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 приминение 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 направленно 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, антибиотиков для подавления аборигенной микрофлоры, решение вопросов по утилизации биомассы генно-модифицированных клеток. В связи с этим огромен интерес к природным штаммам-продуцентам, чьё 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 *Mucor*, 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 *Mucor circinelloides* F 1627 и клетки термотолерантных 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-глюкозидазу и секретируемым иммобилизованными клетками мицелиального гриба *Aspergillus terreus,* в течение 24-48 ч при 50°С. 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°С

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 Agilend 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 «Кристалюкс 4000 М» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД). В качестве газа-носителя использовался азот. Температура термостата-колонок была 190°С, детектора и испарителя по 240 и 260°С, 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 ферментализатов ЦСС. разработанный биокатализатор в виде ИК термотолерантых 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 ферментализатов различного ЦСС в этанол (табл. 2). В качестве контроля эффективности функционирования ИК использовались нативные клетки мицелиального гриба *M. circinelloides.* Следует отметить, что в полученных ферментализатах ЦСС помимо глюкозы содержались ксилоза и арабиноза, поэтому выход этанола рассчитывался исходя из концентрации всех восстанавливающих 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 Института 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 малеиновой 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 деревообрабатывающей 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°С.

Концентрация глюкозы 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 биолюминесцентным люциферин-люцеферазным методом , описанным ранее [3].