

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА
ВТОРИЧНЫХ РЕСУРСОВ
ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА**

Вторичные ресурсы целлюлозно-бумажного производства

Жидкие, содержащие углеводы в растворенном виде и в твердой фазе:

- щелока;
- избыточные оборотные и сточные воды.

Твердые, содержащие клетчатку и лигнин:

- отходы, образующиеся при окорке древесины;
- отходы, образующиеся при сортировании щепы.

Содержание макрокомпонентов в сульфитном щелоке из хвойных пород (г/л, относительная погрешность $\pm 10\%$)

Компонент	До отдувки	После отдувки
Глюкоза	20,8	18,5
Целлобиоза	1,87	1,81
Муравьиная кислота	4,01	1,92
Уксусная кислота	0,94	0,33
Фурфурол	0,20	0,12

Чем мы занимаемся?

Скринингом микроорганизмов, пригодных для переработки вторичных ресурсов ЦБП с получением биопродуктов:

- скринингом дрожжей, для эффективной переработки щелоков;
- поиском мицелиальных грибов для переработки твердых вторичных ресурсов ЦБП.

Что нового предлагаем?

Биотехнологическую переработку вторичных ресурсов ЦБП используя:

- психротолерантные дрожжи, с получением белков;
- получение молочной кислоты культивированием грибом *Rhizopus oryzae* f-1030;
- культивирование мицелиального гриба *Trichoderma reesei* M18 как источника ферментов;
- получение эндофитных и ризосферных бактерий как удобрений;
- получение хитин глюкана из грибов и дрожжей и внеклеточных полисахаридов.

Об актуальности совершенствования технологии дрожжей

Снижение экономической эффективности производства дрожжей как источника белка и БАВ вызвано:

- высокой энергоемкостью производства;
- ориентация производства на монопродукт;
- высокими затратами на приготовление питательных сред;
- истощением сырьевых ресурсов;
- промышленное применение дрожжей рода *Candida* вызывает серьезные экологические проблемы.

Обоснование применения психротолерантных дрожжей в биотехнологии переработки вторичных ресурсов ЦБП

Скрининг штаммов психротолерантных дрожжей по кинетическим характеристикам и выходу биомассы при культивировании на питательных средах, приготовленных из:

- а) используемых в промышленности сульфитных щелоков;
- в) перспективных для промышленности питательных средах из вторичных ресурсов переработки растительного сырья.

Определение ферментативной активности психротолерантных дрожжей при культивировании на перспективных для промышленности питательных средах из вторичных ресурсов переработки растительного сырья.

В работе использованы штаммы:

1) Аскомицетовых дрожжей *Debaryomyces hansenii*:

- *D. hansenii* Н₄₃₃, предоставленный Всероссийской коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (г. Пушкин);

- *D. hansenii* Н₄₆₅₁ – предоставленный коллекцией кафедры «Бионанотехнология и биоорганический синтез» Московского государственного университета пищевых производств;

- *D. hansenii* Н₁₈₋₃ - предоставленные коллекцией кафедры биологии почв Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

2) Базидиомицетовых дрожжей *Guohomyces*

pullulans: КВ₁₋₃₄ - предоставленные коллекцией кафедры биологии почв Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

3) Промышленные штаммы дрожжей рода *Candida*:

- *C. Guilliermondii* sp., *C. scotti* sp., *C. utilis* Y-35, *C. tropicalis* sp. предоставленные лабораторией биотехнологии Белорусского технологического университета.

- *C. tropicalis* КБПУ-4772, *C. tropicalis* КБПУ-4883 - предоставленные коллекцией кафедры биологии почв Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

4) Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-720

предоставленный всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов.

Проведен скрининг дрожжей *D. hansenii* Н₄₆₅₁ , *D. hansenii* Н₄₃₃ , *D. hansenii* Н₁₈₋₃ , *G. pullulans* КВ₁₋₃₄ , *C. Guilliermondii* sp., *C. scotti* sp., *C. utilis* Y-35, *C. tropicalis* sp., *C. tropicalis* КБПУ-4772, *C. tropicalis* КБПУ-4883 для определения кинетических характеристик и выхода биомассы дрожжей при культивировании на питательной среде из сульфитных щелоков.

Что получено в результате исследований?

