

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 6D070100 – Биотехнология

Махатова Жаксылыка Бауманұлы

Разработка технологии ферментативной деполимеризации полисахаридов соломы пшеницы с целью получения глюкозы и сорбита.

Общая характеристика диссертационного исследования. Диссертационная работа посвящена к разработке эффективной ферментативной деполимеризации соломы пшеницы карбогидразами мицелиальных грибов с целью получения глюкозы, с последующим получением сорбита.

Актуальность темы исследований. В Казахстане среди сельскохозяйственных культур по объему возделывания лидирует пшеница. Так например, в 2018 году урожай пшеницы составил 32 млн тонн, в 2019 году - около 33 млн тонн, а отходы (пшеничная солома и отруби) составили более 12-15 млн тонн/год. Ежегодная возобновляемость, низкая стоимость, большой объем данных отходов диктует о необходимости разработки биотехнологии их конверсии, основанной на ферментализе целлюлозы, основного структурного компонента. Широкое разнообразие ферментов предоставляет большие возможности для эффективной переработки данного растительного сырья в биологически ценные вещества, сахара и другие продукты.

Несмотря на то, что к настоящему времени существует множества подходов при переработке соломы пшеницы, большая их часть остается невостребованной. Часть соломы используется на скормливание скота и в качестве подстилки животным, остальная её часть запахивается или сжигается на полях. Хотя солома является крайне перспективным для переработки в качестве исходного сырья для различного направления производства.

В этой связи особый интерес представляет поиск ферментативных технологий деполимеризации полисахаридов соломы пшеницы.

Следовательно, разработка комплексной технологии переработки целлюлозы соломы пшеницы до глюкозы, далее в сорбит, позволит не только улучшить экологическую ситуацию, но и получить сырье и дополнительные ценные продукты для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства.

Цель и задачи исследований

Цель работы – разработка эффективной биотехнологии деполимеризации полисахаридов соломы пшеницы для получения глюкозы и сорбита посредством ферментативного гидролиза.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- на основе результатов микробиологических исследований осуществить скрининг перспективных штаммов-продуцентов целлюлаз и с помощью консорциума микроорганизмов интенсифицировать процессы биосинтеза ферментов;

- подобрать оптимальный состав питательной среды и условия для культивирования штаммов с целью получения сбалансированного ферментного комплекса;

- разработать эффективные методы выделения и очистки комплекса гидролитических ферментов;

- разработать технологию получения высокоэффективной мультиэнзимной композиции для глубокой и поэтапной деполимеризации соломы пшеницы;

- разработать условия и технологии ферментативной обработки для деполимеризации полисахаридов соломы пшеницы с целью получения максимального выхода глюкозы и получения сорбита.

Объекты исследований. Микробиальными источниками пектиназ служили мицелиальные грибы рода *Aspergillus*, полученные в лаборатории кафедры биотехнология ЮКУ им. М.Ауэзова из почв Туркестанской области, *Penicillium* и *Trichoderma*, полученные в лаборатории микробных ферментов Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан. Источниками целлюлолитических ферментов являлись консорциум микроорганизмов «Целлозим Г20х», полученный в результате совместного глубинного культивирования штаммов *A. awamori F-RKM 0719* и *Tr. viride 121*, коммерческие препараты: *Cellic Tec (Novozym, Дания)*, *Accellerase 1000* и *Accellerase DUET*.

Объектом для ферментативного гидролиза служила пшеничная солома, полученная из сорта «Стекловидная-24», районизированная и возделываемая в Туркестанской области.

Научная новизна исследований

Разработана биотехнология получения нового высокоактивного ферментного препарата «Целлозим Г20х» - источника ферментов целлюлазного, ксиланазного, β-глюканазного, пектназного действия, для эффективной деполимеризации полисахаридов соломы пшеницы с целью получения глюкозы и сорбита.

В процессе исследований создан консорциум микроорганизмов-продуцентов целлюлолитических ферментов - штаммов *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719*, обеспечивающий повышение целлюлолитической активности, а также активности сопутствующих ферментов. Установлен оптимальный состав питательной среды и оптимальные условия культивирования микромицетов *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719*. С целью повышения каталитической активности и стабильности ферментного комплекса консорциума микромицетов *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719* разработаны способы выделения и очистки, в результате получен ферментный препарат *Целлозим Г20х* с высокой степенью очистки.

Практическая и теоретическая значимость работы. В результате использования консорциума микроорганизмов-продуцентов целлюлолитических ферментов - штаммов *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719* разработана и экспериментально обоснована эффективная технология получения и использованная ферментного препарата «Целлозим Г20х» (консорциум микроорганизмов), обеспечивающая оптимальные параметры ферментативной обработки полисахаридов соломы пшеницы и позволяющая получить до 2,2 % глюкозы и сорбита. Теоретическая значимость работы заключается в том, что она

расширяет представление о биотехнологических основах получения и применения высокоэффективных целлюлолитических ферментных препаратов «Целлозим Г20х» (консорциум микроорганизмов), при производстве полисахаридов с отходов сельскохозяйственного производства растительного происхождения соломы.

