

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

УДК 577.154.321:633.511

МУРАТОВ ГАЙРАТ АЗАТОВИЧ

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КОНВЕРСИИ
ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ХЛОПКОВОГО ВОЛОКНА**

03.00.23 - биотехнология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

ТАШКЕНТ – 2010

Работа выполнена на кафедре «Биотехнологии и микробиологии» биолого-почвенного факультета Национального университета Узбекистана имени М. Улугбека, а также в лаборатории «Суперкритические флюиды» кафедры «Биохимической инженерии и биотехнологии» факультета Инженерии университета Аджоу, Южная Корея.

Научный консультант: Доктор биологических наук, профессор
РАХИМОВ Мирзаатхам Мирзахакимович

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, академик
Мусаев Джура Азимбаевич

Доктор биологических наук, профессор
Ахмедова Захро Рахматовна

Доктор биологических наук, профессор
Рахманкулов Саидакбар Рахманкулович

Ведущая организация: Институт биоорганической химии АН РУз

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в ___ часов на заседании Специализированного Совета Д 015.02.01 по присуждению учёной степени доктора биологических наук при Институте микробиологии АН РУз по адресу:

100128, г. Ташкент, ул. Абдулла Кадыри, д. 7 Б., факс: (998-712) 244-25-82, Тел. (998-71) 244-25-19

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института микробиологии АН РУз

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

Учёный секретарь
Специализированного Совета,
кандидат биологических наук

С.М.Насметова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы. Целлюлоза возглавляет список мировых возобновляемых ресурсов, мировая продукция которой в природе составляет миллиарды тонн ежегодно. Использование человечеством этих ресурсов приводит к накоплению очень больших количеств целлюлозосодержащих отходов, что ухудшает экологическую обстановку и приводит к потере потенциально ценных ресурсов. Используя современные биотехнологические методы возможно преобразование этих отходов в сахара, спирты, кислоты, газ, пищевые белки и др., что внесёт существенный вклад в развитие науки по пути решения проблем переработки отходов и сохранения экологической чистоты нашей природы. Конверсия целлюлозы в низкомолекулярные вещества может быть осуществлена с помощью физико-химических или биологических методов. Недостатком физико-химических методов является большая энерго- и материалоёмкость, а также довольно жёсткие условия реакции, которые приводят к частичному разложению образующихся низкомолекулярных веществ и загрязнению их примесями. Следовательно, оптимальным во многих отношениях является ферментативный гидролиз (ФГ) целлюлозосодержащего сырья, проводящийся в гораздо более мягких условиях, чем другие методы гидролиза, и получаемые вещества значительно в меньшей степени загрязнены побочными продуктами. Так, например, глюкозный сироп, получаемый в результате ФГ целлюлозы, можно использовать для многих целей без дальнейшей очистки. Поэтому понятен интерес к ФГ целлюлозы, проявляемый практически во всех развитых странах мира.

Большое количество целлюлозосодержащих отходов имеется и в сельском хозяйстве республики, особенно в хлопководстве. Ценными целлюлозосодержащими отходами хлопководства и переработки хлопка-сырца являются такие, как: хлопковый линт, делинт, хлопковый пух, гузапая, створки коробочек, бумажные отходы, пухоотходы масложиркомбинатов и др. Количество их исчисляется миллионами тонн. Они могли бы быть переработаны и использованы для производства полезных продуктов. Однако известно, что из-за высокого содержания лигнина в составе этих отходов, высокой её кристалличности и низкой реакционной способности целлюлоза остаётся трудногидролизуемой. Поэтому, при постановке вопроса о биоконверсии целлюлозосодержащих отходов, проблема прежде всего упирается в преодоление этих факторов. Для промышленной утилизации целлюлозосодержащих отходов важными остаются исследования, направленные на разработку новых способов повышения реакционной способности, где не последнюю роль играет их предварительная обработка, приводящая к аморфизации целлюлозы, так как она решающим образом сказывается на рентабельности и эффективности ферментативного гидролиза. В отечественной и зарубежной литературе широко описаны различные методы предобработки целлюлозосодержащего сырья. Процессы же предобработки, однако, требуют дополнительных материало-,

энергозатрат и специального (устойчивого к агрессивным средам) оборудования. С другой стороны, изучение закономерностей осуществления процесса ФГ целлюлозосодержащего сырья будет способствовать созданию эффективной биотехнологии их ферментативной переработки, в том числе, и хлопковой целлюлозы. Несмотря на важность проблемы, в мировой литературе отсутствуют сведения, касающиеся ферментативной гидролизуемости целлюлозы развивающегося хлопкового волокна. Следует отметить, что именно в данной целлюлозе отсутствует лигнин, а также «плавно» увеличивается кристалличность целлюлозы, формируясь в процессе биосинтеза в природе. Поэтому использование целлюлозы развивающегося хлопкового волокна в качестве субстрата при ферментативной конверсии является очень удобным объектом для выявления всевозможных закономерностей, протекающих при проведении процесса биоконверсии целлюлозы. В данной работе изучены все нюансы, связанные с проведением ферментативного гидролиза, учитывая «субстрат-факторы», «фермент-факторы», «процесс-факторы» и др., целлюлозы развивающегося хлопкового волокна. На основе анализа многочисленных экспериментальных данных, для создания технологии и оптимизации процесса биоконверсии целлюлозы, предлагается новый вид отходов многотоннажного целлюлозосодержащего сырья, который не требует предварительной декристаллизации целлюлозы и не подлежит удалению из неё лигнина. Следовательно, результаты исследований поднимаемых проблем в настоящей работе, имея фундаментальный характер, открывают новый путь к решению многих вопросов, связанных с разработкой и созданием технологии биоконверсии целлюлозосодержащих отходов.

Степень изученности проблемы. Научные исследования, посвященные поиску путей биотехнологической переработки целлюлозосодержащих отходов (древесная целлюлоза; хлопковая целлюлоза; целлюлоза соломы, гузапаи, рисовой лузги, бумажных, промышленных или городских отходов и др.) в низкомолекулярные продукты, активно проводились на протяжении последних десятилетий почти во всём мире. Изучались влияние состава, структуры и других факторов различных по происхождению целлюлозосодержащих субстратов на процесс ФГ целлюлозы. Однако, до сих пор ни в одной стране так и не был реализован промышленный процесс ферментативного гидролиза целлюлозы ввиду целого ряда причин, отмеченных в описании актуальности проблемы. В то же время поиск новых источников возобновляемой энергии, биотоплива, получения полезных продуктов на основе всевозможных отходов, с учётом экологических аспектов, приобретают всё большую значимость. Хлопковая целлюлоза является недостаточно изученным целлюлозосодержащим субстратом и потенциальным источником получения низкомолекулярных сахаров, которые легко могут быть далее конвертированы в биоэтанол – биотопливо на основе продуктов растительного происхождения.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Настоящая работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы кафедры «Биотехнология и микробиология» биолого-почвенного факультета НУУз им. М. Улугбека на тему: «Разработка теории и практики гетерогенного ферментативного катализа», а также гранта ОТ-ФЗ-149 «Закономерности действия целлюлолитического комплекса на хлопковую целлюлозу в зависимости от природы субстрата» (2007-2011 гг.) Центра по науке и технологиям при Кабинете Министров РУз.

Цель исследования. Целью настоящей работы являлось научное обоснование основ оптимизации процесса ферментативной конверсии целлюлозы хлопкового волокна, изучение стадий и закономерностей ферментативного гидролиза, а также определения общих и отличительных особенностей динамики выхода продуктов гидролиза в зависимости от различных факторов.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: 1) сравнительно изучить биоконверсию целлюлозы хлопкового волокна в двух различных условиях (в атмосферном и суперкритическом давлениях CO_2); 2) провести сравнительную оценку ферментативной гидролизуемости целлюлозы хлопкового волокна различных сортов и гибридов в зависимости от их видового происхождения (*G. hirsutum L.*, *G. barbadense L.* и *G. arboreum L.*); 3) исследовать влияние возраста и местоположения волокон на различных плодовых ветвях растений на эффективность ферментативного гидролиза; 4) изучить влияние индивидуальных ферментных препаратов целлюлаз (из 5 использованных в работе) на выход продуктов гидролиза; 5) методами световой и электронной микроскопии выявить характер и механизм расщепления хлопковой целлюлозы и установить их взаимосвязь с эффективностью выхода продуктов гидролиза; 6) установить влияние конкретных факторов (субстрат-, фермент- и процесс-факторы) на процесс ферментативного гидролиза и выход продуктов; 7) подобрать оптимальные режимы ферментативной конверсии хлопковой целлюлозы при гидролизе; 8) исследовать возможность осуществления процесса одновременного осахаривания и ферментации хлопковой целлюлозы в этанол; 9) на основе полученных результатов разработать и рекомендовать принципиальную технологическую схему получения продуктов гидролиза.

Объект исследования. Целлюлоза волокна различных видов хлопчатника: *G. hirsutum L.*, *G. barbadense L.* и *G. arboreum L.*

Методы исследований. Ферментативный гидролиз, суперкритические флюиды, световая и электронная микроскопия, спектрофотометрия, газохроматография и математическая статистика.

Основные положения, выносимые на защиту:

- режим проведения процесса ферментативной конверсии целлюлозы незрелых волокон различных сортов и видов хлопчатника в зависимости от субстрат-, фермент- и процесс-факторов;

- установление характера и механизма расщепления целлюлозы хлопкового волокна при ФГ на надмолекулярном уровне;
- различия в абсолютном выходе продуктов гидролиза при ферментативной конверсии целлюлозы хлопковых волокон из различных плодовых ветвей;
- оценка преимуществ применения метода суперкритического (СК) давления CO₂ в повышении эффективности ферментативной конверсии целлюлозы хлопкового волокна;
- корреляционная зависимость между эффективностью биоконверсии хлопковой целлюлозы при ФГ и степенью кристаллизации целлюлозы в процессе созревания волокон хлопчатника;
- условия осуществления процесса одновременного осахаривания и ферментации (ООФ) целлюлозы хлопкового волокна в биоэтанол;
- предложения нового источника сырья – («курак») в качестве природной нелигнифицированной и легкогидролизуемой формы целлюлозы - дешёвого, многотоннажного, потенциального сырья для биоконверсии в полезные продукты и сокращённой технологической схемы, исключающей стадию предварительной обработки сырья с целью его аморфизации.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые: целлюлазами различного происхождения (целловиридин, пектофоегидин, целлюлазы из *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*) выявлены сравнительные закономерности прохождения ферментативной конверсии целлюлозы разновозрастных хлопковых волокон 3 видов (*G. hirsutum L.*, *G. barbadense L.* и *G. arboreum L.*), 8 сортов и 2 внутривидовых гибридов; определены общие и отличительные особенности динамики выхода продуктов гидролиза в зависимости от возраста, скороспелости и местоположения коробочек на растении, использованных целлюлазных ферментов, продолжительности гидролиза, а также от видовой принадлежности волокон хлопковой целлюлозы; выявлены различия в абсолютных показателях выходов ВС и глюкозы, а также степени конверсии при ФГ волокон хлопчатника из различных плодовых ветвей растений и причины их разнообразия; разработана и показана эффективность принципиально новой методики проведения процесса ФГ целлюлозы хлопкового волокна в условиях СК давления CO₂; привлечением различных методов световой и электронной микроскопии установлены механизм расщепления целлюлозы хлопковых волокон в процессе их ФГ на надмолекулярном уровне и особенности взаимосвязи между характером кристаллизации структуры волокон с выходами ВС и глюкозы.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Экспериментально обоснованы и рекомендованы рациональные режимы проведения процесса ФГ целлюлозосодержащих отходов – сырья, позволяющие достичь максимальных выходов глюкозы, ВС и биоэтанола. В результате многолетних исследований впервые предлагается новый ранее неизученный вид целлюлозосодержащих аморфных и легкогидролизуемых

отходов хлопководства - незрелые (20-40 дн.) волокна хлопчатника («курак»), которые согласно справке Узбекского НИИ селекции и семеноводства хлопчатника ежегодно остаются на полях в достаточном количестве, вследствие чего могут быть рассмотрены и рекомендованы в качестве дешёвого, ценного потенциального сырья для биоконверсии. Для производства биоэтанола с высокой степенью конверсии путём одновременного осахаривания и ферментации непосредственно из целлюлозы незрелых волокон (20-40 дневные) без предварительной обработки рекомендуется использовать целлюлазные ферменты из *Trichoderma reesei* совместно с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Впервые разработан сокращённый вариант принципиальной технологической схемы получения глюкозы и биоэтанола из целлюлозы хлопковых незрелых коробочек (волокон) путём исключения стадии предварительной обработки субстратов перед ФГ, что позволит интенсифицировать технологию биоконверсии целлюлозосодержащих отходов (незрелые волокна хлопчатника). Основные результаты работы рекомендованы научным работникам по биохимии, микробиологии, биотехнологии и инженерно-техническим специалистам, занимающимся переработкой целлюлозосодержащих отходов, а также преподавателям и студентам ВУЗов биологического и сельскохозяйственного профиля.

Реализация результатов. Результаты работы создают научную основу для разработки новых биотехнологических производств с использованием в качестве сырья ранее неизученного и неучтённого вида хлопковых отходов – незрелых хлопковых коробочек («курак»). Необходимые технические условия проведения процесса ФГ переданы технологам в НПП «Тегирмон» для разработки соответствующей опытно-промышленной установки по биоконверсии зелёных хлопковых коробочек.

Опубликована монография «Ферментативная конверсия хлопковой целлюлозы» (13 п.л.), материалы диссертации включены в программы и используются в учебном процессе на общих и спецкурсах кафедры «Биотехнология и микробиология» биолого-почвенного факультета НУУз им. Мирзо Улугбека: для магистров - «Современные проблемы биотехнологии», «Биотехнологические аспекты кругооборота органических веществ», а также для бакалавров - «Ферментная инженерия», «Биотехнология и экология микроорганизмов» и «Основы биотехнологии».

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на: II-Республиканской Научной конференции молодых ученых и студентов, посвящённой 660-летию Амира Темура (Ташкент, 1996); III-Конференции биохимиков Узбекистана (Ташкент, 1996); Международной конференции в Андижанском Гос. университете «Влияние физико-химических факторов на метаболические процессы в организме» (Андижан, 1997); расширенных заседаниях кафедр «Биотехнология», «Низшие растения и микробиология» ТашГУ им. М.Улугбека (Ташкент, 1995-1998); Учёном Совете биолого-почвенного факультета ТашГУ им. М.Улугбека (Ташкент, 1998), Учёном Совете Института микробиологии АН РУз (Ташкент, 1998); Учёном Совете

Института биоорганической химии им. А. С. Садыкова АН РУз (Ташкент, 1998); объединённом научном межлабораторном семинаре лабораторий молекулярной генетики хлопчатника, генной инженерии, биотехнологии растений и Учёном Совете Института Генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз (Ташкент, 1998); Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2000» (Москва, 2000); заседаниях кафедры «Химической инженерии и биотехнологии» Университета Аджоу (Сувон, Южная Корея, 2001-2004); Международной научно-практической конференции «Теоретические и практические основы и перспективы развития селекции и семеноводства хлопчатника» (Ташкент, 2002); «Второй Региональной конференции по развитию технологии энергии по пути к чистой окружающей среде» (Пхукет, Таиланд, 2003); заседании кафедры «Биотехнологии» Сеульского Национального Университета (Сеул, Южная Корея, 2003); научном семинаре в Университете Чунбук (Чунбук, Южная Корея, 2003); семинаре Корейского «Национального института по развитию международного образования» – NIIED (Сеул, Южная Корея, 2004); Международной научно-практической конференции «Современное состояние селекции и семеноводства хлопчатника, проблемы и пути их решения» (Ташкент, 2007); IV Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007); Международной научно-практической конференции «Научные и практические основы улучшения плодородия почв» (Ташкент, 2007); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы молекулярной биологии растений» (Ташкент, 2008); Международной научно-практической конференции, посвящённой 95-летию Саратовского Госагроуниверситета «Вавиловские чтения - 2008» (Саратов, 2008), Республиканской научной конференции «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии» (Ташкент, 2009).

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии при формулировке и постановке целей и задач, обосновании способов их решения, планировании и проведении экспериментальных работ, анализе и обобщении результатов исследований, составлении на их основе заключения и выводов, написании монографии и статей.

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликованы: монография «Ферментативная конверсия хлопковой целлюлозы» (13 печ. л.); 21 научная статья (журнальные) и 13 тезисов докладов в материалах зарубежных и отечественных конгрессов и конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 277 страницах и состоит из: введения, обзора литературы (1 глава), материалов и методов исследования (2 глава), результатов и их обсуждения (3-5 главы), заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений; включает 13 схем, 54 таблицы и 29 рисунков. Библиография состоит из 309 работ, из которых 170 – на английском языке.