- Обоснована целесообразность применения психротолерантных дрожжей вида *Debaryomyces hansenii* и *Gluchoomyces pullulans* в технологии биоконверсии вторичных ресурсов переработки растительного сырья: сульфитных щелоков, ферментализатов клетчатки;
- Установленные закономерности проявления ферментативной активности психротолерантных дрожжей вида *D. hansenii* *G. pullulans* при температурах культивирования от 15 до 25°C на питательных средах, приготовленных из ферментализатав клетчатки.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ *D. HANSENI* И *G.PULLULANS* НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ИЗ СУЛЬФИТНОГО ЩЕЛОКА

Кинетические характеристики роста и выход биомассы дрожжей *D. hansenii*, *G. pullulans* и *Candida* при культивировании на питательной среде из сульфитного щелока концентраций РВ 3,05 % *

Характеристики роста и выход биомассы	<i>D.hansenii</i> Н ₄₆₅₁	<i>G.pullulans</i> КВ ₁₋₃₄	<i>C. tropicalis</i> КБПУ – 4889
Удельная скорость роста μ , ч ⁻¹	0,182 ± 0,006	0,117 ± 0,005	0,112 ± 0,005
Продолжительность генерации Q, ч	3,80 ± 0,09	5,92 ± 0,17	6,19 ± 0,27
Выход биомассы, %	50,43 ± 1,29	47,70 ± 2,14	37,60 ± 1,71

*Температура культивирования дрожжей *D.hansenii* Н₄₆₅₁, *G.pullulans* КВ₁₋₃₄ 20 °С, дрожжей *C. tropicalis* КБПУ – 4889 - 36°С. рН 5.5.

Аэрация - расход воздуха 2 л/мин. на 1 литр культуральной жидкости

Культивирование дрожжей на ферментализатах клетчатки

Из древесных отходов выделяли олигомеры углеводов, которые использовали в качестве модельной среды при определении целлюлазной, ксиланазной и целлобиазной активности дрожжей.

Выделение олигомерных углеводов проводили с использованием ферментов, которые применяются в текстильной промышленности для полировки тканей из хлопковых нитей.

Предварительные исследования показали целесообразность использовать совместно два фермента:

- лакказы (DeniLite II S)- расход 0,25 %;
- целлюлаза (Валюмакс А376)- расход 0,5 %.

Температура: 50 °С, гидромодуль 1:25, рН=6,0-6,5, продолжительность 8 ч при перемешивании.

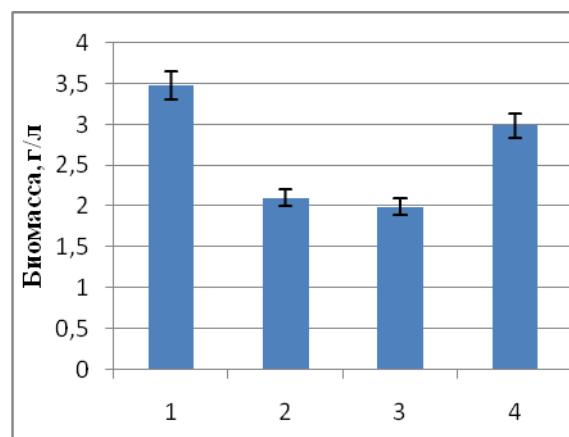
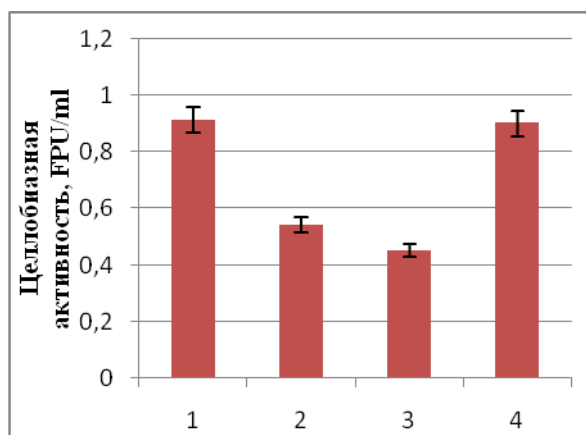
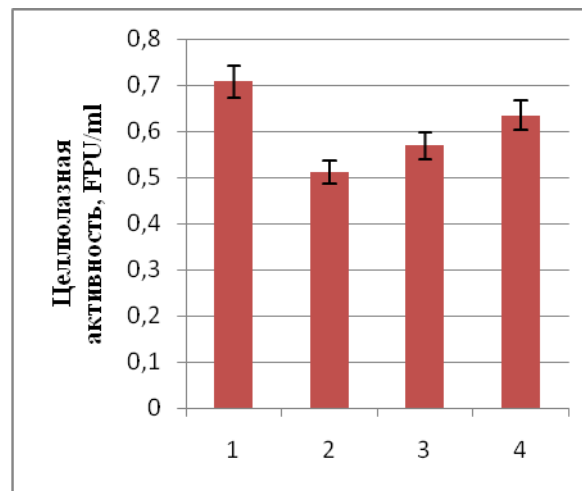
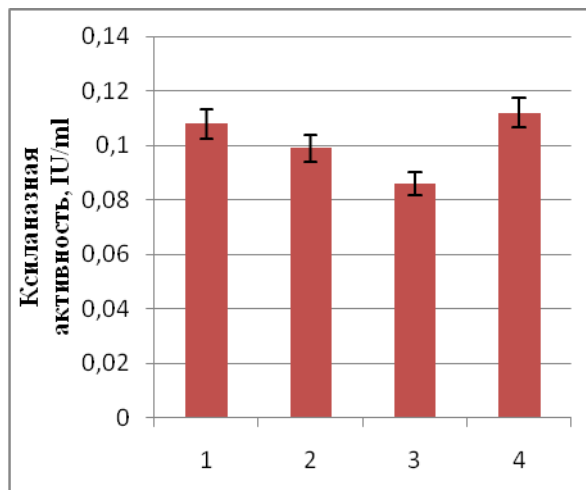
Ферментализат после отделения центрифугированием от клетчатки содержал РВ -0,39 % , после инверсии олигомерных углеводов содержание РВ 0,74 %.

