

УДК 347.433.3.+347.474.3

ГУЛЯЕВ В.М., д.т.н., профессор  
КОРНИЕНКО И.М., к.т.н., доцент  
ЛАРИЧЕВА Л.П., к.т.н., доцент

Днепродзержинский государственный технический университет

## **БИОКОНВЕРСИЯ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА РАПСОВОГО МАСЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИЙ РОДОВ *LACTOBACILLUS* И *BIFIDUMBACTERIUM***

**Введение.** Ограниченность запасов ископаемого топлива, зависимость многих стран от импорта энергетических запасов активизируют поиск новых более доступных видов топливно-энергетического сырья. Неисчерпаемым источником такого сырья является растительная биомасса, две трети которой составляет целлюлоза. В последнее десятилетие значительно возрос интерес к получению биотоплива (этанол) из растительной биомассы с помощью микроорганизмов. Появилось большое число публикаций технологического и экономического характера, в которых этиловый спирт рассматривается как горючее будущего.

Этанол, получаемый из растительной биомассы (биоэтанол), может внести существенный вклад в восполнение энергетических ресурсов. Для получения этанола используется недефицитное сырье, в том числе целлюлозосодержащие отходы. Кроме того, биоконверсия растительной биомассы в этанол энергетически более выгодна, чем ее конверсия в микробную (белок) биомассу.

Таким образом, этиловый спирт можно рассматривать не только как горючее будущего, но и как перспективное сырье для различных отраслей микробиологической промышленности, развитие которой увеличит потребность в этиловом спирте [1].

Рапсовое масло занимает третье место в мировом производстве после соевого и хлопкового масел. Его получают экстракцией или прессованием с последующей переработкой. Масло из семян обычных сортов рапса продолжает пользоваться спросом промышленного химического, металлургического, кожевенного, мыловаренного, текстильного, красильного и прочих производств. Широко используется в машиностроении. С каждым годом все популярнее становится экологически чистый вид биологического топлива на основе рапсового масла [2].

С каждым годом наращивается выращивание рапса на получение масла, а соответственно и увеличиваются отходы, а именно шрот после выдавливания масла и солома [3, 4].

**Постановка задачи.** Цель проведения эксперимента заключается в исследовании биоконверсии отходов производства рапсового масла в этанол и определении влияния ферментов комплекса амилаз на выход этанола из исследуемых субстратов. Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

- подготовка образцов субстрата, которые являются отходами;
- самостоятельное выделение комплекса ферментов амилаз;
- формирование симбиоза молочнокислых бактерий с целью стимуляции биоконверсии;
- определение условий биодegradации с учетом особенностей использования биокатализаторов и посевного материала.

**Результаты работы.** В качестве исследуемого субстрата взяты рапсовый шрот (ГОСТ 11048-95) и рапсовая солома.

На первой стадии процесса культивирования исследуемые субстраты обогащали посевным материалом молочнокислых бактерий с целью ускорения процесса (табл.1).

Таблица 1 – Характеристика посевного материала и субстратов

Образец	Субстрат	Посевной материал
1	Рапсовый шрот	Состав № 1: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> var. <i>Diacetylactis</i> .
2	Рапсовый шрот	Состав № 2: <i>Bifidumbacterium bifidum</i> , <i>Bifidumbacterium infantis</i> , <i>Bifidumbacterium longum</i> , <i>Bifidumbacterium breve</i> , <i>Bifidumbacterium adolescentis</i> .
3	Рапсовая солома	Состав № 1: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> var. <i>Diacetylactis</i> .
4	Рапсовая солома	Состав № 2: <i>Bifidumbacterium bifidum</i> , <i>Bifidumbacterium infantis</i> , <i>Bifidumbacterium longum</i> , <i>Bifidumbacterium breve</i> , <i>Bifidumbacterium adolescentis</i> .

В качестве посевного материала (состав № 1) использован симбиоз: *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* var. *Diacetylactis*.

Посевной материал (состав № 2): *Bifidumbacterium bifidum*, *Bifidumbacterium infantis*, *Bifidumbacterium longum*, *Bifidumbacterium breve*, *Bifidumbacterium adolescentis*.

Условия культивирования: питательная среда для выращивания посевного материала – пастеризованное молоко; температура культивирования – 38°C; время культивирования – 8 часов в анаэробных условиях.

