

*Пятый Съезд Общества
Биотехнологов России*

2-4 декабря 2008 г.

Москва

*Институте биоорганической
химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)*

КОНТРОЛЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ АЛКОГОЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

**РЕШЕТИЛОВ А.Н., АЛФЕРОВ В.А.,
ЛЕДЕНЕВ В.П., РЕШЕТИЛОВА Т.А.СЕРГЕЕВ В.И.**

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН
Пушино, Проспект Науки, 5, Лаборатория биосенсоров

²ГНУ ВНИИ Пищевой биотехнологии РАСХН, Отдел технологии спирта и
комплексной переработки сырья, Москва

³ООО "СпиртПриборСервис", Москва

⁴Тульский Госуниверситет, Кафедра химии, Тула

Первые пять производителей биоэтанола (млрд. л/год)

| Страна | 2004 г. | 2005 г. | 2006 г. |
|----------|---------|---------|---------|
| Бразилия | 15 | 16 | 17 |
| США | 13 | 16 | 18 |
| Китай | 4 | 4 | 4 |
| Индия | 2 | 2 | 2 |
| Франция | 1 | 1 | 1 |
| Россия | --- | --- | ??? |

2008 –
2009 гг.
= ???

Василов Р. Г., Вестник биотехнологии и физико–химической биологии
им. Ю.А.Овчинникова, 2007, Т.3, №2. **Перспективы развития производства
биотоплива в России. Биоэтанол.**

В Совете Министров РФ

- **В России будет создано 30 заводов по производству биотоплива**

Правительство в этом году планирует принять программу по развитию производства биотоплива в РФ, которая предполагает увеличение производства этанола до 2 миллионов тонн в год.

14.03.2008

Дискуссионный вопрос – почему требуются дополнительные измерения в процессе производства этанола/биоэтанола

Биокаталитические технологии и разработка на их базе биосенсорных систем на основе дрожжевых штаммов микроорганизмов и выделенных из них ферментов.

или

Биосенсорный контроль следующих параметров

- Концентрация крахмала
- Активность амилаз(ы)
- Эффективность гидролиза крахмала (концентрация глюкозы)
- Активность дрожжевых клеток
- Выход этанола
- БПК (биохимическое потребление кислорода)

Физико-химические \Leftrightarrow Биохимические

Мнение специалиста

Экономика

Парадоксально, но даже на крупных заводах **базовые процессы не имеют оперативного контроля по таким параметрам как активность ферментов и дрожжей, состав полисахаридов и т.д.** Существующие методы отличаются трудоемкостью и длительностью.

Экология

Экологическая безопасность. Производственные стоки спиртопроизводств составляют по объему сотни и даже тысячи метров кубических в сутки, наличие в них **высокого содержания органики** требует обязательную утилизацию этих отходов.

Спиртовый завод средней мощности - соизмерим с городом с населением **50-100 тыс. человек**. В ряде мест происходит неполная переработка барды, сброс ее в окружающую среду имеет характер экологической катастрофы.

Леденев Владимир Павлович, ВНИИ Пищевой биотехнологии РАСХН, Зав. Отделом технологии спирта и комплексной переработки сырья

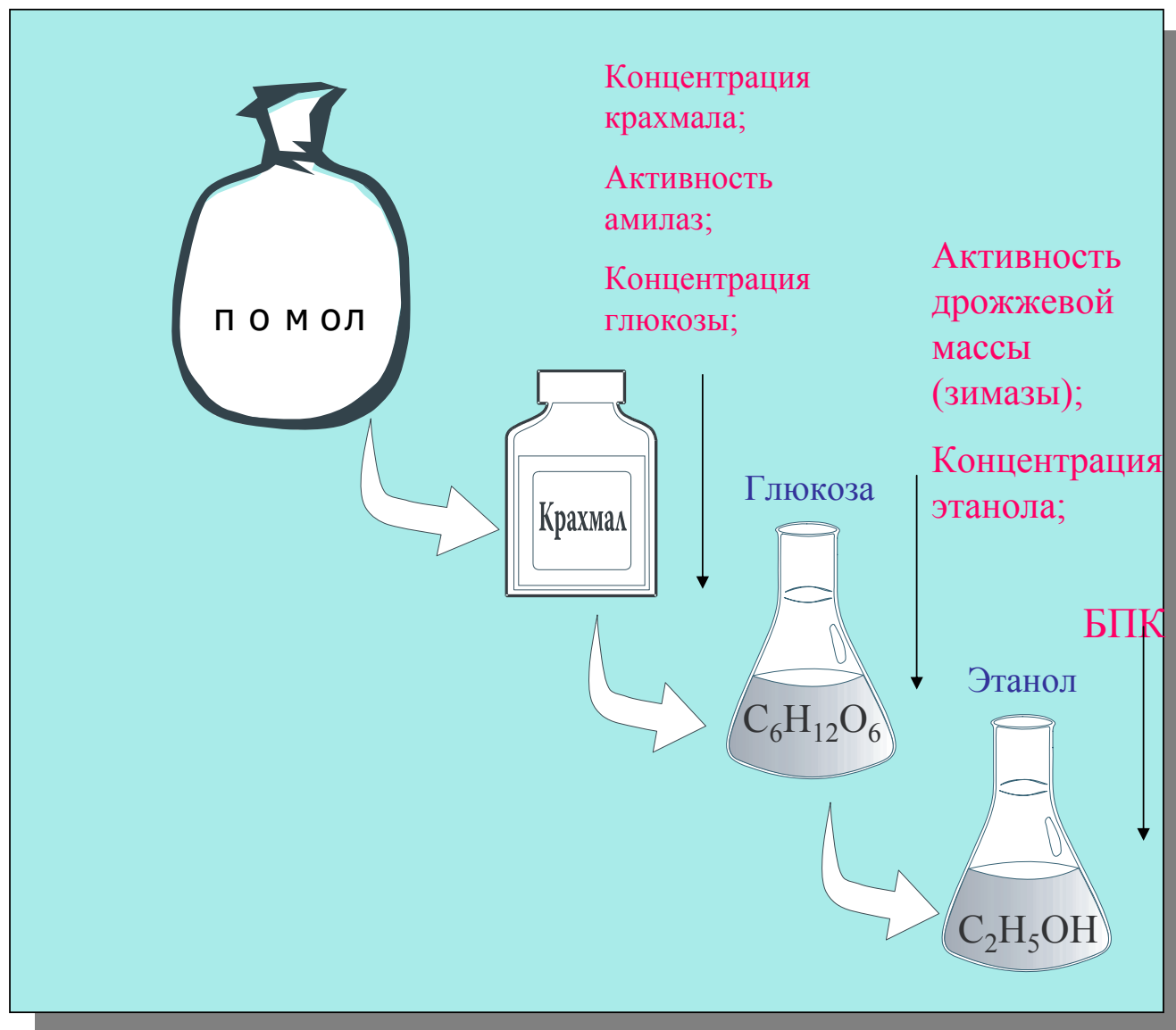
Нормативы

Выход готового продукта

- из 1 т. пшеницы: 0,624 т. (817 л.) спирта
- из 1 т. кукурузы: 410 л. спирта

Василов Раиф Гаянович, Вестник биотехнологии и физико–химической биологии им. Ю.А.Овчинникова, 2007, Т.3, №2. Перспективы развития производства биотоплива в России. Биоэтанол.

