

- line cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases // *Bioresource Technol.* 1995. Vol. 52. P. 119.
2. Скомаровский А.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н. и др. Гидролитическая способность ферментных препаратов из грибов родов *Penicillium* и *Trichoderma* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 210.
  3. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. и др. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674.
  4. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D. et al. Evaluation of novel fungal cellulases for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. Vol. 37. P. 175.
  5. Kurabi A., Berlin A., Gilkes N. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas fir by novel and commercial funded celluloses // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005. Vol. 121–124. P. 219
  6. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: Автореф. канд. дис... канд. хим. наук, М.: МГУ, 2006.
  7. Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н. и др. Рекомбинантная эндо- $\beta$ -1,4-ксилаза *Penicillium canescens* // *Биохимия* 2003. Т. 68. Вып. 1. С. 1631.
  8. Пат. 2288267 (РФ). 2006.
  9. Aslanidis C., de Jong J.P. // *Nucl. Acids Research.* 1990. Vol. 18. P. 6069.
  10. Sambrook J., Russell D. 3<sup>d</sup> ed. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  11. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // *Curr. Genet.* 1995. Vol. 28. P. 474.
  12. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 30.
  13. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В. и др. Выделение и свойства грибных  $\beta$ -глюкозидаз // *Биохимия*, 2009. Т. 74. Вып. 5. С. 699.
  14. Березин К.В., Рабинович М.Л., Синицын А.П. // *Биохимия*. 1977. Т. 42. № 9. С. 1631.

УДК 663.1 + 547.262 + 547.264

## БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССАХ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА И БИОБУТАНОЛА

© 2010 г. Е.Н. Ефременко<sup>1,2</sup>,  
Н.А. Степанов<sup>1,2</sup>,  
А.Б. Никольская<sup>2</sup>,  
О.В. Сенько<sup>1</sup>, О.В. Спиричева<sup>1</sup>,  
С.Д. Варфоломеев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

### Введение

Иммобилизация клеток микроорганизмов означает любое ограничение свободы перемещения их в пространстве, достигаемое применением разных носителей для клеток. Иммобилизация позволяет создавать и поддерживать высокие концентрации клеток в реакционных средах при биотехнологических процессах, повышать их скорости, а также

стабильность функционирования клеток, многократно и продолжительно использовать их, переходить к организации непрерывных технологических процессов [1]. Применение биокатализаторов иммобилизованных форм клеток микроорганизмов в разных процессах получения биотоплив — инновационный подход к решению задач по интенсифика-

ции и повышению экономической и экологической привлекательности уже существующих производств [2]. Известно, что стабильность действия гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов (бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов) сохраняется и после их длительного хранения [3].

Огромные природные запасы возобновляемого органического сырья, содержащего целлюлозу, а также большие объемы отходов сельского хозяйства и промышленности создают предпосылки для разработки и использования технологий получения биотоплив на их основе. Известно, что обязательная физико-химическая предобработка целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) приводит к тому, что в получаемых средах содержится фурфурол, фенольные производные, танины, уксусная кислота, терпены и другие вещества [4], ингибирующие каталитическую активность суспензионных клеток дрожжей и снижающие продуктивность получения этанола в целом. В этой связи интерес к использованию биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток дрожжей, обладающих повышенной резистентностью к воздействию негативных факторов, крайне высок [5–8].

Известно, что дрожжи, традиционно используемые для конверсии в этанол моносахаридов, содержащихся в гидролизатах разного ЦСС, не способны превращать в целевой продукт пентозы (ксилозу и арабинозу), часто присутствующие в больших концентрациях (до 20 г/л) в обрабатываемых клетками средах. Показано, что для конверсии в этанол пентоз наряду с моносахаридами могут применяться мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Mucor* и *Rhizopus*,

однако известно, что они крайне чувствительны к накапливаемому в среде этанолу [9, 10], и его концентрация 45 г/л вызывает практически полное ингибирование ферментационного процесса.