Кинетические характеристики роста и выход биомассы дрожжей *D.hansenii* и *G.pullulans* при культивировании на питательной среде из ферментализатов клетчатки

Характеристики роста и выход биомассы	<i>D. hansenii</i> H ₄₆₅₁	<i>D. hansenii</i> H ₄₃₃	<i>D. hansenii</i> H ₁₈₋₃	<i>G. pullulans</i> KB ₁₋₃₄
Удельная скорость роста μ , ч ⁻¹	<u>0,080 ± 0,004</u>	<u>0,057 ± 0,003</u>	<u>0,049 ± 0,003</u>	<u>0,069 ± 0,004</u>
	<u>0,084 ± 0,004</u>	<u>0,063 ± 0,003</u>	<u>0,059 ± 0,003</u>	<u>0,073 ± 0,003</u>
	0,081 ± 0,004	0,055 ± 0,003	0,057 ± 0,003	0,068 ± 0,004
Время генерации Q, ч	<u>8,66 ± 0,43</u>	<u>12,15 ± 0,58</u>	<u>14,11 ± 0,41</u>	<u>10,04 ± 0,38</u>
	<u>8,25 ± 0,47</u>	<u>11,00 ± 0,36</u>	<u>11,74 ± 0,52</u>	<u>9,49 ± 0,24</u>
	8,55 ± 0,52	12,60 ± 0,45	12,15 ± 0,32	10,19 ± 0,46
Выход биомассы от инвертированных сахаров*, %	<u>48,14 ± 2,18</u>	<u>40,19 ± 1,71</u>	<u>35,41 ± 1,43</u>	<u>46,25 ± 2,11</u>
	<u>51,68 ± 2,38</u>	<u>41,88 ± 2,22</u>	<u>37,73 ± 1,96</u>	<u>49,13 ± 1,39</u>
	47,34 ± 1,69	37,73 ± 1,50	34,29 ± 1,05	46,65 ± 1,72

*температура культивирования, °С, в числителе - 15, в средней части – 20, в знаменателе - 25

Ксиланазная (а), целлюлазная (б) и целлюлобиазная активность (с) и синтез биомассы (д) при культивировании дрожжей *D.hansenii* и *G. pullulans* на питательной среде из ферментализатов клетчатки*.



*температура культивирования, 20°C,

1- штамм *D. hansenii* H₄₆₅₁, 2- штамм *D. hansenii* H₄₃₃

3- штамм *D. hansenii* H₁₈₋₃, 4- штамм *G. pullulans* KB₁₋₃₄

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ РОДА
LIPOMYCES НА ФЕРМЕНТОЛИЗАТЕ
ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ И СИНТЕЗ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

Ферментативная активность психротолерантных дрожжей при культивировании на питательной среде из гидролизата клетчатки при 20 °С

Штаммы психрофильных дрожжей	Активности, мкмоль/см ³		
	Целлюлазная активность	Ксиланазная активность	Целлобиазная активность
КБП 2870	0,065	0,032	0,084
КБП 7035	0,084	0,085	0,260
КБП 123	0,065	0,046	0,160
КБП 1106	0,230	0,032	0,100
<i>Lipomyces</i>	0,084	0,046	0,093
КБП 1807	0,019	0,052	0,093
КБП 105	0,046	0,052	0,084

Ферментативная активность психротолерантных дрожжей при культивировании на питательной среде из гидролизата клетчатки при 25 °С

Штаммы психрофильных дрожжей	Активности, мкмоль/см ³		
	Целлюлазная активность	Ксиланазная активность	Целлобиазная активность
КБП 2870	0,084	0,028	0,056
КБП 7035	0,12	0,093	0,280
КБП 123	0,084	0,028	0,032
КБП 1106	0,32	0,039	0,180
<i>Lipomyces</i>	0,093	0,052	0,032
КБП 1807	0,028	0,032	0,032
КБП 105	0,056	0,032	0,032