Результаты научно-исследовательских работ внедрено в биотехнологическом производстве ТОО «Ана-жер», специализированного предприятия по производству биологических активных продукции в Казахстане.

Разработка защищена патентом на полезную модель № 3429 «Способ получения глюкозы из соломы пшеницы».

Основные положения диссертационной работы используются в учебном процессе по дисциплине «Biotechnology of microorganisms».

Концептуальные положения и результаты исследований можно использовать в подготовке спецкурсов учебного процесса докторантов, магистрантов, бакалавров биотехнологического направлений, а также в разработке научных трудов, учебников и учебно-методических пособий.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

- скрининг перспективных штаммов-продуцентов целлюлаз и консорциум микроорганизмов-продуцентов целлюлолитических ферментов - *штамм Tr. viride 121* и штамм *A. awamori F-RKM 0719*, обеспечивающий повышение целлюлолитической активности, а также активности сопутствующих ферментов.;

- условия культивирования, состав питательной среды и технологии, которые обеспечивают физиологические потребности продуцентов и максимальное образование сбалансированного ферментного комплекса, с использованием различных пищевых отходов, как компонентов питательной среды;

- технология получения и характеристика комплексного ферментного препарата «Целлозим Г20х» (консорциум микроорганизмов).

- оптимальные параметры ферментативной обработки полисахаридов соломы пшеницы, технологии применения ферментного препарата «Целлозим Г20х» (консорциум микроорганизмов) и сравнительная оценка эффективности влияния новых ферментных препаратов на эффективность деполимеризации соломы пшеницы.

Выводы:

1. Разработана эффективная биотехнология ферментативной деполимеризации полисахаридов соломы пшеницы на основе использования нового ферментативного препарата «Целлозим Г20х» (консорциум микроорганизмов), обеспечивающая выход глюкозы и сорбита от исходного сырья до 2,2 % .

2. В результате скрининга из 46 штаммов грибов были отобраны 24 культуры, используя методов ступенчатого отбора на селективных питательных средах выявлены перспективные культуры грибов *A. awamori F-RKM 0719* и *Tr. viride 121*. Исследованы культурально-морфологические и биохимические особенности по синтезу комплекса целлюлолитических ферментов, включающие пять представителей карбогидраз.

3. Создан консорциум микроорганизмов-продуцентов целлюлолитических ферментов - штамм *Tr. viride 121* и штамм *A. awamori F-RKM 0719*. Подобраны оптимальные условия и состав питательной среды для совместного культивирования микромицетов *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719*, которые вводились последовательно, что обеспечило увеличение каталитической активности в пределах 30% - 70% за счет их синергетического эффекта.

4. В результате с высокой степени очистки и выделения ферментного раствора консорциума *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719* получен новый ферментный препарат «Целлозим Г20х» (консорциум микроорганизмов). Изучены физико-химические свойства препарата «Целлозим Г20х» при температурных режимах от 30⁰С до 70⁰С ферментативного гидролиза соломы пшеницы и установлены оптимальные параметры действия и стабильность ферментного препарата при температуре 50⁰С.

5. Из комплексного препарата «Целлозим Г20х» путем гель-колоночной хроматографии на сефадексе была получена β-1,4-эндоглюканаза высокой степени очистки. Путем ЭФ на 7,5 ПААГе было установлено наличие трех форм эндоглюканазы в составе «Целлозим Г20х», молекулярные массы которых лежат в пределах 35-36 кДа.

6. Сравнительная оценка ферментных препаратов по гидролизу микрокристаллической целлюлозы (МКЦ), карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксилана, а также пектину показала, что полученная нами мультиэнзимная композиция *Целлозим Г20х* на основе микромицетов *Tr. viride 121* и *A. awamori F-RKM 0719* превосходит коммерческие препараты аналогичного назначения *Genencor International PS A03143-1.1EN Optiflow RC 2.0* и *PS A03197-1.0EN Acellerase CB100* по активностям и значениям удельных активностей.

7. В экспериментальном производственном испытании ферментный препарат «Целлозим Г20х» показал эффективность при биоконверсии пшеничной соломы с высоким выходом глюкозы и сорбита до 2,2 %.

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 2 статья в журнале, входящем в международную базу данных Scopus, 3 статьи в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК, 9 статьи в международных конференциях, 1 патент на полезную модель.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора отечественной и зарубежной научно-технической и патентной литературы, экспериментальной части, использованных источников, заключения и приложений, включает 126 страниц, 37 рисунков, 24 таблиц. Список литературы состоит из 161 источников.

Диссертационная работа была выполнена в рамках реализации финансируемого в 2015 – 2017 годы гранта МОН РК «Разработка инновационной технологии глубокой переработки углеводсодержащего растительного сырья и отходов с целью получения ксилита и сорбита посредством совмещенного химического и ферментативного гидролитического гидролиза и гидрирования» (договор № 203-35 от 03.03.2017).