

# ПОЛУЧЕНИЕ БИОТОПЛИВ И ВОЛОКНИСТЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛОВ ТОПЛИВНО-ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ В НЕФТЕГАЗОВОЙ ОТРАСЛИ

## PRODUCTION OF BIOFUELS AND FIBROUS CELLULOSE-CONTAINING MATERIALS FOR FUEL AND ENERGY PURPOSES IN THE OIL AND GAS INDUSTRY

**Z. Djamalov**  
**R. Kemalov**  
**A. Kemalov**

*Summary.* Biofuels can help reduce greenhouse gas emissions and bridge the gap between production and consumption.

It is known that ethanol is a renewable energy source. This can largely reduce dependence on oil, and also increases the feasibility of using it in gasoline as an octane booster.

The high cost of dry ethanol attracted the attention of researchers to a more economical option — aqueous ethanol. However, many works have been devoted to its effect on engine performance and exhaust gas emissions, and only a few authors have shown interest in the phase stability problems of these mixtures. This work is aimed at studying the effect of mixing cyclohexanol (CH) with aqueous ethanol-gasoline.

*Keywords:* mushrooms, strains, oil, bioethanol, agar-agar, alcohol, basidiomycete, fructose, solution, saccharification, identification.

**Джамалов Зохид Зафарович**

Аспирант

Казанский федеральный университет;

Институт геологии и нефтегазовых технологий

Казань

[z.djamalov@mail.ru](mailto:z.djamalov@mail.ru)

**Кемалов Руслан Алимович**

К.т.н

Казанский федеральный университет;

Институт геологии и нефтегазовых технологий

Казань

[kemalov@mail.ru](mailto:kemalov@mail.ru)

**Кемалов Алим Фейзрахманович**

Д.т.н

Казанский федеральный университет;

Институт геологии и нефтегазовых технологий

Казань

Аннотация. Биотопливо может способствовать сокращению выбросов парниковых газов и преодолению разрыва между производством и потреблением.

Известно, что этанол является возобновляемым источником энергии. Это может во многом уменьшить зависимость от нефти, а также повышает целесообразность его использования в составе бензина как октана повышающий присадки.

Высокая стоимость сухого этанола привлекла внимание исследователей к более экономичному варианту — водному этанолу. Однако многие работы были посвящены его влиянию на производительность двигателя и на выбросы выхлопных газов и лишь немногие авторы проявили интерес к проблемам фазовой стабильности этих смесей. Данная работа направлена на изучение влияния смешивания циклогексанола (ЦГ) с водным этанолом-бензином.

Ключевые слова: грибы, штаммы, нефть, биоэтанол, агар-агар, спирт, базидиомицет, фруктоза, раствор, осаживание, идентификация.

### Введение

**З**агрязнение воздуха и страх перед истощением запасов ископаемого топлива, сосредоточили внимание на поиске экологически чистых и возобновляемых альтернативных источников энергии. Биоэтанол является одним из наиболее альтернативных видов топлива, используемых во мно-

гих странах для снижения полной зависимости от ископаемого топлива, поскольку он является возобновляемым источником энергии. Биоэтанол вносит значительный вклад в сокращение потребления сырой нефти. Высокое содержание кислорода в этаноле способствует улучшению сгорания топливной смеси, что приводит к снижению токсичных выбросов выхлопных газов по сравнению с бензином, тем са-

Таблица 1. Перечень штаммов базидиальных грибов, исследуемых в работе

№ п/п	Штамм	№ п/п	Штамм
1	Boletus baduus MT-2.04	18	Piptoporus betulinus MT-30.21
2	Coniophora puteana Cp-1	19	Pleurotus eryngii MT-17.31
3	Coprinus comatus MT-25.01	20	Pleurotus ostreatus MT-17.07
4	Flammulina velutipes MT-3.06	21	Pleurotus saju-cajor MT-17.25
5	Fomitopsis pinicola MT-5.41	22	Polyporus varius MT-30.16
6	Ganoderma applanatum MT-6.31	23	Polyporus squamosus MT-30.51
7	Ganoderma lucidum MT-6.09	24	Schizophyllum commune MT-33.01
8	Hypsizigus marmoreus MT-9.03	25	Suillus bovinus MT-18.01
9	Hypsizigus ulmarius MT-9.01	26	Gleophyllum abietinum MT-8.03
10	Inonotus obliquus Inon-1	27	Heterobasidion annosum MT-15.02
11	Laccaria sp. MT-27.01	28	Hypsizigus marmoreus MT-9.02
12	Lactarius necator MT-10.01	29	Trametes hirsuta MT-17.24
13	Laetiporus sulphureus MT-11.07	30	Trametes hirsuta MT-24.20
14	Lycoperdon sp. MT-26.01	31	Trametes hirsuta MT-24.24
15	Phallus hadriani MT-35.07	32	Trametes trogii MT-20.06
16	Phallus impudicus MT-35.11	33	Trametes versicolor It-1
17	Phellinus ignarius MT-14.23	34	Xerula sp. MT-34.05

мым, способствуя поддержанию оптимального состояния окружающей среды [1–7].