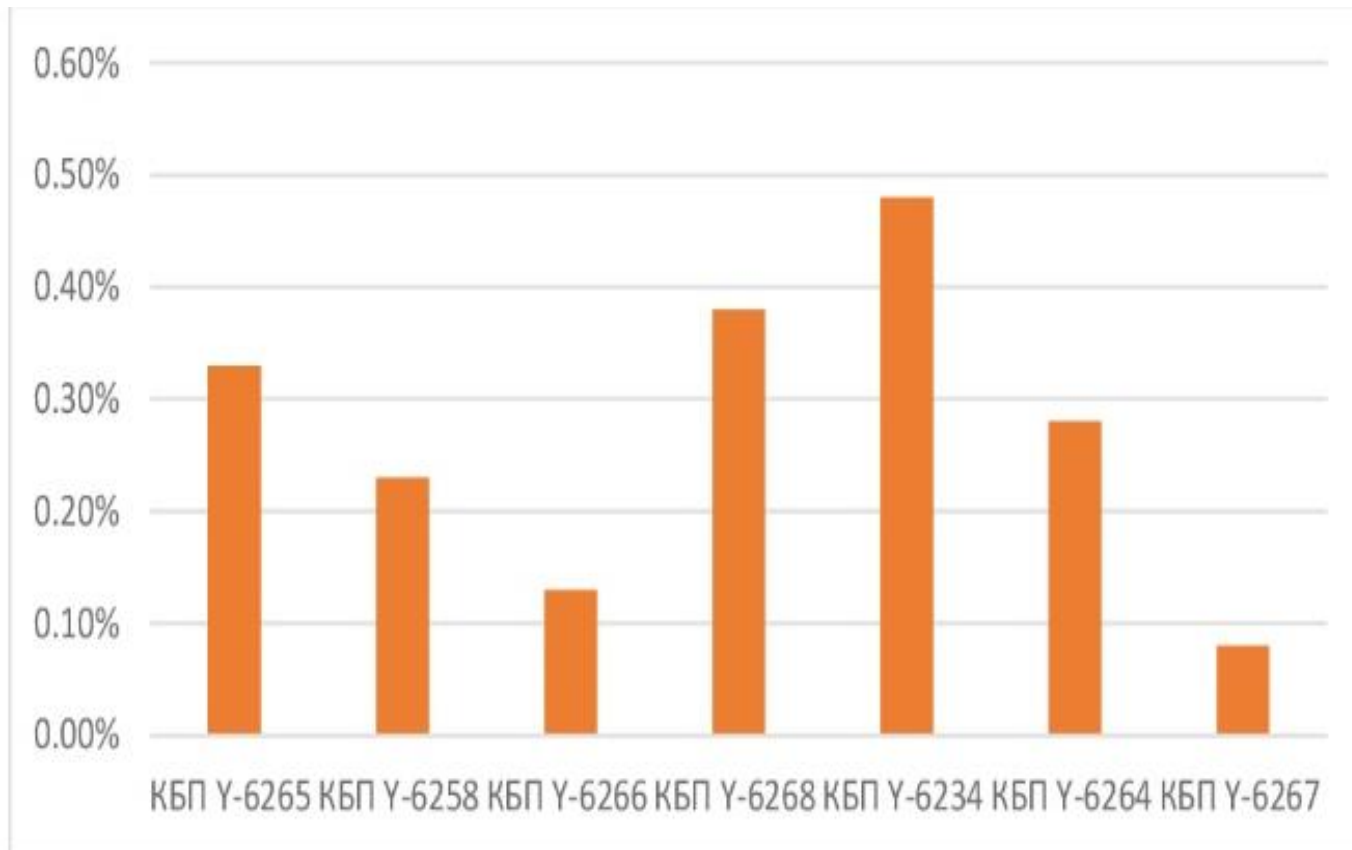
Ферментативная активность психротолерантных дрожжей при культивировании на питательной среде из гидролизата клетчатки при 30 °С

Штаммы психрофильных дрожжей	Активности, мкмоль/см ³		
	Целлюлазная активность	Ксиланазная активность	Целлобиазная активность
КБП 2870	0,018	0,013	0,018
КБП 7035	0,046	0,013	0,018
КБП 123	0,028	0,013	0,018
КБП 1106	0,100	0,039	0,180
<i>Lipomyces</i>	0,240	0,065	0,120
КБП 1807	0,074	0,013	0,018
КБП 105	0,074	0,013	0,018