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, зав. кафедрой «Биотехнология и микробиология» НУУз им. Мирзо Улугбека, д.б.н., проф. Рахимову М.М. и заслуженному профессору университета Аджоу (г. Сувон, Южная Корея), доктору Ким Чуль за всемерное содействие и постоянное внимание к работе. Автор также считает своим долгом выразить признательность Корейскому «Национальному институту по развитию международного образования» - НИЕД (Южная Корея) за финансовую и моральную поддержку, сотрудникам Узбекского НИИ селекции и семеноводства хлопчатника за содействие при выполнении основной части методической работы, коллегам по кафедре «Биотехнология и микробиология» НУУз, а также лаборатории «Суперкритические флюиды» факультета биохимической инженерии и биотехнологии ун-та Аджоу, оказавшим непосредственную помощь и содействие при выполнении настоящей работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава 1. Современное состояние и особенности биоконверсии целлюлозы и целлюлозосодержащих материалов

Данная глава состоит из 7 разделов. В разделах главы систематизированы сведения научно-исследовательских работ и научно-технических разработок, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе по современному состоянию и особенностям процесса ФГ целлюлозы, а также переработки целлюлозосодержащих отходов. Анализируются вопросы биосинтеза, изменения состава и структуры целлюлозы волокон хлопчатника в периоде его развития. Уделяется особое внимание механизмам действия ферментов целлюлазного комплекса на природную целлюлозу, а также факторам, влияющим на скорость и эффективность ФГ целлюлозы. Приводятся основные виды и запасы целлюлозосодержащих отходов хлопководства, производства и переработки хлопка-сырца Узбекистана, а также перспективы их использования. В заключении главы сформулирована и обоснована целесообразность проведения НИР по проблеме, поднимаемой в диссертационной работе.

Глава 2. Объекты и методы исследований

Глава состоит из 3 разделов, включает в себя объекты исследований и схему биоконверсии целлюлозы хлопкового волокна, использованные ферменты и реактивы, а также методику приготовления реактивов и методы исследований.

В качестве объекта исследований субстратов были волокна 8 районированных сортов, 2 внутривидовых гибридов и 3 видов хлопчатника (*G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L.). Исследованию подвергали разновозрастные волокна: сортов "Ташкент-6", "Омад" и "149-Ф" вида *G. hirsutum* L.; сортов "Каршинский-2", "Термез-31", "С-6037" и "Ашхабад-25" вида *G. barbadense* L.; сорт "С-7059" вида *G. arboreum* L., а также их внутривидовые гибриды F₁ (Ташкент-6 x 149-Ф) и F₁ (Каршинский-2 x

Ашхабад-25), отличающиеся скороспелостью, хозяйственно-ценными признаками и качественными показателями волокна. Внутривидовые гибриды F₁ были использованы в качестве среднеспелых образцов. Полевые опыты (посев, отбор проб материалов и их фиксация) проводили на участках экспериментального хозяйства, а также в теплице с искусственным климатом "Фитотрон" Узбекского НИИ селекции и семеноводства хлопчатника.

Для ФГ вышеуказанных субстратов использовали следующие целлюлазные комплексы: а) *целловиридин ГЗХ (Trichoderma viride)* с активностью 83 ед/г по С₁-активности (паспортные данные), 65 ед/г по эндоглюканазе и 1 ед/г по целлюбиазе и *нектофоетидин ГЗХ (Aspergillus foetidus)* - с пектолитической активностью 90ед ПкС/г (паспортные данные) и 37ед/г по целлюбиазе производства Приволжского биохимического завода (Россия); б) целлюлазные ферменты из *Trichoderma viride* (6.9 ед/мг), *Trichoderma reesei* (10.4 ед/мг) и *Aspergillus niger* (1.18 ед/мг) производства компании Sigma Chemical Co. (США). Согласно паспортным данным компании одна единица освобождают 1.0 Ммоль глюкозы из целлюлозы за один час при рН 5.0 и 37°С. Для процесса одновременного осахаривания и ферментации в этанол использовался коммерческий ферментный препарат Spezyme CP (Genencor International Co.), а также "пекарские дрожжи" ("Baker yeasts") *Saccharomyces cerevisiae* (Type I, Sigma Chemical Co., USA).

Для регистрации продуктов ФГ в качестве аналитических реагентов использовали следующие ферменты и реактивы: а) глюкозооксидаза лиофилизованная, производства Львовского предприятия по производству бактериальных препаратов с удельной активностью 74 тыс. ед/г; б) пероксидаза из хрена производства фирмы "Реанал" (Венгрия) с выходной активностью 350-400 тыс. ед/г; в) О-дианизидин марки "Ч", очищенный вакуумной возгонкой, производства Донецкого завода химических реактивов, а также фирмы Sigma Chemical Co.(USA); г) Д-глюкоза марки "ХЧ" производства фирмы "Реахим" и американской Sigma Chemical Co.

Измельчение субстрата – зелёных коробочек (смесь створок, волокон и семян) проводили на измельчающей упруго-деформационной установке научно-производственного предприятия «Тегирмон».

Ферментативную конверсию хлопковой целлюлозы осуществляли в **атмосферных условиях и условиях суперкритического (СК) давления CO₂**.

Определение общих ВС осуществляли с использованием модифицированного метода Шомоди-Нельсона [Клёсов и др., 1980]. Концентрацию глюкозы в растворе после ФГ определяли с помощью глюкозного анализатора (YSI 1500, США), а также с помощью глюкозооксидазно-пероксидазного метода [Берёзин и др., 1977]. Оптическую плотность определяли на спектрофотометрах "Shimadzu UV-1201" (Япония), "Spectromom" (Венгрия), "Specol UV VIS" (Германия) и СФ-26 (Россия) при длинах волны D₆₂₀ - количество ВС и D₄₆₀ - D₄₈₀ - глюкозы.

Ферментация реакционной смеси была осуществлена с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (10 мг/мл) при температуре 35°С. Пробы отбирали после 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36 часов инкубации. Концентрацию

этанола определяли методом газовой хроматографии (газовый хроматограф HP 5890 Series II Plus, снабжённый интегратором Integrator HP 3396A и инжектором Injector HP 6890 Series производства США) используя 120/80 6.6% углеродно-восковую колонку. Использованные параметры настройки газового хроматографа: температура печи 250⁰С, температура инжектора (впрыска) 200⁰С и температура детектора 250⁰С. Контрольный раствор готовился использованием 5 g этанола с добавлением дистиллированной воды до 100 g. Концентрацию этанола считали на основе сравнения площадей пиков образцов и контроля [Ramos et al., 1994].

Содержание целлюлозы в разновозрастных волокнах (субстратах) определяли по стандартному методу Корея и Грея, видоизменённой Шаткиной [Шаткина, 1959]. Степень полимеризации (СП) целлюлозы определяли с помощью вискозиметра Освальда, растворяя её в реактиве Швейцера, как описано в работе [Бредихина, 1955]. Содержание кристаллитов определяли по предложенному способу [Усманов и др., 1974]. Технологические свойства исследованных волокон (метрический номер, разрывная нагрузка) были изучены в лаборатории технологии хлопкового волокна УзНИИССХ по методам, описанным в работе [Иванов и др., 1972]. Непрогидролизовавшиеся частицы и ассоциаты после ФГ изучали на световом микроскопе (марка МБИ-6, МБИ-3) при различных увеличениях. Характерные картины фотографировали с помощью микрофотонасадки МФН-12. Электронно-микроскопические исследования гидролизатов проводили на приборе "Тесла БС-613". Препараты готовили по методике [Киселев, 1965]. Математическую обработку полученных результатов проводили по методу [Доспехов, 1979].

Глава 3. Ферментативная конверсия целлюлозы хлопковых волокон в атмосферных условиях

Данная глава состоит из четырёх разделов, в которых описываются особенности ФГ целлюлозы разновозрастных волокон сортов Ташкент-6, 149-Ф (*G. hirsutum L.*) и их внутривидового гибрида F₁, а также сортов Каршинский-2, Ашхабад-25 (*G. barbadense L.*) и внутривидового гибрида F₁. Анализируются результаты биоконверсии волокон хлопчатника видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.*, собранных из различных плодовых ветвей, а также целлюлозы из незрелых хлопковых коробочек.

Известно, что на эффективность гидролиза целлюлозосодержащих субстратов, наряду с их реакционной способностью, наибольшее влияние оказывают такие факторы, как: содержание целлюлозы, степень их кристалличности и полимеризации, а также технологические свойства волокон [Усманов и др., 1964; Тиунова, 1981; Клёсов и др., 1981; Рахимов и др., 1987]. В процессе биоконверсии хлопковой целлюлозы нами было уделено особое внимание выяснению роли отдельных факторов (скороспелость сортов, возраст волокон и продолжительность реакции ФГ) на динамику выходов ВС и глюкозы.

Из анализа полученных результатов установлено, что в начальной

стадии ФГ с возрастом волокна для всех изученных сортов и видов хлопчатника, независимо от содержания целлюлозы и скороспелости сортов, а также гибридности выходы ВС и глюкозы относительно небольшие (табл. 1). До определенного периода развития выходы ВС и глюкозы увеличиваются, затем происходит небольшое падение, далее наблюдается увеличение выходов ВС и глюкозы, и новое их падение в период созревания, т.е. выходы ВС и глюкозы проходят через экстремум. Такая закономерность сохраняется как для скороспелых, так и для позднеспелых, а также для гибридных волокон. Однако “пики” увеличения и падения различаются количествами выходов ВС и глюкозы при ФГ. Сравнительный анализ полученных в работе результатов и данных, опубликованных в литературе, показал, что в начальной стадии содержание целлюлозы ещё небольшое и с увеличением возраста волокна до 25-30 дней увеличивается и количество целлюлозы, следовательно, будут выше и выходы ВС и глюкозы. Однако, несмотря на то, что содержание целлюлозы в волокнах 30-35 - дневного больше, чем в 25-дневном возрасте, выходы ВС и глюкозы несколько падают. Это связано со структурными особенностями молекулы целлюлозы волокна. Так, волокна 30-35 - дневного возраста уже приобретают слабую кристаллическую структуру [Муратов А. и др., 1983; 1989]. Учитывая, что кристаллическая целлюлоза меньше подвергается ФГ, естественно, можно предположить, что выходы ВС и глюкозы будут ниже. Дальнейшее увеличение выходов ВС и глюкозы с возрастом волокна (до 40 дней) объясняется тем, что при созревании волокон растущие цепи макромолекулы целлюлозы, вклиниваясь в отложившуюся целлюлозную цепь, разрыхляют её структуру [Муратов А. и др., 1973; 1985]. Начиная с 50-дневного возраста, наблюдается резкое падение выходов продуктов гидролиза, которое связано уже со структурным фактором - кристаллической структурой данных образцов. Это явление было характерно для всех изученных волокон сортов, видов и гибрида хлопчатника.

Полученные результаты также свидетельствуют, что выходы глюкозы в 2.5-3.5 раза ниже, чем количество ВС, выделяемых при ФГ хлопковой целлюлозы исследованных образцов соответствующего возраста и времени проведения гидролиза (табл. 1). Так, например, если выходы ВС при 48 часовом ФГ из целлюлозы волокон сортов и гибрида хлопчатника 30-дн. возраста составляли 10.0 (Ташкент-6); 11.8 (149-Ф) и 12.5 мг/мл у гибрида, то в идентичных условиях выходы глюкозы соответственно составляли 3.3; 3.5 и 4.0 мг/мл. Или же для волокон 40-дн. возраста, если выходы ВС составляли 10.0 (Ташкент-6); 10.9 (149-Ф) и 12.0 мг/мл (гибрид F₁); то в аналогичных условиях выходы глюкозы имели значения 3.4; 3.3 и 4.5 мг/мл соответственно. Аналогичная закономерность также наблюдается для целлюлозы волокон сортов вида *G. barbadense* L. Так, если выходы ВС 30-дневных волокон, при 48-часовом гидролизе, составляют 20.2 (Каршинский-2), 23.1 (Ашхабад-25) и 24.7 мг/мл (гибрид F₁), то для глюкозы эти показатели соответственно составляют 3.9; 4.5 и 4.8 мг/мл. Значение выхода глюкозы у скороспелого сорта несколько ниже, чем у позднеспелого сорта и

Таблица 1.

Сравнительные выходы ВС и глюкозы (мг/мл) при ФГ целлюлозы хлопковых волокон сортов и гибридов хлопчатника видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* от продолжительности реакции гидролиза, часы

Возраст волокна, дни	<i>G. hirsutum L.</i>								<i>G. barbadense L.</i>							
	Глюкоза [мг/мл]				ВС [мг/мл]				Глюкоза [мг/мл]				ВС [мг/мл]			
	12	24	36	48	12	24	36	48	12	24	36	48	12	24	36	48
	Ташкент-6								Каршинский-2							
20	1.8	2.5	2.7	3.0	2.3	4.4	5.4	5.9	1.2	2.0	2.4	2.5	6.0	9.6	11.7	12.0
30	1.0	2.4	2.7	3.3	4.9	8.1	9.2	10.0	2.1	3.5	3.7	3.9	10.7	16.9	19.4	20.2
40	1.0	2.6	2.6	3.4	4.8	7.4	9.5	10.0	2.2	3.4	3.9	4.1	10.1	15.5	18.1	18.7
50	0.8	2.2	2.2	2.4	4.0	6.6	8.2	8.8	1.6	2.2	2.6	2.8	6.7	13.2	14.1	15.1
60	0.7	1.7	1.8	2.1	3.1	4.5	5.0	5.7	1.4	2.2	2.4	2.7	5.4	11.5	12.0	13.0
70	0.6	1.3	1.4	1.5	2.1	3.7	4.4	5.0	1.1	1.9	2.2	2.3	4.2	7.1	8.4	8.7
	149-Ф								Ашхабад-25							
20	2.0	2.7	2.9	3.1	2.6	4.8	5.9	6.2	1.4	2.3	2.6	2.7	6.5	10.5	12.7	13.2
30	1.3	2.8	3.0	3.5	5.8	8.0	10.7	11.8	2.5	3.7	4.3	4.5	13.1	19.5	22.2	23.1
40	1.2	2.8	3.0	3.3	5.3	8.5	10.3	10.9	2.5	3.6	4.2	4.4	11.3	16.0	19.5	20.6
50	1.1	2.6	2.8	2.9	4.7	8.0	9.1	9.8	1.9	2.7	3.3	3.5	8.5	14.1	15.1	16.1
60	1.0	2.3	2.5	2.6	3.3	5.1	5.9	7.0	1.6	2.4	2.7	3.0	5.3	10.4	12.0	12.7
70	0.9	1.7	1.8	1.8	2.6	4.2	5.0	5.4	1.3	2.3	2.6	2.8	4.9	8.1	9.6	10.0
	F₁ (Ташкент-6 x 149-Ф)								F₁ (Карши-2 x Ашхабад-25)							
20	2.2	3.0	3.3	3.4	3.0	5.2	6.7	7.2	1.6	2.5	2.8	3.0	7.4	11.7	14.0	14.4
30	1.8	3.4	3.7	4.0	6.2	9.0	11.7	12.5	3.0	4.2	4.7	4.8	14.4	21.0	23.7	24.7
40	1.7	3.9	4.0	4.5	6.0	9.8	11.5	12.0	2.8	3.9	4.4	4.6	12.5	17.7	21.1	21.9
50	1.6	3.4	3.8	4.0	5.1	8.0	9.3	10.5	1.8	3.0	3.5	3.7	9.8	16.0	16.8	19.2
60	1.4	3.0	3.1	3.3	3.7	5.5	6.1	7.0	1.5	2.7	3.0	3.3	6.3	11.2	11.9	13.9
70	1.4	2.4	2.7	2.8	3.1	5.0	5.6	6.0	1.4	2.4	2.8	3.0	5.6	9.0	10.6	11.0
НСР₀₅	0.28	0.38	0.41	0.44	0.31	0.37	0.51	0.61	0.20	0.27	0.31	0.42	0.32	0.45	0.59	0.65

гибрида F₁. В начальной же стадии процесса гидролиза (2 и 4 часа) существенного изменения в выходах глюкозы, независимо от сортности и гибридности, не обнаружено. Характерные сортовые и гибридные различия наблюдаются только после суточного ФГ.

Нами были вычислена степень конверсии хлопковой целлюлозы при ФГ. Установлено, что степень конверсии в ВС и глюкозу, независимо от возраста и времени проведения гидролиза, увеличивается. Но значения их зависят от разновидности сортов, возраста и продуктов, выделенных в процессе гидролиза. Так, если при 2 часовом гидролизе степень конверсии целлюлозы в ВС сорта Ташкент-6 колеблется в пределах от 0.8 (70 дней) до 3.5% (40 дней), то при 48 часовом гидролизе она составляет от 13.3 (70 дней) до 33.1% (20 дней). Для волокон вида и *G. barbadense* L. в начальный период гидролиза (за 2 часа), если степень конверсии в ВС для волокон Каршинский-2 составляет 0.8-7.6, а для волокон Ашхабад-25 – 0.8-10.3 %, то после 12 часового гидролиза она резко увеличиваясь, составляет значения: 11.4-40.8 и 13.3-50.1 % соответственно. После двухсуточного гидролиза эти значения увеличиваются до 23.5-61.8 и 27.0-81.0 %. Аналогичное повышение степени конверсии целлюлозы наблюдается и для глюкозы. Т.е. степень конверсии в более молодом возрасте, независимо от содержания целлюлозы, более высокая. Аналогичная закономерность обнаружена и для позднеспелых сортов. Степень превращения целлюлозы в глюкозу в 3-4 раза ниже, чем в ВС. Высокая степень конверсии целлюлозы в ВС и глюкозу соответствует 48 часовому гидролизу, и, самое главное, 20-40 дневному возрасту волокон. Т.е. они, имея в составе достаточно большое количество целлюлозы, ещё не были закристаллизованы.