В настоящее время бутанол производится из нефти гидролизом галогеналканов или гидролизом и гидратацией алкенов. Однако, в связи с растущим интересом к биотопливам из возобновляемых источников энергии, большой интерес представляет производство бутанола биотехнологическим способом. Ферментация сахаров клетками рода *Clostridium* с образованием смеси растворителей «ацетон-бутанол-этанол» (АБЭ) известна давно, но ее промышленная реализация лимитирована тем, что концентрация 1–2 % бутанола, накапливающегося в среде, существенно ингибирует метаболизм клеток [11, 12]. В этой связи большой интерес представляет использование продуцирующих бутанол клеток в иммобилизованном виде, обеспечивающем их высокую стабильность к целевому продукту [13, 14].

В работе исследовалась возможность использования нового биокатализатора на основе клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ph.v. *bayanus*, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта (ПВС) [15], для получения этанола из ферментативно обработанных отходов сельского хозяйства и промышленности. Для сравнения в аналогичных условиях процесс получения целевого метаболита проводился с использованием свободных клеток той же культуры. Также исследовалась эффективность применения нового биокатализатора, разработанного на основе клеток мицелиальных грибов, иммобилизованных в криогель ПВС [16], для получения этанола из ферментализатов ЦСС в сравнении со свободными клетками тех же культур. Кроме того, изучалось влияние иммобилизации клеток *Clostridium acetobutylicum* в криогель ПВС на продуктивность их по биобутанолу.

Выбор криогеля ПВС в работе для создания биокатализаторов был не случайным, и продиктован тем, что именно этот носитель оказался одним из лучших для иммобилизации клеток микроорганизмов, успешно использованных в разнообразных биотехнологических процессах [17–21].

## Материалы и методы

Использовались мицелиальные грибы *Mucor circinelloides* ВП 4-26 un 20, *Rhizopus oryzae* NNRL-395, *Fusarium oxysporum* 11 dn1, *Aspergillus terreus* ю4a1, ко-

**Ефременко Е.Н.** – докт. биол. наук, вед. науч. сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1/11). Тел.: (495) 939-31-70. E-mail: elena\_efremenko@list.ru.

**Варфоломеев С.Д.** – докт. хим. наук, профессор, член-корр. РАН, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4). Тел.: (499) 137-64-20; (495) 939-35-89. E-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru.

**Степанов Н.А.** – канд. тех. наук, мл. науч. сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-31-70. E-mail: baltazar8181@mail.ru.

**Сенько О.В.** – мл. науч. сотрудник той же кафедры. Тел.: (495) 939-31-70. E-mail: senko@enzyme.chem.msu.ru.

**Никольская А.Б.** – аспирант Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Тел.: (495) 939-31-70. E-mail: anickolskaya@mail.ru.

**Спиричева О.В.** – канд. хим. наук, мл. науч. сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-31-70. E-mail: olga-still@mail.ru.

торые поддерживались на агаризованной среде состава: глюкоза — 20 г/л,  $MgSO_4$  — 0,2 г/л,  $CaCO_3$  — 0,2 г/л, картофель — 200 г, агар — 20 г/л (рН 6,8). Для наращивания спор грибную культуру высевали на чашки Петри и матрацы с агаризованной средой. После образования спор чашки Петри и матрацы хранили при +4 °С.

Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ph.v. *bayanus* (Zymasil Killer) (АЕВ-group) хранили при 4—8 °С на агаризованной полусинтетической среде. Для накопления дрожжевой биомассы использовали жидкую питательную среду состава, г/л: глюкоза — 10; дрожжевой экстракт — 2,0; NaCl — 0,5;  $KH_2PO_4$  — 2,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,5;  $(NH_4)_2SO_4$  — 2,0.

Культивировали клетки дрожжей при 26 °С в аэробных условиях строго до конца логарифмической фазы роста при постоянном перемешивании (180 об/мин) на термостатируемой качалке (IRC-1-U фирмы «Adolf Kunner G Apparatebau», Швейцария). Полученную дрожжевую биомассу отделяли при 10000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга «Beckman 2-21», США) и затем использовали для иммобилизации в криогель ПВС.

Для получения биобутанола использовались строгие анаэробные клетки штамма *Clostridium acetobutylicum* В-1787. Накопление биомассы клеток *C. acetobutylicum* для их иммобилизации в криогель ПВС, а также культивирование иммобилизованных клеток проводилось в анаэробных условиях при 37 °С в среде состава, г/л: пептон (триптон) — 10; дрожжевой экстракт — 5; глюкоза — 25.