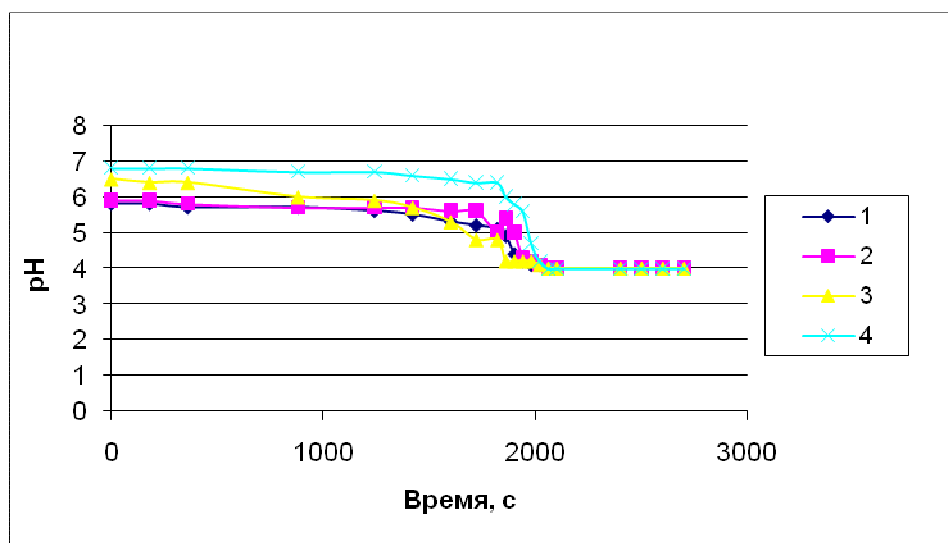
Условия обогащения посевным материалом исследуемого субстрата: к навеске взятого субстрата (рапсовый шрот массой 1 кг, разведенный в 2дм<sup>3</sup> дистиллированной воды) внесли 5% посевного материала (состав № 1, 2); к навеске соломы рапса (рапсовая солома массой 1 кг, разведенная в 2дм<sup>3</sup> дистиллированной воды) внесли 5% посевного материала (состав № 1, 2). В результате получено 4 исследуемых образца (табл.1), которые подлежат культивированию при температуре 25°C в течение 43 часов при достижении концентрации водородных ионов 4,0.

Процесс протекает без доступа кислорода. Оптимальное протекание процесса установили и оценили по результатам изменения концентрации водородных ионов. Изменение концентрации водородных ионов свидетельствует о жизненном цикле развития молочнокислых бактерий.

Установленное значение рН = 4,0 свидетельствует о стационарной фазе роста продуцентов. В процессе культивации зафиксировано выделение газа в образцах 1 и 2, что свидетельствует о нормальном протекании анаэробных условий культивирования и обеспечения анаэробного процесса сбраживания.

По достижении концентрации водородных ионов 4,0 процесс культивирования прекращен. Зависимость значений концентрации водородных ионов от времени прове-

дения эксперимента представлена на рис.1. Полученные образцы пастеризованы при температуре 75°C на протяжении 30 мин.



1 – зависимость для образца 1; 2 – зависимость для образца 2;  
3 – зависимость для образца 3; 4 – зависимость для образца 4

Рисунок 1 – Зависимость изменения концентрации водородных ионов от времени проведения эксперимента

Из результатов, представленных на рис.1, видно, что с момента проведения эксперимента значение рН 6,8 с условий нейтральной среды изменилось под воздействием симбиоза молочнокислых бактерий в сторону кислой среды – рН 4,0, которое было стабилизировано во временных пределах проведения эксперимента от 2000 до 3000 секунд. На основании достигнутых результатов стабилизации значения рН принято решение о прерывании дальнейшего культивирования молочнокислых бактерий.

На втором этапе исследований с целью активации процесса брожения в образцы внесен посевной материал, представленный дрожжами рода *Saccharomyces cerevisiae* – состав № 3 и иммобилизованные ферменты (комплекс амилаз) – состав № 4. С целью получения сравнительной характеристики в 1 и 3 образцы были внесены составы № 3 и 4, а в образцы 2 и 4 – исключительно состав № 3.

Условия получения посевного материала (состав № 3): в ёмкость объёмом 0,5 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды, содержащей 4 г глюкозы, внесено 10 г культуры *Saccharomyces cerevisiae* при перемешивании; термостатирование процесса проводили при температуре 33°C на протяжении 4 часов.

По завершении наблюдения установлено интенсивное пенообразование на поверхности жидкости, которое объясняется интенсивным ростом дрожжей и выделением углекислого газа.

Получение иммобилизованного состава № 4: в ёмкость объёмом 3 дм<sup>3</sup> солода, полученного из пшена [2, 5] с целью выделения комплекса амилаз, при интенсивном перемешивании до полного растворения поместили носитель для иммобилизации ферментов на 48 часов. В качестве носителя для иммобилизации комплекса ферментов амилазы использовали полисинтетический материал флизелин, который обладает водоустойчивыми характеристиками и микропористостью структуры, усиливающей иммобилизацию ферментов [6]. По окончании процесса иммобилизации фермент адсорбиру-

ється на носители [3], в результате чего получен готовый иммобилизованный ферментный препарат амилаз.

