

8. *Sugano M., Mashimo K., Wainai T.* // Fuel. 1999. Vol. 78. P. 945–951.
9. *Taghiei M.M., Huggins F.E., Ganguly B., Huffman G.P.* // Energy & Fuels. 1993. Vol. 7. P. 399–405.
10. *Taghiei M.M., Huggins F.E., Mahajan V., Huffman G.P.* // Energy & Fuels. 1994. Vol. 8. P. 31–37.
11. *Sugano M., Suzuki K., Ohki-Ikemizu R., Mashimo K.* // Chem. Eng. Trans. 2009. Vol. 18. P. 683–688.
12. *Sugano M., Hirano K., Mashimo K.* // Ind. Eng. Chem. Res. 2010. Vol. 49. P. 1138–1142.
13. Patent CN1778871A China / W.B. Li, G.P. Shu, K.J. Li. 2006.
14. *Zhao J., Hugging F.E., Zhen Feng, Huffman G.P.* // Clay & Clay Minerals. 1994. Vol. 42. P. 737–746.
15. *Baruah M.K., Upreti M.C., Baishya N.K., Dutta S.N.* // Fuel. 1981. Vol. 60. P. 971–974.
16. *Erdogan S., Baysal A., Akba O., Hamamci C.* // Polish J. of Environ. Study. 2007. Vol. 16. P. 671–675.
17. *Kwon S.-K., Shinoda K., Suzuki S., Waseda Y.* // Corrosion Sci. 2007. Vol. 49. P. 1513–1526.
18. *Kwon S.-K., Suzuki S., Saito M., Waseda Y.* // Corrosion Sci. 2005. Vol. 47. P. 2543–2549.
19. *Seehra M.S., Roy P., Raman A., Manivannan A.* // Solid State Comm. 2004. Vol. 130. P. 597–601.
20. *Russell J.D.* // Clay Minerals. 1997. Vol. 14. P. 109.
21. *Towe K.M., Bradley W.F.* // J. Colloid and Interface Sci. 1967. Vol. 24, P. 384–392.
22. *Fleischer M., Zhao G.Y., Kate A.* // Am. Mineral. 1975. Vol. 60. P. 485.
23. *Liaw B.J., Cheng D.S., Yang B.L.* // J. of Catal. 1989. Vol. 118. P. 312–326.
24. *Chun-Zhu Li.* Advances in the Science of Victorian Brown Coal. Elsevier, 2004. Chinese edition, 2009. 319 p.
25. *Stevenson F.J.* Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. Second ed. John Wiley & Sons: New York, 1994. 512 p.
26. *Kawahigashi M., Sumida H., Yamamoto K.* // J. Colloid and Interface Sci. 2005. Vol. 284. P. 463–469.
27. SY/T 5119-2008 (Chinese). Analysis method for fractions of rock extract and crude oil. Petroleum Industry Press: Beijing, China, 2008.

УДК 577.15 + 579.222.7 +  
+ 547.262 + 547.264

## ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ГРИБНЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ЦЕЛЛЮЛАЗ, ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ВОЗОБНОВЛЯЕМОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ

© 2013 г. **Е.Н. Ефременко**<sup>1,2</sup>,  
**Н.А. Степанов**<sup>1,2</sup>, **Д.А. Гудков**<sup>1</sup>,  
**О.В. Сенько**<sup>1</sup>, **В.И. Лозинский**<sup>3</sup>,  
**С.Д. Варфоломеев**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

<sup>3</sup> ИНЭОС РАН, г. Москва

### Введение

Широко обсуждаемый сегодня процесс получения биотоплив из возобновляемого целлюлозо-содержащего сырья [1–3] основан на конверсии моносахаридов, образующихся в результате ферментативной обработки исходного субстрата, прошедшего предварительную физико-химическую подготовку. Установлено, что наиболее эффективным является использование комплексов ферментов с различной гидролитической активностью, способных обеспечить комплексную и глубокую деструк-

цию компонентов исходного сырья с обеспечением максимального выхода моносахаров [4–5].

Наиболее эффективно действующий целлюлазный комплекс, синтезируемый и секретируемый микроскопическими грибами [6–7], как правило, содержит эндоглюканазу (EG), экзоглюканазу (СВН) и β-глюкозидазу (BG). EG расщепляет внутренние связи в молекулах целлюлозы, воздействуя на аморфные участки целлюлозных волокон. СВН атакует молекулы целлюлозы и олигосахаридов с

редуцирующего конца, последовательно отщепляя целлобиозные остатки, и действует на кристаллические участки целлюлозы. ВG гидролизует молекулы целлобиозы и растворимые олигосахариды до конечного продукта — глюкозы [8].

Именно применение комплексов целлюлаз, состоящих из ферментов трех основных указанных групп для обработки целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) позволяет достигать максимальной степени деструкции исходного субстрата. Получение полного комплекса целлюлаз при культивировании одного продуцента является более экономически привлекательным по сравнению с получением отдельных целлюлаз в процессе культивирования различных продуцентов с последующим приготовлением смеси целлюлолитических ферментов, так называемого «искусственного комплекса» [9].

Среди промышленных микробных продуцентов целлюлаз ведущую роль играют различные культуры мицелиальных грибов [10]. С использованием представителей рода *Trichoderma* [11, 12] выпускаются коммерческие препараты целлюлаз. Однако существенным недостатком этих целлюлазных комплексов является относительно низкое содержание ВG, отвечающей за конверсию промежуточных продуктов ферментативного гидролиза целлюлозы в конечный продукт — глюкозу [13].

В отличие от мицелиальных грибов рода *Trichoderma* представители рода *Penicillium* синтезируют ферментные комплексы целлюлаз более сбалансированного состава и эффективнее расщепляют целлюлозу и целлюлозосодержащие отходы, при этом индивидуальные ферменты обладают высокой операционной стабильностью [14–16].