Иммобилизация клеток мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий в криогель ПВС проводилась согласно ранее разработанному способу, соответствующим разным типам клеток [15, 16, 21]: рН в экспериментах контролировали потенциометрически рН-метром модели PBL, Швейцария).

Концентрацию сахаров в разных средах определяли методом жидкостной хроматографии при высоком давлении (хроматограф «Agilent 1100» с амперометрическим детектором, США), используя анионообменную колонку «Dionex Carborak PA-20». Раствор 7,5-мМ NaOH применялся в качестве элюента. Для определения концентрации глюкозы в среде использовали глюкозидазный метод с применением стандартного реагента фирмы «Импакт» (Россия).

Концентрацию этанола и бутанола определяли методом газовой хроматографии на хроматографе «Кристалюкс 4000 М» с пламенно-ионизационным

детектором (ПИД). В качестве газа-носителя использовали азот. Температура термостата-колонок 190 °С, детектора и испарителя 240 и 260 °С соответственно.

## Результаты и обсуждение

**Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток дрожжей для получения биоэтанола.** Изучалась возможность конверсии сахаров, содержащихся в отходах промышленности и сельского хозяйства после их ферментативной предобработки, для получения этанола (табл. 1). При сбраживании аналогичных субстратов, например, тростникового жома, пшеничной соломы и бумажных отходов, зарубежными специалистами отмечался 50—80 % выход этанола для свободных клеток дрожжей [22—24], что значительно меньше достигнутого в этом исследовании при использовании как свободных, так и иммобилизованных клеток. Аналогичной информации в отношении иммобилизованных клеток дрожжей в литературе по конверсии исследованных субстратов обнаружено не было, а это значит, что данные виды сырья впервые были обработаны подобным биокатализатором.

Было показано, что во всех протестированных

Таблица 1

**Концентрация, г/л, (числитель) и выход, %, (знаменатель) этанола от теоретически возможного уровня в результате конверсии моносахаридов, содержащихся в ферментализатах отходов сельского хозяйства и промышленности, иммобилизованными в криогель ПВС (А) и свободными клетками дрожжей *S. bayanus* (Б)**

| Субстрат               | $C_{\text{исх. субстр.}}$<br>г сух. в-ва/л | $T_{\text{процесс.}}$<br>°С | Этанол    |           |
|------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|
|                        |                                            |                             | А         | Б         |
| Отходы переработки сои | 265                                        | 24                          | 53,7/90,3 | 50,5/85,0 |
| Тростниковый жом       | 50                                         | 90                          | 9,0/95,1  | 8,7/92,0  |
| Пергамент              | 50                                         | 90                          | 10,8/94,9 | 10,3/91,9 |
| Пшеничная солома       | 50                                         | 90                          | 11,7/92,6 | 11,1/87,8 |
| Свекловичный жом       | 50                                         | 96                          | 15,0/82,9 | 8,2/45,3  |
| Кукурузная кочерыжка   | 50                                         | 24                          | 8,6/98,3  | 7,6/87,4  |

Таблица 2

**Концентрации этанола, накапливающиеся в процессе конверсии различных сахаров (45 г/л) в этанол за 48 ч под действием свободных (числитель) и иммобилизованных (знаменатель) клеток гриба *Mucor circinelloides***

| Сахара    | Концентрация этанола, г/л | Сахара     | Концентрация этанола, г/л |
|-----------|---------------------------|------------|---------------------------|
| Арабиноза | 1,9/7,2                   | Рафиноза   | 2,3/4,0                   |
| Галактоза | 2,2/3,4                   | Рибоза     | 3,4/16,5                  |
| Глюкоза   | 4,0/16,0                  | Сахароза   | 2,8/4,1                   |
| Ксилоза   | 1,6/2,3                   | Фруктоза   | 6,4/14,3                  |
| Мальтоза  | 3,7/5,7                   | Целлобиоза | 3,8/12,7                  |

образцах ферментализатов сырья степень конверсии сахаров в этанол под действием иммобилизованных клеток дрожжей выше, чем в случае свободных клеток. При этом разработанный биокатализатор в виде иммобилизованных клеток успешно функционировал в разных средах, обеспечивая выход целевого продукта, превышающий 90 % (см. табл. 1).