Схема ферментативного получения этанола/биоэтанола



При производстве (био)этанола возможен биосенсорный контроль следующих биохимических параметров

- Концентрация крахмала
- Активность амилазы
- Эффективность гидролиза крахмала
(концентрация глюкозы)
- Активность дрожжевых клеток
- Выход этанола
- Индекс БПК (биохимическое потребление кислорода)

Электрод с биорецепторным элементом

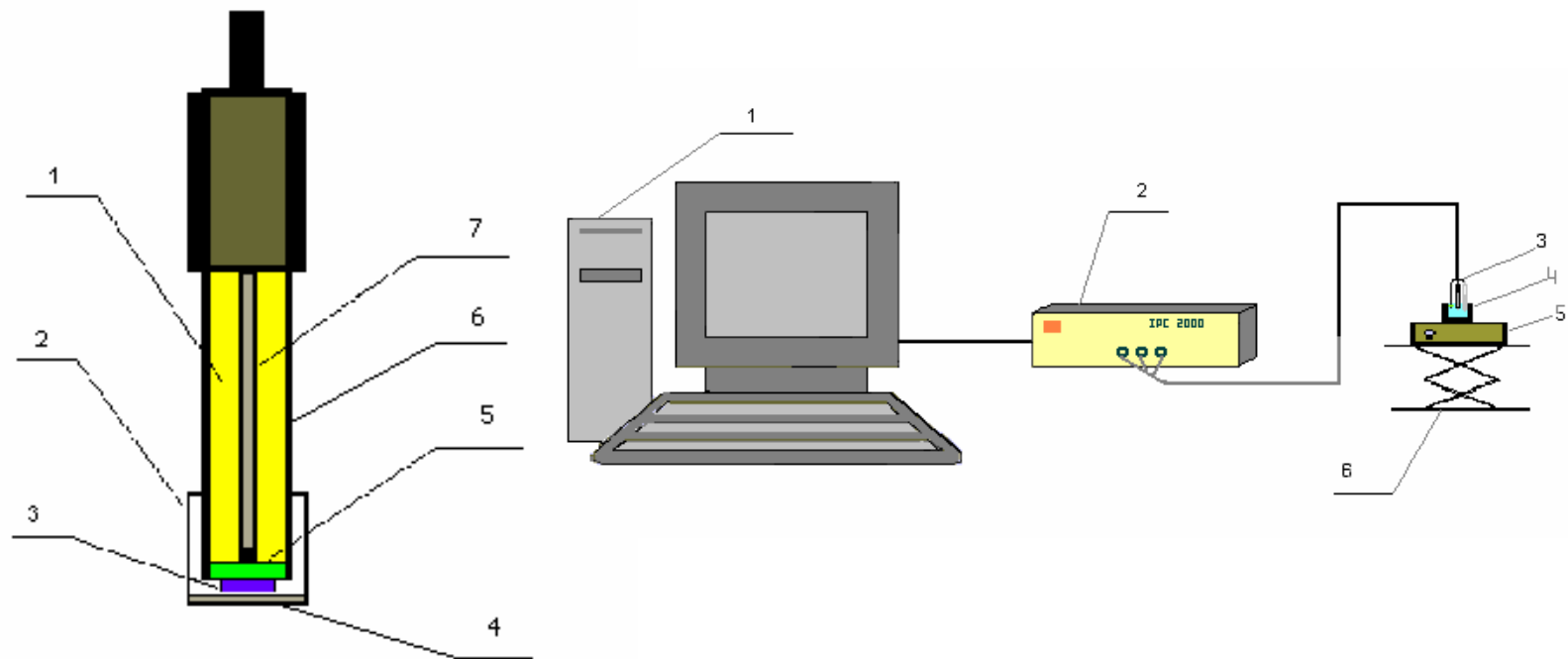
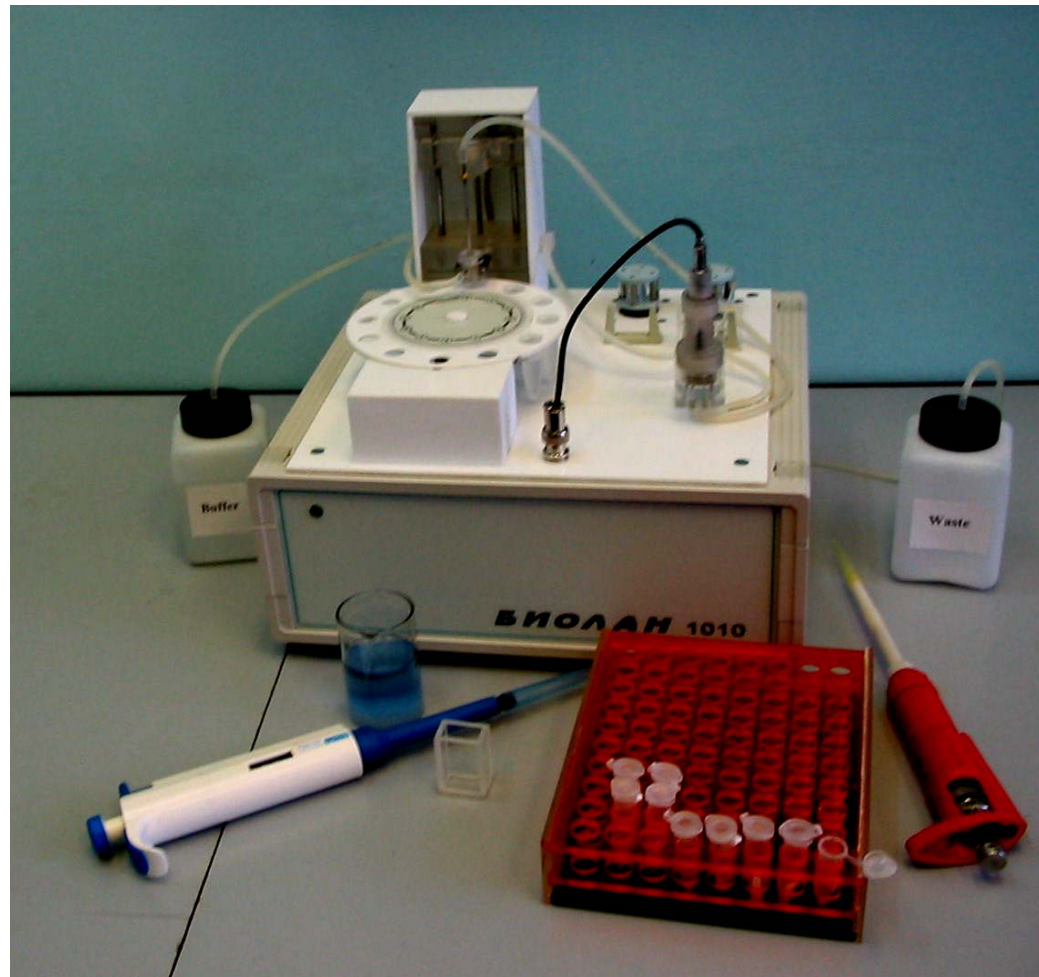