Грибы рода *Aspergillus* осуществляют биосинтез комплексов целлюлаз с широким спектром действия [17, 18], однако активность большинства отдельных

компонентов комплекса недостаточно высока для того, чтобы использовать эти ферментативные комплексы в качестве универсальных для разного рода ЦСС.

Таким образом, интерес к различным мицелиальным грибам, продуцирующим целлюлазные комплексы, существует, и здесь универсальных ферментных препаратов нет.

Вместе с этим биосинтез ферментов при традиционном подходе к решению вопроса их биотехнологического производства сопровождается ростом клеток микроорганизмов и накоплением их биомассы в результате культивирования. Это, как правило, приводит к необходимости решения вопросов, связанных с ее утилизацией [19]. Кроме того, сам процесс накопления биомассы клеток мицелиальных грибов, продуцирующих необходимые ферменты, является достаточно продолжительным (7–14 сут) ввиду низких удельных скоростей роста, характерных именно для этих микроорганизмов [20].

Применение другого подхода к процессу получения гидролитических ферментов, основанного на многократном и длительном использовании клеток мицелиальных грибов в иммобилизованном виде в качестве биокатализатора для биосинтеза и секреции ферментов при наличии индуктора в жидкой питательной среде, привлекательно с точки зрения создания основы принципиально новых технологических решений, позволяющих существенно упростить техническую сторону процесса. В частности, иммобилизация клеток-продуцентов позволяет рассчитывать на упрощение и, следовательно, удешевление стадии отделения биомассы от культуральной жидкости, содержащей ферменты, что, в свою очередь, должно способствовать решению ряда экономических и экологических проблем, связанных с регулярным производством и утилизацией биомассы мицелиальных грибов.

Следует отметить, что в иммобилизованном виде мицелиальные грибы в промышленных процессах практически не используются, имеется лишь несколько научных работ, посвященных исследованию возможности применения иммобилизованных мицелиальных грибов для синтеза ферментов целлюлитического комплекса [21]. Причиной этому является отсутствие эффективных решений по выбору носителя, способного обеспечить длительное метаболически активное состояние иммобилизованных продуцентов целлюлаз. Для иммобилизации мицелиальных грибов известно использование методов адсорбции на нерастворимых носителях [22] или

**Ефременко Е.Н.** – д-р биол. наук, проф., зав. лаб. Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-31-70. Email: elena\_efremenko@list.ru

**Степанов Н.А.** – канд. техн. наук, мл. науч. сотрудник того же университета. Тел. тот же. Email: na\_stepanov@gmail.com

**Гудков Д.А.** – канд. хим. наук, науч. сотрудник того же университета. Тел. тот же. Email: Gudkovdenis@gmail.com

**Сенько О.В.** – науч. сотрудник того же университета. Тел. тот же. Email: senko@enzyme.chem.msu.ru

**Лозинский В.И.** – д-р хим. наук, проф., зав. лаб. ИНЭОС РАН. Тел.: (499) 135-64-92. Email: loz@ineos.ac.ru

**Варфоломеев С.Д.** – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук, проф., директор ИБХФ РАН. Тел.: (499) 137-64-20. Email: sdvarf@sky.chph.ras.ru

включения спор мицелиальных грибов в гель альгината кальция [23].

В данной работе впервые был использован криогель поливинилового спирта (ПВС) в качестве носителя для иммобилизации клеток мицелиальных грибов, являющихся продуцентами целлюлаз.

Целью данной работы была разработка и определение свойств высокоэффективных гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, обеспечивающих продуктивный биосинтез комплексов целлюлитических ферментов, способных осуществлять глубокий гидролиз различного ЦСС.

## Материалы и методы

В работе использовались мицелиальные грибы *Mucor circinelloides* F-1627, *Rhizopus oryzae* F-873, *Fusarium oxysporum* F-2313, *F. solani* F-819 *Aspergillus terreus* F-728, *A. niger* F-679, *Trichoderma atroviride* F-207, *T. harzianum* F-214, которые поддерживались на агаризованной среде следующего 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 грибные культуры высевались на чашки Петри с агаризованной средой. После образования спор культуры хранили при +4 °С.

Культивирование мицелиальных грибов проводилось при 32 °С на минимальной среде состава (г/л):  $(NH_4)_2SO_4$  — 1,4;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,3;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,0014;  $KH_2PO_4$  — 2,0;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  — 0,3;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,005;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  — 0,0016;  $CoCl_2$  — 0,02; пептон — 1,0; твин-80 — 2,0, содержащей 2 % микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в качестве источника углерода.

Иммобилизация клеток мицелиальных грибов в криогель ПВС проводилась согласно ранее разработанному способу для клеток мицелиальных грибов, осуществляющих биосинтез пектиназ [24].

Однако для получения высокоактивных образцов иммобилизованных биокатализаторов, содержащих в своем составе споры мицелиальных грибов и ПВС, в гранулы при их формировании вводили до 1 % делигнифицированных кукурузных стеблей (влажность  $68 \pm 2$  %) от общей массы.

Для получения этанола из гидролизатов ЦСС, полученных под действием целлюлаз иммобилизованных клеток грибов, в работе использовались иммобилизованные термотолерантные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* T2.

Для накопления дрожжевой биомассы использовалась питательная среда следующего состава (г/л): глюкоза — 20; дрожжевой экстракт — 5,0, триптон — 10. Культивирование клеток дрожжей проводили при 26 °С в аэробных условиях строго до конца логарифмической фазы роста при постоянном перемешивании (150 об/мин) на термостатируемой качалке (IRC-1-U «Adolf Kunner G Apparatebau», Швейцария). Полученную дрожжевую биомассу отделяли при 10000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Beckman 2-21, США) и далее использовали для иммобилизации в криогель ПВС согласно ранее разработанному способу для клеток дрожжей, осуществляющих спиртовое брожение [25].