Известно, что эффективность ФГ целлюлозосодержащих материалов, в том числе и хлопковой целлюлозы в значительной степени зависит от уровня кристалличности целлюлозных субстратов [Клесов и др., 1981; Сеницын и др., 1986; Рахимов, 1997; Parsielga et al., 2000]. Кинетика биоконверсии целлюлозосодержащих материалов при ФГ, а также выходов продуктов гидролиза изучалась с помощью различных физико-химических методов (спектрофотометрия, калориметрия, электронная микроскопия и др.) исследования [Березин и др., 1977, Hoshino et al., 1993; 1994]. Одним из прямых методов исследования структуры (степени кристалличности) целлюлозных материалов является метод электронной микроскопии [Усманов и др., 1962, 1974; Муратов А. и др., 1983]. Следовательно, мы в работе провели последовательное электронно-микроскопическое изучение структурных организаций, выделенных из гидролизатов после ФГ хлопковой целлюлозы разновозрастных волокон хлопчатника. Некоторые результаты электронно-микроскопических исследований характера расщепления кристаллитов целлюлозы волокон сорта 149-Ф, в период их развития, приведены на рис. 1.

Анализ характера расщеплённых кристаллитов и их ассоциатов показал, что в периоде вегетации хлопчатника со дня цветения до 25 дневного возраста количество целлюлозы небольшое и, несмотря на значительное

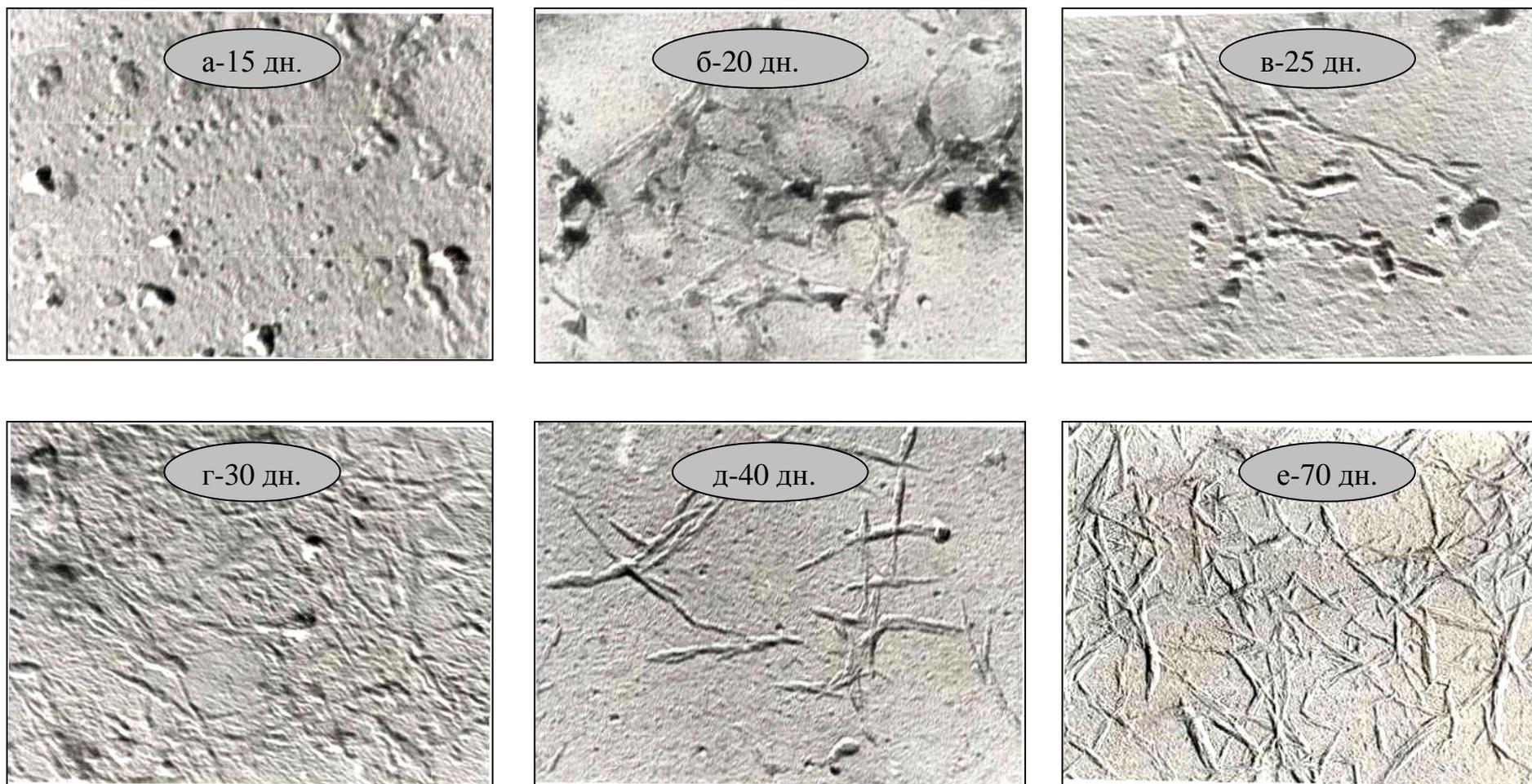


Рис. 1. Электронные микрофотографии гидролизатов целлюлозы хлопкового волокна сорта 149-Ф различной зрелости после ФГ. Увеличение 15000^x.

содержание кристаллитов (табл. 2), в целлюлозе хлопковых волокон не произошло фибриллообразование. Поэтому ассиметричные частицы, характерные для кристаллической целлюлозы, не обнаруживаются. В процессе ФГ, в основном, выделяются масса бесформенных частиц и их скопления (рис. 1 а,б). По-видимому, они являются наиболее плотными (устойчивыми к ферментам) участками волокна. Этот период соответствует периоду роста волокна в длину [Муратов А. и др., 1983; 1985]. Поэтому выходы ВС и глюкозы, как видно, относительно небольшие (табл. 2). Возраст волокон 30-40 дней со дня цветения соответствует периоду интенсивного накопления целлюлозы. В данном этапе формирования волокна происходит отложение целлюлозы в виде фибриллярных образований во вторичной его стенке. При этом содержание кристаллитов значительно увеличивается (табл. 2). Изменяется характер упаковки структурных элементов (микрофибрилл, фибрилл и их слоёв), вследствие отложения новых "порций" целлюлозы, синтезирующихся в этот период. На картинах гидролизованных препаратов, наряду с бесформенными частицами, уже образуется довольно большое число ассиметрических частиц, характерных для кристаллической целлюлозы (рис. 1 в,д). Но плотность их упаковки, т.е. кристалличность, ещё не совсем совершенная, в то же время, содержание целлюлозы в них достаточно высокое (71.3 - 86.1%). Поэтому, в данном периоде развития выходы ВС и глюкозы имеют максимальные значения (табл. 2).

Таблица 2

Влияние кристаллитов целлюлозы хлопковых волокон сортов 149-Ф и Ашхабад-25 на выходы ВС и глюкозы при ФГ

Выходы	Возраст волокон, дни								
	15	20	25	30	35	40	50	60	70
149-Ф									
Кристаллиты, [%]	20.5	40.4	58.0	74.7	76.6	81.9	90.6	93.0	94.2
Глюкоза, [мг/мл]	2.1	3.1	5.2	3.5	3.7	3.3	2.9	2.6	1.8
ВС, [мг/мл]	5.4	6.2	14.0	11.8	12.5	10.9	9.8	7.0	5.4
Ашхабад-25									
Кристаллиты, [%]	22.0	39.1	55.1	71.3	77.2	84.7	89.2	93.7	94.1
Глюкоза, [мг/мл]	2.0	2.7	3.0	4.6	3.7	4.4	3.6	3.0	2.8
ВС, [мг/мл]	9.0	13.2	18.0	23.1	19.2	20.6	16.1	12.7	10.0

При рассмотрении гидролизованных препаратов 40 дн. возраста уже чётко выделяются ассиметричные частицы и их агрегаты, характерные кристаллической целлюлозе. Глобулярные и бесформенные частицы, при этом, полностью отсутствуют (рис. 1 д). Установлено, что длина наблюдаемых частиц (кристаллитов) варьирует в пределах 600-1200 Å, а ширина их, в основном, остаётся неизменной (имея значение порядка 120 Å). Это свидетельствует о завершении процессов биосинтеза целлюлозы волокна и формирования его структуры. В данном периоде развития содержание кристаллитов изменяется незначительно, по сравнению с другими

предыдущими этапами развития, но имеет максимальное значение. Поэтому, начиная с 40 дневного возраста до созревания наблюдается плавное падение выходов ВС и глюкозы. Исходя из полученных данных следует, что на деградацию волокон хлопчатника при ФГ существенное влияние оказывает кристаллизация целлюлозы в процессе её биосинтеза в период их развития.

Наряду с электронно-микроскопическими исследованиями гидролизатов провели анализ непрогидролизовавшихся частиц при ФГ на световом микроскопе. Анализ провели в сравнении с непрогидролизовавшимися частицами, выделенными после кислотного гидролиза. Некоторые данные представлены на рис. 2. Анализ проводился при двух увеличениях. При малом увеличении рассматривали общую картину - картину расщепления волокон, распределения частиц и их ассоциатов. При большом рассматривали отдельные волокна и характер их расщепления. Особое внимание также отводили на кончики отрезков волокон и частиц, выделенных при гидролизе.

Анализ данных показал, что характер расщепления, формы и размеры волокон раннего возраста - до 20 дней идентичны, несмотря на то, что условия кислотного гидролиза очень жесткие по сравнению с ферментативным. Уже с 25-дневного возраста, независимо от сортности и гибридности происходит различие в указанных параметрах. Расщепляемые частицы более крупные, но на микрофотографиях препаратов, полученных после кислотного гидролиза, мелких палочковидных глобулярных и бесформенных частиц, характерных для ферментативного гидролиза, не наблюдается. Кончики волокон как-бы обрублены. Поперечные размеры волокон (отрезков) не изменяются. У образцов же, полученных после ФГ, кончики волокон (отрезков) зазубрены, в отдельных случаях хорошо наблюдается дефибриляция волокон. Увеличивается диаметр волокон за счёт разрыхления, но исходную форму волокна не теряют. По мере роста волокон, в основном, сохраняется такая же картина, если не учесть, что для препаратов, полученных после кислотного гидролиза, число и длина отрезков остается довольно стабильной. У препаратов же, полученных после ФГ, в период созревания названные отрезки более длинные. Отсюда следует, что при ФГ расщепление волокон, прежде всего, протекает в продольном направлении, а затем происходит расщепление на отрезки. При кислотном же гидролизе расщепление на отрезки происходит в основном поперечно.

На основании сравнительного изучения гидролизуемости хлопковой целлюлозы волокон сортов, гибридов хлопчатника видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* установлен общий механизм расщепления волокон при ФГ. Главным отличием является количественное соотношение выходов ВС и глюкозы. Экспериментально установлено, что на биоконверсию целлюлозы разновозрастных волокон хлопчатника, при ФГ, существенное влияние оказывает кристаллизация целлюлозы в процессе её биосинтеза в период их развития. Показано, что повышение кристалличности целлюлозы при созревании волокна и есть основная причина, препятствующая ФГ зрелых волокон.

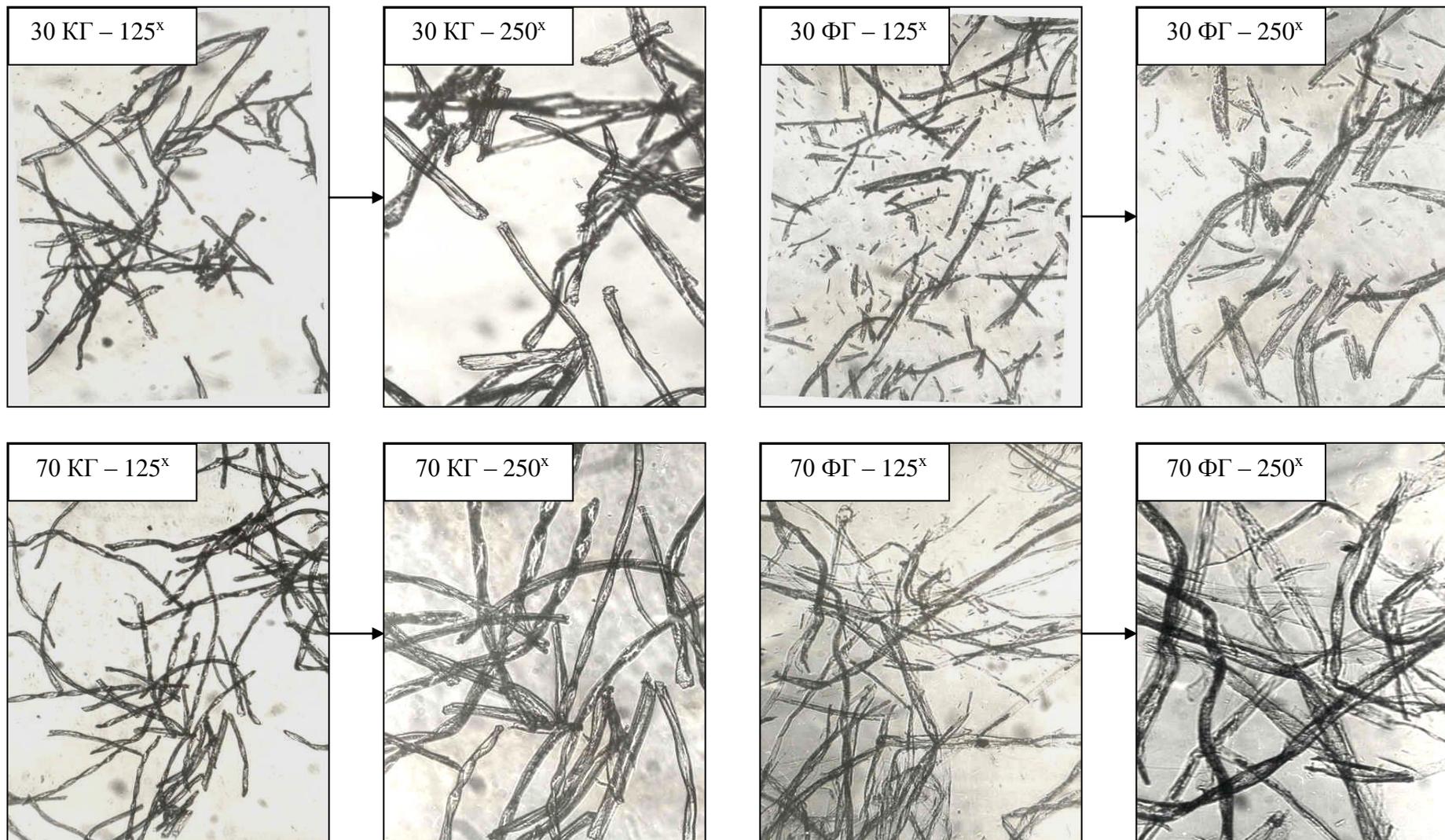


Рис. 2. Микрофотографии непрогидролизованых частиц целлюлозы хлопковых волокон 30 и 70 дневных возрастов вида Ташкент-6 после кислотного (КГ) и ферментативного (ФГ) гидролиза. Увеличение: 125^x и 250^x.

Формирование коробочек хлопчатника на различных плодовых ветвях влияет на содержание целлюлозы в них в процессе биосинтеза, что естественно отразилось и на выходах ВС и глюкозы. При гидролизе 20-дн. волокон выходы ВС из верхних плодовых ветвей (ВПВ), при соответствующих сортах и гибридах, почти в 2 раза превышают значения нижних плодовых ветвей (НПВ) (табл. 3). Если при данном возрасте выходы ВС из волокон НПВ (сорт Ташкент-6) при 48-часовом гидролизе составляют 5.9 мг/мл, то из волокон ВПВ - 11.2 мг/мл. Или же для позднеспелого сорта 149-Ф эти значения в зависимости от расположения их в различных плодовых ветвях, составляют 6.6-12 мг/мл. Аналогичную закономерность можно наблюдать и для вида *G. barbadense* L. (табл. 3). С увеличением возраста волокон ВПВ, при одинаковых условиях гидролиза, кратность увеличения выходов ВС уменьшается примерно до 1.5 раза (30 дней) и до 1.3 (40 дней). Если у сортов сопоставить количественные данные выходов ВС волокна одного и того же возраста ВПВ и НПВ, то становится очевидным, что характер изменения этого показателя, в зависимости от длительности процесса гидролиза, практически одинаков. Однако, при сравнении этих данных установлено, что у волокон ВПВ абсолютные показатели выходов ВС и глюкозы выше, чем у волокон НПВ. Подобная закономерность выходов глюкозы в зависимости от времени гидролиза, возраста и месторасположения волокон хорошо отражена в графиках (рис. 3). На основе анализа полученных результатов установлено, что накопление целлюлозы в хлопковых волокнах различных плодовых ветвей происходит с различной скоростью, что в свою очередь оказывает большое влияние на гидролизруемость и степень превращения целлюлозы. В результате самые большие выходы ВС и глюкозы были получены из хлопковой целлюлозы волокон ВПВ независимо от сортового и видового происхождения.

