться без выхлопной трубы. Двигатели на спирту при работе выделяет водяной пар и небольшое количество углекислоты. Каждый литр этого чистого природного топлива, сожженный вместо бензина, газа или электричества, позволяет сохранить несколько кубометров озонового слоя нашей планеты.

Биоэтанола в отличие от спирта из которого производится алкогольные напитки, топливный этанол не содержит воды и производится укороченной дистилляцией (две ректификационные колонны вместо пяти), поэтому содержит метанол и смещенные спирты, а также бензин, что делает его непригодным для питья.

Этанол возобновляемое топливо, новое снабжение этанолом может быть «выращено» ежегодно, тогда как для производства энергетических источников на основе окаменелого топлива требуется миллионы лет.

Производство и потребление этанола растет как в США, так и во всем мире. В США повышению спроса на этанол способствовало принятие в 1990 году поправок к «Акту о чистом воздухе», которые требуют использования обогащенного кислородом топлива в районах с недопустимо высоким уровнем загрязнения воздуха, особенно в мега полисах. В Казахстане, Узбекистане также необходим аналогичный закон, чтобы очистит воздух городах.

Производство биоэтанола на сегодняшний день достигло более сотни млрд. литров, что конечно же ни в коем мере не может покрыть потребности цивилизации даже на 10%. Но все- таки выход из энергетического кризиса существует, которое может стать спасением человечества.

Глава 2. 2.1 Технология производства спирта из целлюлозы.

Обычный спирт и „целлюлозный спирт“ являются одинаковым продуктом, произведенные с использованием различного сырья и технологических процессов. Получение обычного этанола ведут из крахмала, содержащегося в зерновых культурах (кукурузы, пшеницы и других зерновых культур) „Целлюлозный спирт“ может быть произведен из широкого разнообразия целлюлозосодержащего сырья, включая сельскохозяйственные отходы (стебли, и коробочки хлопка, солома, опилки бумажной целлюлозы и др. целлюлоза является основным компонентом клеточных оболочек растений одним из самых распространенных органических веществ земли. Целлюлозная биомасса состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина, в небольшом количестве белков, липидов и минеральных веществ. Приблизительно 60-65% сухих веществ целлюлозной биомассы представлены в качестве целлюлозы и гемицеллюлозы.

Эффективное разделение этих сложных полимерных структур на простые сахара, необходимые для получения биоэтанола является основой технологии производства этанола из целлюлозы. Среди многочисленных методов производства спирта из целлюлозы, можно выделить два основных варианта переработки, позволяющие получить пригодные для брожения простые сахара, необходимые для получения спирта.

Кислотный гидролиз

Используют химический гидролиз целлюлозной биомассы с помощью различных органических растворителей (кислоты и щелочи)

Ферментативный гидролиз.

Данный метод связан с предварительной подработкой целлюлозной биомассы паром, с последующим резким снижением давления. Такая обработка позволяет получить свободную целлюлозу, пентозаны и лигнин. Не смотря на сложность процесса производства спирта из лигниноцеллюлозного сырья, новые технологические разработки по биоконверсии целлюлозы постоянно улучшают процесс биоконверсии с

использованием термофильных микромицетов и бактерий снижают себестоимость полученного спирта.

После стадии предварительной подготовки сырья к гидролизу, наиболее перспективным в последнее время по мнению ученых является ферментативный гидролиз целлюлозной массы.

Процесс кислотного гидролиза.

Существует два наиболее часто используемых процесса кислотного гидролиза: Гидролиз разбавленной кислотой (1,0 % ной серной кислотой) проводится при высокой температуры - 215⁰С и давлении с продолжительностью до нескольких минут, что позволяет вести процесс непрерывно.

Гидролиз концентрированной кислотой используют сравнительно мягкие температурные режимы и давления. Продолжительность процесса обычно значительно дольше, чем при гидролизе разбавленной кислотой.

Гидролиз концентрированный кислотой.

Этот процесс использует при гидролизе концентрированную кислоту и обеспечивает быстрое преобразование целлюлоз в гексозы, а гемицеллюлозы в пентозы с небольшим разложением. Процесс позволяет минимизировать потери сахаров и проводить восстановление кислоты для повторного ее использования. Гидролиз гемицеллюлоз ведется с использованием 70% ой серной кислоты в течение 2-6 часов в гемицеллюлозном гидролизном реакторе. Низкие температуры и давление минимизируют разложения сахаров.

Следующим шагом является гидролиз целлюлозы. Обезвоженный твердый остаток с первого этапа, содержащий целлюлозы, в течение 1-4 часов подвергается гидролизу с помощью 30-40% раствора серной кислоты. Совмещая процесс фильтрации с процессом обезвоживания полученного раствора, увеличивают кислотную концентрацию до 70% позволяющей наиболее полно провести гидролиз оставшейся целлюлозы. Полученный в

процессе гидролиза сахара выделяются из раствора, а кислота концентрируется в выпарных установках и используется повторно.

Описание процесса ферментативного гидролиза.

Для эффективной работы ферментов, необходимо обеспечить им доступ к молекулам, которые необходимо гидролизовать. Также как и гидролиз крахмала, ферментативный гидролиз целлюлозной массы требует предварительной подготовки. Подразумевается удаление гемицеллюлоз, нарушение структурной целостности целлюлозы и удаление лигнина, с этой целью используют физическое воздействие: температуры и давления или химические методы описанные выше. После проведения предварительной подготовки массы к гидролизу, происходит, ферментативное расщепление молекул целлюлозы и гемицеллюлоз на простые сахара пригодные к сбраживанию.

Процесс получения этанола дополняется стадией брожения, дистилляцией и обезвоживания. Эти технологические процессы аналогичны, технологии получения этанола из крахмалосодержащего сырья.