Для получения органических растворителей (этанол, ацетон, бутанол) из гидролизатов ЦСС, полученных под действием целлюлаз иммобилизованных клеток грибов, использовались иммобилизованные клетки бактерий *Clostridium acetobutylicum* В-1787. Накопление биомассы клеток *C. acetobutylicum* для их иммобилизации в криогель ПВС проводилось в анаэробных условиях при 37 °С в среде следующего состава (г/л): пептон (триптон) — 10; дрожжевой экстракт — 5; глюкоза — 25. Состав биокатализатора был таким же, как описано ранее [26]. Перед проведением ферментации в гидролизатах ЦСС доводили рН до 7, общее содержание глюкозы — до 45 г/л и вносили питательные компоненты. Ферментацию проводили анаэробно при 37 °С в течение 96 ч.

рН в экспериментах контролировали потенциометрически (рН-метр model PBL, Швейцария).

Предобработку ЦСС осуществляли измельчением в планетарной шаровой мельнице активаторного типа в течение 5 мин (центробежное ускорение  $300 \text{ м/с}^2$  при частоте вращения барабанов 1290 об/мин). Для контроля эффективности предобработки разных образцов ЦСС проводили визуализацию частиц с использованием светового микроскопа. Достижимый размер частиц находится в диапазоне 5—80 мкм.

Делигнификацию ЦСС проводили 10 М раствором NaOH в течение 3 ч при 80 °С.

Концентрацию глюкозы в среде определяли глюкозидазным методом с применением стандартного реагента фирмы «Импакт» (Россия).

Для количественной оценки целлюлазной активности эндо-, экзо-глюканаз использовали метод, основанный на определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии целлюлаз на карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ), микрокристалли-

ческую целлюлозу. Восстанавливающие сахара определяли по модифицированному методу Шомоди-Нельсона [27].

Определение  $\beta$ -глюкозидазной активности проводилось с использованием *n*-паронитрофенил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозида (*n*-НФГ) в качестве субстрата. Метод основан на определении скорости образовавшегося *n*-нитрофенола, высвободившегося в результате каталитического действия на субстрат  $\beta$ -глюкозидазы [28].

Определение массы сухих гранул с иммобилизованными клетками проводилось по методике [29].

Концентрацию глюкозы, которую теоретически можно получить при ферментативном гидролизе ЦСС, рассчитывали, исходя из химического состава ЦСС, а именно содержания целлюлозы, определенного в работах [3, 30].

Концентрацию этанола и бутанола определяли методом газовой хроматографии на хроматографе Shimadzu (Япония) с пламенно-ионизационным детектором. В качестве газа-носителя использовали азот. Температура, поддерживаемая термостатом колонок, была 190 °С, детектора и испарителя — 200 °С.

## Результаты и обсуждение

### Биокатализаторы на основе клеток мицелиальных грибов, иммобилизованных в криогель ПВС

В ходе первичных исследований для разработки образцов иммобилизованных биокатализаторов, способных осуществлять биосинтез и секрецию целлюлаз, было отобрано три культуры мицелиальных грибов, относящихся к разным родам *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani* и *Mucor circinelloides* (рис. 1).

Три отобранных из семи исследованных природных штаммов мицелиальных грибов характеризовались присутствием в синтезируемых ими комплексах основных типов целлюлаз: EG, СВН и ВГ (см. рис. 1). Дальнейшее использование клеток трех родов мицелиальных грибов для получения биокатализаторов было необходимо для того, чтобы определить возможность различного воздействия одной и той же процедуры иммобилизации в криогель ПВС на способность клеток осуществлять биосинтез и секрецию целлюлаз. Для этого приготовленные образцы биокатализаторов помещались в среду с содержанием 1 % делигнифицированных кукурузных стеблей или 2 % березовых опилок в качестве источника углерода.