Схема установки

Схема измерения: кювета 2 мл, 20 - 100 мкл пробы, 5-10 мин времени, результат, новое измерение

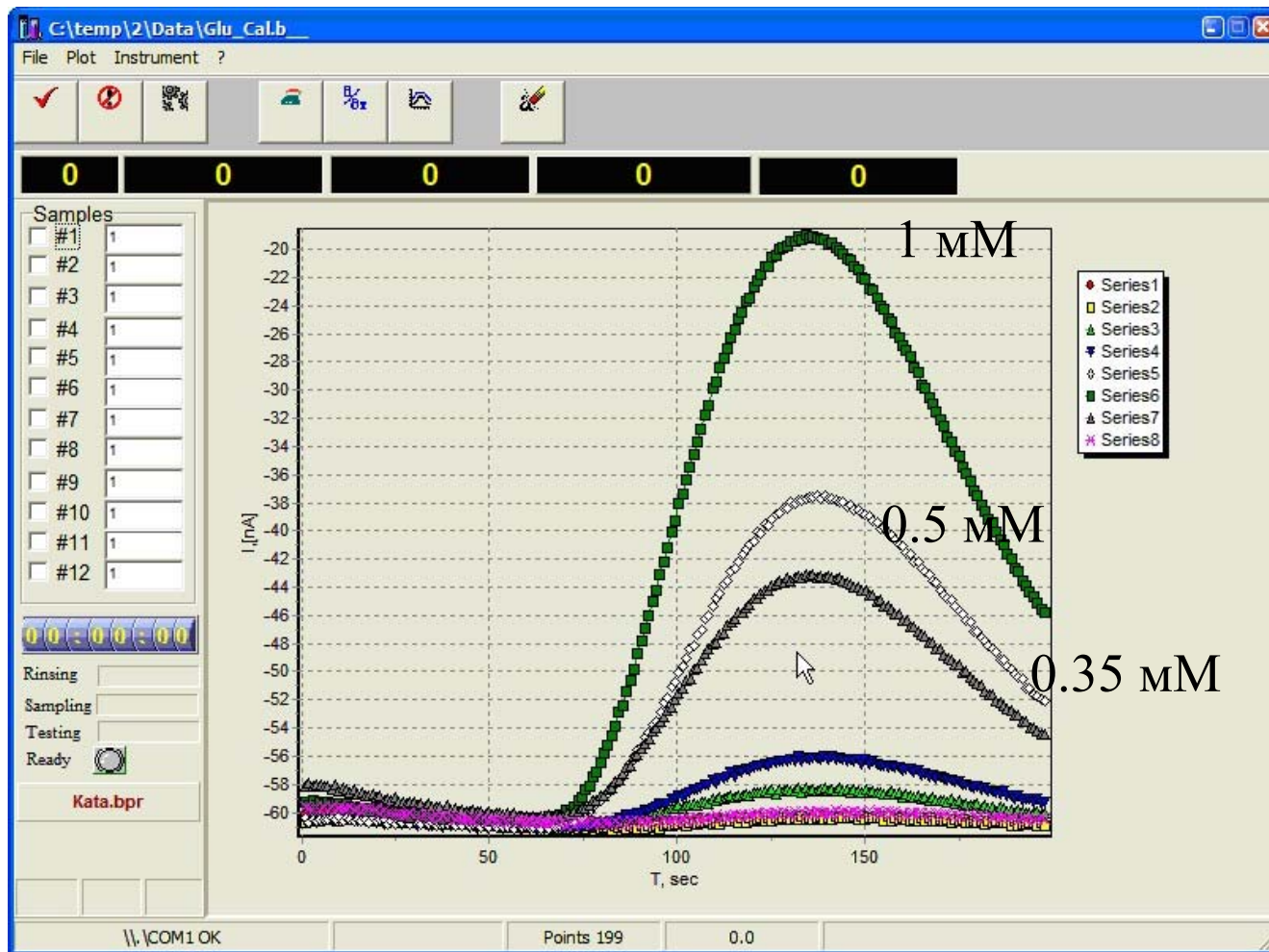
Биосенсорный анализатор содержания в образцах крахмала, глюкозы, этанола. Лабораторная модель



Характеристики сенсоров, используемых для контроля процесса получения этанола

| Фермент | Алкогольoxid аза | Глюкозоoxid аза | Глюкозооксидаза и глюкоамилаза |
|---|---------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Анализируемое соединение | этанол | глюкоза | крахмал |
| Диапазон детекции | 0.05 – 2.50 мМ | 0.05 – 2.50 мМ | 0.003 – 0.05% 0.03 – 0.5 г/л |
| Линейный диапазон детекции | 0.05 – 1.00 мМ | 0.05 – 1.00 мМ | 0.003 – 0.025% 0.03 – 0.25 г/л |
| Чувствительность в области линейного диапазона | 0.97 (нА/с)/мМ | 1.26 (нА/с)/мМ | 1.44 (нА/с)/(г/л) |
| Время ответа, с | 60 | 60 | 300 |
| Период измерения, мин | 5 | 5 | 12 - 15 |
| Коэффициент вариации, % | 2 - 5 | 2 - 5 | 3 - 5 |
| Операционная стабильность, сут | 7 | 10 | ----- |
| Стабильность при хранении (+4° С), сут | 6 мес | 6 мес | 6 мес |
| Кюветный режим измерения | | | |
| Базовый раствор - 30 мМ фосфатный буфер рН 7.6 | | | |