Таким образом, путём изучения гидролизруемости хлопковой целлюлозы различных сортов и гибридов хлопчатника, найдены общие и отличительные особенности динамики выходов ВС и глюкозы в зависимости от: возраста волокон, местоположения коробочек на плодовых ветвях, а также от продолжительности ФГ и др. Впервые установлено, что хлопковая целлюлоза волокон видов *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L. и их внутривидовые гибриды, имея одинаковый механизм расщепления при ФГ равнозначных возрастов, различаются в выходах и степени конверсии целлюлозы в ВС и глюкозу. Показано, что выходы продуктов гидролиза сортов и гибридов вида *G. barbadense* L. при соответствующих возрастах и условиях проведения процесса в 1.3-1.7 раза выше, чем из волокон *G. hirsutum* L. Найдены различия в абсолютных показателях выходов ВС и глюкозы, а также степени превращения при ФГ хлопковой целлюлозы разновозрастных волокон, собранных из разных плодовых ветвей. Установлено, что у волокон ВПВ показатели ВС и глюкозы выше, чем у волокон НПВ, соответственно волокна ВПВ по сравнению с НПВ представляют гораздо больше интереса в качестве субстрата для последующей ферментативной конверсии благодаря худшему качеству

Таблица 3.

Сравнительные выходы ВС и глюкозы (мг/мл) при ФГ целлюлозы хлопковых волокон НПВ и ВПВ видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* (время гидролиза 12-48 часов)

Виды и возраст волокон, дни	Глюкоза [мг/мл]								ВС [мг/мл]								
	НПВ				ВПВ				НПВ				ВПВ				
	12	24	36	48	12	24	36	48	12	24	36	48	12	24	36	48	
Ташкент-6																	
<i>G. hirsutum L.</i>	20	1.6	2.4	2.9	3.0	2.5	3.5	4.4	4.6	2.6	4.9	5.7	5.9	5.1	8.4	10.4	11.2
	30	1.6	2.7	3.2	3.3	2.8	4.6	5.5	5.7	4.2	8.1	9.2	10.0	7.1	11.5	13.9	15.0
	40	1.9	2.9	3.3	3.4	2.9	4.4	5.0	5.1	4.9	7.4	9.6	10.0	6.6	10.6	12.6	13.5
	149-Ф																
	20	1.7	2.5	3.1	3.2	2.7	3.8	4.7	5.0	2.9	4.8	6.1	6.6	5.4	9.1	11.0	12.0
	30	1.7	2.9	3.5	3.6	3.0	4.9	5.7	6.1	5.0	8.0	10.6	11.8	8.0	12.4	14.8	16.0
	40	2.0	3.2	3.7	3.7	3.2	4.7	5.3	5.4	5.3	8.5	10.4	10.9	7.3	11.3	13.5	14.4
	F₁ (Ташкент-6 x 149-Ф)																
	20	1.9	2.7	3.3	3.5	3.0	4.1	5.0	5.4	3.3	5.2	7.0	7.4	6.0	9.8	11.8	12.8
	30	2.0	3.3	3.9	4.0	3.2	5.2	6.1	6.4	5.4	9.0	11.3	12.5	8.7	13.4	15.8	16.8
40	2.5	3.8	4.4	4.5	3.3	4.9	5.6	5.7	6.4	9.8	11.3	12.0	7.9	12.2	14.5	15.5	
Каршинский-2																	
<i>G. barbadense L.</i>	20	1.2	2.0	2.4	2.5	3.2	4.9	5.7	6.0	6.0	9.6	11.7	12.0	7.0	12.3	14.7	15.3
	30	2.1	3.5	3.7	3.9	3.6	5.9	7.1	7.4	10.7	16.9	19.8	20.2	14.0	21.0	23.0	24.5
	40	2.2	3.4	3.9	4.1	3.8	6.1	7.2	7.5	10.1	15.5	18.1	18.7	12.6	18.3	21.0	22.1
	Ашхабад-25																
	20	1.4	2.3	2.6	2.7	3.6	6.2	7.5	7.8	6.5	10.5	12.7	13.2	7.3	12.7	15.5	16.5
	30	2.5	3.7	4.3	4.5	3.9	6.3	7.5	8.2	13.1	19.6	22.9	23.1	15.0	21.6	24.4	25.3
	40	2.5	3.6	4.2	4.4	4.1	6.4	7.4	7.5	11.3	16.0	19.5	20.6	13.0	19.5	23.3	24.0
	F₁ (Каршинский-2 x Ашхабад-25)																
	20	1.6	2.5	2.8	3.0	3.9	5.3	6.5	8.3	7.4	11.7	14.0	14.4	8.0	13.5	16.0	17.7
	30	3.0	4.2	4.7	4.8	4.1	6.8	7.9	8.4	14.4	21.0	23.7	24.7	15.6	22.1	25.0	27.0
40	2.8	3.9	4.4	4.6	4.3	6.4	7.3	7.7	12.5	17.7	21.1	21.9	13.7	20.7	24.3	25.5	
НСР₀₅	0.24	0.41	0.44	0.51	0.27	0.42	0.46	0.59	0.24	0.40	0.42	0.50	0.27	0.42	0.46	0.59	

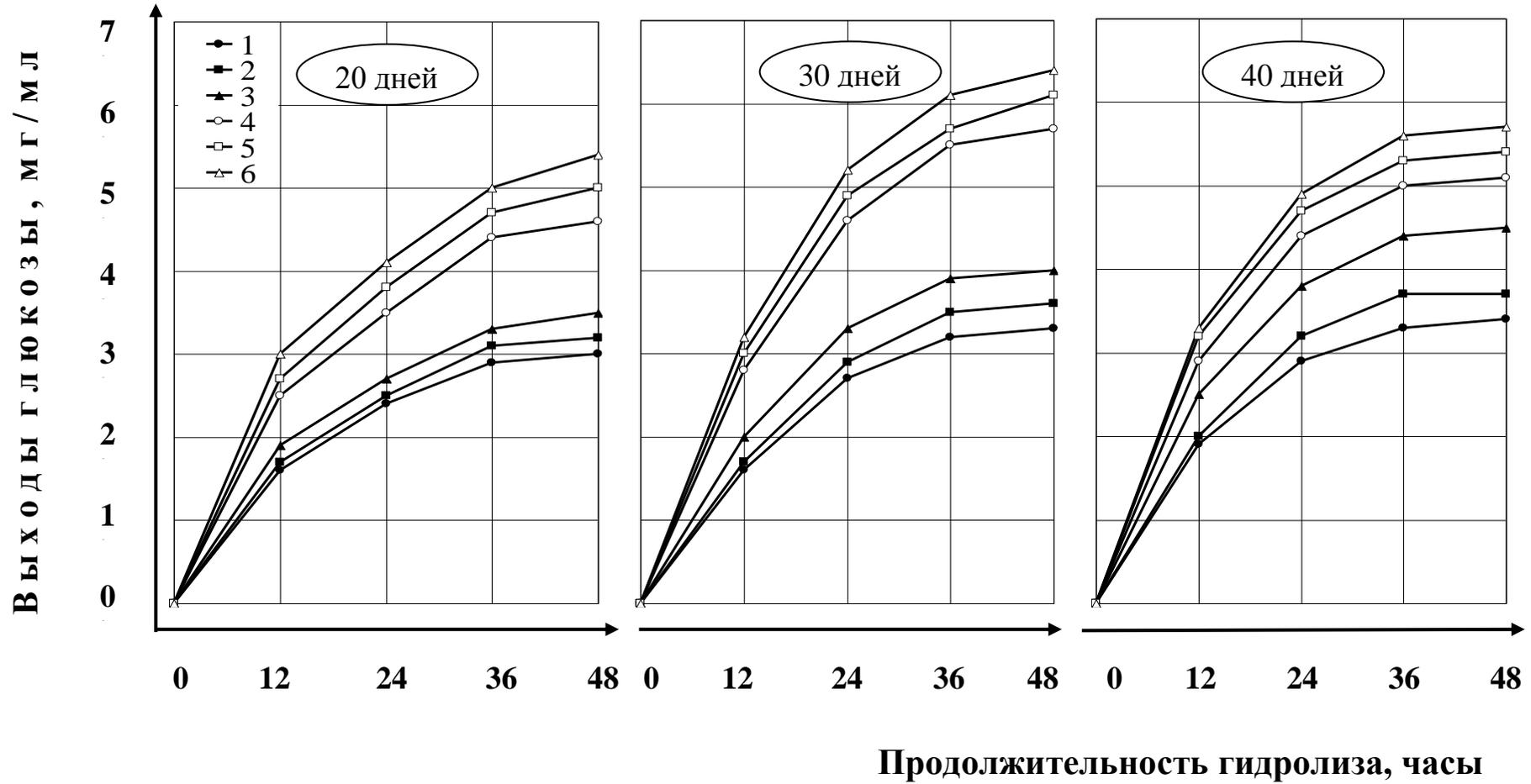


Рис.3. Выходы глюкозы при ФГ целлюлозы хлопковых волокон вида *G. hirsutum L.*, собранных из НПВ (кривые 1-3) и ВПВ (кривые 4-6): 1,4 – Ташкент-6; 2,5 - 149-Ф и 3,6 – F₁(Ташкент-6 x 149-Ф).

синтезируемой целлюлозы, являющейся менее упорядоченной (кристаллической). Важно отметить, что именно волокна ВПВ могут оставаться на полях в конце хлопкоуборочной компании в качестве отходов.

Исследованиями подтверждено, что эффективность ФГ целлюлозы в значительной степени зависит от уровня их кристалличности. Учитывая это, в работе впервые нами проведено последовательное световое и электронно-микроскопическое изучение структурных организаций гидролизатов хлопковой целлюлозы волокон сортов и видов хлопчатника. Впервые установлено, что характер расщеплённых кристаллических частиц при ФГ, а также их формы и размеры, для целлюлозы изученных волокон раннего возраста идентичны. Главные различия в указанных параметрах происходят начиная с 25 дневного возраста. На основе этих исследований впервые предложен механизм расщепления волокон хлопчатника на надмолекулярном уровне при ФГ. Установлена прямая зависимость между кристаллизацией целлюлозы волокон в процессе биосинтеза и выходами продуктов гидролиза при её ферментативной конверсии. Сделана предпосылка, что целлюлоза из недозревших коробочек 30-40 дневного (виды *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.*) возрастов осенне-зимнего сбора ВПВ (практически отходы) могут служить сырьем для ферментативного получения глюкозы и сахаристых веществ.

Глава 4. Ферментативная конверсия целлюлозы хлопковых волокон в условиях суперкритического давления CO₂

Данная глава состоит из трёх разделов, в первом разделе описаны особенности ФГ целлюлозы разновозрастных волокон Ташкент-6, 149-Ф и Омад (вид *G. hirsutum L.*) в условиях СК давления CO₂. Во втором разделе приводятся результаты влияния СК давления CO₂ на биоконверсию целлюлозы разновозрастных волокон сортов Каршинский-2, С-6037, Ашхабад-25 и Термез-31 (вид *G. barbadense L.*). В третьем разделе обсуждаются результаты ФГ (в условиях СК давления CO₂) целлюлозы волокон сорта С-7059 (вид *G. arboreum L.*).

Ниже будут обсуждаться новые результаты исследований, полученные автором в лаборатории «Суперкритические флюиды» факультета «Биохимической инженерии и биотехнологии» ун-та Аджоу (Южная Корея).

Биохимические воздействия СК жидкостей на субстраты впервые были описаны в 1985 Рандольфом и др. [Randolph et al., 1985]. Применение СК углекислого газа при ферментативном гидролизе (ФГ) различных субстратов целлюлозы с целью получения глюкозы было проведено в 1994-1996 годах Чженгом [Zheng et al., 1996; 1998]. Отмечено, что скорость реакции и концентрация глюкозы увеличивались по сравнению с ФГ целлюлозы без углекислого газа. Использование метода СК давления CO₂ при ФГ волокон хлопчатника впервые проводилось автором данной работы [Muratov G. et al., 2002; 2003; 2007].

В своих исследованиях динамику выходов ВС и глюкозы мы анализировали в зависимости от: вида, сорта и возраста волокон;

температуры; СК давления CO_2 ; продолжительности реакции ФГ, а также от использования целлюлазных комплексов различного происхождения.

Прежде всего, в качестве одного из основных факторов, влияющих на процесс ФГ, изучали влияние температуры на выходы ВС и глюкозы при ФГ разновозрастных волокон хлопчатника целлюлазными комплексами различного происхождения при 2-суточном гидролизе (табл. 4). Следует отметить, что выходы ВС и глюкозы в зависимости от возраста волокон, температуры и давления, а также происхождения целлюлазных препаратов, различны. Так, например, если рассматривать волокна сорта Ташкент-6, то с увеличением возраста волокон, выходы ВС и глюкозы уменьшаются. Если при ФГ 30 дневного волокна (30°C) целлюлазным комплексом из *Trichoderma viride* выход ВС составлял 15.5, то в 40 и 60 дневном возрасте это значение соответствует 14.2 и 10.8 мг/мл соответственно. Такое падение выходов ВС и глюкозы можно наблюдать и для вариантов с двумя другими целлюлазными комплексами (*Trichoderma reesei* и *Aspergillus niger*). Это объясняется не содержанием целлюлозы, синтезируемой в процессе роста растений, а уплотнением надмолекулярной структуры от возраста волокон [Муратов А. и др., 1983; 1985; 1989; Муратов Г., 1998]. Несмотря на малое содержание целлюлозы у 30 дневных волокон, выходы ВС самые большие. Это связано с тем, что структура волокон, начиная от 40 дневного возраста, приобретает более плотную упаковку микрофибрилл и становится труднодоступной для целлюлазных препаратов. Об уплотнении (кристаллизации) структуры волокон хлопчатника с 40 дневного возраста было упомянуто в работах [Усманов и др., 1971; Муратов А. и др., 1983; 1985].

Изучением зависимости температуры на эффективность ФГ хлопковой целлюлозы показано, что с увеличением температуры от 30 до 50°C , выходы ВС и глюкозы увеличиваются. Дальнейшее увеличение температуры при ФГ приводит к уменьшению этих показателей. Так, например, если при ФГ целлюлозы волокон Термез-31 выходы ВС при 30°C (30 дн; фермент из *Trichoderma viride*) составляют 16.8 мг/мл, то при 50°C выходы ВС увеличиваются до 28.0 мг/мл, а при 60°C они падают до 23.5 мг/мл. Эти данные получены при ФГ хлопковой целлюлозы в атмосферном (1 атм.) давлении. Аналогичные результаты получены при гидролизе в условиях СК CO_2 давления. Так, если выходы ВС при 30°C имели значения 24.0 мг/мл, то при 50°C и 60°C они составляют 40.1 и 34.4 мг/мл соответственно. Т.е., выходы ВС при ФГ до 50°C увеличиваются, а затем падают. То же самое при ФГ наблюдается и для других возрастов волокон. Но главное различие проявляется в количественном соотношении выходов ВС. Т.е. с увеличением возраста волокон, выходы ВС и глюкозы уменьшаются. Если при ФГ 30 дневного волокна (30°C) целлюлазным комплексом из *Trichoderma viride* выход ВС составлял 16.8, то в 40 и 60 дневном возрасте это значение соответствует 15.3 и 8.9 мг/мл. Или же если при 50°C ФГ выходы ВС составили 28.0 мг/мл (1 атм.) и 40.1 мг/мл (120 атм.), то при ФГ 40 и 60 дневных волокон выходы ВС имели значения 25.2 и 14.9 мг/мл (1 атм.) и 36.1 и 21.4 мг/мл (120 атм.). Это можно наблюдать и для вариантов с двумя

Таблица 4

Сравнительные выходы ВС (мг/мл) при ФГ целлюлозы хлопковых волокон сортов и видов (время гидролиза 48 часов)

Сорта и виды хлопчатника	Возраст волокна, дни	Давление, 1 атм.				СК давление, 120 атм.			
		Температура, °С							
		30	40	50	60	30	40	50	60
<i>Trichoderma viride</i>									
Ташкент-6 <i>G. hirsutum L.</i>	30	15.5	20.9	24.7	19.0	23.8	31.4	35.3	24.6
	40	14.2	19.8	23.4	18.4	21.8	29.8	33.5	21.4
	60	10.8	13.3	17.0	12.3	13.0	20.8	24.3	12.8
Термез-31 <i>G. barbadense L.</i>	30	16.8	23.8	28.0	23.5	24.0	33.6	40.1	34.4
	40	15.3	21.4	25.2	21.6	21.6	30.3	36.1	31.0
	60	8.9	12.4	14.9	12.0	12.8	17.9	21.4	18.4
С-7059 <i>G. arboreum L.</i>	30	15.5	21.1	25.5	21.6	22.2	30.5	36.4	30.9
	40	14.7	20.2	24.1	20.4	21.0	24.3	34.5	28.9
	60	8.3	11.5	13.7	11.6	11.9	16.4	19.6	16.6
<i>Trichoderma reesei</i>									
Ташкент-6 <i>G. hirsutum L.</i>	30	13.9	18.8	22.7	18.2	20.7	28.8	32.5	20.5
	40	13.4	17.9	21.6	17.1	19.4	27.4	30.8	18.9
	60	7.1	8.5	11.0	7.7	9.9	17.6	21.1	9.8
Термез-31 <i>G. barbadense L.</i>	30	15.4	21.6	25.7	21.8	22.0	30.4	36.7	31.1
	40	14.1	19.8	23.6	20.0	21.2	29.5	34.8	29.9
	60	6.0	8.5	10.1	8.5	11.2	15.5	18.5	15.9
С-7059 <i>G. arboreum L.</i>	30	14.8	20.4	24.4	20.7	21.2	29.3	34.9	29.6
	40	13.7	18.6	22.5	19.1	19.8	27.8	33.1	28.7
	60	6.2	8.6	10.2	8.6	11.1	15.4	18.6	15.8
<i>Aspergillus niger</i>									
Ташкент-6 <i>G. hirsutum L.</i>	30	8.6	10.1	13.7	9.7	10.6	14.3	19.7	11.3
	40	7.7	9.2	12.8	8.6	9.7	12.5	18.9	12.5
	60	2.5	2.7	3.9	2.7	3.4	3.9	7.1	3.6
Термез-31 <i>G. barbadense L.</i>	30	9.7	13.6	16.3	13.8	14.2	19.6	23.4	19.9
	40	9.0	12.6	15.0	12.9	13.3	18.6	22.2	19.0
	60	4.6	6.3	7.6	6.5	8.4	11.6	13.9	13.0
С-7059 <i>G. arboreum L.</i>	30	8.9	12.1	14.6	12.4	12.7	17.7	20.9	17.9
	40	7.8	10.6	12.8	10.8	12.0	16.6	19.8	16.8
	60	3.6	5.1	6.1	5.2	6.7	9.3	11.1	9.4
НСР ₀₅		0.27	0.34	0.37	0.32	0.27	0.34	0.37	0.32

другими целлюлазными комплексами (*Trichoderma reesei* и *Aspergillus niger*). Это объясняется не содержанием целлюлозы, синтезируемой в процессе роста растений, а уплотнением надмолекулярной структуры от возраста волокон [Муратов Г., 1998], что подтверждается результатами электронно-микроскопических исследований.