В каждый образец (№ 1 - 4), подлежащий пастеризации и охлаждению до температуры 33°C, внесен посевной материал (состав № 3) в условиях интенсивного перемешивания, лишь в образцы № 1 и 3 также внесен состав № 4 с целью повышения эффективности процесса. Термостатировали образцы при температуре 33°C на протяжении 96 часов. Окончание процесса брожения оценивали по прекращению выделения газа.

Следующим этапом проведения эксперимента является процесс дистилляции раствора в условиях нагревания полученного фильтрата. Из исследуемых образцов получено 1л дистиллята. Полученный дистиллят подлежит ректификации при температуре 78°C, в результате чего получен этиловый спирт плотностью 793 кг/м<sup>3</sup> (табл.2). По окончании процесса дистилляции образовавшиеся отходы подлежат инактивации. В результате обработки полученных данных эксперимента установлено практический выход этанола из взятой навески субстратов (рапсовый шрот и рапсовая солома) массой 1 кг (табл.2).

Таблица 2 – Выход этанола из навески субстратов (массой 1 кг)

Субстрат	Выход этанола при участии симбиоза молочнокислых бактерий в среде без ферментов, г	Выход этанола при участии симбиоза молочнокислых бактерий и ферментов, г	Выход этанола без участия молочнокислых бактерий, г
Рапсовый шрот	15,62	17,3	9,52
Рапсовая солома	2,55	3,26	1,86

Как видно из табл.2, использование ферментов увеличивает выход этанола на 10,76% из рапсового шрота и 27,8% из рапсовой соломы, что дает возможность оценить проведенный процесс как экономически целесообразный и эффективный с технологической точки зрения. Полученные результаты исследований свидетельствуют о возможности использования указанной технологии наряду с получением рапсового масла для переработки его на биодизель с целью получения ценного коммерческого продукта.

Применение сложного состава посевного материала – молочнокислых бактерий и дрожжей – обеспечивает более высокий выход этанола из исследуемых субстратов по сравнению с использованием исключительно посевного материала из *Saccharomyces cerevisiae*. Как свидетельствуют данные, приведенные в табл.2, использование молочнокислых бактерий значительно увеличивают выход этанола из исследуемых субстратов, что свидетельствует об интенсификации процесса биodeградации молочнокислыми бактериями растительных субстратов.

В биотехнологической практике часто используют одновременно ферментную обработку растительного сырья наряду с молочнокислыми бактериями с целью размягчения целлюлозы в процессе подготовки льна и хлопка для дальнейших этапов получения натуральных тканей.

При масштабной переработке отходов производства рапсового масла возможно получение этанола. Данные исследования могут быть использованы для снижения себестоимости биодизеля за счёт получения этанола из отходов производства.

**Выводы.** Анализ полученных результатов исследований дает возможность утверждать о перспективе использования данного биотехнологического подхода, направленного на интенсификацию методов получения этанола из отходов производства, а при использовании комплекса – молочнокислых бактерий и иммобилизованных ферментов. На основе результатов исследований рекомендовано использовать биотехнологические манипуляции, направленные на грамотное применение возможностей промышленной микробиологии и инженерной энзимологии с целью оптимизации технологии получения спирта из отходов производства рапсового масла путём использования иммобилизованных ферментов и симбиоза молочнокислых бактерий для увеличения выхода продукта.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лобанок А.Г. Микробный синтез на основе целлюлозы: белок и другие ценные продукты / Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н. – Мн.: Наука и техника, 198. – 325с.
2. Муратова Е.И. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие / Е.И.Муратова, О.В.Зюзина, О.Б.Шуняева. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. – 80с.
3. Биотехнология: учеб. пос. для вузов в 8 кн. / [под ред. Н.С.Егорова, В.Д.Самуилова]. – Кн. 7: Иммобилизованные ферменты / [И.В.Березин, Н.Л.Клячко, А.В.Левашов и др.]. – М.: Высшая школа, 1987. – 159с.
4. Барбанец Л.Д. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження / Барбанец Л.Д., Борзова Н.В. – Київ: Наукова думка, 2010 – 400с.
5. Корнієнко І.М. Використання полісинтетичного матеріалу, як носія для покращення іммобілізації живих організмів / Корнієнко І.М., Волошин М.Д. // Хімія і сучасні технології: II Міжнар. конф., 26-28 квітня 2005 р.: тези доп. – Дніпропетровськ: УДХТУ, 2005. – С.296.
6. Дорош А.К. Производство спиртовых напитков: сырье, аппараты, технологии получения спирта и водки с рекомендациями для индивидуальных производителей / Дорош А.К., Лисенко В.С. – К.: Либідь, 1995 – 272 с.

*Поступила в редколлегию 04.06.2012.*