Рабочее окно программы "Biolan 1010" с видом сигналов

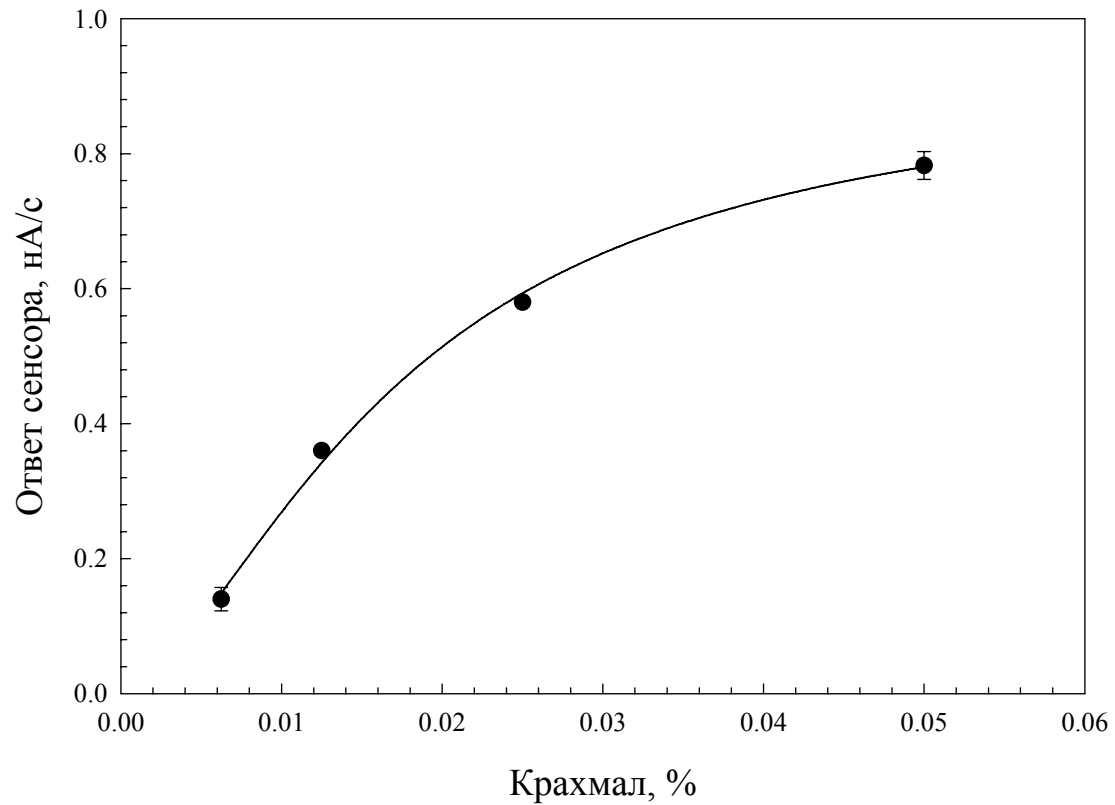
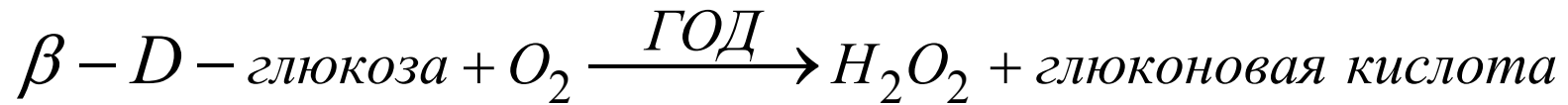


Регистрация сигналов, построение калибровки, нахождение неизвестной концентрации. Измерение этанола.

Определение крахмала – биосенсор на основе двух ферментов - глюкозооксидазы и глюкоамилазы

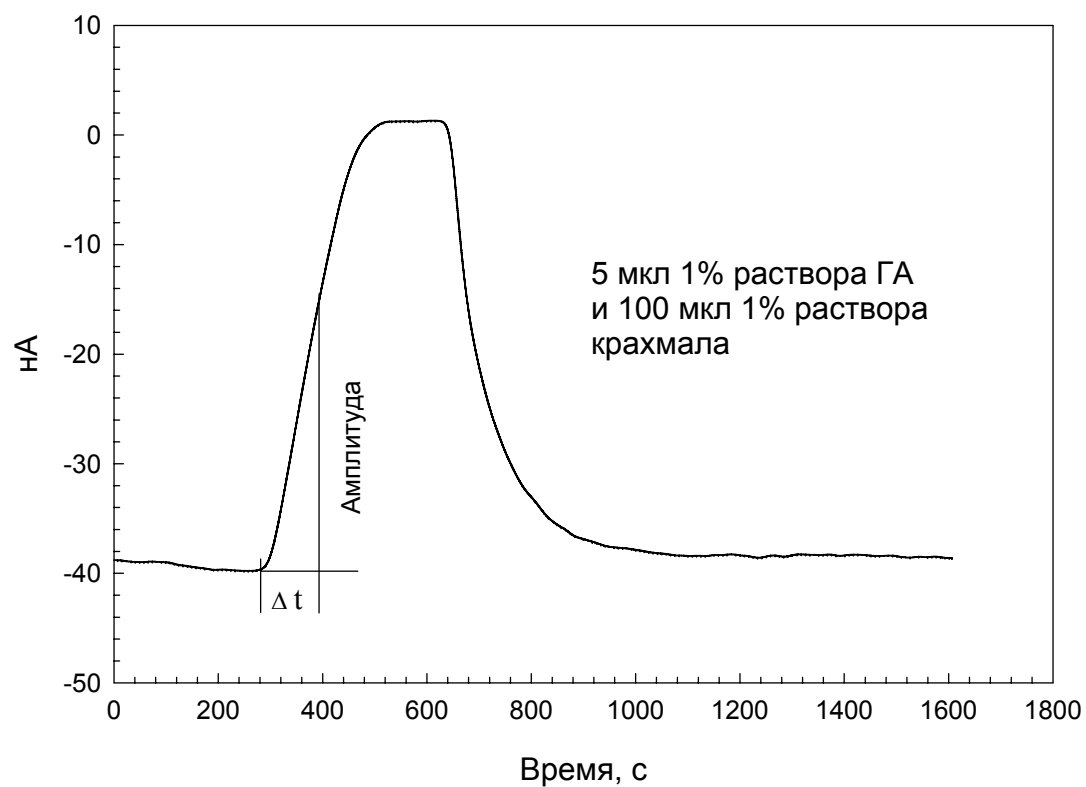
амилаза(ы) – (альфа-, глюко-)

Крахмал → β -D-глюкоза



Шкала
концентрац
ий должна
быть
умножена
на $\times 20$
(степень
разведения)