Биоэтанол имеет высокое октановое число, поэтому он является хорошей альтернативой опасным соединениям тетраэтилсвинца и может быть использован в качестве потенциального усилителя октанового числа. Биоэтанол является нетоксичным соединением, поэтому с ним легче обращаться, чем с токсичным метанолом [8–10]. Кроме того, смеси этанола и бензина обеспечивают лучшую производительность двигателя по сравнению с чистым бензином при различных условиях испытаний. Поэтому этанол рассматривается как перспективная добавка к бензину [11].

Материалы на основе сахара и крахмала, такие как сахарный тростник и зерно, являются двумя группами сырья, которые в настоящее время используются в качестве основных ресурсов для производства этанола. Третья группа — лигноцеллюлозные материалы, представляющие собой оптимальный вариант производства этанола. Лигноцеллюлозная биомасса и другие сахарозосодержащие материалы в настоящее время используются в качестве экономичного альтернативного сырья для производства этанола [12,13]. Зависимость от кукурузы и других зерновых продуктов питания в качестве основного сырья для производства биоэтанола, может повлиять на уменьшение количества корма для животных и продуктов питания для людей, поэтому ожидается, что большая часть этанола, который в будущем будет использоваться в качестве альтернативы ископаемому топливу, будет представлять собой этанол из лигноцеллюлозной

биомассы [14–19]. Высокая стоимость производства этанола обусловлена тем, что необходимостью является использование энергии для процессов дистилляции и обезвоживания, которые производятся для того, чтобы избавиться от азеотропной воды, сопровождающей этанол [20].

В качестве объекта исследования были выбраны грибы отдела *Basidiomycota*. Шестьдесят один штамм базидиальных грибов выделен из природных плодовых тел, произрастающих на древесине и древесных остатках, в лаборатории биотехнологии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина и включен в коллекцию штаммов базидиальных грибов лаборатории биотехнологии [35]. Пять штаммов (*T. versicolor* IT-1, *C. puteana* Cp-1, *T. versicolor* B-08/06, *I. obliquus* Inon-1, *F. pinicola* Fr-7) полученных из коллекции «Базидиальные грибы съедобные и биотехнологически значимые» кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, выделено лично профессором, д.б.н. Шнырёвой Аллой Викторовной [35]. Частичный список исследуемых в работе штаммов приведен в таблице 1.

Первичную видовую принадлежность грибов устанавливали, изучая ряд макроморфологических признаков плодовых тел согласно определителям [21–23]. Выделение чистых культур проводили на плотной питательной среде — суловом агаре, содержащем: агар — 15 г/л. («Panreas», США), соевый пептон — 3 г/л. («CarlRoth», Германия), жидкое суло — 30 г/л. («Тедди Бир», Россия) на чашках Петри. Стерилизацию питательной среды проводили при 121 °С в течение 20 минут.

Получение чистых культур проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе. Плодовые тела разламывали, либо делали надрез вдоль плодового тела стерильным скальпелем, затем разламывали плодовое тело по линии надреза. Из открывшейся стерильной части гриба с помощью пинцета выделяли фрагменты мицелия диаметром 5–10 мм. и переносили на сусловый агар, помещая по 2–3 фрагмента на каждую чашку Петри. После этого чашки выдерживали при температуре 28 °С в течение 5–7 суток, раз в сутки осуществляя мониторинг на наличие/отсутствие патогенной микрофлоры. Культуры, подвергшиеся контаминации патогенной микрофлорой, многократно пересеивали до получения монокультур. Помимо визуального контроля, чистоту культуры оценивали методом световой микроскопии при фазово-контрастном освещении и увеличении  $\times 800$ . Критерием чистоты и принадлежности к базидиомицетам выделенных культур служило наличие специализированных структур на гифах мицелия — пряжек и отсутствие бактериального заражения. Чистоту культуры оценивали на всех этапах исследования. Выделенные штаммы пересеивали в биологические пробирки со скошенным суловым агаром и хранили культуры при температуре 4 °С.

Для погруженного культивирования использовали стандартную питательную среду, содержащую: глюкоза — 20 г/л. («Химмед», Россия), соевая мука полуобезжиренная — 10 г/л. («Сойка», Россия),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,25 г/л. («Химмед», Россия),  $KH_2PO_4$  — 2,5 г/л. («CarlRoth», Германия) [24, 25]. Стерилизацию питательной среды проводили при 121 °С в течение 30 минут. Кусочки агаризованной среды, обросшей мицелием, размером не больше 3–5 мм<sup>2</sup> переносили в качалочные колбы объемом 750 мл. со 100 мл. стерильной среды в количестве 30–40 штук и культивировали на ротационном шейкере при температуре 28 °С и скорости вращения 250 об./мин. Первичное культивирование в жидкой среде проводили до ее просветления и полного потребления нерастворимого субстрата.

Для получения жидкого посевного материала, культуру, полученную из фрагментов агара с мицелием, переносили в колбы со стерильной питательной средой, в количестве 10% от объема питательной среды и культивировали на ротационном шейкере при температуре 28 °С и скорости вращения 250 об./мин в течение 4–6 суток в зависимости от штамма.