Биоэтанол, также как и гидролизный спирт, получают из лигноцеллюлозных материалов, при дрожжевом брожении изредуцирующих сахаров возобновляемых растительных отходов сельского хозяйства и лесной промышленности. Согласно по уравнению:



Целлюлоза состоит из остатков молекул глюкозы, которая при кислотном или ферментативном гидролизе образует глюкозу:



Кроме целлюлозы, в состав клеточных оболочек растений входят еще несколько других углеводов, известных под общим названием

гемицеллюлоз, извлекаемых из клеточных оболочек 1% от раствором серной или соляной кислоты при нагревание, при ферментативном гидролизе.

Биоконверсия служит для получения главным образом биоэтанола, а также кормовые и технические продукты из непищевого растительного сырья (соломы, шелухи семян, отходов хлопководства, зерноводства на ценные пищевые сахара и хорошо перевариваемые корма для животноводства.

2.1. Отличительные свойства различных способов гидролиза лигноцеллюлозных материалов.

Гидролиз растительных материалов происходит обычно в присутствии разбавленных или концентрированных минеральных или органических кислот и солей (реже), дающие в водных растворах кислую реакцию. В результате гидролиз превращает полисахариды сырья в моносахариды (пентозы и гексозы), а также гидролизный лигнин (выход 30% в расчете на 1т. абсолютно сухого сырья)

Поскольку на процесс гидролиза (скорость и степень гидролиза) полисахаридов влияет размер частиц сырья его предварительно измельчают.

Гидролиз разбавленными кислотами (в основе 0,4-0,7 ной серной кислоты) осуществляют при 120-190⁰С и 0,6-1,5 МПа)

Достоинство способа: можно использовать влажное сырье и проводить реакцию без генерации кислоты, вследствие малого его расхода.

Недостатки: - большие затраты тепла на гидролиз, связанное с потерей моносахаридов из-за разложения в реакционной зоне до фурфурола, оксиметилфурфурола загрязнение гидролизатов побочными продуктами, что снижает их качество. Тем не менее, простота определила интенсивное развитие данного способа, который является основным в гидролизной промышленности России.

Гидролиз концентрированными кислотами (30-41%ной HCl), а также 70-80%ной H₂SO₄ ведут при температурах не выше 60С и

атмосферном давлении получением гидролизатов, содержащих большое количество моносахаридов и немного примесей.

Недостатки: - в этом процесс необходимо высушивать растительное сырье, регенерировать кислоту применять дефицитные материалы для защиты оборудования от коррозии.

Гидролиз растительного сырья химическим способом неизбежно сопровождается разложением моносахаридов, при котором образуются нежелательные побочные продукты – фурфурольных реакций ингибирующие процесс брожения, уменьшающие выход спирта. Режим процесса гидролиза (температура, концентрация кислот, продолжительность) выбирают таким образом, чтобы степень гидролиза составило 90%. При оптимальных режимах выход моносахаридов составляет 46-50%.

Гидролиз легко растворимых полисахаридов проводят периодически в одну ступень. При этом вследствие высокого соотношения констант скорости гидролиза – K_2 , сырья разложения K_p - моносахаридов ($K_2 \gg K_p$) выход их приближается к количественно равному гидролизу.

При гидролизе трудногидролизуемых полисахаридов (упомянутые константы близки между собой.)

Степень разложения моносахаридов существенно возрастает. Поэтому их максимальный выход при одноступенчатом процессе не превышает 50% от исходного увеличения выхода моносахаридов достигается применением так называемого перколяционного гидролиза. В основе способа лежит принцип непрерывной фильтрации раствора кислоты через растительный материал с одновременным отбором гидролизата. При этом раствор служит не только катализатором, но и экстрагентом моносахаридов, которые непрерывно выводятся из зоны реакции. Твердая фаза загружается в аппарат периодически.

В докторской диссертации В.И.Сушкова (2004г)(40) проведен сравнительный анализ способов сернокислого гидролиза растительного сырья при производстве гидролизного этилового спирта. Для его

производства используют отходы деревообработки и отходы от переработки сельскохозяйственного сырья (солома, шелуха льна, конопли, хлопка и др.) Известно, что при комплексной переработке возобновляемого лигниноцеллюлозосодержащего сырья получают этаноловый спирт, кормовые дрожжи, фурфурол и топливо (лигнин).

Основным потребителем теплоэнергo ресурсов в гидролизном производстве является перколяционный гидролиз. Известно другие способы гидролиза растительного сырья, альтернативные перколяционному гидролизу, которые отличаются типом используемого оборудования и технологическими режимами. Автор, изучая ряд существующих в гидролизном производстве способ гидролиза исследовал преимущества и недостатки существующих способов. Автор отличает, что процесс перколяционного гидролиза имеет ряд положительных сторон: 1) процессы гидролиза гемицеллюлозы и целлюлозы и фильтрации гидролизатов от гидролизуемого сырья и лигнина последовательно в одном аппарате; 2) объединение гидролизатов гемицеллюлоз и целлюлоз водном аппарате позволяют перерабатывать все гексозы сырья в этанол; 3) в процессе подготовки гидролизата за счет снижения давления и самоиспарения паров предусмотрена экономия теплоэнергo ресурсов, выделение фурфурола и очистка гидролизата от летучих примесей; 4) технологические режимы перколяционного гидролиза и технологические режимы подготовки нейтрализованного гидролизата позволяет обеспечить выход моносахаридов от абсолютного сухогосырья 35-39% (содержание моносахаридов в гидролизатах древесины от редуцирующих веществ 60-61%, выход кормовых дрожжей от редуцирующих веществ 48-52% влажности лигнина не более 65% (Холькин 1989г)(42), (Сушков 2009г)(41) Технологическая схема переработки растительного сырья перколяционным гидролизом с получением фурфурол содержащего конденсата (ФСК) спиртовой бражки и кормовых дрожжей представлена на рис.1