Отметим, что отходы сои используются, в основном, для производства биодизельного топлива [25]. В литературе данных по использованию отходов, остающихся при переработке соевых бобов, для производства топливного этанола, не обнаружено. Таким образом, впервые было показано, что разработанный биокатализатор на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток дрожжей может успешно применяться для получения этанола из гидролизатов сои, остающихся в качестве отхода производства на заводах по производству пищевого соевого белка, при этом может быть получена концентрация этанола в 5–10 раз выше по сравнению с другими источниками сырья (табл. 1).

Несмотря на интенсивные исследования, которые ведутся во всем мире в поисках путей интенсификации производства этанола и снижения его себестоимости, только в очень узком перечне работ [26–29] обсуждается возможность промышленного использования иммобилизованных клеток в таких процессах, что связано с отсутствием практически значимых образцов биокатализаторов на современном мировом рынке. Более того, сегодня возможность использования иммобилизованных клеток дрожжей для получения этанола обсуждается более в отношении крахмалосодержащего сырья [26–28, 30] и лактозосодержащих отходов [29, 31], а не ЦСС, поскольку последний источник сахаров считается трудно обрабатываемым и содержащим большее количество веществ, способных негативно воздей-

ствовать на клетки. В этой связи разработанный и исследованный биокатализатор на основе иммобилизованных клеток дрожжей может представлять большой практический интерес.

**Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток мицелиальных грибов для получения биоэтанола.** Первоначально была исследована возможность применения клеток мицелиальных грибов, иммобилизованных в криогель ПВС, в процессах трансформации сахаров в этанол. Сравнительный анализ эффективности функционирования свободных клеток и биокатализатора на основе иммобилизованных клеток мицелиального гриба *Mucor circinelloides* в процессе конверсии сахаров в этанол показал, что концентрация накапливающегося целевого продукта при использовании иммобилизованных клеток за одно и то же время в 1,4–4,8 раз выше (табл. 2), чем при использовании свободных клеток. Была установлена возможность многократного задействования одних и тех же иммобилизованных клеток грибов для сбраживания разных индивидуальных сахаров в периодическом режиме, при этом продуктивность биокатализаторов не изменялась, по крайней мере, пять рабочих циклов (по 24 ч).

Исследовалась возможность применения биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток мице-

Таблица 3

**Концентрация, г/л, основных моносахаридов в ферментализатах образцов ЦСС**

| ЦСС              | Глюкоза | Арабиноза | Ксилоза |
|------------------|---------|-----------|---------|
| Пшеничная солома | 24,0    | –         | 5,2     |
| Пергамент        | 23,0    | –         | 4,2     |
| Свекловичный жом | 13,0    | 10,4      | 0,2     |
| Тростниковый жом | 18,5    | 2,9       | 6,1     |

Таблица 4

**Использование свободных (числитель) и иммобилизованных (знаменатель) в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов для получения этанола из ферментативно предобработанных образцов ЦСС**

| ЦСС, мицелиальный гриб                        | Глюкоза*, г/л | Этанол   |                         |
|-----------------------------------------------|---------------|----------|-------------------------|
|                                               |               | С, г/л   | Выход, % от теор. возм. |
| Тростниковый жом, <i>Mucor circinelloides</i> | 18,5          | 3,9/11,0 | 41,5/117,0              |
| Пшеничная солома, <i>Mucor circinelloides</i> | 24            | 0,4/9,0  | 3,2/73,5                |
| Свекловичный жом, <i>Mucor circinelloides</i> | 13            | 6,9/9,1  | 104,1/137,3             |
| Пергамент, <i>Rhizopus oryzae</i>             | 23            | 1,4/9,1  | 11,9/77,6               |

\* В среде после ферментативной переработки ЦСС.

мицелиальных грибов для конверсии сахаров в ферментализатах сельскохозяйственных отходов, состав которых указан в табл. 3. Было установлено, что в результате конверсии сахаров, присутствующих в исследуемых средах, под действием свободных и иммобилизованных клеток мицелиальных грибов накапливается этанол. В случае применения биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток концентрация этанола до 22,5 раз (в зависимости от штамма и используемого исходного сырья) превышает результаты, полученные в тех же средах с использованием свободных клеток мицелиальных грибов (табл. 4).