При исследовании штаммов базидиомицетов на способность к продуцированию этилового спирта жидкий посевной материал в количестве 10 мл. переносили в качалочные колбы на 750 мл. со 100 мл. стандартной питательной среды и культивировали при температуре

28 °С и 250 об./мин на качалке в течение времени, необходимого для полного потребления муки. После этого в колбы добавляли стерильный раствор глюкозы с концентрацией 400 мг/мл. в количестве 5 мл. и закрывали стерильными гидрозатворами с резиновыми пробками. Колбы выдерживали в анаэробных условиях при температуре 25 °С в течение 7 суток. При изучении влияния концентрации исходного субстрата (глюкозы) на синтез целевого продукта этанола, в стандартную питательную среду добавляли глюкозу в концентрациях 20, 60, 100, 160 и 200 г/л. Культивирование проводили в течение 4 суток, далее помещали колбы в анаэробные условия и выдерживали при температуре 25 °С в течение 7 суток.

Для исследования динамики накопления этанола на модельных субстратах, в качестве которых использовали 2% растворы фруктозы, целлобиозы, галактозы, арабинозы, ксилозы, 10 мл. жидкого посевного материала переносили в качалочные колбы на 750 мл. со 100 мл. стандартной питательной среды и культивировали на качалке при температуре 28 °С и 250 об./мин и в течение времени, необходимого для полного потребления муки. Затем биомассу отмывали в асептических условиях стерильной водой, переносили в колбы со стерильными растворами сахаров и закрывали стерильными гидрозатворами с резиновыми пробками. Колбы выдерживали в анаэробных условиях при температуре 25 °С в течение 11 суток. Отбор проб проводили 1 раз в 24 часа. При работе со средами, содержащими глюкозу, биомассу не отмывали, а определяли остаточное содержание глюкозы в среде и затем вносили дополнительно раствор глюкозы с концентрацией 20 г/л. Исследование возможности многократного использования биомассы для продуцирования спирта проведено аналогично эксперименту по исследованию возможности продуцирования спирта. После 7-ми суток анаэробной стадии, биомасса была асептически отфильтрована, помещена в колбу со 100 мл. среды с глюкозой в концентрации 20 г/л. Затем колба снова была помещена в анаэробные условия на 7 суток. Эксперимент повторялся 5 раз, после каждого цикла определялись концентрации этанола и биомассы.

Исследование возможности осахаривания субстратов проводили на чашках Петри с использованием измельченной соломы ржи (размер частиц до 5 мм.) в качестве модельного субстрата. Солому в количестве 5 г. помещали в чашку Петри, добавляли 10 мл. водопроводной воды, автоклавируем. После этого, на чашку Петри вносили 5–7 пеллет из погруженной культуры. Осахаривание проводили в течение 7 суток. Каждый день отбирали по 3 чашки, проводили экстракцию содержимого чашки Петри в 100 мл. горячей водопроводной воды. Экстракцию проводили в тече-

ние часа. После этого отбирали образцы на анализ для определения концентрации образующихся редуцирующих сахаров. Исследование возможности прямой конверсии лигноцеллюлозного сырья в этанол проводили на модельных субстратах, в качестве которых были выбраны карбоксиметилцеллюлозы натриевая соль (20 г/л, «Карбокам», Россия), микрокристаллическая целлюлоза марки Avicel (20 г/л «Fluka», Германия), измельченная солома ржи с размером частиц до 5 мм. (30 г/л), хвойные опилки двух видов: опилки с размером частиц 10–15 мм. и опилки, прошедшие механическую обработку (измельчение), с размером частиц 1–2 мм. В колбы, содержащие модельные субстраты, вносили по 100 мл. биомассы с культуральной жидкостью и выдерживали без аэрации в течение 7 суток при температуре 25 °С.

### Идентификация штаммов микроорганизмов

Идентификацию штаммов МТ-24.24, МТ-17.24 и МТ-5.21 проводили во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП «ГосНИИ-генетика». Штамм It-1 был идентифицирован на кафедре микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова профессором, д.б.н. Шнырёвой А.В [35].

Видовую верификацию/идентификацию штаммов базидиомицетов осуществляли на основе секвенирования внутреннего транскрибируемого спейсерного участка (ITS) кластера генов рПНК. Амплификацию ITS последовательности, кодирующей ген низкомолекулярной 5.8S рПНК и фланкирующие ген спейсерные последовательности ITS1 и ITS2, проводили с использованием стандартных праймеров ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

### Определение концентрации биомассы

Для оценки концентрации накапливаемой биомассы, на промежуточных этапах эксперимента и к концу времени культивирования, биомассу высушивали при температуре 56–60 °С в течение 24–26 часов до остаточной влажности 6–8%. После этого взвешивали биомассу до второго знака после запятой и проводили сравнение выхода воздушно-сухой биомассы в г/л питательной среды.