варочная

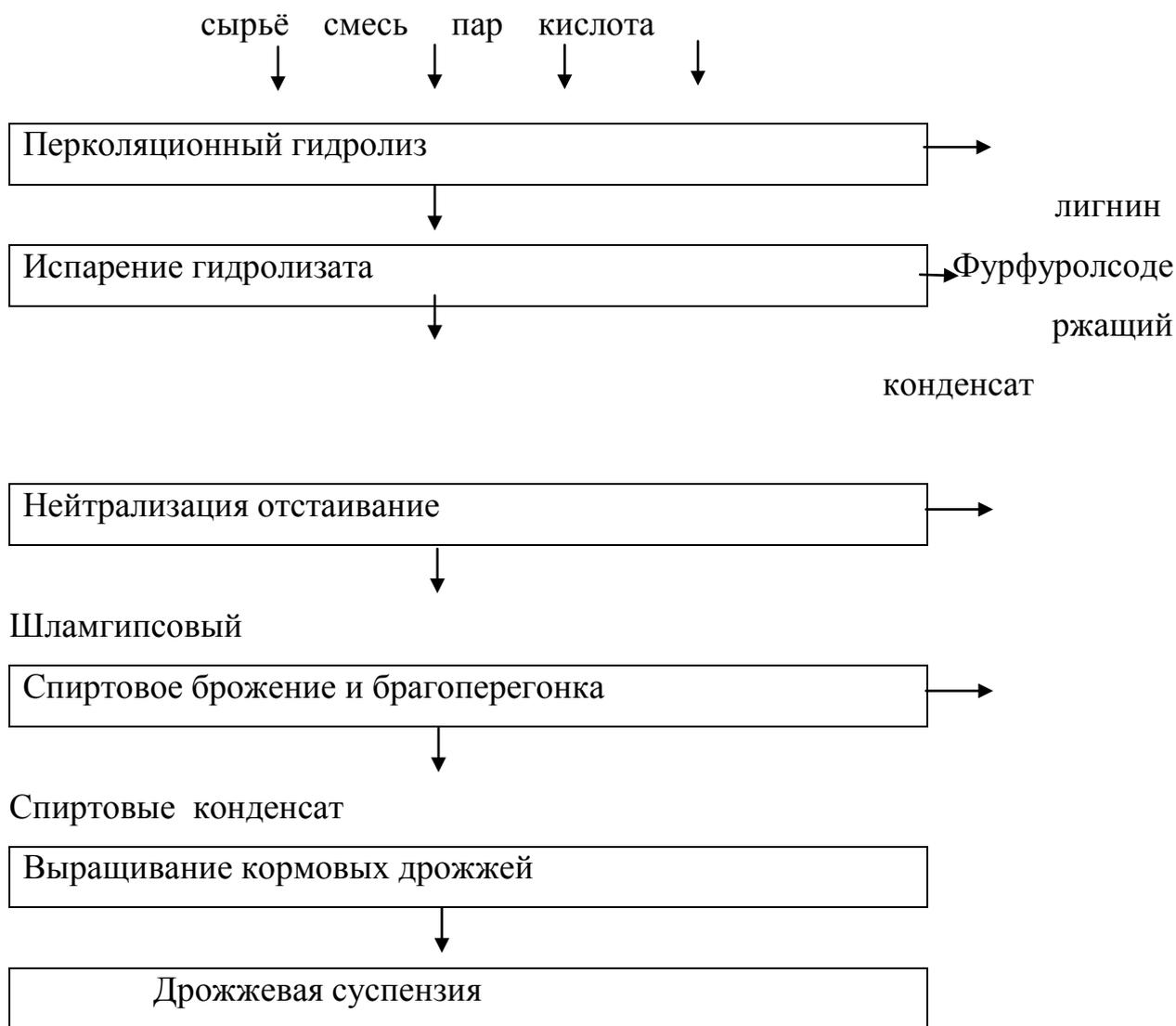


Рис.1. Технологическая схема получения и переработка гидролизата.

В тоже время процесс перколяционного гидролиза имеет ряд недостатков:

- 1) Низкая производительность одного гидролиза аппарата.
- 2) для обеспечения непрерывности потока требуется 11 гидролиза аппаратов, что повысит производительность на 2т. а. с. с./час
- 3) высокий гидромодуль (1:14) не позволяет получить концентрированные растворы моносахаридов (2,8-3,0%), что ведет к низкой концентрации спирта в бражке (1,2:1,5%), высокому расходу пара при брагоперегонке (30% от общего расхода пара) и сбросу большого

количества жидких отходов (отработанная жидкость на очистительные сооружения с содержанием ХПК-5000:8800 мг O₂/дм³.)

В связи с этим к новым способам гидролиза предъявляются следующие требования :уменьшение теплоэнергозатрат, безотходность производства, увеличение выхода и повышение качества промежуточных продуктов гидролиза, простота аппаратного оформления, возможность автоматизации компьютеризации. Наиболее перспективным считается одно и двухступенчатый гидролиз в аппаратах непрерывного действия с механической обработкой сырья (Холькин)