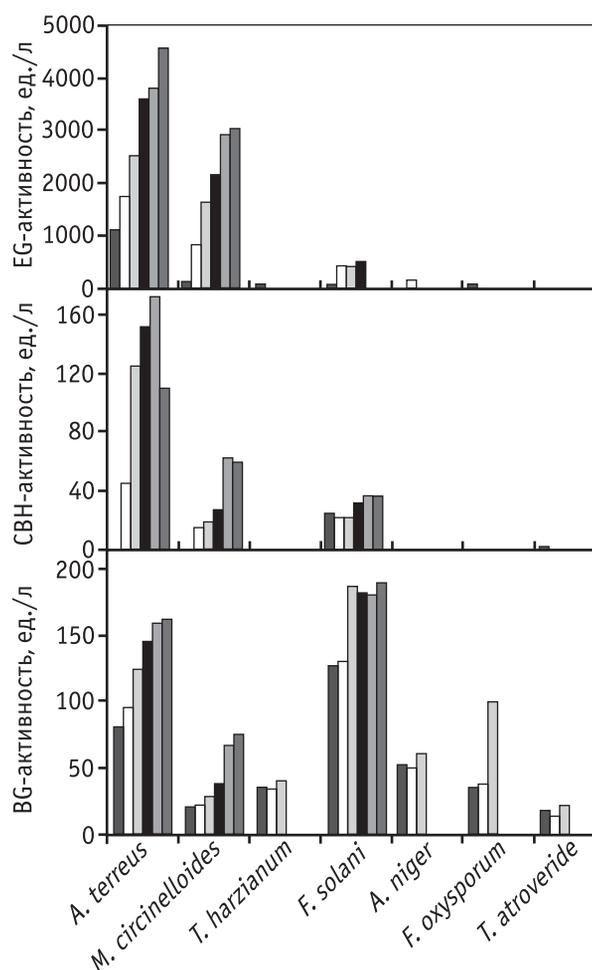
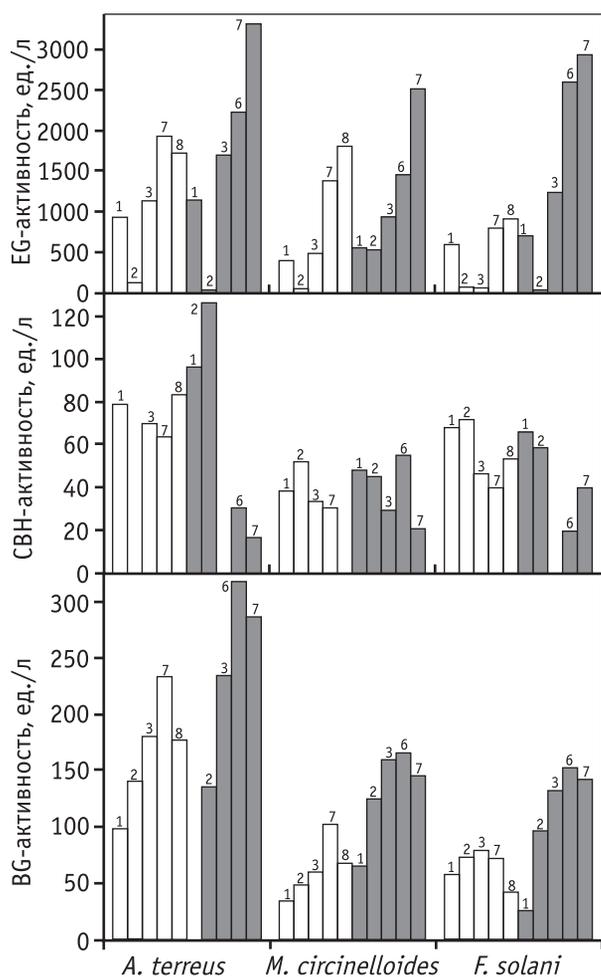


Рис. 1. Целлюлазные активности, детектируемые в средах с мицелиальными грибами после 2 (■), 5 (□), 7 (▨), 9 (▩), 11 (▧), 13 (▦) сут их культивирования (среда с добавлением 1 % делигнифицированных кукурузных стеблей в качестве источника углерода)

Наибольшую целлюлитическую активность в иммобилизованном виде на различных этапах культивирования проявлял мицелиальный гриб *A. terreus* (рис. 2). Следует отметить, что разный уровень детектируемых целлюлазных активностей, а также кинетика накопления этих активностей в питательной среде свидетельствовали о различиях в составе ферментных комплексов, синтезируемых иммобилизованными и свободными клетками одних и тех же мицелиальных грибов (см. рис. 1, 2).

Кроме того, у иммобилизованных и свободных клеток грибов были выявлены различия в кинетике накопления целлюлазных активностей. Так, у иммобилизованных клеток накопление целлюлаз в среде культивирования начиналось значительно раньше. Более высокая и быстрая продуктивность

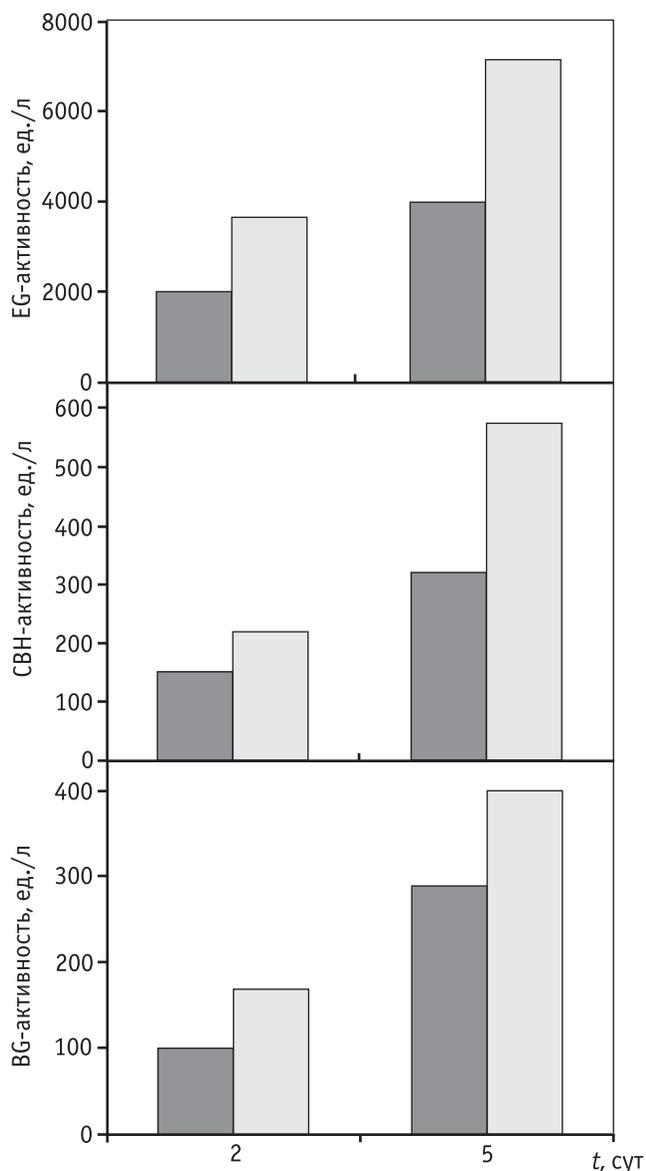


**Рис. 2.** Целлюлазные активности, детектируемые в средах с иммобилизованными биокатализаторами: □ – среда с добавлением 1 % делигнифицированных кукурузных стеблей в качестве источника углерода; ■ – среда с добавлением 2 % березовых опилок. Цифры над столбцами – количество суток от начала культивирования, соответствующее времени анализа ферментативной активности

иммобилизованных клеток может быть связана с тем, что в иммобилизованном виде клетки мицелиальных грибов лучше приспособлены к синтезу ферментов. Известно, что для мицелиальных грибов, функционирующих при твердофазном культивировании, характерна высокая метаболическая активность [31, 32].