### Определение концентрации редуцирующих сахаров

Определение концентрации редуцирующих сахаров осуществляли согласно методике с использованием

DNS-метода, адаптированного с целью уменьшения расхода рабочего реагента до 1 мл. [26, 27]. Состав реактива DNS: дистиллированная вода — 1416 мл., 3,5-динитросалициловая кислота — 10,6 г. («Acros», Бельгия), NaOH — 19,8 г («Химмед», Россия), Na-K тартрат — 306 г. («Biochem», Франция), фенол (нагретый до 50 °С) — 7,6 мл. («Вектон», Россия), метабисульфит Na («Реахим», Россия) — 8,3 г. Пробы культуральной жидкости в объеме 1 мл. отбирали с соблюдением правил асептики и переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Биомассу мицелия отделяли центрифугированием в течение 20 мин при  $5 \cdot 10^3$  г. В пробирки Видаля (10x80), содержащие по 1 мл. рабочего реагента, вносили 1 мл. исследуемой жидкости и 2 мл. дистиллированной воды. В качестве контроля, вместо исследуемых проб использовали дистиллированную воду, а в качестве калибратора — растворы глюкозы с концентрацией от 0,15 до 1,5 г/л. Пробы тщательно перемешивали и помещали в кипящую водяную баню на 5 мин., затем охлаждали. Измеряли величину оптической плотности опытных и калибровочных проб против контрольной (холостой) пробы в кюветках с длиной оптического пути 10 мм. при длине волны 540 нм. [28]. В случае, если концентрация редуцирующих сахаров в исследуемой пробе превышала 1,5 г/л, исследуемую жидкость разводили дистиллированной водой.

### Определение концентрации глюкозы

Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом, используя коммерческую тест-систему «Фотоглюкоза», (Импакт, РФ). Пробы культуральной жидкости в объеме 1 мл. отбирали с соблюдением правил асептики и переносили в микроцентрифужные пробирки, объемом 1,5 мл. Биомассу мицелия отделяли центрифугированием в течение 20 мин при  $5 \cdot 10^3$  г. Пробы растворов сахаров из опытов по оценке ферментативной активности также отбирали в объеме 1 мл., но использовали без предварительной обработки. Для приготовления рабочего реагента 1 таблетку ферментного препарата растворяли в 40 мл. дистиллированной воды и довели объем до 50 мл. В пробирки Видаля (10x80), содержащие 2 мл. рабочего реагента вносили 0,025 мл. исследуемой жидкости (опытная проба), дистиллированной воды (контрольная проба) или 10 мл. раствора глюкозы (калибратор). Пробы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 15 мин. при температуре 37 °С. Измеряли величину оптической плотности опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы в кюветках с длиной оптического пути 10 мм. при длине волны 500 нм. В случае, если концентрация глюкозы в исследуемой пробе превышала 25 ммоль/л., исследуемую жидкость разводили дистиллированной водой.

Исследование  
целлюлазной активности  
чашечным методом

Фрагменты агаризованной среды с мицелием размером 3\*3 мм. переносили с соблюдением правил асептики из рабочей культуры в центр чашки Петри с СМС-агаром следующего состава: NaNO<sub>3</sub>—2,0 г/л. («Химмед», Россия), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>—1,0 г/л. («CarlRoth», Германия), MgSO<sub>4</sub>—0,5 г/л. («Химмед», Россия), KCl — 0,5 («Химмед», Россия), пептон — 0,2 г/л. («CarlRoth», Германия), Na-карбоксиметилцеллюлоза — 2,0 г/л. («Карбокам», Россия), агар — 17,0 г/л. («Panreac», США), где Na-карбоксиметилцеллюлоза выступала в качестве единственного источника углерода [29].

После 5 суток культивирования при 28 °С, поверхность чашек заливали на 5 минут аптечным раствором Люголя («Московская фармфабрика», Россия) разведённым дистиллированной водой в соотношении 1:20. После этого раствор Люголя сливали. Если штамм обладал целлюлазной активностью, появлялась зона просветления вокруг колонии гриба. Коэффициент целлюлазной активности вычисляли по формуле [30]:

$$A = \frac{S_{\text{зоны просветления}} - S_{\text{колонии}}}{S_{\text{колонии}}}, \text{ где}$$

A — коэффициент целлюлазной активности;  
S<sub>зоны просветления</sub> — площадь неокрашенного участка вокруг мицелия;  
S<sub>колонии</sub> — площадь, занимаемая мицелием гриба.

Определение фенолоксидазной  
активности чашечным методом  
(метод Бавендамма)

Фрагменты агаризованной среды с мицелием размером 3\*3 мм. асептические переносили в чашки Петри со средой, содержащей: агар — 15 г/л («Panreac», США), жидкое сусло — 30 г/л («Тэдди Бир», Россия), галловая кислота — 3,5 г/л («Диаэм», Россия) [31]. О выделении фенолоксидаз судили на основании появления коричневой окраски в субстрате вокруг растущего мицелия. Коэффициент фенолоксидазной активности (ОА) вычисляли по формуле:

$$OA = \frac{S_{\text{зоны окрашивания}} - S_{\text{колонии}}}{S_{\text{колонии}}}, \text{ где}$$

ОА — коэффициент фенолоксидазной активности;  
S<sub>зоны окрашивания</sub> — площадь окрашенного участка вокруг мицелия;  
S<sub>колонии</sub> — площадь, занимаемая мицелием гриба.