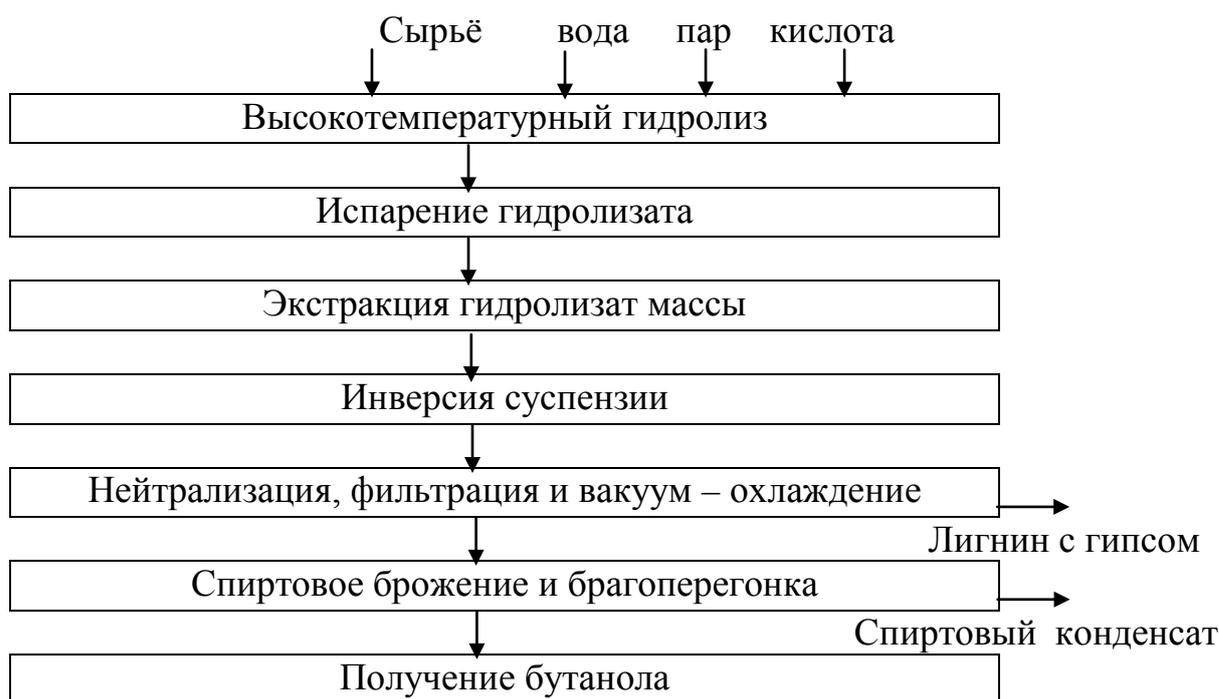
Для этого используют экструдеры и дефибраторы в которых за счет механической обработки и парового взрыва интенсифицируют процесс сернокислотного гидролиза полисахаридов растительного сырья. Несмотря на увеличение расхода электроэнергии, автор считает о снижении затрат на 1 т редуцирующих веществ. (Жуков, 2001 г)(43)

Существует несколько технологических схем получения биоэтанола с использованием экструдеров и дефибраторов. Наиболее простая схема с использованием двухчервячного экструдера и высокотемпературного режима гидролиза древесных опилок. Этот способ имеет следующие основные преимущества по сравнению с перколяционным способом гидролиза:

- 1) Снижение расхода пара при быстром нагреве гидролизуемого сырья за счет сил трения и давления.
- 2) Снижения расхода воды в процессе гидролиза, что позволяет получить реакционную смесь с содержанием сухих веществ 33% , фильтрат водного экстракта с концентрацией моносахаридов 10%, общий гидромодуль 1:3.
- 3) При высокотемпературном гидролизе ($t = 237^{\circ} \text{C}$, $P = 2,8 \text{ мПа}$, расход серной кислоты -3%, время контакта 25 сек.) наблюдается падение скорости распада моносахаридов.
- 4) Выход моносахаридов от абсолютного сухого сырья составляет 41,3%.

Технологическая схема с двухступенчатым процессом гидролиза древесной щепы лиственных пород на экструдерах и дефибраторах предусматривает комплексную переработку сырья. На первой ступени получают фурфурол или пентозный гидролизат и на его основе кормовые дрожжи.

На второй ступени - гексозный гидролизат, который используют для получения биоэтанола.



Известны схемы, где сочетаются процессы автогидролиза, парового взрыва, щелочной экстракции лигнина и высокотемпературного гидролиза целлюлозы в экструдера. Канадской фирмой СТЕЙК высокотемпературный гидролиз проводят в двухчервячном экструдере ($t = 200^{\circ}\text{C}$, время-5мин,

концентрация кислоты 0,5-1%) Степень гидролиза целлюлозы достигает 50-60%. Концентрация моносахаридов в гидролизате составляет 13%, концентрация этанола в спиртовой бражке 6-7%.

Дефибратор был использован для получения гидролизат массы ($t=165^{\circ}\text{C}$ концентрация серной кислоты 2,5%) которую экстрагировали водой (гидромодуль 1:8-10, $t=20^{\circ}\text{C}$ время 5-10мин) фильтровали получали пентозный гидролизат и целлолигнин. Целлолигнин гидролизовали в трубчатом реакторе ($P = 2,3-2,75\text{МПа}$, $t = 219-228^{\circ}\text{C}$, концентрация кислоты 0,43-0,62%) Суспензию фильтровали на вакуум-фильтре, получали гексозный гидролизат и лигнин. Общий выход моносахаридов при переработке древесного сырья смешанных пород в лабораторных условиях составил 40-41% от абсолютно сухого сырья. В случаи получения фурфурола дефибрацию проводили при температуре 190°C и фурфурол содержащие пары отделяли в циклоне, максимальный выход фурфурола от абсолютно сухого сырья составляет 10%. Согласно данным Жукова Н.А.(2001 г)

Непрерывные гидролизеры имеют более высокую производительность, облегчают автоматизацию процессов гидролиза. Сравнительные исследования различных режимов гидролиза разбавленной серной кислотой в непрерывно действующих аппаратах опытно-промышленного типа показала, что средний выход моносахаридов составляет 32-42% от абсолютно сухого сырья. Это соответствует выходу моносахаридов на Российских предприятиях при периодическом перкуляционном гидролизе (Холкин,1989г)(42)

Согласно данным Сушкова В.И (2009) для всех технологических схем с непрерывно действующими гидролизерами характерны одни тоже недостатки;

- 1) Технологические схемы осложнены дополнительными процессами в том числе процессом фильтрования трудно фильтрующегося лигнина.
- 2) Отсутствует снижения отходов.

Эти недостатки, считает автор, сдерживает внедрение непрерывных методов гидролиза на гидролизных предприятиях России.

Таким образом гидролиз лигноцеллюлозного сырья химическим методом связан с большим расходом концентрированной кислоты H_2SO_4 и значительным расходом тепла, воды. Гидролиз растительного сырья химическим способом сопровождается разложением моносахаридов, с образованием продуктов фурурольных реакций, ингибирующие процесс брожения. В настоящее время гидролиз целлюлозы химическим способом является неэффективным и экологически не чистым способом конверсии. В связи с чем, в Узбекистане взамен гидролиза химическим способом, является весьма перспективным и эффективным биоконверсия гидролиза лигноцеллюлозного сырья, для производства биоэтанола и производства обогащенных кормов для животноводстве.

Глава 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

3.1. Объект, предмет и методы исследования.