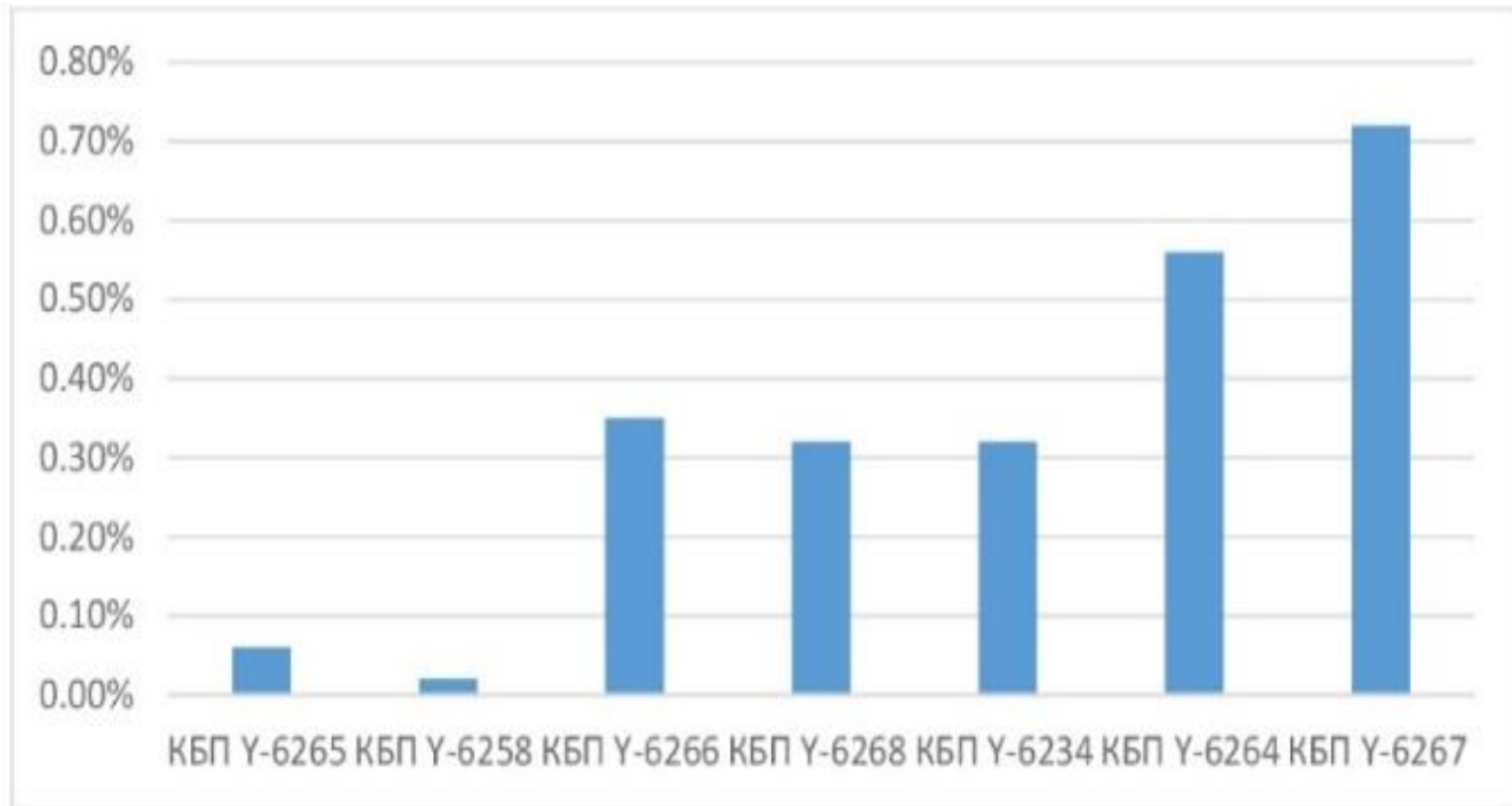
Эффективность культивирования дрожжей рода *Lipomyces*

Показатели	При 20°С			При 30°С		
	У- 6268	У-6267	У-6264	У-6265	У-6234	У-6268
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0,135 ±0,012	0,042 ± 0,008	0,039 ± 0,009	0,054 ± 0,004	0,04 ± 0,003	0,054 ± 0,005
Время генерации, ч	7,41±1,00 2	23,67 ± 2,545	25,7 ± 4,648	18,61 ± 0,115	24,67 ± 0,457	18,29 ± 0,153
Выход биомассы, %	45,45±2,4 64	56,16 ± 3,218	32,49 ± 3,015	33,33 ± 0,265	6,78 ± 0,148	3,20 ± 0,050
Концентрация внеклеточных полисахаридов, %	0,32	0,71	0,55	0,32	0,48	0,38

Концентрация внеклеточных полисахаридов при синтезе различными штаммами при 30 °С



Концентрация внеклеточных полисахаридов при синтезе различными штаммами при 20 °С



Выводы

- психротолерантные дрожжи являются альтернативой используемых в промышленности дрожжам *Candida*;
- культивирование психротолерантных дрожжей при низких температурах энергетически выгодно;
- психротолерантные дрожжи менее требовательны к стерильности производства;
- психротолерантные дрожжи утилизируют олигомеры углеводов;
- психротолерантные дрожжи – это источник белка, жиров и внеклеточных полисахаридов, которые могут использоваться для кормления животных.