Определение жизнеспособности штаммов базидиальных грибов в присутствии пероксида водорода

Для исследования жизнеспособности штаммов базидиальных грибов в присутствии пероксида водорода 10 мл. жидкого посевного материала переносили в качалочные колбы на 750 мл. со 100 мл. стандартной питательной среды. В каждую из колб вносили по 1 мл. раствора пероксида водорода («Flagma», Россия) с концентрациями от 0,5 до 4% с шагом в 0,5% и культивировали на качалке при 250 об./мин и температуре 28 °С в течение 4-х суток. После этого оценивали количество накопленной биомассы. В качестве контроля использовали колбу с посевным материалом без внесения пероксида водорода.

Определение  
концентрации этилового спирта

Концентрацию продуцированного этилового спирта определяли методом газовой хроматографии на приборе Кристалл-5000.2 («Хроматэк», Россия) с ПИД-детектором на колонке Хромосорб 102 (3 м × 3 мм) в изотермическом режиме при температуре колонки 200 °С.

Оптимизация состава  
питательной среды для штаммов  
базидиальных грибов

Оптимизация состава питательной среды включала в себя определение трофических потребностей, метод полного факторного эксперимента (ПФЭ) и метод крутого восхождения.

Так, определение трофических потребностей заключалось в подборе источников азота и углерода, их комбинировании и оценке выхода воздушно-сухой биомассы на определенные сутки культивирования.

В качестве источников углерода были выбраны: глюкоза (20 г/л, («Химмед», Россия), соевое масло (20 мл/л, «BiologicOils», Россия), подсолнечное масло (20 мл/л, «Золотая семечка», Россия), меласса (35 г/л, «Юсико», Россия), сусло (30 г/л, «Тедди Бир», Россия); в качестве источников азота были выбраны: соевая мука полуобезжиренная (20 г/л, «Сойка», Россия), пептон (10 г/л, («CarlRoth», Германия), кукурузный экстракт (10 мл/л, «Агросевер», Россия), дрожжевой экстракт (5 г/л, «CarlRoth», Германия). Минеральный фон оставался неизменным и включал MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,25 г/л, «Химмед», Россия) и KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,5 г/л, «CarlRoth», Германия). Исследование проводили на 20 вариантах питательных сред. Для определения времени культивирования предварительно определена динамика накопления биомассы. Время, к которому накапливалось максимальное количество биомассы на стандартной питательной среде, считалось оптимальным временем