**Ответ ГОД сенсора на введение 5 мкл 1% раствора
препарата Алкоголаза П 400 и 100 мкл 1% раствора
крахмала**



Получение и биосенсорное определение этанола

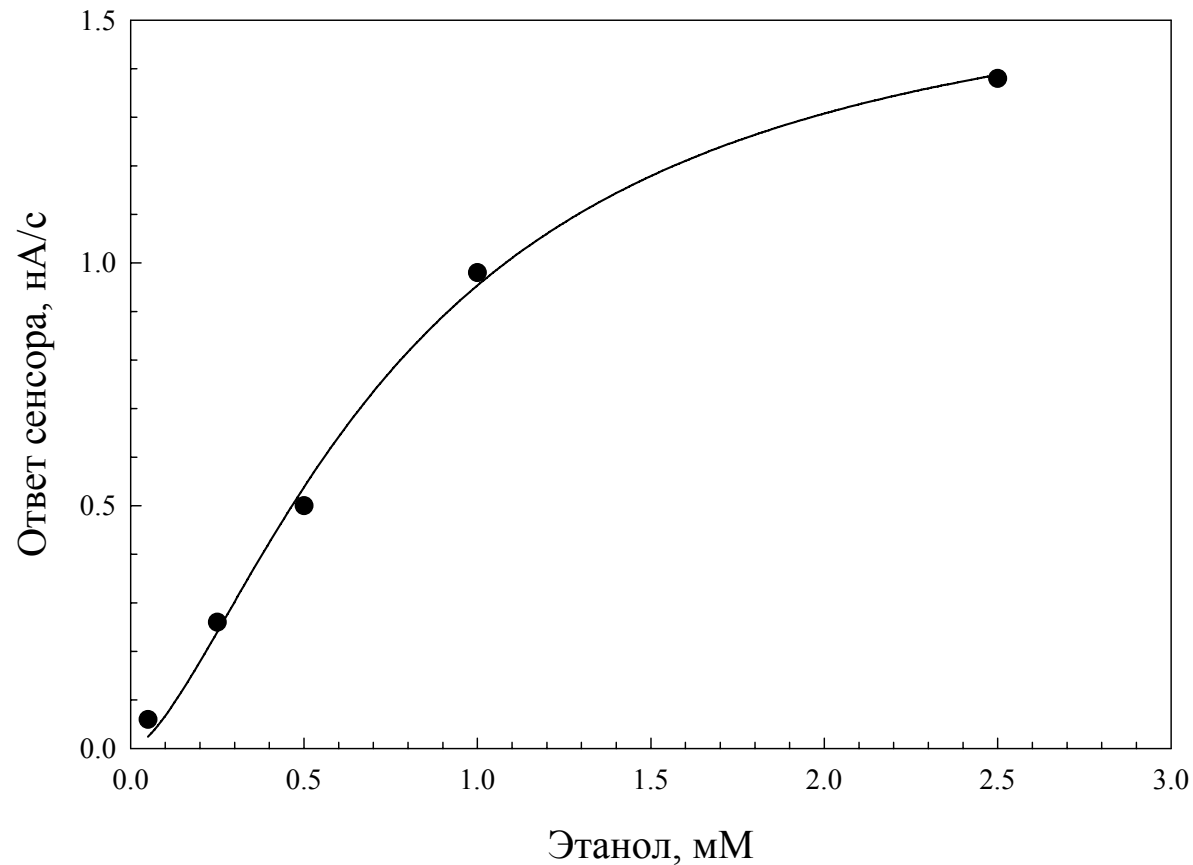
зимаза



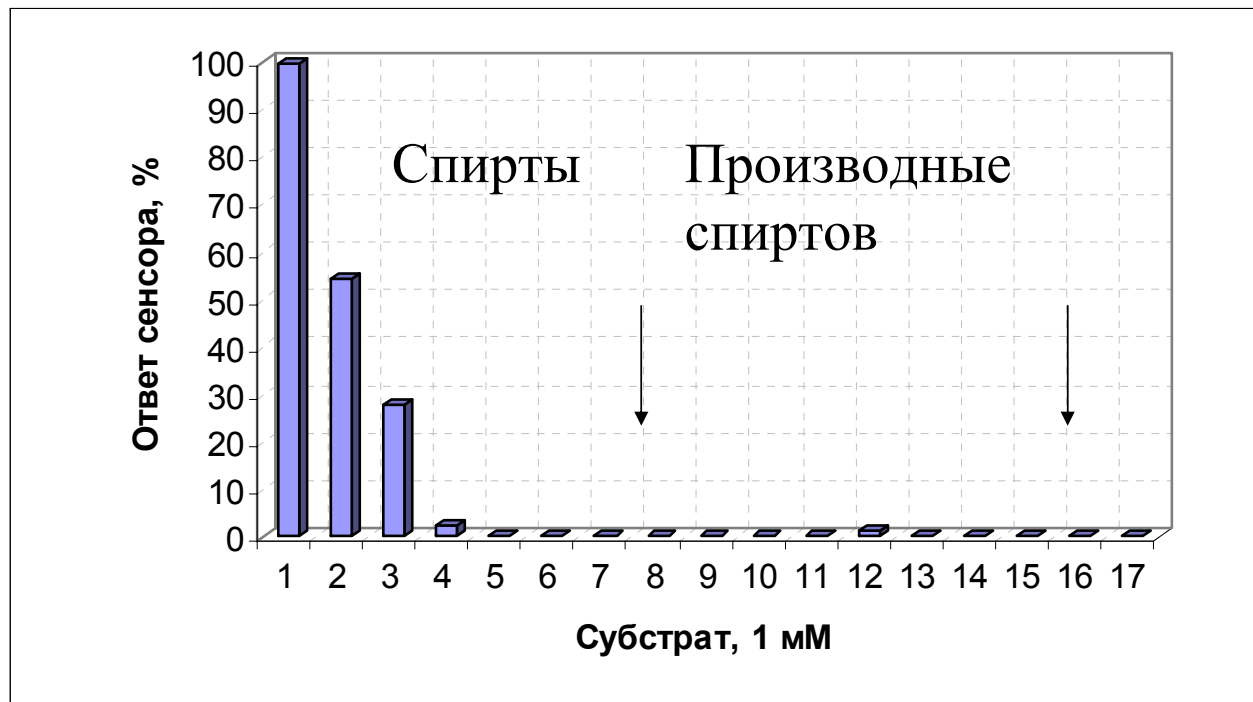
алкоголь-
оксидаза



Концентрацию этанола на выходе процесса оценивают с помощью сенсора на основе алкогольоксидазы



1 мМ этанола = 0.046 г/Литр (~ водка в разведении 1:10 000).