Среди изученных целлюлазных комплексов самые высокие выходы ВС при равнозначном возрасте приходится на ФГ хлопковой целлюлозы в присутствии *Trichoderma viride*. Самые минимальные выходы ВС и глюкозы были получены при ФГ хлопковой целлюлозы в присутствии *Aspergillus niger*. Это, по-видимому, связано с активностью целлюлазных ферментов. Аналогичная закономерность была отмечена при ФГ при температурах 40, 50 и 60°C. Максимальные выходы ВС наблюдаются при температуре 50°C во всех изученных вариантах. Дальнейшее увеличение температуры реакции ФГ приводит к уменьшению выходов ВС. Это, по-видимому, связано с понижением активности целлюлаз при высоких температурах. Аналогичные результаты были получены в работе [Kamat et al., 1995], в которой изучалась активность ферментов при различных температурах проведения ФГ. Было установлено, что целлюлазные ферменты начинают терять свою активность при температуре выше 45°C.

Анализируя полученные данные по изучению влияния температуры на ход ФГ разновозрастных волокон хлопчатника, как в атмосферном, так и в СК давлении CO₂, установлено, что для получения высоких выходов ВС и глюкозы оптимальной температурой является проведение реакции при 50°C. Зависимость влияния температуры на выходы ВС хорошо иллюстрируются на гистограммах (рис. 4).

Было подробно изучено влияние продолжительности процесса проведения ФГ хлопковой целлюлозы. Показано, что как в атмосферном, так и в СК состоянии выходы ВС, независимо от возраста волокон, при увеличении продолжительности реакции увеличивается. Так, например, если сравнить волокна сорта Ташкент-6 при 12 часовом гидролизе и давлении 1 атм. выходы ВС для 30-дневного возраста составляет 11.0 мг/мл, а для 40 и 60 дн. возрастов составляют 8.3 и 5.6 мг/мл соответственно. Аналогичная закономерность наблюдается и для волокон, подвергнутых гидролизу при СК давлении, с той разницей, что в данном случае количество выхода ВС несколько выше. Общая зависимость выходов ВС при ФГ волокон сорта Ташкент-6 от продолжительности процесса представлена на рис. 5.

Следующим важным процесс - зависимым фактором при ФГ является СК давление [Gregg et al., 1996, 1998]. Динамику выходов ВС при ФГ разновозрастных волокон видов и сортов хлопчатника в зависимости от СК давления проводили при 1, 100, 120, 140 и 160 атм.

Следует отметить, что ФГ целлюлозы хлопковых волокон в условиях СК давления CO₂ проводится впервые. В таблице 5 приведены некоторые результаты выходов ВС и глюкозы при ФГ целлюлозы разновозрастных

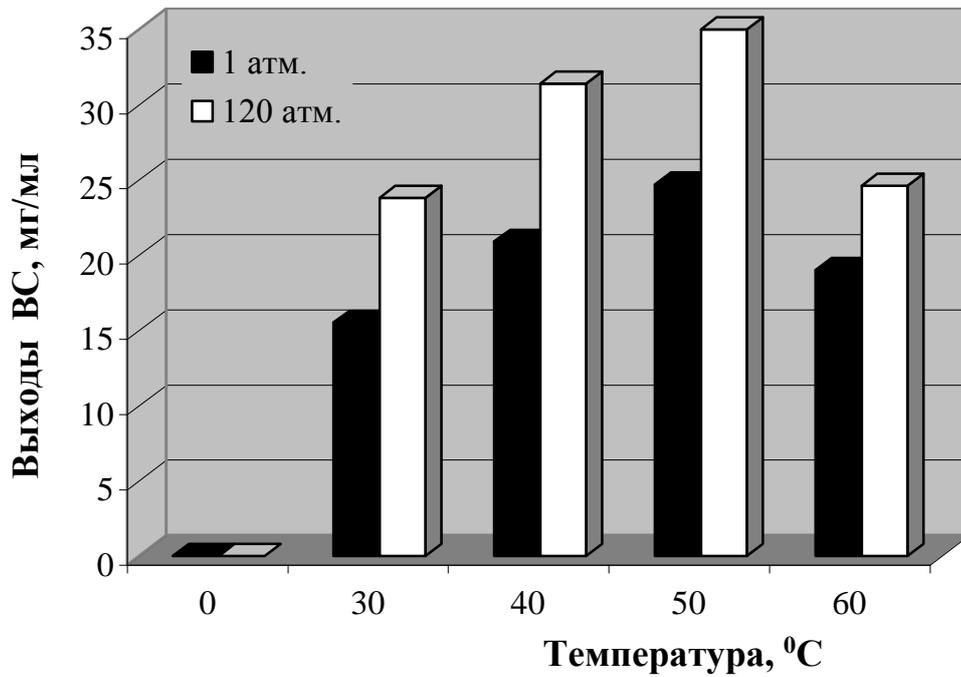


Рис. 4 Влияние температуры на выходы ВС при ФГ целлюлозы 30-дн. хлопковых волокон сорта Ташкент-6 в условиях атмосферного (1 атм.) и в СК CO₂ (120 атм.) давления целлюлазами из *Trichoderma viride* (продолжительность гидролиза 48 часов)

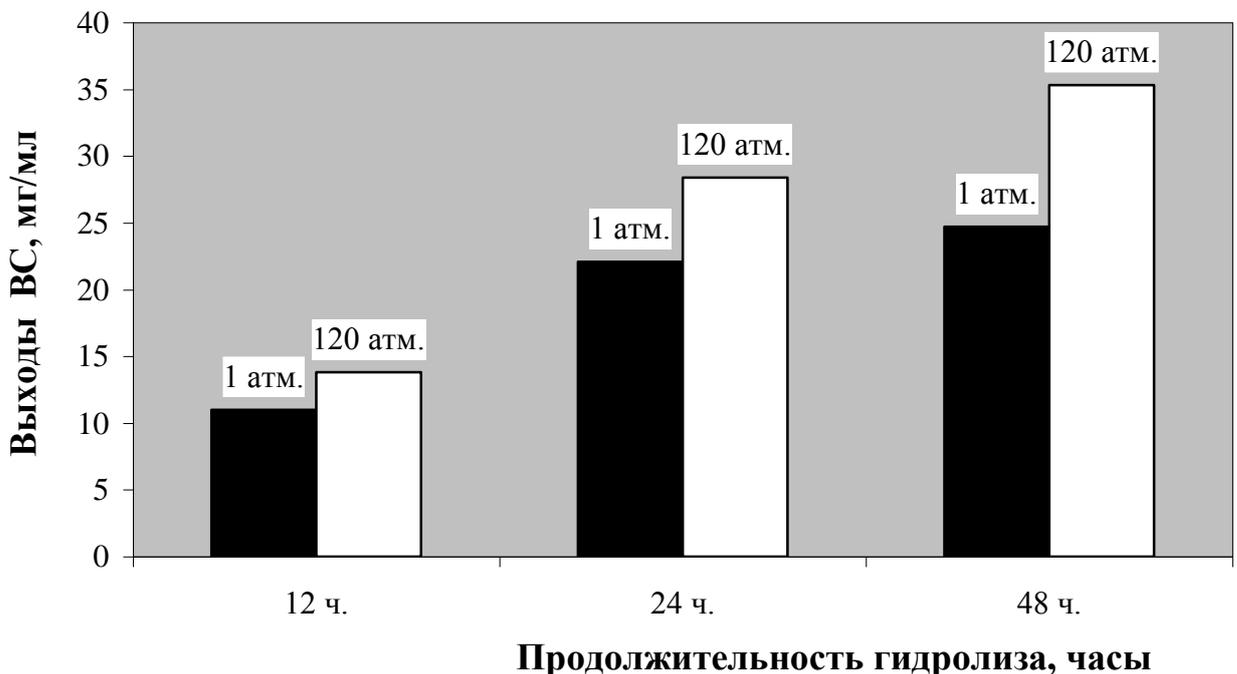


Рис. 5 Выходы ВС при ФГ целлюлозы 30-дн. хлопковых волокон сорта Ташкент-6 в условиях атмосферного (1 атм.) и СК CO₂ (120 атм.) давления целлюлазами из *Trichoderma viride*

волокон сортов и видов хлопчатника при различных СК давлениях CO₂ целлюлазными комплексами различного происхождения. В данном случае в качестве субстрата использовали волокна двух возрастов, различающиеся резко по структуре целлюлозы волокон: 30 дневные (с аморфной структурой)

Таблица 5

**Содержание целлюлозы, выходы ВС и глюкозы при ФГ целлюлозы хлопковых волокон
при различных СК давлениях CO₂ целлюлазными комплексами различного происхождения
(продолжительность гидролиза 48 часов)**

Сорта и виды хлопчатника	Возраст волокна, дни	Содержание целлюлозы, %	<i>Trichoderma viride</i>				<i>Trichoderma reesei</i>				<i>Aspergillus niger</i>			
			100 атм	120 атм	140 атм	160 атм	100 атм	120 атм	140 атм	160 атм	100 атм	120 атм	140 атм	160 атм
В о с с т а н а в л и в а ю щ и е с а х а р а , м г / м л														
Омад <i>G.hirsutum L.</i>	30	73.2	29.4	33.2	28.0	25.7	29.0	29.3	17.9	17.5	16.7	20.0	11.6	10.2
	60	93.1	20.5	21.7	21.0	19.5	18.1	20.4	19.7	17.0	6.9	7.6	7.3	7.1
С-6037 <i>G.barbadense L.</i>	30	70.3	36.1	37.4	36.1	30.5	29.0	34.0	32.1	31.8	19.2	22.7	18.1	16.3
	60	92.6	19.0	21.6	20.8	20.2	16.9	18.0	16.9	14.1	9.6	14.3	12.1	10.4
С-7059 <i>G.arboreum L.</i>	30	75.0	32.7	36.4	32.7	29.4	30.7	34.9	31.4	27.9	18.3	20.9	18.8	18.0
	60	91.7	17.6	19.6	17.0	15.1	16.3	18.6	16.7	16.0	9.7	11.1	9.9	9.5
НСР₀₅			0.47	0.53	0.55	0.61	0.47	0.53	0.55	0.61	0.47	0.53	0.55	0.61
Г л ю к о з а , м г / м л														
Омад <i>G.hirsutum L.</i>	30	73.2	13.2	14.3	9.5	8.3	11.8	12.6	9.0	8.1	7.1	7.1	7.1	6.3
	60	93.1	7.1	7.4	7.3	6.9	6.0	6.8	5.7	5.0	3.1	3.5	3.2	3.3
С-6037 <i>G.barbadense L.</i>	30	70.3	16.5	21.1	18.5	17.7	13.7	19.0	18.5	16.3	8.8	11.0	9.3	9.6
	60	92.6	8.1	8.4	8.9	7.5	8.2	9.0	8.5	8.0	3.7	6.8	6.2	6.2
С-7059 <i>G.arboreum L.</i>	30	75.0	19.2	21.6	20.7	18.6	17.5	19.4	17.0	14.0	10.0	11.6	10.5	8.4
	60	91.7	7.6	8.5	7.6	6.8	7.0	7.8	6.8	6.1	4.0	4.9	4.4	3.9
НСР₀₅			0.34	0.37	0.41	0.44	0.34	0.37	0.41	0.44	0.34	0.37	0.41	0.44

и 60 дневные (с кристаллической структурой). В том и другом случае предварительную обработку не проводили. Установлено, что с повышением давления до 120 атм. выходы ВС и глюкозы повышались, а выше происходило падение этого показателя, как у 30 дн., так и у 60 дн. волокон. Это происходило независимо от скороспелости сортов и от содержания в них целлюлозы. Так, например, если выходы ВС и глюкозы у 30 дн. волокон сорта Омад при давлении 100 атм составили 29.4 и 13.2 мг/мл (*Trichoderma viride*), то у 60 дн. волокон они соответственно имели значения 20.5 и 7.1 мг/мл. При повышении давления до 120 атм. эти значения повышались по выходу ВС у 30 дн. волокон до 33.2 мг/мл, а увеличение давления при ФГ до 160 атм. приводило к понижению выхода ВС до 25.7 мг/мл, против 33.2 мг/мл (120 атм.). Аналогичное наблюдали и по выходу глюкозы. Если выход глюкозы у 30 дн. волокна сорта Омад при давлении 120 атм. имеет значение 14.3 мг/мл, то при давлении 160 атм. выход глюкозы падает до 8.3 мг/мл. Эта закономерность наблюдалась и при использовании целлюлазного комплекса из *Aspergillus niger*. Так, например, если выходы ВС и глюкозы у 30 дн. волокон сорта Омад при давлении 100 атм. составили 16.7 и 7.1 мг/мл, то у 60 дн. волокон эти показатели имели значения 6.9 и 3.1 мг/мл соответственно. Увеличение давления до 120 атм. приводило к повышению выходов ВС и глюкозы у 30 дн. волокон Омад до 20.0 мг/мл (ВС) и 7.1 мг/мл (глюкоза). Поднятие СК давления до 160 атм. приводило к понижению выходов до 10.2 (ВС) и 6.3 мг/мл (глюкоза) волокон данного возраста и сорта. Эта закономерность наблюдалась и для сортов С-6037 и С-7059 хлопчатника. По видимому, поднятие давления до 120 атм. положительно влияет на ход ФГ, увеличивая хороший доступ ферментов к плотным участкам субстрата, т.е. происходит хороший контакт участков поверхности субстрата и поверхности фермента. Из литературы также известно, что в данном случае может образоваться уксусная кислота (продукт частичной деструкции гемицеллюлоз субстрата), которая также может способствовать (катализировать) реакцию деполимеризации при ФГ [Синицын и др., 1988]. Дальнейшее повышение давления приводит к деформации структуры поверхности ферментного комплекса, а также уменьшает активность фермента. Аналогичное явление было отмечено и в работе Марти [Marty et al, 1990]. На основании полученных результатов установлено, что максимальный выход ВС и глюкозы при ФГ разновозрастных волокон хлопчатника при использовании целлюлазного препарата из *Aspergillus niger* наблюдался при СК давлении 120 атм. Влияние СК давления на выходы ВС при ФГ представлено на гистограмме (рис. 6).

При сравнительном изучении различных целлюлазных ферментов было установлено, что максимальные выходы по ВС и глюкозе были получены при ФГ 30 дн. волокон сортов и видов хлопчатника использованием целлюлазного препарата из *Trichoderma viride* при СК давлении 120 атм.