Выходы этанола в средах, представляющих ферментализаты свекловичного и тростникового жома, рассчитанные по концентрации конвертируемой глюкозы, превысили 100 %-ный теоретически возможный уровень (см. табл. 4). Очевидно, что превышения ожидаемых концентраций этанола появились именно в этих средах за счет конверсии в этанол пентоз, преимущественно арабинозы, что согласуется с данными табл. 3.

Как и в случае с иммобилизованными клетками дрожжей (см. табл. 1), для биокатализаторов на основе разных иммобилизованных клеток мицелиальных грибов были проведены исследования конверсии отходов переработки сои в этанол (табл. 5). Исходный образец сырья содержал сахарозу, стахиозу, раффинозу, фруктозу и галактозу. Ввиду высокой вязкости исходных растворов для конверсии сахаров в этанол их разбавляли водой до конечной суммарной концентрации сахаров в среде 50 г/л перед внесением иммобилизованных клеток мицелиальных грибов.

Как и в других экспериментах, лучшие показатели конверсии сахаров в этанол были у биокатализатора, полученного на основе клеток *Mucor circinelloides*, обеспечивающего практически 90 %-ный

Таблица 5

**Конверсия сахаров, содержащихся в отходах переработки сои в этанол под действием иммобилизованных клеток мицелиальных грибов в течение 96 ч**

| Иммобилизованные клетки мицелиальных грибов | Этанол, г/л |
|---------------------------------------------|-------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i>                   | 9,3±0,5     |
| <i>Mucor circinelloides</i>                 | 23,4±1,0    |
| <i>Aspergillus terreus</i>                  | 10,9±0,3    |

выход целевого продукта в данной среде. Лучшими продуцентами биоэтанола при сравнении иммобилизованных клеток мицелиальных грибов и дрожжей следует признать последние, характеризующиеся более высокими скоростями продуцирования этанола, очевидно, вследствие повышенной их толерантности к негативным факторам, сопровождающим процесс, в частности, к накоплению целевого продукта и снижению pH среды в процессе ферментации. Однако мицелиальные грибы показали возможность использования гораздо более широкого спектра субстратов, которые могут быть конвертированы в этанол.

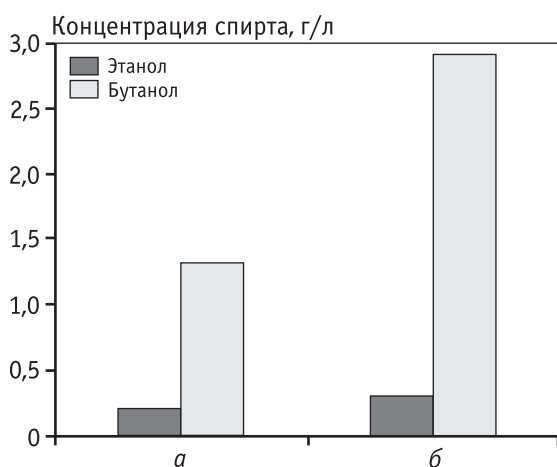
**Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток бактерий *Clostridium acetobutylicum* для получения биобутанола.** Был разработан биокатализатор на основе водород-продуцирующих анаэробных клеток бактерий *Clostridium acetobutylicum*, иммобилизованных в криогель ПВС, концентрация влажной биомассы клеток в таком биокатализаторе 10 %, а концентрация криогеля ПВС — 15 %.

АБЭ-процесс с участием биокатализатора проводили в мини-реакторе, в котором отношение объема среды к объему газовой фазы составляло 2,0.

Анализ культуральной жидкости после 72 ч работы биокатализатора на основе иммобилизованных клеток *Clostridium acetobutylicum*, показал, что в среде содержатся, г/л: ацетон — 0,95; бутанол — 2,90; этанол — 0,23; ацетат — 0,66; масляная кислота — 3,00. Сравнение этих данных с теми же характеристиками среды, полученной в аналогичных условиях, но с использованием суспензионных клеток, позволило заключить, что иммобилизация клеток и их использование в АБЭ-процессе в выбранных условиях приводит к изменениям в составе культуральной жидкости. Так концентрация бутанола, накапливающаяся за трое суток в среде культивирования иммобилизованных клеток, была в 2,5 раза выше обнаруженной в среде со свободными клетками (рисунок). Это изменение отражалось на соотношении растворителей (ацетон:бутанол:этанол), накапливающихся в среде: почти 4:12:1 вместо 3:6:1, установленного для свободных клеток той же культуры. Определение остаточной концентрации глюкозы в среде с иммобилизованными и свободными клетками показало, что в случае иммобилизованных клеток ее потребление было выше на 35 %.