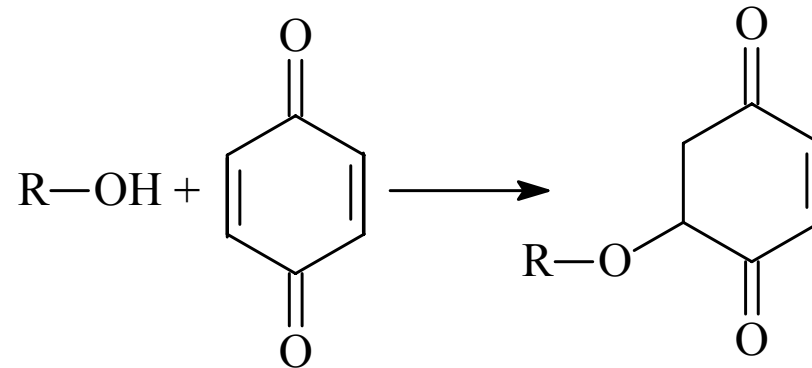
АО - выделяется в лаборатории.

Стабильность = ???

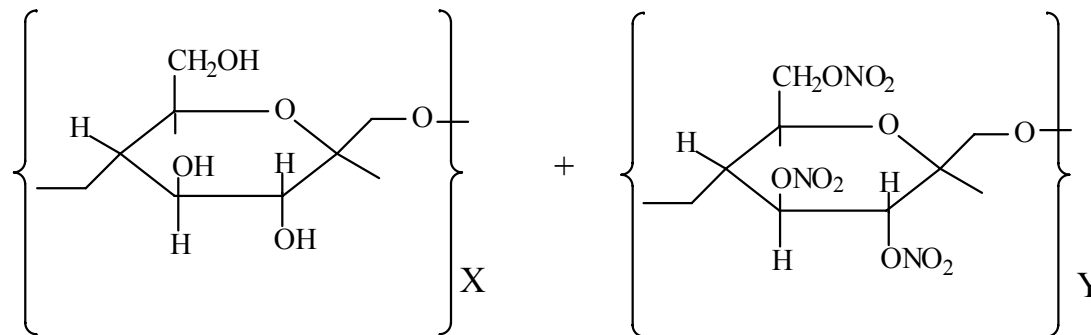
Субстратная специфичность биосенсора на основе АО (*H. polymorpha* NCYC 495 In), иммобилизованной на мембране, активированной гидрохиноном и ДЭАЭ-декстраном.

Обозначения по оси X: 1 – метанол (С1), 2 – этанол (С2), 3 – пропанол (С3), 4 – бутанол (С4), 5 - изопропанол, 6 - изобутанол, 7 - изоамиловый спирт (С6), 8 - 2,3-бутандиол, 9 - 4-метилгексанол, 10 - метилциклогексанол, 11 - метиламиноэтанол, 12 - трифторэтанол, 13 - трихлорэтанол, 14 - метоксибензиловый спирт, 15 - бензиловый спирт, 16 - глицерин, 17 - глюкоза

Способ иммобилизации белков



Химическая иммобилизация 1,4-бензохинона на поверхность полимерной мембраны Protran Sus.



Строение нитроцеллюлозной мембраны (Protran Sus).

Оценка правильности результатов анализа этанола, полученных с помощью ферментного и микробного биосенсора.

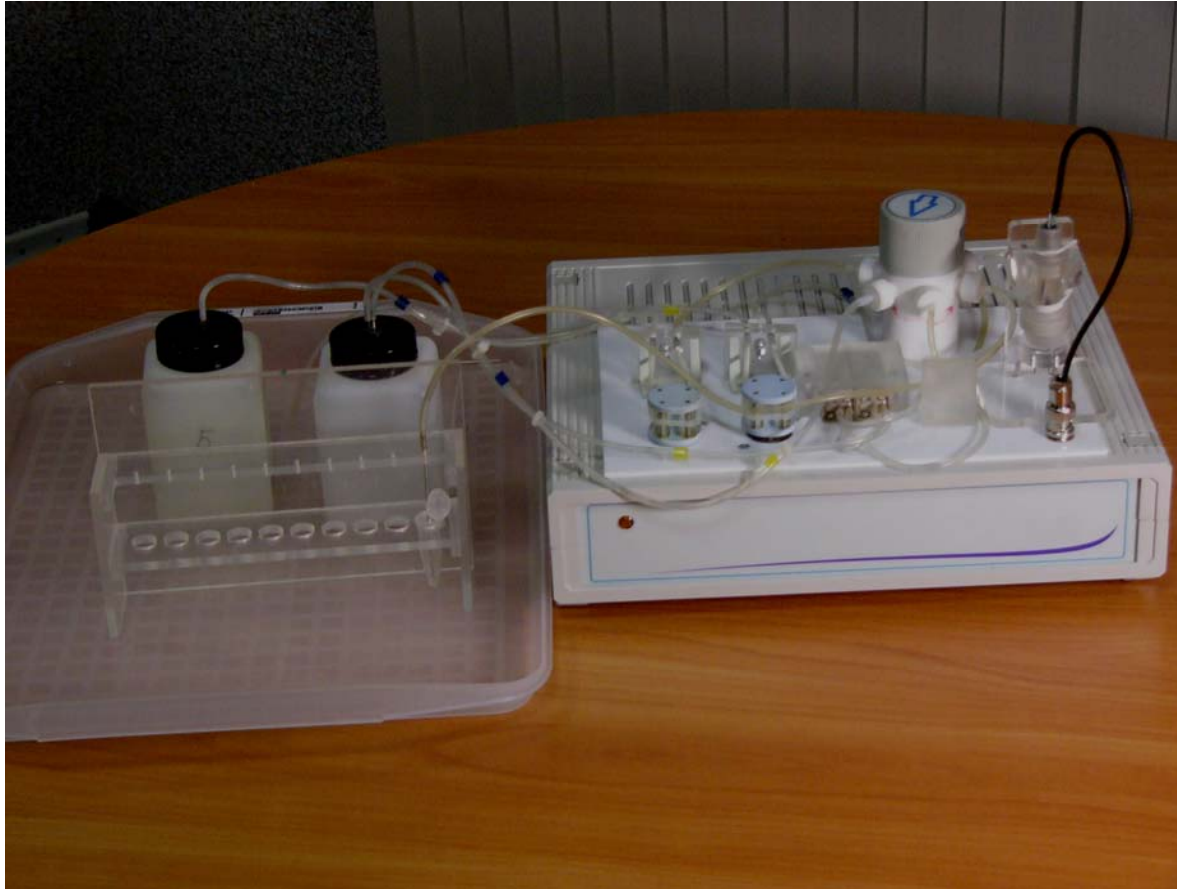
ГНУ ВНИИ Пищевой биотехнологии РАСХН

| № образца | Концентрация этанола, % об. | | |
|-----------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| | Ферментный биосенсор | Микробный биосенсор | Газовая хроматография |
| 1 | 61±5 | 65 ± 5 | 62.3 ± 0.2 |
| 2 | 69±2 | 77 ± 5 | 68.4 ± 0.3 |

**Результаты анализа образцов вино-водочных изделий,
полученных с помощью бисенсора на основе АО,
выделенной из клеток *H. polymorpha* NCYC 495 In**

| № обр азц а | Название образца | Концентрация этанола, % об. | |
|----------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| | | Ферментный биосенсор | Заявленное производителем |
| 1 | Вино красное сухое «Carranc» (Испания) | 12.1±0.3 | 12 |
| 2 | Вино розовое сухое «Vilamor» (Португалия) | 11.2±0.2 | 11 |
| 3 | Вино полусухое «San Marco, mission Cabernet sauvignon» (Чили) | 13.2±0.2 | 13 |
| 4 | Водка «Империял» | 41±2 | 40 |

Анализ БПК (биологического потребления кислорода). Лабораторная модель системы.