В целом при ФГ разновозрастных волокон сортов и видов хлопчатника в оптимальных условиях (СК давление CO_2 120 атм., температура 50°C)

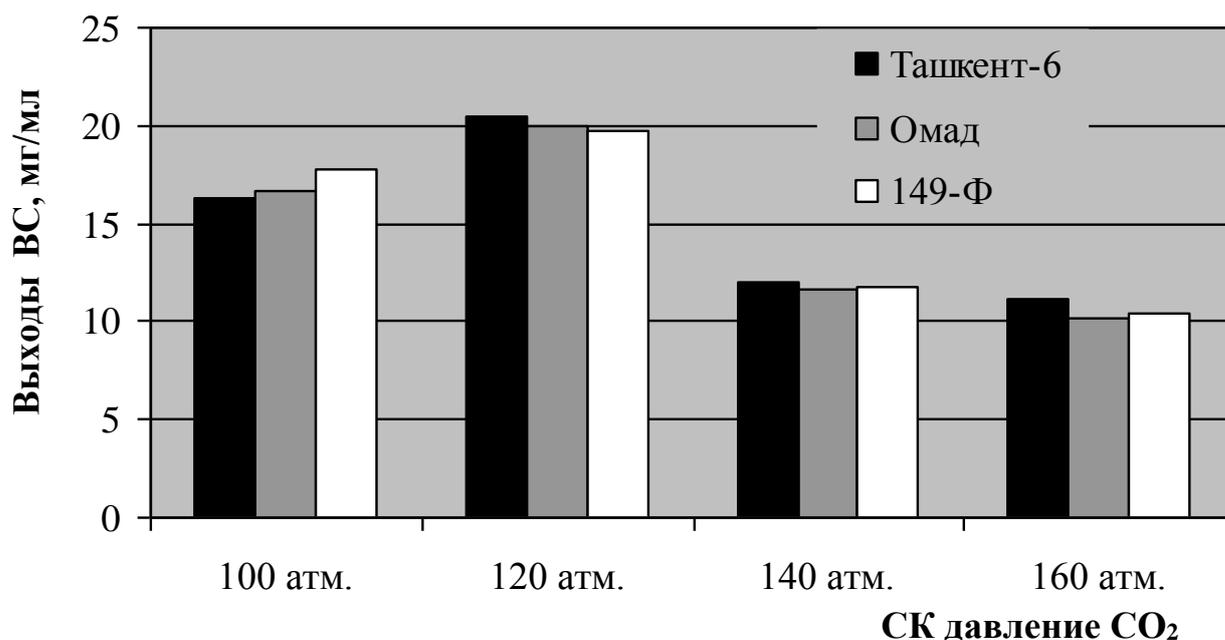


Рис. 6 Выходы ВС при ФГ целлюлозы 30-дн. хлопковых волокон сортов вида *G. hirsutum L.* при различных давлениях в СК CO₂ целлюлазами из *Aspergillus niger*

целлюлазами различного происхождения в зависимости от продолжительности реакции гидролиза установлена одинаковая закономерность. Существенное различие наблюдается лишь в количественных соотношениях выходов продуктов гидролиза. Самые большие выходы ВС и глюкозы отмечались при ФГ целлюлазами из *Trichoderma viride*, а самые низкие – из *Aspergillus niger*.

Таким образом, в результате исследований были определены оптимальные условия проведения эксперимента: давление 120 атм, температура 45-50°C и продолжительность реакции 48 часов. Высокие выходы ВС и глюкозы получены под действием целлюлазных ферментов из *Trichoderma viride*, а самый лучший субстрат - 30-40-дневные хлопковые волокна изученных сортов и видов хлопчатника. Общие выходы ВС и глюкозы при ФГ в условиях СК CO₂ в 1.2 -1.4 раза были выше, чем при атмосферном давлении.

Глава 5. Биоконверсия целлюлозы разновозрастных волокон хлопчатника в этанол

В данной главе диссертационной работы приводится анализ результатов исследований по одновременному осахариванию и ферментации хлопковой целлюлозы разновозрастных волокон 5 сортов, относящихся к 3 видам хлопчатника. Важность и актуальность получения биоэтанола из целлюлозосодержащих отходов с использованием биотехнологических методов подробно обоснованы и описаны в обзоре литературы (глава 1.7). Следует отметить, что в настоящее время технология получения этанола в развитых странах мира является хорошо отработанной и базируется на двух принципиально разных процессах. Этанол может быть получен химическим

путём высокотемпературной каталитической гидратацией этилена, получаемого из нефти и газа. Второй путь – биотехнологический, когда этанол получают как продукт ферментации сахарозы или крахмала с помощью микроорганизмов.

Обычный этанол и "топливный биоэтанол" являются одинаковым продуктом, произведенным с использованием различного сырья и технологических процессов. Получение обычного этанола ведут из крахмала, содержащегося в зерновых культурах (типа кукурузы, пшеницы или сои). "Топливный биоэтанол" может быть произведен из широкого разнообразия целлюлозосодержащего сырья, включая сельскохозяйственные отходы (стеблей зерна, соломы хлебных злаков, выжимок сахарного тростника, опилок, бумажной целлюлозы и т.д.).

Как и при переработке зернового сырья, процесс гидролиза, при получении спирта из целлюлозы, необходим для выделения из биомассы простых сахаров, пригодных для сбраживания. Как известно, целлюлоза и гемицеллюлоза представляют собой сложные углеводные цепочки, называемые полисахаридами (длинные цепи простых сахаров). Эффективное разделение этих сложных полимерных структур на простые сахара, необходимые для получения спирта, является основой технологии производства этанола из целлюлозы.

Среди многочисленных методов производства спирта из целлюлозы можно выделить два основных варианта переработки, позволяющих получить пригодные для брожения в простые сахара: а) кислотный гидролиз - использует химический гидролиз целлюлозной биомассы с помощью различных кислот; б) ферментативный гидролиз - метод подразумевает предварительную предобработку биомассы паром, позволяющей подготовить целлюлозную структуру к ферментативному гидролизу.

Процесс получения этанола путём ФГ осуществляется в 2 стадии: первая – проведение самого процесса ферментативного гидролиза и вторая стадия – брожения. В последние годы широко проводятся исследования по модификации процессов ферментации, т.е. осуществление прямой конверсии целлюлозы в этанол. Один из путей модификации процесса ферментации состоит в одновременном проведении осахаривания и ферментации биомассы. При использовании ФГ целлюлозосодержащих материалов для получения сахаров, одновременное сбраживание позволяет устранить ингибирование целлюлолитических ферментов избытком сахаров (ингибирование ферментов этанолом сказывается в меньшей степени, чем ингибирование сахарами). Отсутствие ингибирующего эффекта, в свою очередь, даёт возможность использовать меньшие количества ферментов для осуществления гидролиза.

В своих исследованиях мы также провели НИР по изучению закономерностей получения биоэтанола из хлопковой целлюлозы волокон хлопчатника различной зрелости и видового происхождения, некоторые результаты которых будут представлены и обсуждены ниже. Следует отметить, что исследования были проведены в лаборатории

«Суперкритические флюиды» факультета «Биохимическая инженерия и биотехнология» университета Аджоу (Южная Корея).

Для ферментативного осахаривания хлопковой целлюлозы в нашей работе, с целью определения эффективности ферментов при биоконверсии, мы использовали целлюлазные комплексы различного происхождения из *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* и *Aspergillus niger*.

На примере биоконверсии хлопковой целлюлозы волокон сорта Омад изучали закономерности динамики выходов этанола (мг/мл) при ФГ целлюлазами из *Trichoderma reesei* и дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от продолжительности гидролиза.

Анализ полученных результатов показал, что с увеличением продолжительности реакции выходы этанола и степень превращения целлюлозы увеличиваются. Следует здесь отметить, что при изучении кинетики ФГ хлопковой целлюлозы в зависимости от времени реакции нами было установлено, что максимальные выходы ВС и глюкозы соответствовали 48 часам. Дальнейшее увеличение времени гидролиза не приводило к увеличению выходов ВС и глюкозы. В данном случае, реакцию проводили до 36 часов, т.к. выходы этанола, независимо от происхождения целлюлазных ферментов, увеличиваются до 24 часов и незначительно до 30 часов. Дальнейшее проведение реакции приводило к существенному уменьшению выходов этанола. Пробы на анализ выходов этанола брали через каждые 6 часов и темпы выходов этанола во всем периоде проведения гидролиза были различными. Установлено, что выделение этанола начинается уже после 2 часового гидролиза. При гидролизе волокон сорта Омад (независимо от происхождения целлюлаз) для 30 дневных волокон при 2-х часовом гидролизе выделяется этанол: 3.0 мг/мл (*Trichoderma viride*); 3.7 мг/мл (*Trichoderma reesei*) и 1.2 мг/мл (*Aspergillus niger*), а степень конверсии соответственно составляет 4.1; 5.5 и 1.6 %. Аналогичная закономерность обнаружена и для 40 дневных волокон: 3.2 мг/мл (*Trichoderma viride*); 3.5 мг/мл (*Trichoderma reesei*) и 1.2 мг/мл (*Aspergillus niger*) при степени конверсии целлюлозы 3.7; 4.2 и 1.4%. При дальнейшем увеличении времени гидролиза до 24 часов наблюдается резкое повышение, как выхода этанола, так и степени конверсии целлюлозы. Прибавка составляет примерно 1.3-4.3 мг/мл. При 30 часовом гидролизе также повышается выход этанола, но прибавка составляет примерно 0.1-0.3 мг/мл. Дальнейшее увеличение времени реакции приводит к уменьшению выхода этанола от 1.2 до 2.8 мг/мл в зависимости от использования различных целлюлазных ферментов и возраста волокон. Вышеописанная закономерность хорошо проиллюстрирована на гистограммах (рис. 7).

Если говорить о завершении реакции одновременного осахаривания и ферментации (ОФФ) за несколько короткий срок по сравнению с ФГ целлюлозы волокон без дрожжей можно отметить следующее. В реакционной камере кроме фермента и субстрата присутствуют жизнеспособные клетки (дрожжи), ферментирующие продукты гидролиза в спирт. Они должны иметь способность развиваться в условиях среды

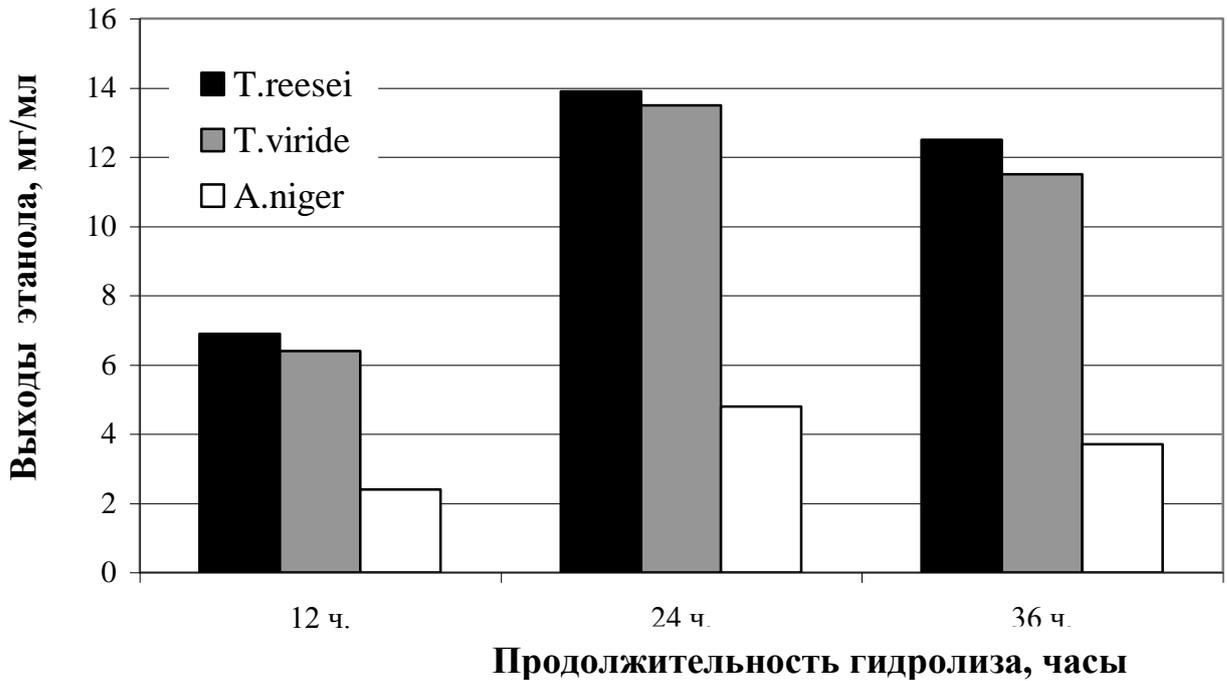


Рис. 7 Выходы этанола при ООФ целлюлозы 30-дн. хлопковых волокон сорта Омад целлюлазами различного происхождения и *Saccharomyces cerevisiae*

проведения процесса ФГ. Т.е. в реакционной камере происходит 2 процесса, первый – ферменты, обладающие целлюлолитической активностью, второй – микроорганизмы, обладающие способностью сбраживать моно- или олигосахариды. В начале гидролиза образующиеся продукты первого процесса (глюкоза и ВС) немедленно перерабатываются дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, продуцирующими этанол. Следовательно, уже в начале гидролиза (через 2 часа) образуется этанол. Причём, чем больше продолжительность процесса, тем больше и выходы этанола. Однако, если без добавления дрожжей, образующиеся в результате ФГ глюкоза (высокие концентрации) ингибируют процесс ФГ, то данный способ обладает несомненным преимуществом: продукты гидролиза целлюлозы немедленно перерабатываются микроорганизмом, продуцирующим этанол. Следовательно, они не ингибируют активность целлюлолитических ферментов. Так как основной продукт брожения – этанол – является токсичным для дрожжей, то реакция прекращается уже через 24 часа, а не через 48 часов, как при выделении глюкозы и ВС без дрожжей. Отвод продуктов способствует протеканию процесса.

Максимальные выходы этанола и высокие степени конверсии были получены при ФГ целлюлозы 30 дн. волокон сорта Омад целлюлазами из *Trichoderma reesei* за 24 часа гидролиза. Это подтверждается также результатами исследований других учёных. В работе [Клёсов, 1987] отмечается, что при использовании целлюлаз из *Trichoderma reesei* с активностью по фильтровальной бумаге 2-5 ед/мл и предварительно обработанного субстрата в концентрации 5-25% по массе становится возможным осуществление прямой ферментации сахаров в этанол. Также отмечается, что мутантные штаммы *Trichoderma reesei* являются:

эффективными продуцентами разнообразных ферментов, включая целлюлазы и ксиланазы; содержание внеклеточных ферментов исключительно высоко и целлюлаза из них уже промышленно вырабатывается во многих странах мира для этих целей (США, Россия, Япония, Дания и др).

При выявлении зависимости выходов биоэтанола от возраста волокон основное внимание уделили волокнам хлопчатника вида *G. barbadense L.*, т.к. согласно результатам, описанным в предыдущих главах, высокие выходы глюкозы и ВС при ФГ разновозрастных волокон хлопчатника соответствовали именно волокнам вида *G. barbadense L.*

Зависимость выходов этанола при ФГ от возраста волокон наблюдается и сохраняется во всём периоде проведения процесса ФГ, т.е. с увеличением возраста волокон выходы этанола уменьшаются. Это явление было обнаружено уже в начале проведения реакции ФГ. Так, при 2 часовом гидролизе, если при ФГ 30 дн. волокон сорта Термез-31 выход этанола составляет 4.2 мг/мл, то при ФГ волокон 40 и 60 дн. возрастов выходы этанола соответственно составляют 4.0 и 2.7 мг/мл. Аналогичное можно отметить и для позднееспелого сорта Ашхабад-25, но, естественно, с меньшим выходом этанола учитывая содержание целлюлозы в волокнах. Так, если при ФГ 30 дн. волокна сорта Ашхабад-25 выход этанола составляет 3.5 мг/мл, то при ФГ волокон 40 и 60 дн. возраста выходы этанола имеют значения 3.3 и 1.3 мг/мл соответственно. Этому, по-видимому, способствует постепенная кристаллизация целлюлозы волокна в процессе роста и развития. Наблюдаемая закономерность в основном сохраняется во всём периоде процесса. Однако, количественные соотношения выходов этанола из 30 и 40 дн. волокон несколько меняются. Т.е. начиная с 6 часового гидролиза в абсолютном большинстве случаев выходы этанола из 30 дневных волокон немного меньше, чем из 40 дн. волокон. Предельно максимальные значения выходов этанола наблюдаются на 30 часовой период гидролиза. Однако, между выходами этанола при ФГ и продолжительностью реакции 24 и 30 ч. существенной разницы в практическом отношении не обнаружено.

Зависимость степени конверсии хлопковой целлюлозы волокон сортов хлопчатника вида *G. barbadense L.* от возраста хорошо проиллюстрирована на гистограммах, представленных на рис. 8.