Однако твердофазная ферментация, как известно, по сравнению с глубинным способом культивирования характеризуется рядом недостатков, наиболее значительным из которых является необходимость более продолжительного культивирования клеток [33, 34]. Кроме того, при твердофазном культивировании грибов требуется последующая

экстракция целлюлаз из субстратной массы. Глубинное культивирование свободных клеток позволяет избежать этой стадии, так как секрета целлюлаз осуществляется клетками непосредственно в жидкую питательную среду. Иммобилизация клеток и их культивирование в жидких питательных средах позволяют совместить преимущества глубинного культивирования и твердофазной ферментации, поскольку криогель ПВС выступает в качестве твердой подложки для мицелия и стимулирует поддержание биосинтеза целлюлаз на высо-



**Рис. 3.** Накопление активности целлюлаз в среде культивирования образцов иммобилизованного биокатализатора на основе клеток *A. terreus*, содержащего (□) и не содержащего (■) индуктор синтеза целлюлаз в своем составе (1 % делигнифицированные кукурузные стебли)

ком уровне и их секрецию в жидкую среду. Использование иммобилизованных форм гриба позволяет интенсифицировать процесс глубинного культивирования мицелиальных грибов. Наиболее продуктивным оказался штамм мицелиального гриба *A. terreus*, способный осуществлять биосинтез и накопление внеклеточных ферментов целлюлазного комплекса как в свободном, так и в иммобилизованном виде.

С целью повышения продуктивности иммобилизованного биокатализатора непосредственно в его состав были включены индукторы биосинтеза целлюлолитических ферментов, в качестве которых использовались делигнифицированные кукурузные стебли (1 % от общей массы гранулы).

Было показано, что клетки *A. terreus*, споры которого были иммобилизованы в криогель ПВС с добавлением целлюлозосодержащего материала, обеспечивали биосинтез и секрецию полного комплекса целлюлаз, содержащего EG, СВН и ВG, но при этом уровень целлюлазных активностей для такого иммобилизованного биокатализатора был на 60 % выше уровня аналогичного биокатализатора, исходно не содержащего целлюлозосодержащий материал в своем составе (рис. 3).

Таким образом, была установлена целесообразность одновременного включения в состав гранул и иммобилизованных клеток мицелиального гриба источника углерода, индуцирующего синтез целлюлаз. В дальнейших экспериментах были использованы именно эти целлюлозосодержащие иммобилизованные биокатализаторы.

### **Биосинтез целлюлазных ферментов иммобилизованными клетками мицелиального гриба *A. terreus* в средах с различными образцами ЦСС**

Анализ влияния pH среды культивирования и температуры проведения процесса позволил определить оптимальные условия, необходимые для накопления максимальной активности ферментов целлюлазного комплекса в среде, содержащей МКЦ в качестве источника углерода: pH 5,0–5,5, температура процесса 28 °С. Максимальные значения EG-, СВН- и ВG-активностей, полученные при данных условиях, достигали 9250, 720 и 400 ед./л соответственно (табл. 1). Дальнейшие эксперименты проводили в указанных условиях.

Поскольку в качестве субстратов ферментов целлюлазного комплекса, секретируемых разработан-

ным биокатализатором, предполагалось использовать сложные по химическому составу образцы различных промышленных и сельскохозяйственных отходов, то дальнейшие исследования проводились с использованием именно таких субстратов. При культивировании иммобилизованных клеток мицелиального гриба в среде, содержащей 2 % измельченных кукурузных стеблей, максимальные значения эндоглюканазной, экзоглюканазной и β-глюкозидазной активностей несколько снизились по сравнению с активностями, зафиксированными в процессе культивирования таких же образцов иммобилизованных клеток в среде, содержащей в качестве индуктора синтеза целлюлаз очищенную МКЦ (табл. 1).

Очевидно, что данная тенденция обусловлена наличием природных ингибиторов клеточного метаболизма и целлюлаз в используемом природном субстрате в отличие от коммерчески доступных очищенных препаратов. Аналогичные тенденции в изменении уровней активностей целлюлаз, продуцируемых свободными клетками, ранее отмечались в литературе [10].

Анализ полученных результатов показал, что увеличение концентрации субстрата (опилок) в среде культивирования от 2 до 5 % (по сухим веществам) положительно сказывается на уровне накопления EG-активности, приводя к ее увеличению в два раза.