Стандартный
метод БПК₅ =
5 суток

Биосенсорный
метод =
5 - 10 мин

**Точность,
совпадение,
спектр
веществ = ???**

Существующие методы анализа

- Традиционные методы контроля – хроматографические, химические.
- Хроматография – дорогостоящие, времязатратные.
- Денситометрия - неспецифичные, сопряженные с множеством ручных процедур.
- Химические, основанные на реакциях восстановления – низкооперативные, низкоспецифичные.

Полыгалина Г.В. Технохимический контроль спиртового и ликеро-водочного производств. М. Колос, 1999. 336 С.

Предложение

разработка основ технологии получения биокаталитических препаратов – бактериальных и дрожжевых штаммов микроорганизмов и фермента АО и разработка на их базе биосенсорных систем для детекции низших спиртов (этанола, биоэтанола).

Еще раз о проблемах этанол/биоэтанол

- **Сырье** – пшеница, кукуруза, маис, сорго, сахарный тростник, сахарная свекла и т.д. Отходы сельскохозяйственного производства и деревообрабатывающей промышленности – солома, травы, древесина, опилки, твердые бытовые отходы.
 - **Способ получения** – спиртовое брожение.
-

- Когда имеешь дело с отлаженным процессом – все хорошо (??), а если есть необходимость **введения новых элементов** (??)
 - Поиск оптимального сырья для биоэтанола – разработка **рентабельных технологий** переработки одного и того же сырья в биотопливо = проблема (??).
-

- В перечне технологических и методических вопросов актуальными являются поиск подходов, позволяющих повысить **селективность, чувствительность, время жизни сенсора, снизить стоимость одиночного измерения, упростить измерительную часть анализатора.**
- Важно, чтобы биотехнологи **были знакомы с разработками практического плана, выполняемыми в РФ** и были бы готовы при их выпуске принять на свои производства.

В КАЧЕСТВЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Опыт говорит - созданные к настоящему моменту модели представляют собой лабораторные исследовательские комплексы. Для практики нужны более простые и надежные приборы. Разработка производится.

В КАЧЕСТВЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Готовы для обсуждения любой
формы сотрудничества

Лаборатория биосенсоров



КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Анатолий Николаевич Решетилов

**Россия, 142290, Московская область, Пущино, пр. Науки, 5,
ИБФМ РАН.**

Тел: 7 (495)9257448, 7 (4967)731666, тел/факс:

(495)9563370.

E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

Спасибо за внимание !

Актуальность

Ферментационная биотехнология:

- контроль при использовании спиртов метилового и этилового в качестве ростовых субстратов или трансформируемых соединений.

Промышленное получение этилового спирта:

- контроль в режиме реального времени - *on line* - содержания продукта в ферментационной среде. Значительное повышение экономической эффективности производства (справедливо также для производств пива, ликеров, тоников, крепких алкогольных напитков) – пищевая промышленность.

Медицина и судебно-медицинская экспертиза:

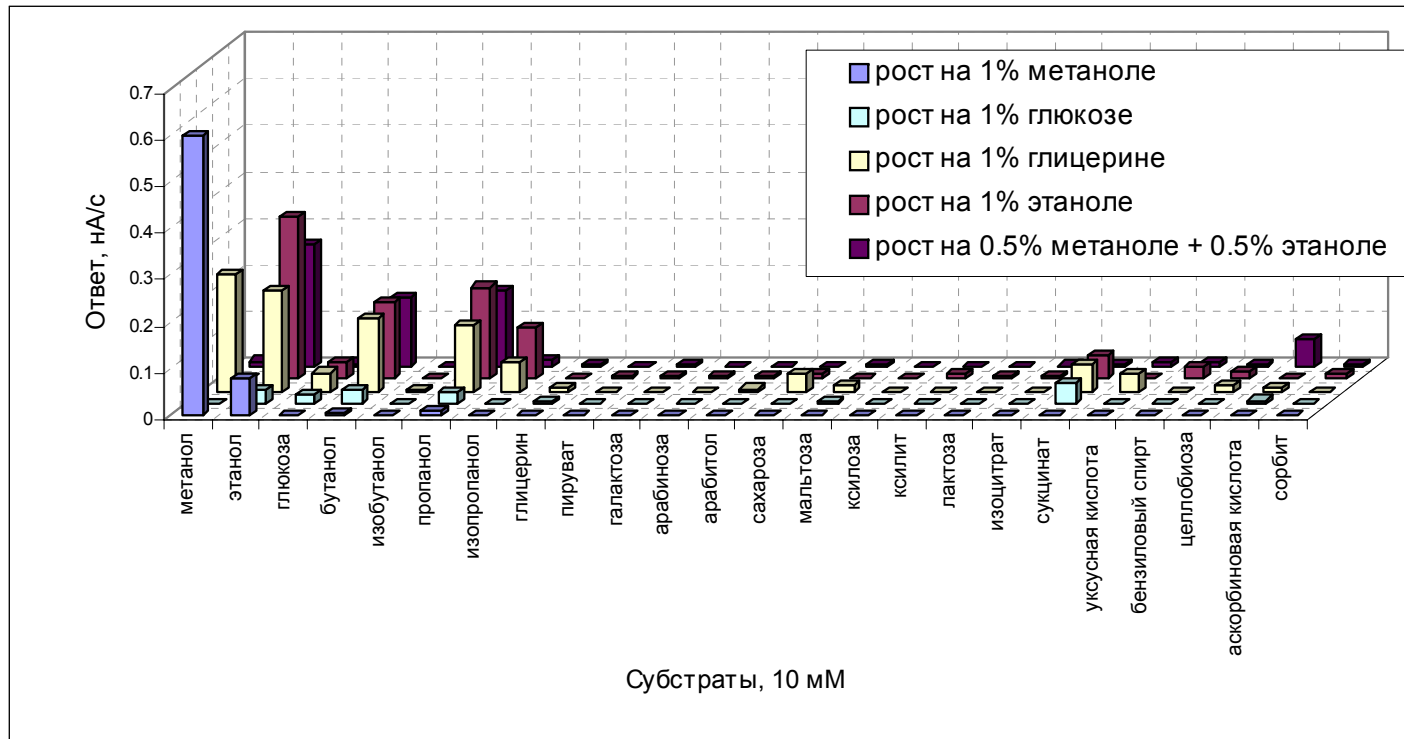
- оперативное решение диагностических задач – алкоголь
- в крови,
- в слюне, моче
- выдыхаемом воздухе.