В качестве объекта исследования использовалась нетрадиционное растительное сырье отходы хлопководства- гузапая, отходы пищевой промышленности.

3.2. Предмет исследования.

Исследование биоконверсии лигноцеллюлозы растительной биомассы различными штаммами: базидомицетов.

3.3. Методы исследования.

Определение целлюлазной активности

В работе использовали метод Somogyi-Nelson в модификации Фениксовой Р.В. (46), основанный на определении образующихся редуцирующих сахаров (РС) в реакционной смеси после инкубации культуральной жидкости с субстратом.

Реактивы, использованные при определении:

1. А) Раствор А: 24 г безводного Na_2CO_3 и 12 г виннокислого калия-натрия растворяли в 250 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляют при перемешивании раствор $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (4 г в 40 мл воды) и далее – 16 г NaHCO_3 .

Б) Раствор Б: 180 г Na_2SO_4 растворяли в 500 мл горячей (80°C) воды и кипятили в течение 5 мин.

В) Рабочий раствор получали из компонентов А и В, взятых в соотношении 4:1 (по объёму). Раствор готовили в день использования.

2. Реактив Нельсона: 25 г молибдата аммония растворяли в 450 мл воды. К данному раствору добавляли 25 мл концентрированной серной кислоты и 3 г арсената натрия, растворенного в 25 мл воды. Общий объём доводили до 500 мл и перемешивали. Раствор инкубировали при $36-40^\circ\text{C}$ в течение 48 часов.

3. Стандартный раствор глюкозы, с известной концентрацией (200 мг/л).

4. 1 %-ный раствор натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы в 0,05 М растворе ацетатного буфера с рН 4,9.

Техника определения: к 50 мкл соответственно разбавленной культуральной жидкости добавляли 50 мкл 1 %-го раствора натрий-КМЦ. Пробирку помещали в водяную баню с температурой 50°C. После 15 мин инкубации добавляли 100 мкл реагента Шомоди и перемешивали. Пробирку помещали в кипящую водяную баню и выдерживали не менее 30 мин. После чего пробирку немедленно охлаждали под струей водопроводной воды или в ледяной воде и добавляли 100 мкл реактива Нельсона, после чего перемешивали. В пробирки добавляли 2,2 мл дистиллированной воды и раствор колориметрировали при $\lambda=660-670$ нм против дистиллированной воды (или раствора реактивов).

Общую целлюлолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{2 \cdot 10 \cdot 1,11 \cdot P \cdot D}{D_{\text{гл}} \cdot t},$$

где

2 и 10 – коэффициенты, учитывающие перевод на 1 мл;

P – степень разбавления;

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

$D_{\text{гл}}$ – оптическая плотность стандартного раствора глюкозы (200 мг/л);

t – продолжительность инкубации, мин.

1,11 – переводной коэффициент, учитывающий перевод количества глюкозы с мкг на микромоль ($200/180=1,11$)

Известно, что значение оптической плотности исследуемого раствора равно [133, 134]: **литература**

$$A_x = \varepsilon_{\lambda} C_x l_x$$

Значение оптической плотности стандартного раствора равно:

$$A_{\text{ст}} = \varepsilon_{\lambda} C_{\text{ст}} l_{\text{ст}}$$

Разделив, одно уравнение на другое, получим:

$$A_x/A_{ст} = \varepsilon_{\lambda} C_x l_x / \varepsilon_{\lambda} C_{ст} l_{ст}$$

Так как $l_x=l_{ст}$, $\varepsilon_{\lambda}=\text{const}$, то

$$C_x=C_{ст}A_x/A_{ст}.$$

Метод сравнения применяют при однократных определениях; он требует обязательного соблюдения основного закона светопоглощения.

Удельную целлюлолитическую активность рассчитывали на единицу веса (мг) общего белка, содержащегося в культуральной жидкости.

Определение ксиланазной активности

Для определения ксиланазной активности использовали также метод Somogyi-Nelson в модификации Фениксовой Р.В. [9], с использованием реактивов 1 и 2, как описано выше.

3. Раствор ксилозы, с известной концентрацией (200 мг/л).

4. 1 %-ный раствор ксилана в 0,05 М растворе ацетатного буфера с рН 4,9.

Техника определения: к 50 мкл соответственно разбавленной культуральной жидкости добавляли 50 мкл 1 %-ный раствор ксилана. Остальное так, как описано выше.

Общую ксиланазную активность определяли по формуле:

$$A = \frac{2 \cdot 10 \cdot 1,314 \cdot P \cdot D}{D_{кс} \cdot t},$$

где

2 и 10 – коэффициенты, учитывающие перевод на 1 мл;

P – степень разбавления;

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

$D_{кс}$ – оптическая плотность стандартного раствора ксилозы (200 мг/л);

t – продолжительность инкубации, мин.

1,314 – переводной коэффициент, учитывающий перевод количества ксилозы с мкг на микромоль ($200/152,2=1,314$).

Удельную ксиланолитическую активность рассчитывали на единицу веса (мг) общего белка в культуральной жидкости.

Определение содержания глюкозы.

Концентрация глюкозу определяют с помощью глюкозооксидазного реагента. Метод основан на регистрации начальной скорости появления окрашенных продуктов окисления 0-дианизидина, которая образуются в результате катализируемой пероксидазой реакции 0-дианизидина с перекисью водорода, образующейся окислении глюкозы и 0-дианизидина.

Реактивы:

1. 0,1 М Na-фосфатный буфер с рН 7,0
2. Раствор пероксидазы в 0,1М фосфатном буфере (рН 7,0). Концентрация пероксидазы в запасном растворе составляет $2,75 \times 10^{-6}$ М. (оптическая плотность раствора на длине волны 403 нм должно составит 0,25). Раствор хранят в холодильнике в течение 2-4 недель
3. Глюкозооксидазный реагент готовят путем добавления 0,01 мл запасного раствора пероксидазы и необходимого количества глюкозооксидазы к 50 мл 0,1М фосфатном буфере (рН7,0). Количество добавляемого глюкооксидазы рассчитывают таким образом, чтобы ее активность в реагенте составляла 8-20 ед/мл. На 50 мл реагента добавляют 10 мг сухого препарата глюкозооксидазы с активностью 100 тыс. ед/г или 0,05 мл суспензии фермента (20 мг/мл) с активностью 400 тыс. ед./г. Реагент калибруют и используют в тот же день, когда он был приготовлен.
4. Готовят спиртовой раствор 0-дианизидина путем растворения 6,2 мг вещества в 10 мл этанола.