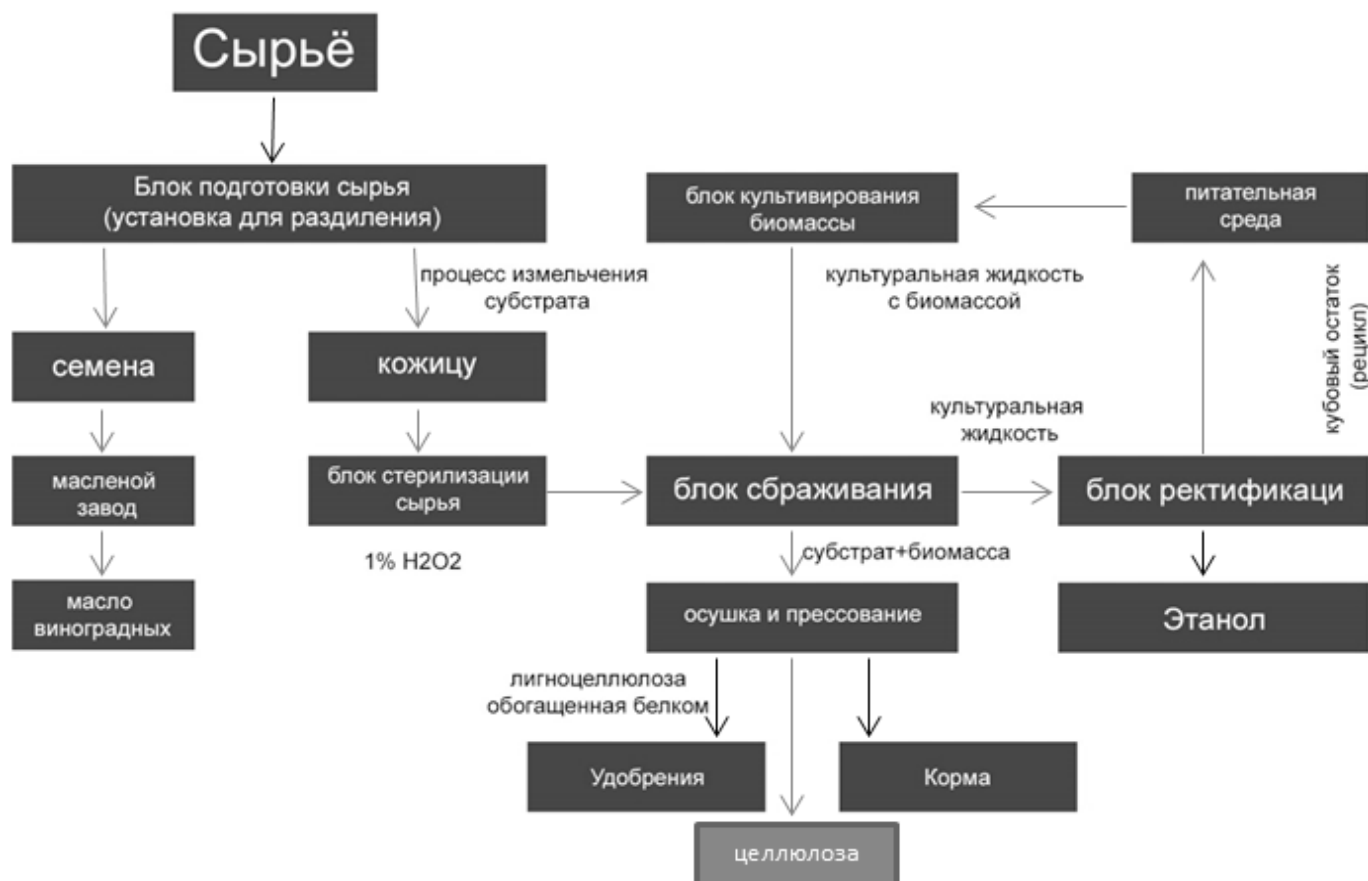


Рис. 1. Принципиальная схема производства биоэтанола из виноградной выжимки

культивирования в эксперименте по определению трофических потребностей.

Метод полного факторного эксперимента проводился для тех факторов (компонентов питательной среды), при которых выход биомассы был максимальным. Эксперимент проводили на трех уровнях. На основании данных ПФЭ были поставлены эксперименты по методу крутого восхождения [32–34].

### Статистические методы

Обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010. Экспериментальные значения были получены в трехкратной повторности, результаты показаны в виде среднего значения, а погрешности — в виде стандартного отклонения по выборке.

### Результаты технологии получения биоэтанола

На основании результатов, полученных при проведении исследований по выявлению штаммов, облада-

ющих ферментативной (целлюлазной и лигниназной) активностью и способных к прямой конверсии лигноцеллюлозы в этанол, предложена принципиальная технологическая схема производства биоэтанола из виноградной выжимки (рисунок 1).

Сырьё, в качестве которого могут быть использованы виноградная выжимка, либо обыкновенный тростник, поступает в блок подготовки сырья. В блоке подготовки есть разные потоки для выжимки винограда. Оттуда отделяются семена, и затем направляются в масленный завод, чтобы получить из него ценный продукт. В блоке подготовки осуществляется измельчение сырья: для виноградной выжимки рекомендуемый размер частиц составляет 1–2 мм., для обыкновенного тростника — 5–10 мм. Затем измельченное сырьё поступает в блок стерилизации, где осуществляется обработка сырья 1% раствором пероксида водорода в течение одного часа. Стерильный субстрат поступает в ферментеры блока сбраживания. Ферментеры представляют собой емкости, внутренний объем которых разделен на две камеры фильтрующей перегородкой. Одна камера предназначена для загрузки биомассой базидиальных грибов, а другая для загрузки стерильных субстратов. Биомасса для

Таблица 2. Параметры технологического процесса производства биоэтанола из лигноцеллюлозного сырья

Показатели	Единица измерения	Значение параметра
<b>Блок подготовки сырья</b>		
Степень измельчения субстрата:	мм	
Виноградная выжимка		1–2
Обыкновенный тростник		5–10
<b>Блок стерилизации сырья</b>		
Концентрация раствора пероксида водорода	% масс.	1,0
Температура обработки сырья	°С	25–30
Время стерилизации	Час	1
<b>Блок культивирования биомассы (при стерилизации)</b>		
Температура	°С	121
Давление	атм.	1
Время стерилизации	Час	1
<b>Блок культивирования биомассы (при культивировании)</b>		
Температура	°С	28
Расход воздуха	м <sup>3</sup> /м <sup>3</sup>	3
Скорость вращения мешалки ферментеров	Об./мин	180–220
Время культивирования для одной генерации (всего 3)	Час	72
<b>Блок сбраживания</b>		
Температура	°С	25
Время сбраживания субстрата	Сут	7
Скорость перемешивания	Об./мин	20 (2 раза в сутки)
<b>Осушка и прессование</b>		
Температура	°С	60
Время	Час	24
Остаточная влажность	% масс.	6–8

Таблица 3. Материальный баланс блока производства биомассы

Приход:	% масс.
Сульфат магния семиводный	0,45
Дигидрофосфат калия	4,52
Соевое масло	80,87
Соевая мука	14,10
Погруженная культура (сухая масса)	0,07
Итого	100,00
Расход:	% масс.
Биомасса	76,31
Остаток культивирования	23,69
Итого	100,00