**СИНТЕЗ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ГРИБА *R. oryzae* F-1030
НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ
ИЗ СУЛЬФИТНОГО ЩЕЛОКА**

Цель данной работы – определение влияния способа культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков, на выход молочной кислоты.

Для решения поставленной задачи необходимо:

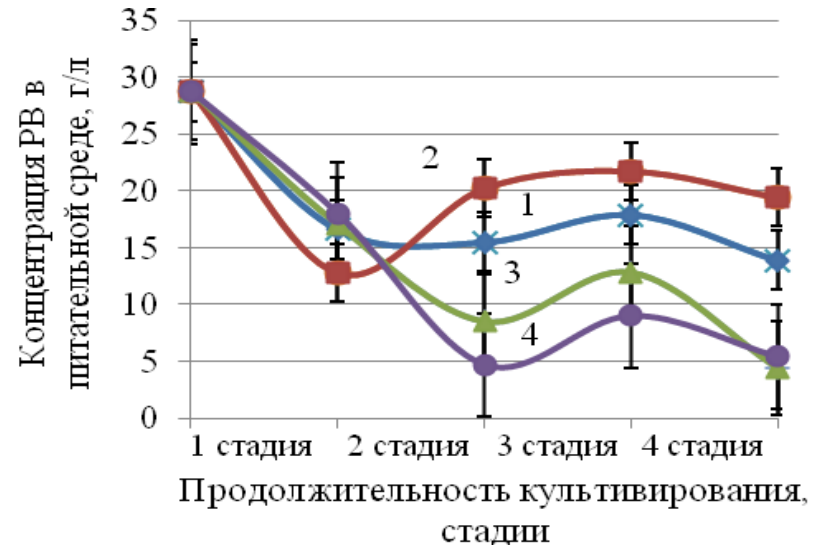
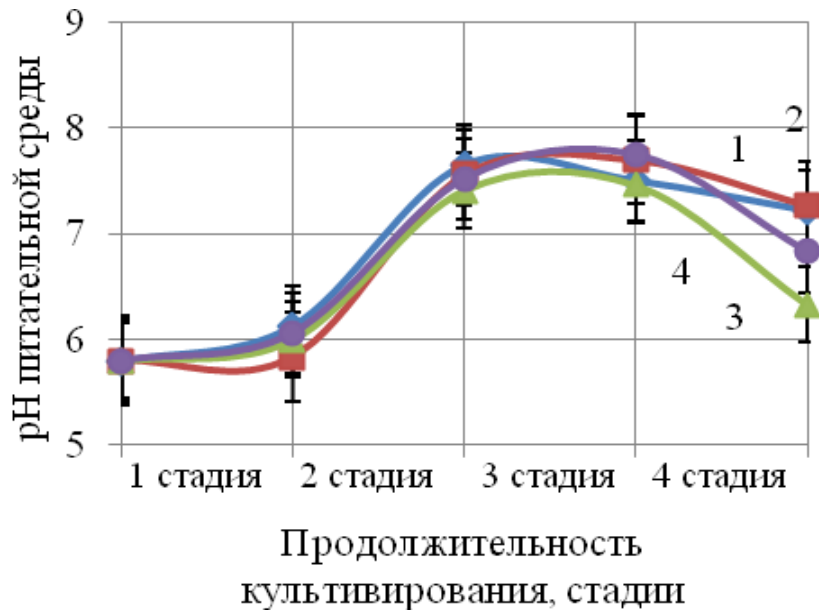
- определить влияние отъемно-доливного метода культивирования на синтез молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков;

- определить влияние периодического метода культивирования на синтез молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 на питательных средах, приготовленных на основе сульфитных щелоков;

Для решения поставленной задачи необходимо:

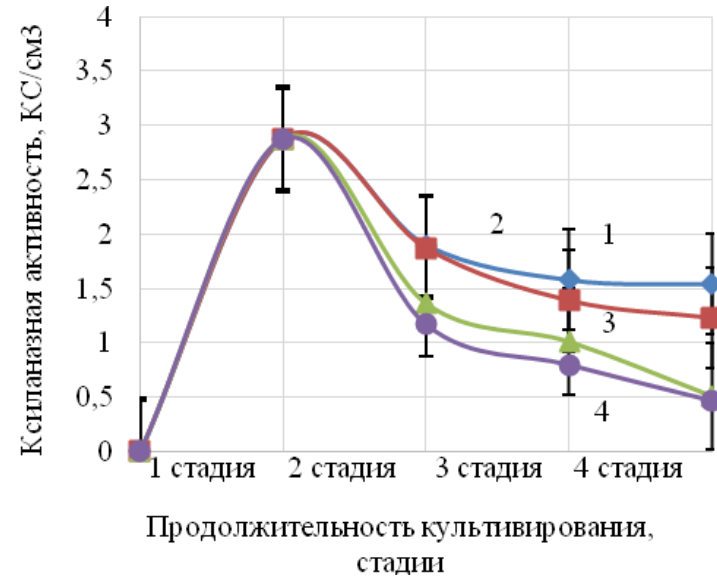
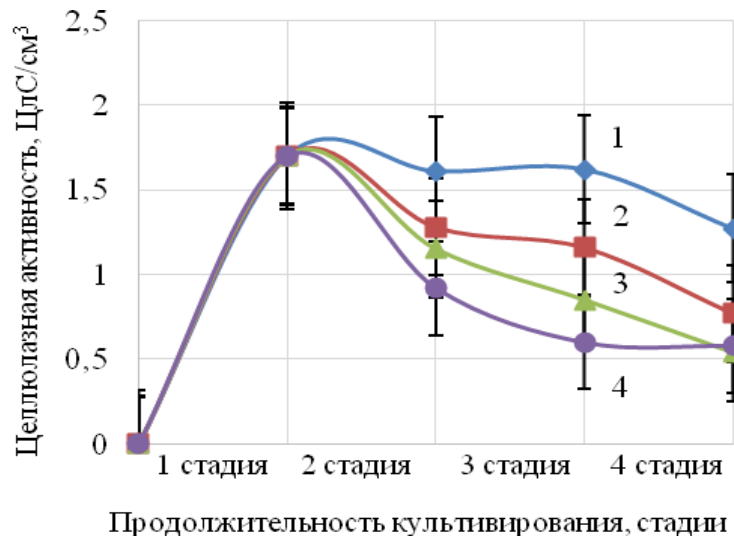
- обосновать влияние состава питательной среды на основе сульфитных щелоков и условий культивирования гриба *R. oryzae* F-1030 на синтез молочной кислоты;
- определить целлюлазную и ксиланазную активность гриба *R. oryzae* F-1030 при культивировании на питательной среде на основе сульфитного щелока и, соответственно, способность утилизировать грибом олигомерные углеводы с последующим синтезом молочной кислоты;
- определить влияние минеральных источников азота и фосфора на выход молочной кислоты при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030 на питательной среде, приготовленной из сульфитного щелока.

Динамика изменения рН (а) и содержания редуцирующих веществ (б) в питательной среде на основе сульфитного щелока при культивировании гриба *R. oryzae* F-1030



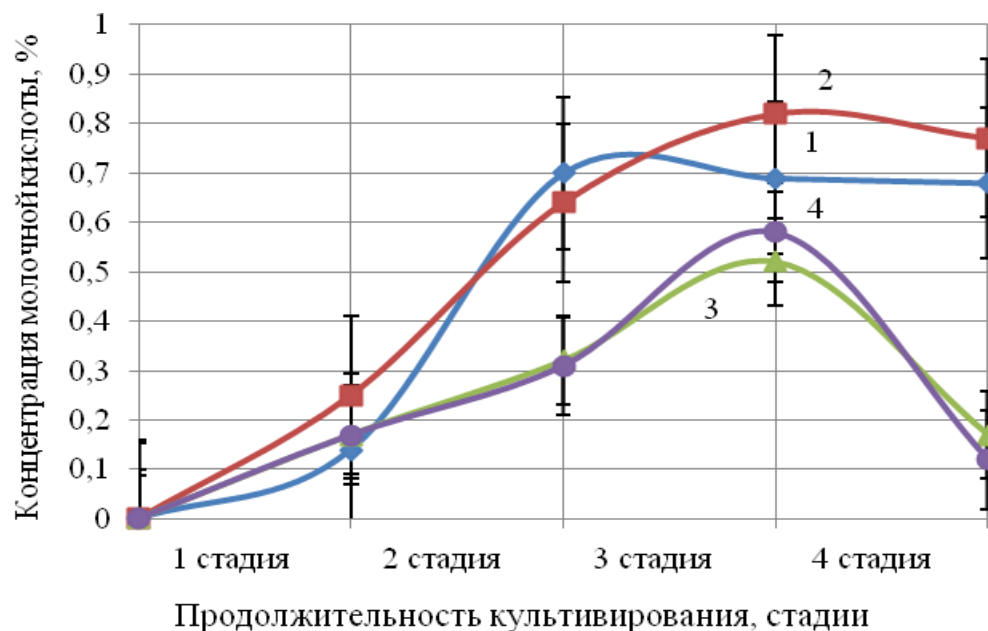
1 – отъемно-доливным способом с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 2 - отъемно-доливным способом без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 3 – периодическим способом с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 4 – периодическим способом без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4