Стандартная процедура определения глюкозы заключается в следующем. В 1-см спектрофотометрическую кювету вносят 2,15 мл глюкозооксидазно-пероксидазного реагента и 0,25 мл исследуемого раствора, смесь тщательно перемешивают. Через 5-20 мин (за 5 мин успевает полностью выделиться перекись водорода, и ее концентрация остается на постоянном уровне до 20 мин) в кювету вносят 0,1 мл спиртового раствора 0-дианизидина, смесь быстро перемешивают и сразу же регистрируют начальную скорость накопления окрашенных продуктов на длине волны 460 нм с помощью регистрирующего спектрофотометра, снабженного самописцем. Начальная скорость накопления окрашенных продуктов пропорциональна тангенсу угла наклона прямой на ленте самописца по отношению к направлению движения бумаги. Чувствительность самописца выбирается таким образом, чтобы полная ширина бумажной ленты соответствовала примерно 0,2 единицы оптической плотности, скорость движения бумаги должна составлять примерно 6 см/мин. С помощью стандартных растворов глюкозы проводят калибровку (рассчитывают соответствующие тангенсы углов наклона прямых на ленте самописца) и относительно нее рассчитывают концентрацию глюкозы в исследуемых растворах. Скорость нарастания окраски пропорциональна концентрации

глюкозы в диапазоне 2×10^{-5} – 1×10^{-3} М. Для каждой новой порции глюкозооксидазно-пероксидазного реагента необходимо проводить свою калибровку.

Определение клетчатки (целлюлоз).

По своему распространению в растениях целлюлоза занимает первое место среди всех органических веществ. Целлюлоза – высокомолекулярный полисахарид, нерастворимый в воде, состоит из остатков β -1,4 глюкозы, связанных β -1,4 глюкозидной связью.

При кипячении с крепкой серной кислотой полностью расщепляется на глюкозу. Определение целлюлозы по модификации А.И Ерамакова (46) Метод основан на окислении и растворении различных веществ, составляющих надмолекулярную структуру целлюлозы.

Метод заключается обработкой измельченных хлопковых и зерновых отходов смесью четырех объемов этилового спирта с одним объемом азотной кислоты (относительной плотностью 1,4) В колбы емкостью 200-300 мл. отвешивают по 1-3 гр. Измельченных образцов, в зависимости от содержания целлюлозы.

К навеске примешивают 50 мл. смеси спирта с азотной кислоты, колбы соединяют с обратным холодильником с резиновой пробкой и помещают на кипящую баню на 1 час, колбу в воду не погружают, кипение должно быть равномерным. По окончании нагревания, дают осесть осадку, раствор декантируют на стеклянный фильтр, на поверхности которого 1-2 мл. толченого стекла. Фильтр вместе со стеклом перед фильтрованием предварительно просушивают жидкость декантируют очень осторожно, чтобы не взмутить осадок. К осадку, оставшемуся в колбе, прибавляют еще 50 мл. смеси спирта с кислотой и снова нагревают 30 мин. После вторичной декантации через тот же стеклянный фильтр осадок в колбе промывают маленькими порциями 96% ного этилового спирта, затем к промытому осадку в колбе прибавляют 50 мл. 1,25 % ного раствора щелочи и смесь нагревают на

плитке. Щелочной раствор вместе с осадком переносят на стеклянный фильтр, отсасывают и промывают два раза по 10-15 мл. горячей дистиллированной водой и 1-2 раз этиловым спиртом (96 % ным). Стеклянный фильтр с чистой белой клетчаткой сушат до постоянного веса при 105⁰С (обычно 2 час). Для ускорения сушки осадок после промывания спиртом, рекомендуют промыть серным эфиром. Расчет производится в процентах по разности между весом фильтра и осадком целлюлозы и весом сухого фильтра с тертым стеклом.

С целью наиболее полного удаления лигнина при обработке навески исследуемого материала к азотной кислоте добавляют 9-80% уксусную кислоту и кристаллический трихлоруксусную кислоту.

Определение лигнина (по Вильштетеру и Цехмейстеру).

Метод заключается в гидролизе клетчатки соляной кислотой, насыщенной хлористым водородом.(относительная плотностью 1,20 - 1,21) при комнатной температуре. После гидролиза определяют вес оставшегося лигнина.

Насыщение соляной кислоты хлористым водородом проводили на установке (1), помещенной в вытяжной шкаф. Насыщенная соляная кислота с относительной плотностью 1,20 - 1,21 содержит 41-42% HCl хранят кислоту в холодном месте в слянке с притертой пробкой с пришлифованным стеклянным колпачком.

Метод определения.

На аналитических весах отвешивают 3 гр мелкоизмельченного растительного материала, просеянного с отверстиями диаметром 1 мм и доведенного до постоянного веса (при 105⁰С) Навеску помещали в аппарат соксклета и экстрагируют серным эфиром для удаления смол, воска и жиров. Обезжиренную навеску переносят в мерную колбу с

притертой пробкой и проливают 100 мл насыщенной соляной кислоты, колбу закрывают пробкой, смесь осторожно встряхивают. За 24 ч. При комнатной температуре гидролиз клетчатки, проходит полностью, по окончании которого содержание колбы доводят водой до метки и фильтруют через стеклянный фильтр с отсасыванием. Фильтры до фильтрования доводят до постоянного веса при 100 -105⁰С. Осадок на фильтре промывают горячей водой до получения безцветных фильтратов. Затем фильтр вместе с осадком высушивают до постоянного веса.