При культивировании иммобилизованных клеток в среде, содержащей измельченную рисовую солому в качестве источника углерода, необходимого для биосинтеза целлюлаз, максимальные активнос-

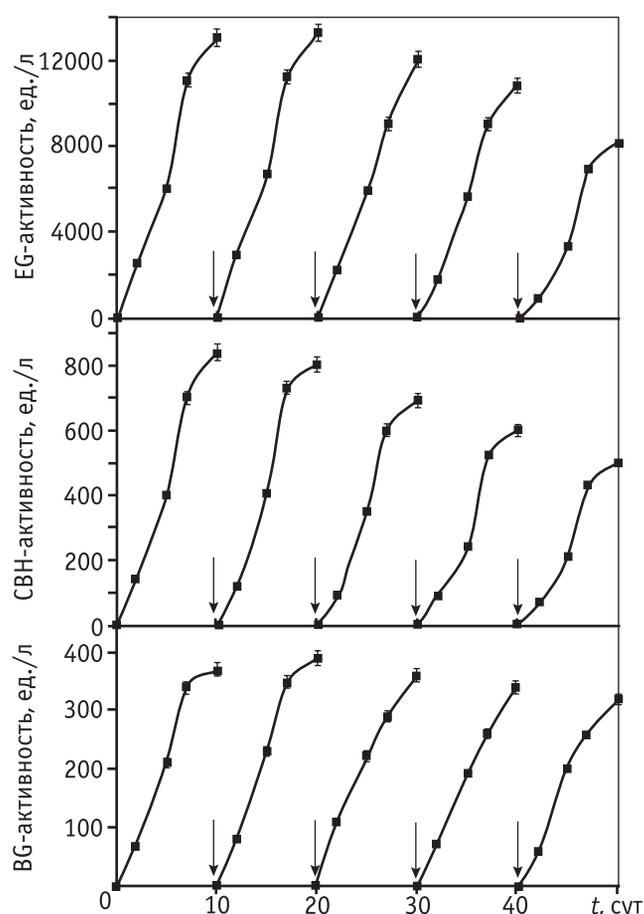
Таблица 1  
**Максимальные значения активностей ферментов целлюлазного комплекса, детектируемые после культивирования иммобилизованных клеток в течение 6 сут в средах, содержащих различные источники углерода**

Концентрация ЦСС в среде (по сухим веществам), %	Активность, ед./л		
	EG	СВН	ВG
МКЦ	9250	720	400
Кукурузные стебли	8540	550	365
Делигнифицированные дубовые опилки	530	90	65
Березовые опилки	3680	550	390
Березовые опилки	7100	550	330
Рисовая солома	13390	840	400

ти EG, СВН, ВГ, накапливающихся в культуральной жидкости, превышали те уровни, которые были установлены на других исследовавшихся субстратах. Следует также отметить, что наиболее значительные изменения в уровне детектируемой активности при варьировании субстратов, вводимых в среду для получения целлюлазного комплекса, были отмечены для EG.

### Многokратное использование иммобилизованных клеток для получения ферментов целлюлазного комплекса

Известно, что иммобилизованные клетки привлекают к себе внимание возможностью их многократного использования для реализации различных биокаталитических процессов [35, 36]. В этой связи была исследована возможность длительного использования иммобилизованных клеток мицели-



**Рис. 4.** Динамика накопления целлюлазных активностей в среде периодического культивирования при многократном использовании иммобилизованного биокатализатора. Стрелками указана замена среды в реакторе с иммобилизованными клетками, продуцирующими целлюлазы

альных грибов для получения комплекса целлюлаз на среде, содержащей рисовую солому в качестве источника углерода (рис. 4).

Было установлено, что биокатализатор способен стабильно осуществлять биосинтез и секрецию ферментов целлюлазного комплекса в условиях периодического культивирования при проведении, по крайней мере пяти рабочих циклов с полной заменой питательной среды в конце каждого рабочего цикла. Средняя продуктивность процесса с участием иммобилизованных клеток по EG-, СВН- и ВГ-активностям составила 1200, 70 и 30 ед./(л/сут) соответственно. Период полуинактивации разработанного иммобилизованного биокатализатора составил 50 сут.

Культуральные жидкости, содержащие комплекс целлюлаз, секретируемых в среду культивирования иммобилизованными биокатализаторами на основе клеток, были использованы для направленной гидролитической обработки различных образцов ЦСС.

Следует отметить, что в среде культивирования, предназначенной для получения целлюлаз, содержался именно тот источник ЦСС в качестве индуктора синтеза ферментов, который позже обрабатывался полученным комплексом.

Концентрация ЦСС в среде составляла 50 г/л по сухим веществам. Дозировка культуральной жидкости, содержащей целлюлазы и применявшейся для обработки ЦСС, нормировалась к общей концентрации белков и составляла 15 мг общего белка/г сухих веществ ЦСС. Ферментативный гидролиз проводился при 45 °С и рН 5 в течение 40 ч. По окон-

**Таблица 2**  
**Концентрация и выход глюкозы в ферментализатах различного ЦСС, полученных при использовании культуральной жидкости, содержащей целлюлазы иммобилизованных клеток *A. terreus***

ЦСС	Глюкоза	
	Концентрация, г/л	Выход от теоретически возможного, %
Кукурузные стебли	16,8±0,2	81,9±0,9
Пшеничная солома	17,1±0,3	96,0±1,7
Рисовая солома	18,0±0,1	95,2±0,5
Березовые опилки	14,5±0,3	59,4±1,2
Дубовые опилки	13,9±0,3	51,1±1,1

чании процесса во всех образцах анализировали концентрацию накопившейся глюкозы (табл. 2).

Согласно полученным данным, при ферментативной обработке ЦСС максимальная концентрация глюкозы (18 г/л) была получена при обработке рисовой соломы целлюлазным комплексом, продуцируемым иммобилизованными клетками мицелиальных грибов. Эти данные согласуются с результатами, представленными в табл. 1, из которых следует, что именно этот субстрат обеспечивал максимальный уровень накопления трех основных целлюлазных активностей. При этом выход глюкозы от теоретически возможного уровня составил 95 %. При использовании в качестве деградируемого субстрата опилок выход глюкозы составил более 50 % от теоретически возможного уровня, что может быть связано с исходной недостаточной предобработкой данного сырья перед ферментативным гидролизом.