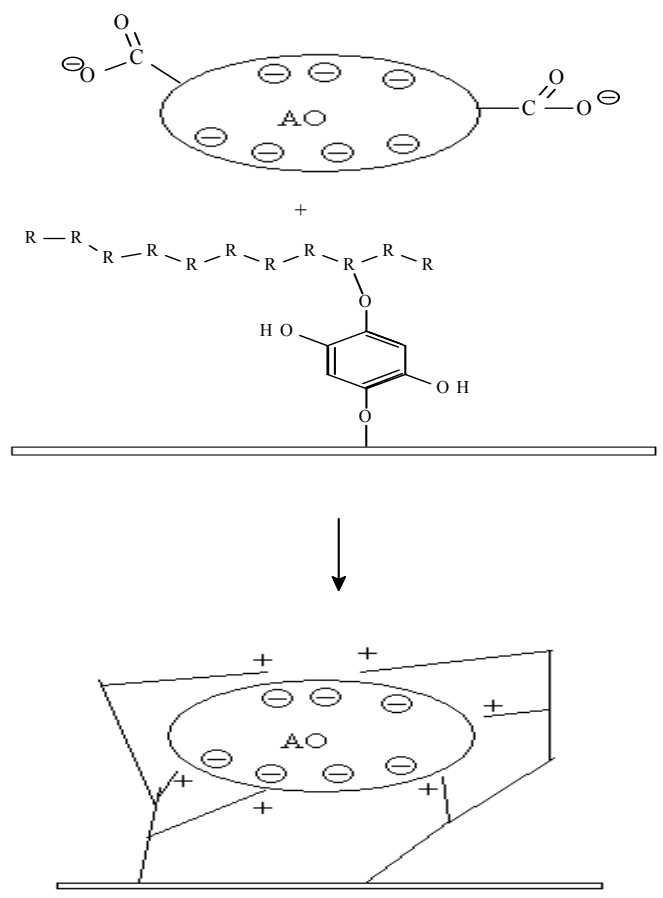
Два последних типа анализа - ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНАЯ неинвазивная диагностика - высокая актуальность

Особая актуальность – для задач судебно-медицинской экспертизы и служб МВД.

- Промышленность - Бурение газовых скважин – закачивание до сотен тонн метилового спирта - пробкообразование - выброс метанола в окружающую среду – оценка содержания.
Методы мониторинга - биосенсорная технология.
- Природные углеводородные источники топлива – нефти, газа – сокращение объемов. Биотехнологический способ промышленного получения технического спирта из растительных остатков – БИОТОПЛИВО или БИОЭТАНОЛ.
- Научные исследования. Студенты ВУЗов - специальности "аналитическая химия", "аналитическая биотехнология" - современные методы анализа спиртов.

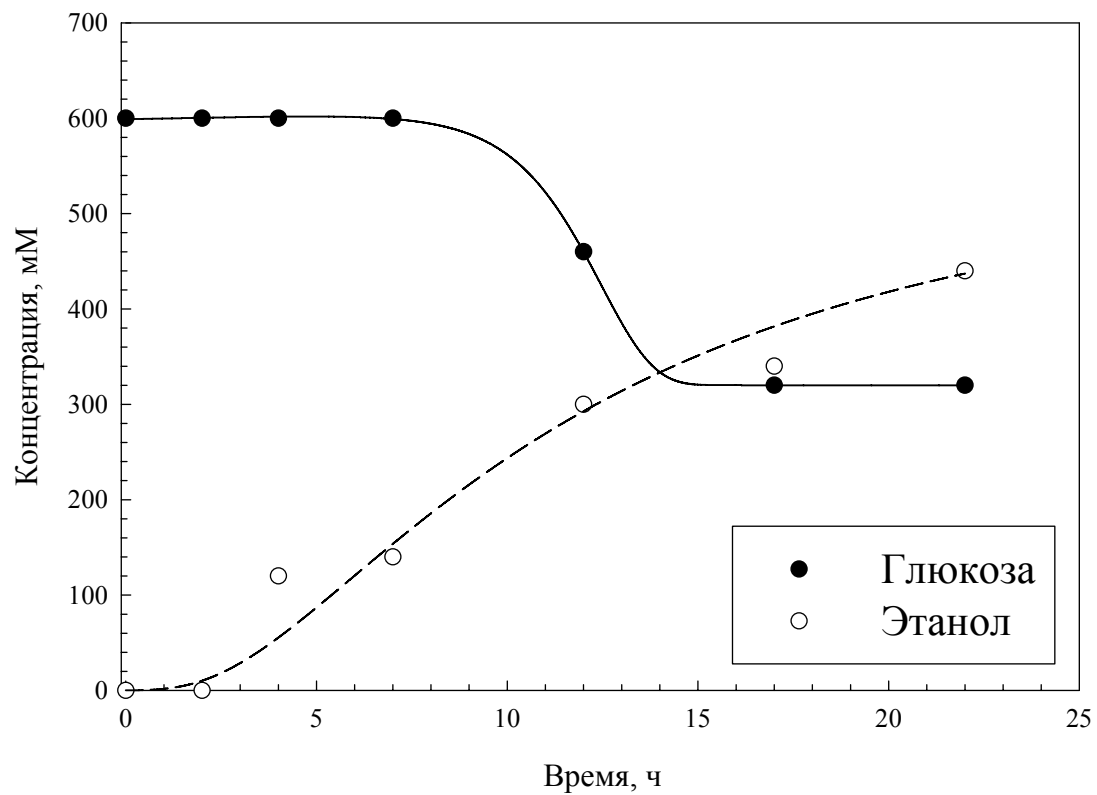
Субстратная специфичность биосенсора на основе *P. angusta* ВКМ У-2518 при культивировании на различных субстратах.





Иммобилизация АО на поверхности мембраны, активированной бензохиноном и ДЭАЭ – декстраном (диэтиламиноэтил- декстраном).

Динамика потребления глюкозы и образования этанола
дрожжевыми клетками контролируется сенсорами
на основе глюкозооксидазы и алкогольоксидазы



Субстратная специфичность штаммов микроорганизмов по отношению к олигосахаридам. Обозначения по оси X: 1-мальтоза, 2-целлобиоза, 3-сахароза, 4-раффиноза, 5-лактоза, 6-мелибиоза.