Динамика изменения целлюлазной (а) и ксиланазной (б) активностей гриба *R. oryzae* F-1030 при культивировании на питательных средах на основе сульфитного щелока.



1 – отъемно-доливным способом с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 2 - отъемно-доливным способом без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 3 – периодическим способом с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 4 – периодическим способом без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4

Динамика синтеза молочной кислоты грибом *R. oryzae* F-1030 при культивировании на питательных средах на основе сульфитного щелока



1 – отъемно-доливным способом с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 2 - отъемно-доливным способом без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 3 – периодическим способом с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 ; 4 – периодическим способом без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 .

Выход биомассы и молочной кислоты в зависимости от способа культивирования гриба *R. oryzae F-1030*

Способ культивирования	Сухая биомасса, г/л	Выход молочной кислоты, %	Концентрация молочной кислоты, г/л
Отъемно-доливной с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4	$9,1 \pm 0,5$	$40,8 \pm 2,0$	$6,5 \pm 0,5$
Отъемно-доливной без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4	$6,9 \pm 0,5$	$32,8 \pm 2,0$	$5,9 \pm 0,5$
Периодический с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4	$9,2 \pm 0,5$	$29,5 \pm 2,0$	$3,0 \pm 0,5$
Периодический без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4	$9,6 \pm 0,5$	$33,5 \pm 2,0$	$3,0 \pm 0,5$

Грибы и бактерии - источники:

- Ферментов - *Trichoderma reesei* M18;
- Клеточная стенка – адсорбент микотоксинов (дрожжи, мицелиальные грибы, бактерии);
- эндофитные и ризосферные бактерии (микробиологические удобрения, стимуляторы роста растений и животных, адсорбенты токсинов).

**ПЕРЕРАБОТКА ВТОРИЧНЫХ РЕСУРСОВ
ПРОИЗВОДСТВА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ
БИОСОРБЕНТ ИЗ БИОМАССЫ ГРИБА
RHIZOPUS ORYZAE F-1030**

Состав биосорбента от вида обработки биомассы

Показатели биосорбента	Последовательность обработки биомассы			
	двухстадийная		трехстадийная	четырёхстадийная
	1	2	3	4
	Na ₂ CO ₃ (9,0 %), HCl	Na ₂ CO ₃ (2,0%), HCl	Na ₂ CO ₃ , HCl, H ₂ O ₂	Na ₂ CO ₃ , HCl, H ₂ O ₂ , NaOH
Выход, %	37,0	28,0	38,3	27,1
Зольность, %	0,4	0,7	1,1	1,5
Общее содержание азота, %	2	2,9	2,6	3,3
Содержание Д- глюкозамина, %	29,7	45,06	43,9	58,14
Содержание азота принадлежащего Д- глюкозамину, %	1,66	2,52	2,45	3,25

Характеристика биосорбента в зависимости от последовательности обработки биомассы

Характеристики биосорбента	Последовательность обработки биомассы			
	двухстадийная		трехрехстадийная	четырёхстадийная
	1	2	3	4
	Na_2CO_3 (9,0 %), HCl	Na_2CO_3 (2,0%), HCl	Na_2CO_3 , HCl, H_2O_2	Na_2CO_3 , HCl, H_2O_2 , NaOH
Адсорбционная емкость, $Q_k \cdot 10^{-4}$, г/г	1,58	2,63	2,77	7,54
Удельная поверхность, $S_{\text{уд}}$, м ² /г	0,52	0,31	0,55	1,49
Объем микропор, W_0 , см ³ /г	0,149	0,150	0,168	0,058
Эффективность адгезии частиц латекса, Эл, %	91,4	95,1	92,9	98,8
ξ -потенциал поверхности, мВ	+0,70	+0,71	-1,05	+1,40

Творческий коллектив

Аспиранты, соискатели, магистранты и бакалавры КНИТУ:

- Мингазова Л.А.;
- Белкина Е.В.;
- Крякунова Е.В.;
- Канарская З.А.;
- Хусаинов И.А.

И многие другие, имена которых Вы найдете в наших публикациях.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!