Ранее авторами статей, посвященных исследованию иммобилизованных клеток рода *Clostridium* [13, 14] подобных изменений в соотношении продуцируемых растворителей отмечено не было. Видимо, полученный результат обеспечивался выбранным носителем для клеток, а также условиями их иммобилизации и использования в АБЭ-процессе.

Была показана возможность многократного использования биокатализатора на основе иммо-



Накопление спиртов свободными (а) и иммобилизованными (б) клетками бактерий *Clostridium acetobutylicum* при одинаковых условиях их 72-ч культивирования (концентрация клеток в среде 43 г/л, 37 °C)

билизированных в криогель ПВС клеток *Clostridium acetobutylicum* для получения бутанола в периодических условиях функционирования мини-реакторов. При этом не менее, чем за пять рабочих циклов по 72 ч указанное соотношение растворителей в среде практически не изменялось.

Современное развитие производства бутанола идет по пути создания и применения в АБЭ-процессе новых генетически модифицированных штаммов клеток рода *Clostridium* [32, 33], обеспечивающих получение сред с измененным соотношением накапливающихся растворителей в сторону увеличения доли бутанола. В данной работе иммобилизация клеток позволила добиться аналогичного результата с использованием для получения бутанола уже хорошо изученной бактериальной культуры, повысив эффективность ее применения — увеличив выход целевого продукта без поиска и введения в процесс новых, в том числе рекомбинантных штаммов.

## Заключение

Показана высокая эффективность получения биоэтанола из разнообразных отходов промышленности и сельского хозяйства (пшеничная солома, свекловичный и тростниковый жом, пергамент, кукурузная кочерыжка, соевые отходы) с использованием биокатализаторов на основе клеток дрожжей и мицелиальных грибов, иммобилизованных в криогель ПВС. Установлено, что иммобилизованные клетки мицелиальных грибов способны конвертировать в этанол более широкий спектр сахаров, присутствующих в обрабатываемых средах, чем дрожжи, традиционно используемые в этанольном брожении.

Для биокатализаторов, полученных на основе иммобилизованных клеток как дрожжей, так и мицелиальных грибов, в процессах получения этанола отмечены более высокие степени конверсии потребленных субстратов в целевой продукт и, соответственно, накопление более высоких концентраций этанола по сравнению со свободными клетками тех же микроорганизмов. Анализ результатов, полученных при исследовании дрожжей и мицелиальных грибов, позволил установить, что указанные тенденции в изменении характеристик процессов, проводимых с использованием иммобилизованных клеток, являются общими.

Установлено, что иммобилизация клеток, продуцирующих бутанол, позволяет устойчиво изменить соотношение между накапливающимися в среде

растворителями с увеличением доли бутанола, что может сделать промышленное получение этого целевого продукта биотехнологическим методом с использованием нового биокатализатора более привлекательным по сравнению с процессом, традиционно использующим свободные клетки бактерий.

*Данная работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 19 «Химические аспекты энергетики» и Программы перспективных направлений развития МГУ в 2010–2013 гг. ПНР-5 «Энергоэффективность, наноматериалы и бионаносистемы».*

