

УДК 663.534

Н.А.Степанов, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко

ТРАНСФОРМАЦИЯ ВОЗОБНОВЛЯЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭНЕРГИИ В ВИДЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ В БИОЭТАНОЛ

В связи с прогрессирующим дефицитом ископаемых топлив в настоящее время возник ряд проблем, связанных с поиском и технологическим освоением новых источников энергии, получаемых из возобновляемого сырья, к которым относится биоэтанол. Сегодня объем мирового рынка этанола оценивается в 50 млрд. л/год, из которых около 60% используется как добавка к моторному топливу. В последние годы процесс получения биоэтанола предполагает использование возобновляемого целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) с последующей его конверсией в целевой продукт [1-2]. Одной из проблем использования ЦСС для получения биотоплива является присутствие в этих источниках возобновляемой биомассы природных ингибиторов, останавливающих эффективное функционирование клеток [3]. Возникает необходимость преодоления этого ингибирующего воздействия на используемые продуценты биоэтанола. В свете этого актуальной является разработка и применение гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток (ИК), обладающих повышенной резистентностью к воздействию негативных факторов [4].

Усовершенствованием организации процесса получения биоэтанола является применение продуцентов, способных осуществлять конверсию не только гексоз, но и пентоз в целевой продукт. Генно-модифицированные штаммы микроорганизмов, на получение которых было направлено большое количество научных проектов с целью получения такого рода продуцентов, не востребованы производством, по целому ряду причин. Среди которых необходимость введения индукторов в среды для биосинтеза необходимых ферментов

тов, антибиотиков для подавления аборигенной микрофлоры, решение вопросов по утилизации биомассы генно-модифицированных клеток. В связи с этим огромен интерес к природным штаммам-продуцентам, чье применение в этой области биотехнологии становится очень актуальным. В качестве таких клеток могут применяться природные (генетически немодифицированные) штаммы мицелиальных грибов родов *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fuzarium* и *Micor*, способные осуществлять конверсию различных сахаров, в том числе и пентоз (ксилозы и арабинозы), в этанол [5-6].

Таким образом, данная работа была направлена на реализацию процесса получения биоэтанола из различных ферментативных гидролизатов целлюлозосодержащего сырья под действием биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток мицелиальных грибов и дрожжей.

В работе в качестве продуцента этанола использовались клетки мицелиального гриба *Micor circinelloides* F 1627 и клетки термотolerантных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* T2.

Иммобилизацию клеток мицелиальных грибов и дрожжей в криогель поливинилового спирта проводилась согласно ранее разработанным способам, соответствующим разным типам клеток [7-8].

Ферментативный гидролиз ЦСС осуществлялся комплексом целлюлаз, включающим эндо-экзоглюканазы и β -глюказидазу и секреируемым иммобилизованными клетками мицелиального гриба *Aspergillus terreus*, в течение 24-48 ч при 50°C. Гидролизаты содержали 0,2 г/л ампицилина и были приготовлены на основе 0,1 М натрий ацетатного буфера, pH -5,0.

Таблица 1. Брожение ферментативных гидролизатов различного ЦСС ИК дрожжей *S. cerevisiae* T2 при 42°C

| Ферментативный гидролизат | Исходная концентрация глюкозы, г/л | Этанол, г/л | Выход, % |
|---------------------------|------------------------------------|-------------|----------|
| Рисовой соломы | 19,9±0,4 | 9,1±0,2 | 90,0±1,0 |
| Свекловичного жома | 13,0±0,2 | 6,0±0,1 | 90,5±0,5 |
| Пергамента | 23,0±0,5 | 10,7±0,1 | 91,0±1,0 |
| Пшеничной соломы | 24,0±0,3 | 11,2±0,1 | 92,0±1,0 |
| Сосновых опилок | 49,3±1,4 | 21,5±0,3 | 85,0±2,0 |
| Осиновых опилок | 26,6±1,2 | 10,9±0,3 | 80,0±2,5 |
| Березовых опилок | 15,2±0,6 | 6,7±0,2 | 87,0±1,5 |
| Дубовых опилок | 14,6±1,0 | 6,4±0,4 | 86,0±1,0 |
| Тростниковой багассы | 18,5±0,3 | 8,5±0,2 | 90,0±0,5 |
| Стеблей топинамбура | 23,0±0,7 | 10,6±0,1 | 90,0±0,5 |