В последние годы в УзНИИССХ проводятся научно-исследовательские работы по выращиванию хлопчатника в полях как второй культуры после зерновых. Несмотря на то, что при данном способе выращивания высевают в основном скороспелые сорта, всё же увеличиваются числа нераскрывшихся коробочек. Учитывая вышеизложенное в наших экспериментах мы, наряду с позднеспелыми сортами, использовали довольно новые скороспелые сорта Омад (вид *G. hirsutum L.*) и Термез-31 (вид *G. barbadense L.*). Для сравнения и определения закономерностей биоконверсии хлопковой целлюлозы в этанол в видовом разрезе изучали и сорт С-7059 (вид *G. arboreum L.*). Некоторые данные по выходам в этанол при ФГ хлопковой целлюлозы разновозрастных

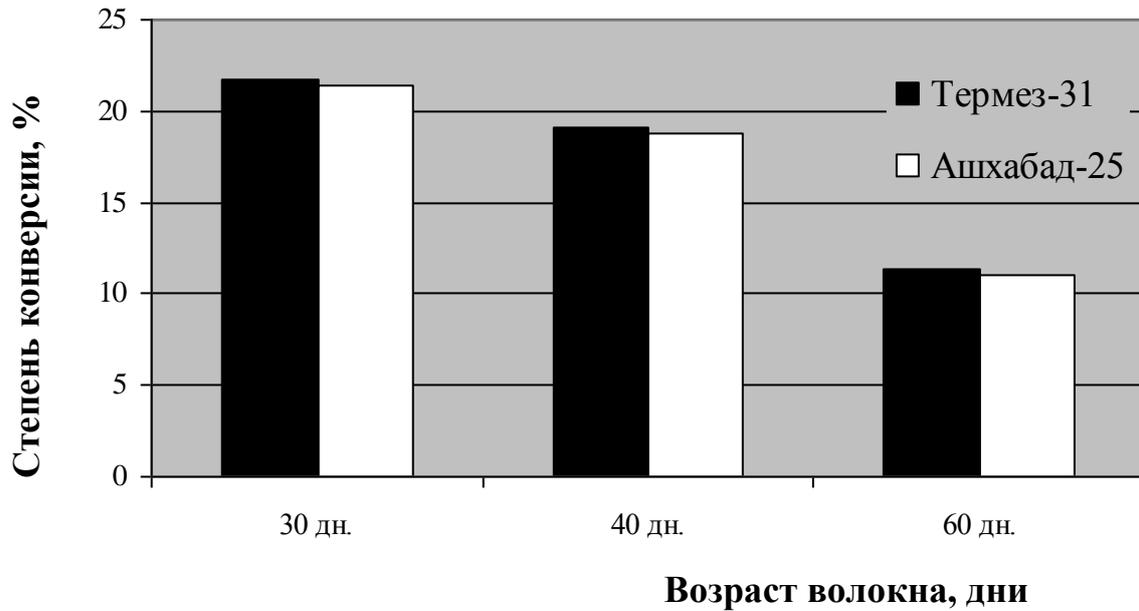


Рис. 8 Степень конверсии целлюлозы хлопковых волокон сортов Термез-31 и Ашхабад-25 целлюлазами из *Trichoderma reesei* и *Saccharomyces cerevisiae*

волокон сортов и видов хлопчатника целлюлазами из *Trichoderma reesei* и дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* приведены в таблице 6. Следует отметить, что условия проведения (время гидролиза, температура и давление) были одинаковы. Из таблицы видно, что у всех изученных 30-дневных волокон содержание целлюлозы ниже, чем у 40 дневных. Но выходы этанола практически были одинаковыми для каждого индивидуального сорта. При взаимном межсортном сравнении наблюдаются определённые отличия в количестве выходов этанола и в степени конверсии хлопковой целлюлозы. Так, например, если для 30 и 40 дневных волокон сорта Омад выходы этанола составляли 13.9 и 14.0 мг/мл, то для волокон Термез-31 (при данных возрастах) имели значения 15.9 и 16.0 мг/мл соответственно. Или же, если для сорта 149-Ф выходы этанола при данных возрастах составляли 14.7 и 14.8 мг/мл, то для волокон Ашхабад-25 имели значения 15.5 и 16.2 мг/мл. Аналогичное можно сказать относительно степени конверсии хлопковой целлюлозы в этанол. Так, например, если степень конверсии для 30 и 40 дн. волокон составляли 18.9 и 16.6% (сорт Омад) и 19.5 и 16.5 % (сорт 149-Ф), то для волокон вида *G. barbadense* L. имели значения 21.4 и 19.1 (сорт Термез-31) и 21.7 и 18.8 % (сорт Ашхабад-25). Выходы этанола и степень конверсии хлопковой целлюлозы волокон вида *G. arboreum* L. в количественном отношении приближаются к волокнам вида *G. hirsutum* L. Отсюда следует, что волокна видов *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L. и *G. arboreum* L., имея одинаковый характер расщепления при ФГ, различаются в степени конверсии в этанол. Причём, показано, что, несмотря на различный темп накопления целлюлозы в волокнах сортов Омад (73.2 и 84.3%) и С-7059 (75.0 и 87.0%), выходы этанола при биоконверсии их целлюлозы практически одинаковы. Некоторое различие в степени конверсии объясняется различной структурой самих волокон.

Таким образом, используя хлопковую целлюлозу 30 и 40 дн. волокон хлопчатника в качестве субстрата, целлюлаз из *Trichoderma reesei* в качестве фермента и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* путём ООФ впервые достигнута высокая степень конверсии хлопковой целлюлозы в биоэтанол, что по выходу составляет 21.7% или 30.4% от теоретического.

Таблица 6

Динамика выходов этанола при ООФ целлюлозы хлопковых волокон сортов и видов хлопчатника целлюлазами из *Trichoderma reesei* и дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*

Сорта хлопчатника	Возраст волокна, дни	Содержание целлюлозы, %	Выход этанола, мг/мл	Степень конверсии, %	% от теоретич
<i>G. hirsutum L.</i>					
Омад	30	73.2	13.9	18.9	25.8
	40	84.3	14.0	16.6	19.6
149-Ф	30	75.3	14.7	19.5	25.8
	40	89.2	14.8	16.5	18.4
<i>G. barbadense L.</i>					
Термез-31	30	74.1	15.9	21.4	28.8
	40	83.5	16.0	19.1	22.8
Ашхабад-25	30	71.3	15.5	21.7	30.4
	40	86.0	16.2	18.8	21.9
<i>G. arboreum L.</i>					
С-7059	30	75.0	13.3	17.7	23.6
	40	87.0	14.0	16.0	18.4

Разработанные теоретические положения и новые результаты, полученные на основе биоконверсии хлопковой целлюлозы, могут быть в перспективе внедрены в практику для переработки целлюлозосодержащих отходов промышленности и сельского хозяйства с целью получения глюкозы, ВС, биоэтанола и др. полезных низкомолекулярных продуктов. В связи с этим нами предлагается принципиальная технологическая схема (рис. 9) получения глюкозы и биоэтанола. Она состоит из двух частей. В первой представлена схема получения глюкозы от сбора до её рафинирования, включая измельчение сырья и ФГ (рис. 9 А). ФГ может быть осуществлён как в атмосферном, так и в условиях СК СО₂ давления. Оптимальные условия, рекомендуемые для технологии проведения процесса ФГ, подробно описаны и приведены в работе. Совместное использование обеих частей схемы отражают получение биоэтанола (рис. 9 АБ).

Предлагаемая схема позволяет повысить эффективность биоконверсии целлюлозосодержащих отходов и проведения процесса ФГ, т.к. она исключает стадию предварительной обработки сырья (субстратов) перед проведением ФГ из существующей методики процесса гидролиза. Это

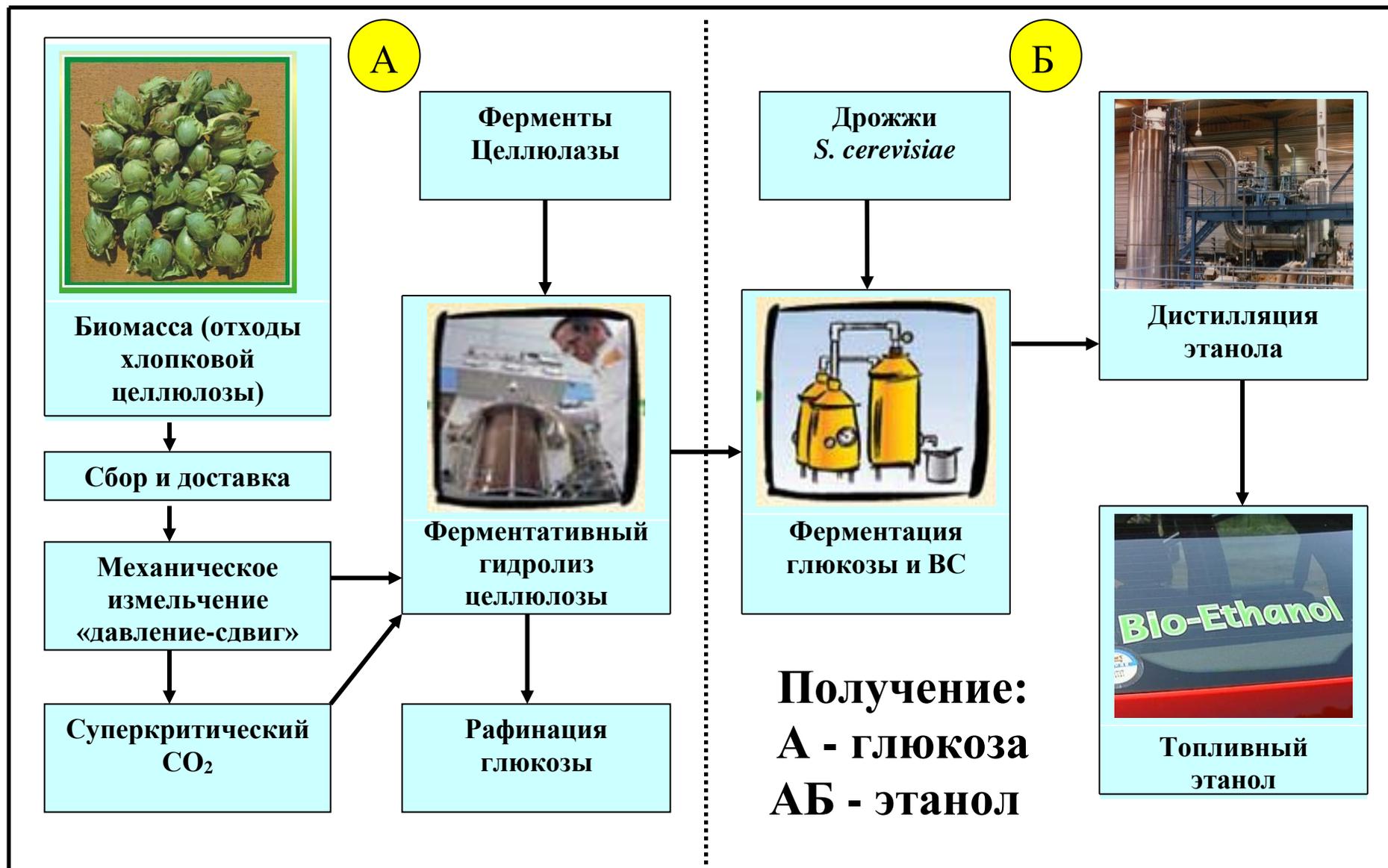


Рис. 9 Принципиальная схема получения глюкозы и биоэтанола из отходов хлопковой целлюлозы

позволяет существенно сократить объём затрат на процесс проведения ФГ. Данная технологическая схема процесса ФГ может быть использована не только для отходов хлопковой целлюлозы, но и других отходов целлюлозосодержащей биомассы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель и задачи, поставленные в диссертационной работе, решены полностью. Впервые выполнен системный анализ особенностей проведения ферментативной конверсии целлюлозы разновозрастных волокон трёх видов восьми сортов и двух внутривидовых гибридов хлопчатника. Подробно изучены и проанализированы влияние таких факторов, как: скороспелость сортов, возраст и местоположение волокон (коробочек) на кусте; продолжительность реакции гидролиза; влияние температуры; давления, а также различных целлюлазных ферментных комплексов и др. Установлены общие и отличительные особенности закономерности процессов ФГ от видового происхождения хлопковой целлюлозы. Показано, что на гидролизуюемость и степень превращения хлопковой целлюлозы в ВС и глюкозу большое влияние оказывает место формирования волокна на плодовых ветвях растения. В работе представлены абсолютные количественные показатели выходов ВС и глюкозы, а также степени конверсии при ФГ хлопковой целлюлозы разновозрастных волокон, собранных из различных плодовых ветвей. Подтверждено, что эффективность ФГ целлюлозы и целлюлозосодержащих материалов в значительной степени зависит от уровня кристалличности целлюлозных субстратов. Учитывая это, в работе впервые проведено последовательное световое и электронно-микроскопическое изучение структурных организаций, выделенных из гидролизатов после ФГ хлопковой целлюлозы разновозрастных волокон сортов и видов хлопчатника. На основе этих исследований впервые предложен механизм расщепления волокон хлопчатника на надмолекулярном уровне при ФГ. В работе впервые использована новая методика проведения процесса ФГ целлюлозы волокон различных сортов и видов хлопчатника в условиях СК CO₂ и обсуждаются результаты эффективности её действия на выходы продуктов гидролиза. Новая методика проведения исследований процесса ФГ целлюлозы была разработана автором в лаборатории «Суперкритические флюиды» кафедры «Биохимической инженерии и биотехнологии» университета Аджоу (Южная Корея). При использовании новой методики, во всех вариантах экспериментов, общие выходы ВС и глюкозы в 1.2 -1.4 раза были выше, чем в обычных условиях. Разработанные теоретические положения и новые результаты, полученные на основе ферментативной и биоконверсии хлопковой целлюлозы, могут быть в перспективе внедрены в практику для переработки целлюлозосодержащих отходов промышленности и сельского хозяйства с целью получения глюкозы, ВС, биоэтанола и др. полезных низкомолекулярных продуктов. В связи с этим в работе предлагается принципиальная технологическая схема получения глюкозы и биоэтанола,

которая позволит повысить эффективность проведения процессов ферментативной и биоконверсии целлюлозосодержащих отходов, исключением стадии предварительной обработки сырья (субстратов) перед проведением ФГ из общепринятой методики процесса гидролиза. Результаты экспериментальных исследований работы представляют практический интерес также в плане разработки и создания устройств-реакторов для проведения процесса ФГ целлюлозосодержащего сырья. Другим важным в практическом отношении достоинством работы является то, что в качестве возможного нового источника целлюлозы, для последующего превращения в полезные низкомолекулярные продукты, впервые предложены незрелые волокна хлопчатника осенне-зимнего сбора. Они, имея в своем составе 70-85 % целлюлозы, в значительных количествах остаются переработанными. Учитывая аморфную структуру их целлюлозы, они могут быть подвергнуты ФГ с высокой степенью конверсии, без предварительной декристаллизации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведены сравнительные исследования условий, режимов, стадий проведения процесса ферментативной конверсии целлюлозы разновозрастных хлопковых волокон 3 видов (*G. hirsutum L.*, *G. barbadense L.* и *G. arboreum L.*), 8 сортов, 2 внутривидовых гибридов в атмосферном, суперкритическом CO₂ давлениях и определено влияние субстрат-, фермент- и процесс-зависимых факторов.

2. Разработана и показана эффективность принципиально новой методики проведения процесса ФГ целлюлозы хлопкового волокна в условиях СК CO₂. Показано, что использование данного метода приводит к повышению в среднем от 20 до 40% выхода продуктов гидролиза по сравнению с атмосферными условиями для всех изученных волокон и этому явлению дано объяснение.

3. Установлена роль кристаллизации целлюлозы в процессе формирования хлопкового волокна, а также прямая корреляционная зависимость между степенью кристалличности и эффективностью ферментативной конверсии. Выявлено, что выходы низкомолекулярных веществ при ФГ целлюлозы хлопкового волокна в возрасте 30-40 дней больше, чем в ранние периоды роста и периоды созревания хлопчатника, что обусловлено различными этапами кристаллизации целлюлозы в процессе роста и созревания волокон.

4. На основе привлечения методов световой и электронной микроскопии выявлены механизм и характер расщепления целлюлозы хлопковых волокон при ФГ на надмолекулярном уровне. Установлено, что формы и размеры расщеплённых кристаллических частиц при ФГ, для целлюлозы волокон раннего возраста - до 20 дней (*G. hirsutum L.*, *G. arboreum L.*) и 25 дней (*G. barbadense L.*) идентичны. Главные различия в указанных параметрах происходят начиная с 25 дневного возраста, независимо от видового и сортового разнообразия образцов.

5. Исследовано и научно обосновано влияние скороспелости и местоположения хлопковых волокон на ферментативную гидролизуемость. Показано, что выходы продуктов гидролиза выше у позднеспелых сортов, чем у скороспелых, а у гибридов F₁ (=среднеспелых) они превышают значения как скоро-, так и позднеспелых сортов. Найдено, что у волокон верхних плодовых ветвей выходы низкомолекулярных продуктов, а также степени их конверсии при ФГ в 1.5-1.7 раза выше, чем у волокон нижних плодовых ветвей. Это объясняется различиями процессов биосинтеза целлюлозы и такие закономерности характерны для всех изученных образцов.

6. Установлено, что целлюлоза хлопковых волокон видов *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. и их внутривидовые гибриды, имея одинаковый характер расщепления при ФГ, различаются в выходах и степени конверсии целлюлозы. Показано, что волокна вида *G. barbadense* L. в 1.5-2 раза легче подвергаются гидролизу, чем из видов *G. hirsutum* L. и *G. arboreum* L. При этом условные «пики-максимумы» и «пики-минимумы» выходов ВС и глюкозы у вида *G. barbadense* L. проявляются на 5 дней позже, чем у других видов.

7. Определены оптимальные условия проведения ФГ и степени конверсии хлопковой целлюлозы, без предварительной обработки, в атмосферных (а) и в условиях СК давления СО₂ (б): а) возраст волокон 30-40 дней, смесь ферментов целловиридина и пектофоетидина, температура 40-50⁰С, время гидролиза 48 часов; б) возраст волокон 30-40 дней, целлюлаза из *Trichoderma viride*, давление 120 атм., температура 45-50⁰С, продолжительность гидролиза 36-48 часов. В указанных условиях достигнута максимальная степень конверсии.

8. Впервые осуществлён процесс одновременного осахаривания и ферментации целлюлозы хлопковых волокон в виде одностадийного процесса. Показано, что он по сравнению с двустадийным процессом имеет преимущество в снижении общего времени гидролиза. Используя целлюлозу 30-40 дн. волокон хлопчатника в качестве субстрата, целлюлаз из *Trichoderma reesei* в качестве фермента и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* путём ООФ, достигнута степень конверсии в биоэтанол 21.7% или 30.4% от теоретического.

9. Целлюлоза незрелых хлопковых коробочек - «курак» (30-40 дн. возраста), которая в осенне-зимний период практически остаётся в виде отходов на полях республики, рекомендуется в качестве дешёвого, многотоннажного и потенциального сырья (субстрата) для ферментативной конверсии. Разработана технологическая схема получения глюкозы и биоэтанола из «курака», которая исключает стадию предварительной обработки сырья из общепринятой методики процесса ФГ. Необходимые технические условия проведения процесса переданы технологам (НПП «Тегирмон») для разработки соответствующей опытно-промышленной установки.