По разности между весом фильтра с осадком и его начальным весом определяют количество лигнина, которое вычисляют в процентах к навеске. В полученном фильтрате (при необходимости) определяют количество редуцирующего сахара и пересчитывают его на клетчатку (45)

3.4. Результаты и их обсуждение.

ТЕХНОЛОГИЯ ОСАХАРИВАНИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ СУБСТРАТОВ.

3.4.1. Делигнификация субстратов, химическим и биологическим способом.

Из аналитического обзора литературы, установлена обычный спирт и “целлюлозный спирт” являются одинаковым продуктом, полученного с использованием различного сырья и технологических процессов. Получение обычного этанола ведут из крахмала, содержащегося в зерновых культурах. “Целлюлозный спирт” производят из широкого разнообразия целлюлозосодержащего сырья, главным образом, из отходов сельского хозяйства (стебли, коробочки хлопчатника, солома, опилки, отходы бумажной целлюлозы и др.). Целлюлозная биомасса состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и небольшом количестве белков, липидов и минеральных веществ.

Приблизительно 60-65% сухих веществ целлюлозной биомассы представлены целлюлозой и гемицеллюлозой. Среди многочисленных методов производство этанола из целлюлозы можно выделить два основных варианта переработки, позволяющие получить пригодные для брожения простые сахара, необходимые для получения спирта - это производство гидролизного спирта на гидролизных заводах и ферментативный гидролиз. Существуют два наиболее часто используемых процесса кислотного гидролиза: гидролиз разбавленной и концентрированной кислотой. Процесс гидролиза разбавленной кислотой (1,0 %-ной серной кислотой) происходит при высокой температуре 215⁰С и давлении с продолжительностью несколько минут.

Гидролиз концентрированной кислотой используют сравнительно мягкие температурные режимы (60°C) и давления. Продолжительность значительно дольше, чем разбавленной кислотой (2-6 час)

Этот способ используют при гидролизе концентрированную серную кислоту и обеспечивает быстрое расщепление целлюлозы до глюкозы, а гемицеллюлоз до пентозы с небольшим разложением сахаров. Процесс позволяет минимизировать потери сахаров и проводит восстановление кислоты для повторного её использования.

Недостатки гидролизных способов производства этанола:

—в первом варианте при использовании для гидролиза разбавленной кислоты 1,0 % раствор H_2SO_4 и высокой температуры 215°C , продолжительность несколько минут.

Отмечаются следующие недостатки:

—большие затраты тепла на гидролиз;

—большие потери моносахаридов за счет их разложения в реакционной зоне до фурфурола, оксиметил фурфурола, образовавшиеся глюкоза уплотняется до ди- три сахаридов- ревертоз. Происходит карамелизация сахаров. Все эти вещества ингибируют дрожжи при спиртовом брожении.

Во втором варианте при гидролизе целлюлозы концентрированной (70 %) серной кислотой ведут при низком давлении и низкой температуре 60°C .

Недостатки: В этом варианте необходимо высушивать растительное сырье, **регенерировать** кислоту, применять дефицитные материалы для защиты оборудования от коррозии, и сложное металлоемкое оборудование.

Кислотный гидролиз связан с большим расходом воды, тепла, экономически малоэффективен, и является не экологический чистой технологией.

3.4.2. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозы.

Получение легкоусвояемых сахаров из лигноцеллюлозы отходов сельского хозяйства хлопководства, зернового производства и пищевой промышленности, этот путь утилизации растительных полимеров

предполагает разработку эффективной технологии непрерывного получения глюкозы из целлюлозы. В дальнейшем возможно конверсия глюкозы во фруктозу и использование ее в пищевой промышленности или в качестве сырья для микробиологического синтеза различных целевых продуктов. Особое внимание, по мнению специалистов, заслуживает получение из ферментативных гидролизатов целлюлозы биоэтанола. Биоэтанол в отличие от спирта из которого производятся алкогольные напитки, топливный этанол не содержит воды и производится укороченной дистилляцией, поэтому содержит метанол и сивушные спирты, а также бензин, что делает его непригодным для питья.

Биоэтанол возобновляемое топливо, снабжение этанолом может быть выращено ежегодно, тогда как для производства энергетических источников на основе окаменелого топлива требуется миллионы лет.

В настоящее время основными положениями энергетической программы всех стран планеты является реализация материально технической базы для широкого применения нетрадиционных источников энергии.

Важным фактором определяющий расщепление высокоорганизованных лигноцеллюлозных субстратов является их надмолекулярная структура. Которая представляет собой сложный матрикс, состоящий из лигнина, гемицеллюлозы, связанные ковалентной связью между собой и целлюлозой и протопектином. Целлюлозные фибриллы погружены в лигногемицеллюлозный матрикс. Лигнин делает целлюлозу и гемицеллюлозу плохо перевариваемым животными. Таким образом, биоконверсия целлюлозы и гемицеллюлозы связана с процессом делигнинофикацией.

Существуют различные способы разрушения лигногемицеллюлозного матрикса: химические, физические, ферментативные. Наиболее приемлемым способом является ферментативный способ гидролиза лигнина. С целью выделения лигнина является способ “парового взрыва”. В данной работе исследовали” влияние различных способов на расщепление лигнина в качестве контроля ферментативному гидролизу .

Биоконверсию лигнина проводили фазидальными грибами, характеризующиеся лигнинозой ксиланазной и целлюлолитической активностью.

Также использовали целлюлолитические системы термофильных бактерий. В природе целлюлолитические волокна, возможно являются для целлюлолитических бактерий лучшим субстратом, чем продукты расщепления. Это создает для бактерий ряд экологических преимуществ. Бактерии адсорбированные на целлюлозных волокнах лучше потребляют продукты.

БИОКОНВЕРСИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ОТХОДОВ хлопчатника БАЗИДАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

№	Субстрат хлопковая шелуха	Количества хлопковая шелухи в гр.	Количество целлюлозы в гр.	Р. В. г/л	Степень гидролиза целлюлозы в %.
1	Глубин. культ. хлопковая шелуха (створки + стебли)	20	5,0	0,240	4,8
2	Глубин. культ. хлопковая шелуха (створки + стебли) 15 гр с добавлением 5 гр пшеничные отруби.	20	5,0	1,165	23,2
3	Твердо фазное культивирование створки, без предварительной обработки	20	4,5	0,270	6,0%
4	Твердо фазное культивирования створки с предобработкой 1% H ₂ SO ₄ и кипячением	20	5,0	0,550	12,2
5	Твердо фазное культивирования стебли без предварительной	20	5,0	0,370	6,2

	обработки				
6	Твердофазное культивирование стеблей предварительной обработкой 1% H ₂ SO ₄ кипячением	20	5,0	0,420	8,4

Исследования проводились в трех повторностях. В таблице приведены средние данные по образованию глюкозы (г/л) и степени гидролиза целлюлозы.

Процесс биоконверсии лигноцеллюлезных отходов хлопчатника (различные створки и стебли) проводили базидальными микроскопическими грибами штамм 1. Культурная среда характеризовалась следующей ферментативной активностью.

β-1,4 экзоцеллюлозой активность ед/мл=14,4

Ксиланаза – 22,4 ед/мл

Лигниниза- 18,6 ед/мл

Белок- 5,6 мг/мл

Из культуральной среды отделяли грибной мицелий от культуральной жидкости путем фильтрования. Культуральная жидкость использовалось для гидролиза лигноцеллюлозы, мицелий оставшийся после фильтрации использовали для твердофазной биоконверсии, отдельно хлопковые створки и хлопковые стебли. В колбу 1 объемом 250 мл вносили створки- 20 гр , колбу 2 стебли 20 гр. В каждую колбу добавляли по 10% воды автоклавировали в течение 1 час при 160°C и после охлаждения в каждую колбу вносили по 50мл мицелий, твердофазное культивирование проводили в течении 7 суток. Опыты при глубинной ферментации проводились с целью биоконверсии лигноцеллюлозы с добавлением в среду 50мл.жидкой культуральной жидкости +50 мл. стерильной водопроводной воды. Опыт 1 проводили без добавления в среду пшеничных отрубей. Опыт 2 с

добавлением в среду хлопковой шелухи 15гр + 5гр крупных пшеничных отрубей с целью обогащения культуральной среды азотом, липидами и минеральными веществами.

Исследованиями установлено, что добавление к 15гр хлопковой шелухи + 5гр пшеничных отрубей почти в 5 раз увеличило степень гидролиза, целлюлозы и составило 23,2% по сравнению с опытом 1, куда не добавляли.

Исследования показали неполноценность питательной среды для культивирования базидальных грибов при использовании только хлопковой шелухи и в последующих опытах необходимо добавлять отходы пищевой промышленности пшеничные отруби или рисовую лузгу.

Использование твердофазного культивирования базидальных грибов имело цель предварительной обработки хлопковой шелухи (створки и стебли) с целью повышения степени их усвояемости животными. Известно, что лигноцеллюлозные отходы сельского хозяйства, в частности целлюлоза хлопковой шелухи усваивается на 25%, опыты 3,4,5,6 показали, что возможно увеличение степени гидролиза целлюлозы, если проводить предобработку хлопковой шелухи раствором 0,7-1% H_2SO_4 и кипячением, что позволяет расщепить надмолекулярный матрикс, состоящий из ковалентно связанного лигнина с гемицеллюлозой, протопектином, исследования показали, что такая предобработка хлопковых створок и стеблей позволяет в 2 раза увеличить степень конверсии целлюлозы до глюкозы и до 12%, но это не предел, так как биоконверсия как показали опыты по глубинной ферментации базидальных грибов необходимость обогащения хлопковой шелухи другими отходами пищевой промышленности, использовать термофильные штаммы ассоциации бактерии, или использовать способ парового или воздушного взрыва. Эти исследования нами будут продолжены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Список использованной литературы.

1. Лобанок А Г, Бабицкая В Г, Богдановская Ж А, «Микробный синтез на основе целлюлозы, белок и другие ценные продукты» г. Минск, наука и техника, 1988, 259 с.
2. Академия наук СССР, институт биохимии и физиологии микроорганизмов. Ответственные редакторы. Академик Г.К.Скрябин, д.б.н. Е.Л.Головлев, д.х.н.
А.А. Клесов. Проблемы биоконверсии растительного сырья.
3. Абрамович Ц.Л. Озолия Н.Р, Сергеева В.Н Химия древесины, 1987 , № 2, с. 88-94
4. Бейнарт И.И., Ведерников Н.А. Клеточная стенка древесины при химическом воздействии. г.Рига,1982 г. с.70.
5. Бекер М.Е. Биоконверсия растительного сырья: тезис доклад. Всесоюзного симпоз. Рига,1982, Т.1. с. 2-4.
6. Салматова Л.С. Физиология растительной клетки. Л.,1983г.
7. Kirk T.N. New horizons for Biotechnological Utilization of the Forest Resource: lectures given at the 1985. Marcus Wallenberg Sympos. in Falun. Falun 1985, pp.27-42
8. Fogarty W.M., Ward O.P. Proc. Biochem, 1972, vol.7, N8,P13.
9. рустамбекова Г.У.
10. Khan A.W. Gen. Microbiol. 1980, N2, p.499-502.
11. Khan A.W. Gan Pes. 1984, Vol 17, N4, p21-23.
12. Volfova O., et, al. 3 Симпозиум соц. стран по биотехнологии Братиславаб 1983ю Сю 95ю
13. Spinnler H. Biotechnol, 1986, vol18, N3 p.217-222.
14. Kleijntjens K.P., Boks P. A., Luyben K. Ch. Biotechnol Lett, 1986, vol.8, N9, p.667-672.

15. Douglas K. energy Biomass: Proc. Nat. Meet. Biomass, 1985. p.219-230
16. Khan A. W. Biomass. 1986. vol.10 N3, P165-174
17. Ljungdahl L. G., Eriksson K.E. Adv. Microbiol. Ecol., 1985, Vol8 p.237-299.
18. Avgerinos, Wang
19. Saddler et al.
20. Цирлин
21. Zeikus