#### **Получение органических растворителей из ферментативных гидролизатов ЦСС под действием иммобилизованных клеток дрожжей и бактерий**

Ферментативные гидролизаты, полученные в результате обработки различных видов ЦСС целлюлазами, секретируемыми иммобилизованными клетками грибов, могут использоваться для получения различных коммерчески значимых продуктов, в частности органических растворителей (этанол, ацетона, бутанола).

Подтверждением этого послужили эксперименты, в которых в качестве катализаторов трансформации полученных сахаров использовались иммобилизованные клетки дрожжей или бактерий [37].

При использовании иммобилизованных клеток термотолерантных дрожжей осуществлялся процесс ферментации гидролизатов различного ЦСС (табл. 3). Реакционная смесь была приготовлена на основе 0,05 М цитратного буфера (рН 5), в которую вводили ЦСС (5 % по сухим веществам) и комплекс целлюлаз в концентрации 15 мг общ. белка/г сухих веществ ЦСС. Процесс проводился при температуре 45 °С в течение 48 ч. По окончании процесса во всех пробах определяли концентрацию накапливающегося этанола (табл. 3).

Выход целевого продукта, согласно полученным данным, составил 86—91 % в зависимости от исходного источника ЦСС.

Таким образом, была показана возможность высокоэффективной конверсии гидролизатов ЦСС,

Таблица 3

**Концентрация и выход этанола в процессе конверсии глюкозы, содержащейся в гидролизатах ЦСС, в этанол под действием иммобилизованных клеток дрожжей**

ЦСС	Этанол	
	Концентрация, г/л	Выход от теоретически возможного, %
Кукурузные стебли	7,7±0,2	89,8±2,3
Пшеничная солома	7,9±0,1	90,6±1,1
Рисовая солома	8,4±0,1	91,5±1,1
Березовые опилки	6,4±0,3	86,5±4,0
Дубовые опилки	6,1±0,2	86,0±2,2

Таблица 4

**Концентрация органических растворителей, накапливающихся в процессе ацетон-бутанол-этанольного брожения ферментативных гидролизатов ЦСС под действием иммобилизованных клеток бактерий**

ЦСС	Концентрация, г/л		
	ацетона	бутанола	этанол
Кукурузные стебли	3,0±0,2	9,4±0,3	0,5±0,1
Пшеничная солома	3,6±0,3	10,2±0,2	0,9±0,2
Рисовая солома	3,8±0,3	11,6±0,2	1,2±0,3

полученных под действием целлюлаз иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, в биоэтанол.

Для исследования возможности трансформации различного ЦСС в органические растворители использовался иммобилизованный биокатализатор на основе клеток *Clostridium acetobutylicum*, включенных в криогель ПВС (табл. 4).

Максимальная концентрация растворителей 11,6 г/л была достигнута при использовании ферментативного гидролизата рисовой соломы. Следует отметить, что соотношение между концентрациями растворителей оставалось практически одинаковым независимо от типа обработанного ЦСС.

## **Заключение**

Разработан оригинальный гетерогенный биокатализатор в виде клеток мицелиального гриба *Aspergillus terreus*, иммобилизованных в криогель

ПВС с добавлением индуктора синтеза комплекса целлюлаз, включающего эндоглюканазу, экзоглюканазу и  $\beta$ -глюкозидазу. Указанный биокатализатор обладает длительным периодом полуинактивации (до 40 сут) при его 4-кратном использовании для получения комплекса целлюлаз в периодическом режиме.

Впервые показано, что разработанный биокатализатор стабильно сохраняет высокий уровень продуктивности по полному комплексу целлюлаз при использовании различных субстратов-индукторов биосинтеза ферментов: березовых и дубовых опилок, рисовой соломы и делигнифицированных кукурузных стеблей.

Культуральные жидкости, содержащие комплексы целлюлаз, полученные как результат функционирования разработанного иммобилизованного биокатализатора в среде с определенным ЦСС, были использованы для направленной гидролитической обработки того же сырья.

Показана возможность высокоэффективной конверсии полученных гидролизатов ЦСС в органические растворители под действием иммобилизованных клеток дрожжей и бактерий.

*Данная работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта № 16.512.11.2163 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы» и гранта РФФИ № 11-04-93002 Вьет\_а.*