Таблица 4. Материальный баланс блока производства биомассы

Приход:	% масс.
Виноградная выжимка	18,6
Вода	81,4
Итого:	100
<b>Расход:</b>	
Культуральная жидкость, в т.ч.	82,5
Этонол	3,8
Вода	81,4
Виноградная выжимка	14,8
Итого:	100,0

процесса ферментации производится следующим образом: питательная среда подается в блок культивирования биомассы (ферментеры), в котором происходит ее стерилизация и осуществляется засев питательной среды жидкой культурой базидиального гриба. Культивирование биомассы осуществляется в течение 3–4 суток. Процесс ферментации сбраживания субстрата (виноградной выжимки или тростника обыкновенного) протекает в течение 5–7 дней при температуре 25°C. Биомасса используется в течение не менее трех циклов ферментации (с загрузкой свежего сырья для каждого цикла). Культуральная жидкость направляется в блок ректификации. Кубовый остаток процесса ректификации направляется в рецикл в блок культивирования биомассы. Отработанные субстрат и биомасса поступают на осушку и прессование с целью производства лигноцеллюлозных удобрений или кормов, обогащенных белком. Технологические показатели процесса приведены в таблице 2.

В таблице 3 и 4 приведены материальные балансы блоков производства биомассы и сбраживания.

Выход биоэтанола по отношению к сырью (выжимки) составляет 26% масс. Преимуществом предлагаемой технологии является безотходность и отсутствие воздействия на окружающую среду. Важным аспектом предложенной технологии производства биоэтанола, основанной на применении базидиальных грибов для сбраживания лигноцеллюлозных субстратов, является отсутствие примесей, в частности, метанола и сивушных масел в составе культуральной жидкости.

#### ВЫВОДЫ

В исследовании были выбраны природные штаммы базидиальных грибов, а также определены основные методы исследования, среди которых были выделены способы культивирования базидиальных грибов, исследование различных видов активностей базидиальных грибов, методы исследования убыли исходного субстрата и накопления целевого продукта.



## ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. Ibrahim, E.N. Awad, Y. Barakat, Volatility and environmental impact of some oxygenated gasoline blends, *Egypt. J. Petrol.* 16 (2007) 29–50.
2. C. Dardiotis, G. Fontaras, A. Marotta, G. Martini, U. Manfredi, Emissions of modern light duty ethanol flex-fuel vehicles over different operating and environmental conditions, *Fuel* 140 (2015) 531–540.
3. A. Elfasakhany, Investigations on performance and pollutant emissions of spark-ignition engines fueled with n-butanol-, isobutanol-, ethanol-, methanol-, and acetone-gasoline blends: A comparative study, *Renew Sustainable Energy Rev.* 71 (2016) 404–413.
4. P. Iodice, G. Langella, A. Amoresano, Ethanol in gasoline fuel blends: Effect on fuel consumption and engine out emissions of SI engines in cold operating conditions, *Appl. Therm. Eng.* 130 (2018) 1081–1089.
5. B. Dog̃an, D. Erol, H. Yaman, E. Kodanl, The effect of ethanol gasoline blends on performance and exhaust emissions of a spark ignition engine through exergy analysis, *Appl. Therm. Eng.* 120 (2017) 433–443.
6. J.D. Becerra-Ruiz, R.G. Gonzalez-Huerta, J. Gracida, A. Amaro-Reyes, G. Macias-Bobadilla, Using green-hydrogen and bioethanol fuels in internal combustion engines to reduce emissions, *Int. J. Hydrogen Energy* 44 (2019) 12324–12332.
7. L.V. Amaral, N.D. Santos, V. Roso, R. Sebastião, F. PachecoPujatti, Effects of gasoline composition on engine performance, exhaust gases and operational costs, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 135 (2021) 110196.
8. T.M.M. Abdellatif, M.A. Ershov, V.M. Kapustin, M.A. Abdelkareem, M. Kamil, A.G. Olabi, Recent trends for introducing promising fuel components to enhance the anti-knock quality of gasoline: A systematic review, *Fuel* 291 (2021) 120112.
9. A. da Silva Jr., J. Hauber, L.R. Cancino, K. Huber, The research octane numbers of ethanol-containing gasoline surrogates, *Fuel* 243 (2019) 306–313.
10. T.M. Foong, K.J. Morganti, M.J. Brear, G. Gabriel da Silva, Y. Yang, F.L. Dryer, The octane numbers of ethanol blended with gasoline and its surrogates, *Fuel* 115 (2014) 727–739.
11. U.K. Efemwenkikie, S.O. Oyedepo, U.D. Idiku, D.C. Uguru-Okorie, A. Kuhe, Comparative analysis of a four stroke spark ignition engine performance using local ethanol and gasoline blends, *Proc. Manuf.* 35 (2019) 1079–1086.
12. L. Clifford, U. Hannah, Cellulosic ethanol: securing the planet future energy needs, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 838–841.
13. N. Patni, S.G. Pillai, A.H. Dwivedi, Wheat as a promising substitute of corn for bioethanol production, *Proc. Eng.* 51 (2013) 355–362.
14. A.A. Yusuf, L.F. Inambao, Bioethanol production from different Matooke peels species: A surprising source for alternative fuel, *Case Studies Thermal Eng.* 13 (2019) 100357.
15. Y. Zhao, A. Damgaard, S. Liu, H. Chang, Thomas H. Christensen, Bioethanol from corn stover — Integrated environmental impacts of alternative biotechnologies, *Resour. Conserv. Recycl.* 155 (2020) 104652.
16. S. Shields, R. Boopathy, Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cane, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (2011) 142–146, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.10.006>.
17. J. Wang, Y.M. Kim, H.S. Rhee, M.W. Lee, J.M. Park, Bioethanol production from mannitol by a newly isolated bacterium, *Enterobacter* sp. JMP3, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 199–206, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.012>.
18. Q. Kang, L. Appels, T. Tan, R. Dewil, Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities, *Sci. World J.* (2014) 13, <https://doi.org/10.1155/2014/298153>, Article ID298153.
19. K.S. Neelkant, S. Kulkarni, S.K. Jayalakshmi, K. Sreeramulu, Saccharification of the pretreated husks of corn, peanut and coffee cherry by the lignocellulosytic enzymes secreted by *Sphingobacterium* sp. ksn for the production of bioethanol, *Biomass Bioenergy* 127 (2019) 105298.
20. J.L. FranciscoAlves, V.F. Silva Filho, R.A. Francisco Machado, C. Marangoni, Ethanol enrichment from an aqueous stream using an innovative multi-tube falling film distillation column equipped with a biphasic thermosiphon, *Process Safet. Environ. Protect.* 139 (2020) 69–75.
21. Saritha, M. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility / M. Saritha, A. Arora, Lata // *Indian journal of microbiology.* — 2012. — Vol. 52. — № . 2. — Pp. 122–130.
22. Alvira, P. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review / P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro // *Bioresour. Technol.* — 2010. — Vol. 101. — № . 13. — Pp. 4851–4861.
23. Eggeman, T. Process and economic analysis of pretreatment technologies / T. Eggeman, R.T. Elander // *Bioresour. Technol.* — 2005. — Vol. 96. — № . 18. — Pp. 2019–2025.
24. Mosier, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass / N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch // *Bioresour. Technol.* — 2005. — Vol. 96. — № . 6. — Pp. 673–686.
25. Klinke, H.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw / H.B. Klinke, B.K. Ahring, A.S. Schmidt, A.B. Thomsen // *Bioresour. Technol.* — 2002. — Vol. 82. — № . 1. — Pp. 15–26.
26. Tran, A.V. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS5776 / A.V. Tran, R.P. Chambers // *Enzyme and microbial technology.* — 1986. — Vol. 8. — № . 7. — Pp. 439–444.
27. ten Have, R. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi / R. ten Have, P. J.M. Teunissen // *Chemical Reviews.* — 2001. — Vol. 101. — № . 11. — Pp. 3397–3414.
28. Reid, I.D. Solid-state fermentations for biological delignification / I.D. Reid // *Enzyme and microbial technology.* — 1989. — Vol. 11. — № . 12. — pp. 786–803(b).
29. Zhao, L. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production / L. Zhao, G.L. Cao // *Bioresour. Technol.* — 2012. — Vol. 114. — Pp. 365–369.

30. Nazarpour, F. / F. Nazarpour, D.K. Abdullah, N. Abdullah et. Al. // BioMed research international. — 2013. — Vol. 2013. Pp. 1–9.
31. Taniguchi, M. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw / M. Taniguchi, H. Suzuki, D. Watanabe, K. Sakai, K. Hoshino, T. Tanaka // Journal of bioscience and bioengineering. — 2005. — Vol. 100. — № . 6. — Pp. 637–643.
32. Shrestha, P. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol / M. Rasmussen S.K. Khanal // Journal of agricultural and food chemistry. — 2008. — Vol. 56. — № . 11. — Pp. 3918–3924.
33. Patel, H. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation / H. Patel, A. Gupte, S. Gupte // BioResources. — 2009. — Vol. 4. — № . 1. — Pp. 268–284.
34. Ferraz, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis* / A. Ferraz, A.M. Córdova, A. Machuca // Enzyme and Microbial Technology. — 2003. — Vol. 32. — № . 1. — Pp. 59–65.
35. Кожевникова Е.Ю., Бескоровайная Д.А., Новиков А.А., Шнырева А.В., Барков А.В., Винокуров В.А. // Новые штаммы базидиальных грибов — продуценты этанола из лигноцеллюлозного сырья // Прикладная биохимия и микробиология. М. — 2016. — том. 52. — № .6. — ст. 609–613.

© Джамалов Зохид Зафарович ( z.djamatov@mail.ru ),

Кемалов Руслан Алимович ( kemalov@mail.ru ), Кемалов Алим Фейзрахманович.

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Казанский федеральный университет