Таблица 2. Характеристики процесса получения биоэтанола из ферментативных гидролизатов ЦСС под действием свободных и ИК мицелиального гриба *Mucor circinelloides*

| Ферментативный гидролизат ЦСС | Концентрация ВС, г/л | Свободные клетки | | ИК | |
|-------------------------------|----------------------|------------------|----------|-------------|----------|
| | | Этанол, г/л | Выход, % | Этанол, г/л | Выход, % |
| Пшеничной соломы | 42,0±0,5 | 9,0±0,4 | 42,0±1,0 | 13,1±0,2 | 61,0±0,5 |
| Сосновых обессмоленных опилок | 60,0±2,0 | 11,0±1,0 | 36,0±2,0 | 13,5±0,5 | 44,0±2,0 |
| Свекловичной багассы | 36,0±1,0 | 8,0±0,4 | 43,0±0,5 | 9,7±0,3 | 53,0±0,5 |
| Кукурузных стеблей | 46,0±2,0 | 10,6±0,2 | 45,0±1,0 | 13,8±0,5 | 58,0±1,0 |
| Рисовой соломы | 40,0±1,0 | 10,5±0,3 | 51,0±1,0 | 14,0±0,1 | 68,0±1,0 |
| Осиновых опилок | 54,0±2,0 | 6,0±0,5 | 21,0±2,0 | 13,0±0,3 | 46,0±2,0 |

Концентрация сахаров в различных средах определялась методом жидкостной хроматографии высокого давления (хроматограф Agilent 1100 с амперометрическим детектором, США), с применением анионообменного носителя Dionex CarboPak PA-20. Раствор 7,5 мМ NaOH применялся в качестве элюента. Концентрация этанола определялась методом газовой хроматографии на хроматографе «Кристаллокс 4000 М» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД). В качестве газа-носителя использовался азот. Температура термостата-колонок была 190°C, детектора и испарителя по 240 и 260°C, соответственно.

Изучалась возможность конверсии глюкозы, содержащейся в различных отходах промышленности и сельского хозяйства после их ферментативной обработки, для получения этанола ИК термотолерантных дрожжей (табл. 1).

Было показано, что во всех протестированных образцах ферментативных гидролизатов ЦСС разработанный биокатализатор в виде ИК термотолерантных дрожжей успешно функционировал, обеспечивая выход целевого продукта, превышающий 80%. Максимальная концентрация этанола (21,5 г/л) была получена в пробах при использовании в качестве субстрата ферментативного гидролизата сосновых опилок. При этом выход этанола от теоретически возможного уровня составил 85 %. Максимальный выход этанола был в случае использования в качестве субстрата гидролизата пшеничной соломы (92,0 %), это означало, что практически вся глюкоза была конвертирована

непосредственно в целевой продукт.

Как и в случае с ИК дрожжей, для биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток мицелиального гриба были проведены исследования по конверсии ферментативных гидролизатов различного ЦСС в этанол (табл. 2). В качестве контроля эффективности функционирования ИК использовались нативные клетки мицелиального гриба *M. circinelloides*. Следует отметить, что в полученных ферментативных гидролизатах ЦСС помимо глюкозы содержались ксилоза и арабиноза, поэтому выход этанола рассчитывался исходя из концентрации всех восстанавливющих сахаров (ВС), содержащихся в ферментативных гидролизатах ЦСС.

Сравнительный анализ эффективности функционирования свободных клеток и биокатализатора на основе ИК мицелиального гриба *M. circinelloides* в процессе получения этанола показал, что концентрация накапливающегося целевого продукта при использовании ИК за один и тот же период времени в 1,2-2,2 раз выше (табл. 2), чем у свободных.

Таким образом, была показана высокая эффективность получения биоэтанола из разнообразных отходов промышленности и сельского хозяйства с использованием биокатализаторов на основе клеток дрожжей и мицелиальных грибов, иммобилизованных в криогель ПВС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (контракт № 11-04-93002 Вьет_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nigam P.S. Production of liquid biofuels from renewable resources / Nigam P.S., Singh A // Progr Energ Combust Sci, 2011. - V. 37. - P. 52-68.
2. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review // Energ Convers Manag, 2011. - V. 52. - P. 858-875.
3. Palmqvist E. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II. inhibitors and mechanisms of inhibition / Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B. // Bioresour Technol, 2000. - V. 74. - P. 25–33.
4. Биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов в процессах получения биоэтанола и биобутанола. / Ефременко Е.Н. [и др.] // Катализ в промышленности, 2010. - Т. 5. - С. 70-76.
5. Millati R. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. / Millati R., Edebo L., Taherzadeh M.J. // Enz Microb Technol, 2005. - V.36. - P. 294-

300.

6. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. / Sues A. [et al] // FEMS, 2005. -V.5. - P. 669–676.

7. Иммобилизованный биокатализатор, способ его получения и способ получения молочной кислоты с использованием этого биокатализатора / Ефременко Е.Н. [и др.] // Патент РФ на изобретение № 2253677, 2002.

8. Способ получения иммобилизованного биокатализатора и биокатализатор для производства спиртосодержащих напитков. // Ефременко Е.Н. [и др.]. // Патент РФ на изобретение № 2322499, 2008.

□Авторы статьи:

Степанов

Николай Алексеевич,
канд. техн. наук, младший научный
сотрудник (Институт биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля РАН)

Email: baltazar8181@mail.ru

Сенько

Ольга Витальевна,
научный сотрудник каф.
химической энзимологии МГУ,
младший научный сотрудник Инсти-
тута биохимической физики им.
Н.М. Эмануэля РАН
Email:senko@enzyme.chem.msu.ru;

Ефременко

Елена Николаевна,
докт.биол.наук, проф., зав. лаб.
«Экобиокатализа» каф. химической
энзимологии МГУ, в.н.с. Института
биохимической физики им. Н.М.
Эмануэля РАН
Email:elena_efremenko@list.ru,

УДК 579.66

О.В. Сенько, Н.А.Степанов, О.В. Маслова, И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко

РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

В настоящее время разработка энерго- и ресурсосберегающих технологий для целей химической отрасли является весьма актуальной. Частным случаем таких технологий является использование микроорганизмов – продуцентов коммерчески значимых продуктов для трансформации различных отходов пищевой, деревообрабатывающей промышленности и сельского хозяйства.

Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов в различных процессах весьма привлекательно благодаря возможному значительному увеличению длительности использования одной и той же биомассы продуцента, повышению устойчивости клеток к негативным факторам, упрощению стадии отделения биомассы от культуральной жидкости [1].

Фумаровая кислота нашла широкое применение в различных областях: в пищевой промышленности в качестве регулятора кислотности, в медицине при лечении псориаза, для получения янтарной и яблочных кислот, в химической промышленности для получения различных полиэфиров, алкидных смол, пластификаторов. В настоящее время промышленный синтез фумаровой кислоты происходит с участием малениновой кислоты и катализаторов в водных растворах при низких значениях pH. Альтернативой такому методу получения может служить биотехнологический способ, осуществляемый путем трансформации углеводсодержащих субстратов (моносахаров) в фумаровую кислоту под действием мицелиальных грибов рода *Rhizopus*. Использование в качестве субстратов целлюлозосодержащих отходов дерев-

вообрабатывающей промышленности и сельского хозяйства должно обеспечить улучшение экономической и экологической составляющих процесса получения конечного продукта.

Данная работа была направлена на реализацию процесса получения фумаровой кислоты из различных ферментативных гидролизатов целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) под действием биокатализатора в виде иммобилизованных клеток мицелиального гриба *Rhizopus oryzae*.

Материалы и методы

В работе в качестве продуцента фумаровой кислоты использовался мицелиальный гриб *R. oryzae* F - 1032(ВКПМ).

Биокатализатор в виде иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* был получен согласно ранее разработанной методике [2].

Ферментативные гидролизаты ЦСС (100 г с.в./л) получены путем обработки измельченной пшеничной соломы и осиновых опилок коммерческими препаратами целлюлаз (Sigma, США) в расчете 6 мг/г субстрата в течение 48 ч при 55°C.

Концентрация глукозы в них определялась с использованием стандартного набора реагентов (Импакт, Россия).

Концентрацию фумаровой кислоты, накапливающейся в среде, определяли с использованием набора стандартных реагентов (Abcam, Англия).

Концентрация внутриклеточного АТФ в иммобилизованных клетках *R. oryzae* определялась биolumинесцентным люциферин-люцеферазным методом, описанным ранее [3].