## Литература

- Demirbas M.F., Balat M., Balat H. // *Energ. Convers. Manag.* 52 (2011). P. 1815–1828.
- Nigam P.S., Singh A. // *Progr. Energ. Combust. Sci.* 37 (2011). P. 52–68.
- Balat M. // *Energ. Convers. Manag.* 52 (2011). P. 858–875.
- Kumar R., Singh S., Singh O.V. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008). P. 377–391.
- Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev O.N., Burlingame R., Emalfarb M., Baez M., Sinityn A.P. // *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 97 (2007). P. 1028–1038.
- Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Синецын А.П. // *Прикл. биохим. микробиол.* 42 (2006). С. 674–680.
- Jing D., Li P., Xiong X.Z., Wang L. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (2007). P. 793–800.
- Mandels M. // *In annual reports on fermentation processes.* Vol. 5. Academic Press, Inc., New-York. (1982). P. 35–78.
- Mathew G.M., Sukumaran R.K., Singhania R.R., Pandey A. // *J. Sci. Ind. Res.* 67 (2008). P. 898–907.
- Chinedu N.S., Nwinyi O.B., Okochi V.I. // *Can. J. Pure. Appl. Sci.* 2 (2008). P. 357–362.
- Chandra M., Kalra A.P., Sharma K., Sangwan R.S. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2009). P. 605–609.
- Nakari-Setälä T., Penttilä M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995). P. 3650–3655.
- Fujii T., Fang X., Inoue H., Murakami K., Sawayama S. // *Biotechnol. Biofuels.* 2 (2009). P. 24.
- Ellouz Chaabounis S., Belguith H., Hassairi I., Rad K.M., Ellouz R. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (1995). P. 267–269.
- Mo H., Zhang X., Li Z. // *Process Biochem.* 39 (2004). P. 1293–1297.
- Teixeira Sehnem N., Bittencourt L.R., Camassola M., Dillon A.J.P. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006). P. 163–167.
- Dedavid E., Lopes F.C., Silveira S.T., Brandelli A. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152 (2009). P. 295–305.
- Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F., Xi Y. // *Bioresour. Technol.* 99 (2008). P. 7623–7629.
- Williams P.T. // *John Wiley & Sons, Ltd ISBNs: 0-470-84912-6 (HB); 0-470-84913-4 (PB).* (2005) 400 p.
- Thygesen A., Thomsen A.B., Schmidt A.S., Jørgensen H., Ahring B.K., Olsson L. // *Enzym. Microb. Tech.* 32 (2003). P. 606–615.
- Lustaa K.A., Chunga K., Sul W., Park H.S., Shin D. // *Process Biochem.* 35 (2000). P. 1177–1182.
- Hui Y.S. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2010). P. 79–84.
- McCabe B.K., Kuek C., Gordon G.L.R., Phillips M.W. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30 (2003). P. 205–209.
- Пат. 2383618 (РФ). Иммобилизованный биокатализатор для микробиологического получения пектиназа // Е.Н. Ефременко, О.В. Сенько, О.В. Спиричева, С.Д. Варфоломеев, Б.Л. Шаскольский, В.И. Лозинский. 2010.
- 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.
- Efremenko E., Stepanov N., Senko O., Nikolskaya A., Maslova O., Zorov I., Sinityn A. // *19-th European Biomass Conference and Exhibition.* (2011). P. 1735–1738.
- Ghose T.K. // *Pure. Appl. Chem.* 59 (1987). P. 257–268.
- Kotak A., Bando H., Kaya M., Kato-Murai M., Kuroda K., Sahara Y., Hata Y., Kondo A., Ueda M. // *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008). P. 622–627.

29. Stone K.M., Roche F.W., Thornhill N.F. // *Biotechnol. Techniques*. 6 (1992). P. 207–212.
30. Demirbas A. // *Energ. Convers. Manag.* 50 (2009). P. 2782–2801.
31. Singhanian R.R., Sukumaran R.K., Pilla A., Prema P., Szakacs G., Pandey A. // *Ind. J. Biotech.* 5 (2006). P. 332–336.
32. Toca-Herrera J.L., Osma J.F., Rodrigues Couto S. // *Appl. Microbiol.* 1 (2007). 391–400.
33. Смирнов К.А., Алашкевич Ю.Д., Решетова Н.С. // *Химия растительного сырья*. 3 (2009). С. 161–164.
34. Barrios-Gonzalez J. // *Proc. Biochem.* 4 (2012). P. 175–185.
35. Efremenko E.N., Senko O.V., Zubaerova D.H., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I. // In book: *Biotechnology: state of the art and prospects for development* (Ed. G.E. Zaikov), Nova Science Publishers Inc., N.-Y., Ch.11. (2008). P. 103–110.
36. Efremenko E., Stepanov N., Nikolskaya A., Senko O., Gudkov D., Spirichev O., Varfolomeev S. // In book: *18-th European Biomass Conference and Exhibition: From research to industry and markets*, (Eds. J. Spitzer, J.F. Dallemand, D. Baxter, H. Ossenbrink, A. Grassi, P. Helm), ETA-Florence Renewable Energies. (2010). P. 1753–1758.
37. Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Никольская А.Н., Сенько О.В., Спричева О.В., Варфоломеев С.Д. // *Катализ в промышленности*. № 5. 2010. С. 70–76.

## **У МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПРОМЫШЛЕННО-ЭКОНОМИЧЕСКИЙ ФОРУМ «СТРАТЕГИЯ ОБЪЕДИНЕНИЯ: РЕШЕНИЕ АКТУАЛЬНЫХ ЗАДАЧ НЕФТЕГАЗОВОГО И НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСОВ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ»**

**29–30 октября 2012 г.**

Уже пятый год подряд ОАО «ВНИПИНЕФТЬ» проводит форум «Стратегия объединения: решение актуальных задач нефтегазового и нефтехимического комплексов на современном этапе» под председательством президента РСХ Иванова В.П. при поддержке РСПП, Ассоциации нефтепереработчиков и нефтехимиков, Российского союза химиков, Союза нефтегазопромышленников России, ОАО «Газпром нефть», ИНХС РАН, ОАО «ВНИИ НП», ГУП ИНХП РБ, НП «Международная Ассоциация Нобелевского движения», химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина.

В форуме приняли участие представители Государственной Думы РФ, Московской ТПП, отраслевых российских и зарубежных компаний, НПЗ и НХЗ, проектных и инжиниринговых компаний, институтов, общественных организаций и СМИ.

В первый день форума, проходившем в здании правительства Москвы, на пленарном заседании обсуждались задачи и перспективы развития нефтегазового и нефтехимического комплексов России, вопросы внедрения новых современных технологий

в нефтепереработке и нефтехимии, энергоэффективность и энергосбережение, деятельности НИИГ (национальный институт нефти и газа). В заседаниях приняли участие Шмаль Г.И., президент Союза нефтегазопромышленников России, Рябов В.А., генеральный директор Ассоциации нефтепереработчиков и нефтехимиков, Дмитриевский А.Н., академик, директор Института проблем нефти и газа РАН. Большой интерес у делегатов вызвали