## Литература

1. Efremenko E.N., Lyagin I.V., Senko O.V. et al. // Leading-Edge Environmental Biodegradation / Ed.L.E. Pawley. N.-Y.: Nova Science Publ. Inc., 2007. Ch.1. P. 11.
2. Варфоломеев С.Д., Ефременко Е.Н., Крылова Л.П. // Успехи химии. 2010. Т. 79.
3. Ефременко Е.Н., Татарина Н.Ю. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 3, С. 383.
4. Clark T.A. Mackie K.L. // J. Chem. Tech. Biotechnol. 1984. Vol. 34. P. 101.
5. Yu J., Zhang X., Tan T. // J. Biotechnol. 2007. Vol.129. P. 415.
6. Yu J., Zhang X., Tan T. // Biomass Bioenerg. 2009. Vol. 33. P. 521.
7. Yamashita Y., Kurosumi A., Sasaki C., Nakamura Y. // J. Biochem. Eng. 2008. Vol. 42. P. 314.
8. Liu R., Li J., Shen F. // Renew Energ. 2008, Vol. 33. P. 1130.
9. Karimi K., Emtiazi G., Taherzadeh M.J. // Enzyme Microb. Tech. 2006. Vol. 40. P. 138.
10. Karimi K., Emtiazi G., Taherzadeh M.J. // Proc. Biochem. 2006. Vol. 41. P. 653.
11. Степаненко П. // The Chem. J. 2008. P. 30.
12. Shapovalov O.I., Ashkinazi L.A. // Rus. J. Appl. Chem. 2008. Vol. 81. P. 2232.
13. Huang W., Ramey D.E., Yang S. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2004. Vol. 113–116. P. 887.
14. Lienhardt J., Schripsema J., Qureshi N., Blaschek H.P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2002. Vol. 98–100. P. 591.
15. Пат. 2322499 (РФ) Способ получения иммобилизованного биокатализатора и биокатализатор для производства спиртосодержащих напитков // Е.Н. Ефременко, Н.А. Степанов, Н.Н. Мартыненко, И.М. Грачева. 2008.
16. Пат. 2253677 (РФ) Иммобилизованный биокатализатор, способ его получения и способ получения молочной кислоты с использованием этого биокатализатора // Е.Н. Ефременко, О.В. Спиричева, С.Д. Варфоломеев, С.П. Синецкий, А.В. Байбак, В.И. Лозинский. 2005.
17. Lozinsky V.I., Plieva F.M. // Enzyme Microb. Tech. 1998. Vpl. 23. P. 227.
18. Efremenko E.N., Spiricheva O.V., Veremeenko D.V., Lozinsky V.I. // Chem. Industry. 2004. Vol. 58. P. 116.
19. Stepanov N.A., Efremenko E.N. Biocatalysis and Biocatalytic Technologies. N.-Y.: Nova Science Publ. Inc., 2006. Ch. VI. P. 67.
20. Efremenko E., Senko O., Zubaerova D. et al. // Food Techn. Biotechn. 2008. Vol. 46. P. 208.
21. Efremenko E., Lyagin I., Gudkov D., Varfolomeyev S. // Biocatalysis Biotransform. 2007. Vol. 25. P. 359.
22. Ballesteros M., Oliva J M., Negro M.J. et al. // Process Biochem. 2004. Vol. 29. P. 1843.
23. Ballesteros M., Oliva J. M., Negro M.J. et al. // World J. Microb. Biot. 2002. Vol. 18. P. 559.
24. Martín C., Galbe M., Wahlbom F. et al. // Enzyme Microb. Tech. 2002. Vol. 31. P. 274.
25. Pimentel L.D., Patzek T.W. // Nat. Res. Research. 2005. Vol. 14. P. 65.
26. Fujii, N. Oki T., Sakurai A. et al. // J. Ind. Microbiol. Biot. 2001. Vol. 27. P. 52.
27. Jamai L., Ettayebi K., Yamani J.E., Ettayebi M. // Biore-sour. Technol. 2007 Vol. 98. P. 2765.
28. Bandaru V.V.R., Somalanka S.R., Mendu D.R. et al. // Enzyme Microb. Tech. 2006. Vol. 38. P. 209.
29. Staniszewski M., Kujawski W., Lewandowska M. // J. Food Engineer. 2007. Vol. 82. P. 618.
30. Olofsson K., Bertilsson M., Liden G. // Biotechn. Biofuels. 2008. Vol. 1. P.1.
31. Staniszewski M., Kujawski W., Lewandowska M. // Food Engineer. 2009. Vol. 91. P. 240.
32. Lee S., Cho M.O., Park C.H. et al. // Energy Fuels. 2008. Vol. 22. P. 3459.
33. Lienhardt J., Schripsema J., Qureshi N., Blaschek H.P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2002. Vol. 98–100. P. 591.