Список опубликованных работ:**Монография:**

1. Муратов Г.А. Ферментативная конверсия хлопковой целлюлозы. Ташкент: ООО «Мехридарё», 2007. - 206 с. (13 п. л.).

Статьи, опубликованные в научных журналах и сборниках:

2. Муратов Г.А., Юлдашев Б. Т., Рахимов М. М. Ферментативный гидролиз хлопковых волокон сортов и гибрида вида *G.hirsutum L.* // Узб. биол. ж. - Ташкент, 1997.- № 4.- С.45-48.

3. Муратов Г.А., Рахимов М. М. Сравнительная ферментативная гидролизуемость волокон хлопчатника видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* // Узб. биол. ж. - Ташкент, 1998.- №4.- С.45-47.

4. Муратов Г.А., Рахимов М. М., Юлдашев Б. Т., Муратов А.М. Влияние кристаллитов целлюлозы на деградацию разновозрастных волокон хлопчатника при их ферментативном гидролизе // Доклады АН РУз. - Ташкент, 1998.- №4.- С.37-40.

5. Муратов Г.А., Рахимов М. М., Юлдашев Б. Т. Ферментативный гидролиз хлопковых волокон. // Прикладная биохимия и микробиология. - Москва, 1998.- № 34 (5).- С.525-528(рус), - С.477-479(eng).

6. Gayrat Muratov and Chul Kim. Enzymatic hydrolysis of cotton fibers in supercritical CO₂ // Biotechnology and Bioprocess Engineering. - Seoul (South Korea), 2002.- Vol.7.- №2.- P. 85-88.

7. Muratov G., Kim C. Producing of sugars by biodegradation of cotton fibers in supercritical CO₂ // Coll. articles: Second Regional Conference on Energy Technology towards a Clean Environment. - Phuket (Thailand), 2003.- Vol.1.- P.304-308.

8. Муратов Г.А. Чиқиндидан маҳсулот ёки глюкоза ва қанд моддалари олишда янги хомашё хусусида //Ж. Ўзбекистон қишлоқ хўжалиги. - Тошкент, 2007.- №3.- 19 б.

9. Муратов Г.А. Пахта чиқиндисидан шакар // Ж. Ўзбекистон қишлоқ хўжалиги. - Тошкент, 2007.- №9.- 18 б.

10. Муратов Г.А. Ферментативное расщепление незрелых волокон сортов хлопчатника вида *G. hirsutum L.* // Ж. Вестник Аграрной Науки Узбекистана. - Ташкент, 2007.- №1-2(27-28).- С.73-75.

11. Муратов Г.А. Биодegradация целлюлозы разновозрастных волокон тонковолокнистых сортов хлопчатника вида *G. barbadense L.* // Узб. биол. ж. - Ташкент, 2007.- №4.- С.26-29.

12. Муратов Г.А., Ким Ч. Эффект суперкритического давления CO₂ на биоконверсию волокон сортов различных видов хлопчатника // Узб. биол. ж. - Ташкент, 2007.- №4.- С.31-35.

13. Муратов Г.А. Биоконверсия незрелых хлопковых волокон сортов вида *G. hirsutum* L., собранных из различных симподиальных ветвей // Доклады АН РУз. - Ташкент, 2007.- №5.- С.79-81.

14. Муратов Г.А. Целлюлозосодержащие отходы хлопководства Узбекистана как перспективное сырьё для получения биоэтанола //Ж. Агро илм. - Ташкент, 2007.- №2. - С.8.

15. Муратов Г.А. Незрелые зеленые коробочки хлопчатника // Ж. Ўзбекистон қишлоқ ҳўжалиги. - Ташкент, 2007.- №11.- С.18.

16. Муратов Г.А. Биоконверсия хлопковой целлюлозы до глюкозы под действием суперкритического давления CO_2 // Химия природных соединений. - Ташкент, 2007.- №5.- С.529-530.

17. Муратов Г.А., Рахимов М. М., Муратов А.М. Электронно-микроскопические исследования гидролизатов волокон сортов хлопчатника вида *G. barbadense* L. // Ж. Вестник НУУЗ. - Ташкент, 2007.- №4.- С.143-145.

18. Рахимов М. М., Муратов Г.А. Обзор современного состояния проблемы получения биоэтанола в мире и перспективы этого направления в республике Узбекистан // Ж. Вестник Аграрной Науки Узбекистана. - Ташкент, 2007.- №1-2(27-28).- С.107-110.

19. Муратов Г.А. Ферментативная конверсия хлопковой целлюлозы в глюкозу и сахаристые вещества // Узб. биол. ж.- Ташкент, 2008.- №3.- С.31-33.

20. Муратов Г.А. Биоконверсия хлопковой целлюлозы в этанол // Доклады АН РУз. - Ташкент, 2008.- №3.- С.72-74.

21. Muratov G.A., Kim C. Utilization of Supercritical Fluids in Enzymatic Conversion of Cotton Biomass // Research Progress in Biotechnology. - New York, 2008. Nova Biomedical Books. – P. 35-40.

22. Муратов Г.А. Сравнительная оценка влияния атмосферного и суперкритического давления CO_2 на биodeградацию целлюлозы волокон хлопчатника // Ғўза, беда селекцияси ва уруғчилиги илмий ишлар тўплами - Ташкент, 2009.- №28.- С.145-150.

Тезисы научных докладов:

23. Муратов Г.А., Юлдашев Б.Т., Рахимов М.М. Ферментативный гидролиз волокон сортов и гибрида хлопчатника в период их развития // Тез. докл. 3 конф. биохимиков Узбекистана. - Ташкент, 1996.- С.135.

24. Муратов Г.А., Юлдашев Б.Т., Рахимов М.М. Сравнительное микроскопическое изучение механизма процессов кислотного и ферментативного гидролиза хлопкового волокна // Амир Темурнинг 660 йиллигига бағишланган Ёш олимлар ва талаб. II-Респ. Илмий конф. тезислари туплами. - Тошкент, 1996.- С.35.

25. Муратов Г.А., Юлдашев Б.Т. Хар хил навли ва дурагай пахта толаларини ўсиш даврида ферментлар ёрдамида парчалаш // «Организмдаги

модда алмашинуви жараёнларига физик ва кимёвий омилларнинг таъсири», номли Ҳалқаро илмий анжуман материаллари.- Андижон, 1997. 2К.- 110 б.

26. Muratov G.A. Comparative biodegradation of cotton fibers by enzymes of cellulase complex // Proceedings of Intern. Conf. of Fund. Sci. "Lomonosov-2000", Moscow State University. - Moscow, 2000.- P.48.

27. Гайрат Муратов, Чул Ким. Ферментативный гидролиз разновозрастных волокон хлопчатника катализирующихся четырёхокисью углерода // Тез. докл. Межд. научно-практич. конф. «Теоретич. и практич. основы и перспективы развития селекции и семенов. хлопчатника». - Ташкент, 2002.- С.60-61.

28. Муратов Г.А. Влияние температуры на биоконверсию целлюлозы волокон хлопчатника сорта Ташкент-6 // Мат. Межд. научно-практич. конф. «Соврем. состояние селекции и семеноводства хлопчатника, проблемы и пути их решения». - Ташкент, 2007.- С.34-36.

29. Муратов Г.А., Ким Ч. Использование суперкритического углекислого газа для биоконверсии хлопковых волокон // Тез. докл. IV Москов. междун. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - Москва, 2007.- С.81-82.

30. Муратов Г.А., Ким Ч. Зависимость биоконверсии целлюлозы разновозрастных волокон сортов хлопчатника вида *G. hirsutum* L. от суперкритического давления CO₂ // Мат. межд. научно-практич. конф. «Соврем. состояние селекции и семеноводства хлопчатника, проблемы и пути их решения». - Ташкент, 2007.- С.37-39.

31. Муратов Г.А. Ферментативная конверсия целлюлозы разновозрастных волокон хлопчатника вида *G. arboreum* L. // Мат. Межд. научно-практич. конф. «Соврем. состояние селекции и семеноводства хлопчатника, проблемы и пути их решения». - Ташкент, 2007.- С.40-41.

32. Муратов Г.А., Ким Ч. Ферментативное получение глюкозы и сахаров из целлюлозы незрелых коробочек хлопчатника // Мат. Межд. научно-практич. конф. «Научные и практические основы улучшения плодородия почв». - Ташкент, 2007. Ч.2.- С.224-226.

33. Муратов Г.А. Ферментативное получение глюкозы и сахаристых веществ из хлопковой целлюлозы // Мат. Межд. научно-практич. конф. «Актуальные проблемы молекулярной биологии растений». - Ташкент, 2008.- С.33-35.

34. Муратов Г.А. Влияние суперкритического давления CO₂ на ферментативную конверсию хлопковой целлюлозы // Мат. Межд. научно-практич. конф., посвящ. 95-летию Саратовского госагроуниверситета «Вавиловские чтения - 2008». - Саратов, 2008.- Ч.1.- С.33-34.

35. Рахимов М.М., Муратов Г.А. Современное состояние проблемы ферментативной конверсии целлюлозы // Мат. Респ. Науч. Конф. «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии». – Ташкент, 2009. – С.42-43.

**Биология фанлари доктори илмий даражасига талабгор Муратов Гайрат
Азатовичнинг 03.00.23 – «Биотехнология» ихтисослиги бўйича «Пахта
толаси целлюлозасини ферментатив конверсиялашнинг илмий
асослари» мавзусидаги диссертациясининг
РЕЗЮМЕСИ**

Таянч сўзлар: целлюлоза, пахта толаси, таркибида целлюлозаси мавжуд чиқиндилар, биоконверсия, ферментатив гидролизлаш, целлюлаза, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*.

Тадқиқот объектлари: ғўзанинг *G. hirsutum L.*, *G. barbadense L.* ва *G. arboreum L.* турлари пахта толаси целлюлозаси.

Ишнинг мақсади: ишнинг асосий мақсади пахта целлюлозасини турли омилларга боғлиқ ҳолда ферментатив гидролизлашнинг босқич ва қонуниятлари, ҳамда гидролиз маҳсулотлари чиқимларининг динамикасини умумий ва фарақланувчи хусусиятларини ўрганиш орқали ферментатив конверсиялаш жараёнининг оптимизациялашни илмий асослашдан иборат.

Тадқиқот усули: ферментатив гидролизлаш, ёруғлик ва электрон микроскопия, спектрофотометрия, газохроматография ва математик ҳисоблаш усуллари.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: мазкур ишда, биринчи маротаба, келиб чиқиши юзасидан турлича бўлган целлюлазалар ёрдамида ғўзанинг 3 турига мансуб 8 нав ва 2 та дурагай пахта толалари целлюлозасини биоконверсиялашнинг босқич ва қонуниятлари ўрнатилган; пахта целлюлозасини гидролизлашда ажралиб чиқадиган маҳсулотлар чиқими кинетикасини субстрат-, фермент- ва жараён омиллари билан боғланган ҳолда умумий ва фарақланувчи хусусиятлари аниқланган; пахта толасини биоконверсиялаш орқали юқори чиқимли глюкоза, қанд моддалари ва биоэтанол олиш учун ФГ жараёнида СК СО₂ босим шароити биринчи маротаба ишлаб чиқилган, қўлланилган ва самарадорлиги аниқланган; ёруғлик ва электрон микроскоп услубларини қўллаган ҳолда ғўзани ўсиш давридаги пахта целлюлозасини парчаланиш хусусияти ва уни ферментатив гидролизланиш жараёнида ажралиб чиқадиган кичик молекулали фойдали маҳсулотлар чиқимлари билан боғлиқликлари кўрсатиб берилган.

Амалий аҳамияти: тадқиқот натижаларига кўра, илгари ўрганилмаган ва ҳисобга олинмаган, ҳар йили кечги кузда далаларда етарли микдорда қолиб кетадиган пахтачилик чиқиндиси ҳисобланган - пишиб етилмаган кўсаклар глюкоза, қанд моддалари ва биоэтанол олиш учун потенциал арзон ва қимматли хом ашё сифатида таклиф этилган.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: илмий тадқиқотлар натижалари ўқув жараёнига киритилган; ғўзнинг пишиб етилмаган кўсаклар целлюлозасидан глюкоза ва биоэтанол олиш мақсадида тажрибавий қурилмасини ишлаб чиқиш ва яратиш учун тайёрланган “техник шарт”лар “Тегирмон” ИИКга топширилди ва уни тадбиқ этилиши эса республикамизнинг иқтисодиётининг ривожланишига катта ҳисса кўшади.

Қўлланиш соҳаси: биотехнология, микробиология, биохимия, ўқув жараёни.

Р Е З Ю М Е

диссертации Муратова Гайрата Азатовича на тему: “Научные основы ферментативной конверсии целлюлозы хлопкового волокна” на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.00.23 – «Биотехнология»

Ключевые слова: целлюлоза, хлопковое волокно, целлюлозосодержащие отходы, биоконверсия, ферментативный гидролиз, целлюлаза, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*.

Объекты исследования: целлюлоза хлопковых волокон видов *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L. и *G. arboreum* L.

Цель работы: целью настоящей работы являлось научное обоснование основ оптимизации процесса ферментативной конверсии целлюлозы хлопкового волокна, изучение стадий и закономерностей ферментативного гидролиза, а также определения общих и отличительных особенностей динамики выходов продуктов гидролиза в зависимости от различных факторов.

Метод исследования: ферментативный гидролиз, суперкритические флюиды, световая и электронная микроскопия, спектрофотометрия, газохроматография и математическая статистика.

Полученные результаты и их новизна: впервые: установлены стадии и закономерности проведения биоконверсии целлюлозы разновозрастных хлопковых волокон 3 видов, 8 сортов и 2 внутривидовых гибридов хлопчатника целлюлазами различного происхождения; определены общие и отличительные особенности кинетики выходов продуктов гидролиза целлюлозы хлопкового волокна в зависимости от субстрат-, фермент- и процесс- зависимых факторов; разработан и использован принципиально новый метод проведения процесса ФГ целлюлозы хлопкового волокна в условиях СК давления CO₂ и его влияние на эффективность, скорость гидролиза и выходы продуктов гидролиза; привлечением методов световой и электронной микроскопии установлен характер расщепления целлюлозы хлопкового волокна в процессе его развития на надмолекулярном уровне, а также его взаимосвязь с выходами низкомолекулярных продуктов при ФГ.

Практическая значимость: предложен новый ранее неизученный вид целлюлозосодержащих аморфных и легкогидролизуемых хлопковых отходов - незрелые хлопковые коробочки («курак»), которые ежегодно остаются на полях в достаточном количестве и рекомендуются в качестве дешёвого, ценного потенциального сырья для биоконверсии в глюкозу и биоэтанол.

Степень внедрения и экономическая эффективность: результаты исследования включены в учебный процесс, а также переданы в НПП «Тегирмон» в виде технических условий для разработки опытно-промышленной установки с целью получения глюкозы и биоэтанола из целлюлозы незрелых коробочек хлопчатника, внедрение которой внесёт значительный вклад в развитие экономики республики.

Область применения: биотехнология, микробиология, биохимия, учебный процесс.

R E S U M E

Thesis of Muratov Gayrat Azatovich on the scientific degree competition of the doctor of sciences in biology speciality 03.00.23 – “Biotechnology” subject: “Scientific basics of cotton fiber cellulose enzymatic conversion”

Key words: cellulose, cotton fiber, cellulosic wastes, bioconversion, enzymatic hydrolysis, cellulase, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*.

Subjects of the inquiry: cotton fiber cellulose of species *G. hirsutum L.*, *G. barbadense L.* and *G. arboreum L.*

Aim of the inquiry: aim of research is scientific basis of cotton fiber cellulose enzymatic conversion process optimization via study stages and laws of enzymatic hydrolysis, as well as detection of general and distinctive individuality for dynamics in hydrolysis products yields depending on various factors.

Method of inquiry: enzymatic hydrolysis, supercritical fluids, light and electronic microscopy, spectrophotometry, gas chromatography and mathematical statistics.

The results achieved and their novelty: for the first time: established stages and laws of conducting different age cotton fiber cellulose bioconversion from 3 kinds, 8 species and 2 intra-kind cotton hybrids by the cellulases of various origin; detected general and distinctive individuality for dynamics in cotton fiber cellulose hydrolysis products yields, depending on substrate-, enzyme- and process depending factors; developed and used principally new method for conducting cotton fiber cellulose enzymatic hydrolysis in CO₂ supercritical fluids and its influence on the effectiveness, rate of hydrolysis and yields of hydrolysis products; by using light and electronic microscopy established character of cotton fiber cellulose splitting during their ripening on sub molecular level as well as its correlation with low molecular products after enzymatic hydrolysis.

Practical value: new never studied before kind of cellulosic amorphous and easy hydrolysable cotton wastes – unripe cotton boxes («kurak»), which left on the fields in enormous amounts and can be further recommended as cheap and valuable potential raw material for bioconversion to glucose and bioethanol is offered.

Degree of embed and economic effectivity: research results included to the educational process as well as passed to SMF «Tegirmon» as technical specifications for development pilot reactor for production of glucose and bioethanol from unripe cotton boxes cellulose, introduction of which can considerably contribute in development of our country economy.

Sphere of usage: biotechnology, microbiology, biochemistry, educational process.