

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. Имобилизованный 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](mailto: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](mailto: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](mailto:elena_efremenko@list.ru),

УДК 579.66

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

## РЕСУРСОБЕРЕГАЮЩАЯ 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 углеводосодержащих субстратов (моносахаров) в фумаровую кислоту под действием мицелиальных грибов рода *Rhizopus*. Использование в качестве субстратов целлюлозосодержащих отходов дере-

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).

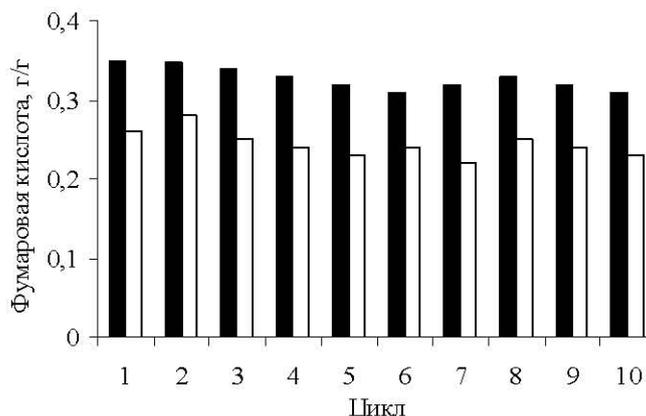
Биокатализатор в виде иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* был получен согласно ранее разработанной методике [2].

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

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

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

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



Накопление фумаровой кислоты в средах с ферментативными гидролизатами различного растительного сырья: ■ - пшеничной соломы, □ – осиновых опилок.

### Результаты и обсуждения

Для исследования возможности трансформации ферментативных гидролизатов ЦСС в качестве субстрата использовалась пшеничная солома и опилки осины, представляющие собой отходы сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности. Концентрация глюкозы в них составляла, соответственно, для пшеничной соломы составила  $34,8 \pm 0,1$  г/л, а для осиновых опилок –  $39,7 \pm 0,1$  г/л.

Культивирование иммобилизованных клеток *R. oryzae* осуществлялось при  $32^\circ\text{C}$  и использовании концентрации биокатализатора в питательной среде равной 65 г/л. Продолжительность цикла культивирования иммобилизованных клеток 48ч, после этого биокатализатор в отделялся от культуральной жидкости и в реактор с иммобилизованными клетками *R. oryzae* подавалась свежая питательная среда (ферментативные гидролизаты) аналогичного состава (рис.).

Общая продолжительность культивирования иммобилизованных клеток *R. oryzae* составила 480 ч. За время использования биокатализатора было отмечено снижение его продуктивности на  $11,4 \pm 0,2\%$ . По окончании каждого цикла контролировалась концентрация внутриклеточного АТФ в иммобилизованных клетках, как одного из показателей, свидетельствующих об их физиологиче-

ском состоянии. Было установлено, что уровень данного параметра колебался в пределах одного порядка, что подтверждало уровень метаболической активности иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* на протяжении всего процесса использования для получения фумаровой кислоты из ферментативных гидролизатов ЦСС. Более низкие концентрации накапливающегося конечного продукта были отмечены при использовании в качестве субстрата осиновых опилок (рис.).

Как видно из таблицы, полученные в данной работе результаты по выходу фумаровой кислоты соответствуют лучшим мировым аналогам, однако использование продуцента в иммобилизованном виде для трансформации гидролизатов ЦСС позволяет более, чем в 2 раза (в зависимости от источника сырья) увеличить срок использования клеток мицелиального гриба *R. oryzae*, взятых не в свободном, а в иммобилизованном виде.

Таким образом, была продемонстрирована возможность использования иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* для реализации ресурсосберегающего процесса получения фумаровой кислоты из ферментативных гидролизатов ЦСС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (программа фундаменталь-

Таблица. Основные характеристики процесса получения фумаровой кислоты из ферментативных гидролизатов ЦСС

Клетки	Сырье	Максимальный выход фумаровой кислоты, г/г субстрата	Длительность применения, ч	Ссылка
<i>R. oryzae</i>	Навоз, содержащий включения ЦСС	0,31	90	[4]
<i>R. arrhizus</i>	Древесина эвкалипта	0,35	230	[5]
<i>R. formosa</i>	Жом маниоки	0,22	24	[6]
<i>R. oryzae</i> (генно-модифицированный штамм)	Кукурузная солома	0,35	120	[7]
<i>R. oryzae</i> (иммобилизованные)	Пшеничная солома, осиновые опилки	0,35	480	Данная работа

ных исследований №3 «Энергетические аспекты переработки ископаемого и возобновляемого глеродсодержащего сырья»).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. *Rhizopus oryzae* fungus cells producing L(+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycelium. / Efremenko E.N. [et al] // Appl Microb Biotech, 2006. - V.72. - P.480-485.
4. Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material – dairy manure – using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 / Liao W. [et al] // Bioresour Technol, 2008. - V. 99. - P. 5859–5866.
5. Fermentative production of fumaric acid from *Eucalyptus globulus* wood hydrolyzates / Rodríguez-López. [et al] // J Chem Technol Biotech, 2012. - V. 87. - P. 1036–1040.
6. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse / Carta F.S. [et al] // Bioresour Technol, 1999. - V. 68. - P. 23–28.
7. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. / Xu Q. [et al] // Bioresour Technol, 2010. - V. 101. - P. 6262-6266.

□ Авторы статьи:

Сенько  
Ольга Витальевна,  
научный сотрудник каф. химической  
энзимологии МГУ, мл. научн. сотр.  
Института биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля РАН  
Email:senko@enzyme.chem.msu.ru

Степанов  
Николай Алексеевич,  
канд.техн.наук, младший научный  
сотрудник (Институт биохимической  
физики им. Н.М. Эмануэля РАН)  
Email: [baltazar8181@mail.ru](mailto:baltazar8181@mail.ru)

Лягин Илья Владимирович,  
к.х.н., старший научный сотрудник  
каф. химической энзимологии МГУ  
Email: [lyagin@mail.ru](mailto:lyagin@mail.ru)

Маслова  
Ольга Васильевна,  
младший научный сотрудник каф.  
химической энзимологии МГУ  
Email: [olga-still@mail.ru](mailto:olga-still@mail.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](mailto:elena_efremenko@list.ru)

УДК 579.695

Ф. Т. Мамедова, А.Б. Никольская, Е.Н. Ефременко

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В настоящее время биомасса микроводорослей представляет большой интерес как один из ценных источников возобновляемого сырья для получения различных коммерчески значимых продуктов, используемых в химической, нефтехимической и пищевой промышленности [1]. Для культивирования микроводорослей обычно используют синтетические минеральные среды. Однако при использовании таких сред себестоимость получаемой биомассы оказывается достаточно высокой, поскольку требует использования различных реактивов, их взвешивания, растворения, транспортировки к месту наращивания микроводорослей. Одним из способов удешевления производства является комплексное использование полученной биомассы, ее глубокая трансформация в

различные конечные продукты. Другим способом повышения экономической эффективности представляется выращивание клеток на сточных водах, загрязненных различными соединениями, способными выполнять роль биогенов для микроводорослей. Это позволит удешевить питательную среду и решить проблему очистки сточных вод и накопления целевой биомассы. В этой связи актуальна разработка методов культивирования микроводорослей как концентраторов биогенных элементов, содержащихся в сточных водах.

Целью данной работы являлось исследование возможности использования сточных вод для накопления биомассы микроводорослей на примере зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* С-1.