

DOI: 10.15593/2224-9400/2017.4.05

УДК 579.66

Н.С. Воронина, И.А. Пермякова, В.В. ВольхинПермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия**ПЕРЕРАБОТКА ГЛИЦЕРИНА, ПОЛУЧЕННОГО
В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЯ,
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

*В производстве биодизеля имеется побочный продукт – глицерин, избыток которого на товарном рынке приводит к необходимости искать новые пути применения технического глицерина. Показана возможность использования глицерина, полученного как побочный продукт производства биодизеля, в качестве субстрата для роста культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. При сравнении кинетических показателей роста выявлено, что рост культуры дрожжей с использованием в качестве субстрата глицерина после производства биодизеля выше, чем аналогичные показатели при росте на химически чистом глицерине и близки по кинетическим показателям к росту на глюкозе. Указанное явление может быть объяснено наличием в глицерине как побочном продукте производства биодизеля остатков непрореагировавших продуктов перэтерификации, а также микроэлементов, попавших в масло из растительного сырья, которые более полно обеспечивают потребности растущей культуры в питательных веществах. При этом не требуется глубокая очистка глицерина от непрореагировавших компонентов, за исключением удаления избытка этанола выпариванием и нейтрализации щелочи, что делает выгодным утилизацию технического глицерина. Результаты исследования подтверждают, что глицерин может быть использован в производстве кормовых дрожжей.*

Ключевые слова: биодизель, глицерин, дрожжи, триглицериды, перэтерификация, *Saccharomyces cerevisiae*.

N.S. Voronina, I.A. Permyakova, V.V. Volkhin

Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russian Federation

RECYCLING OF THE GLYCERIN OBTAINED FROM THE BIODIESEL PRODUCTION BY USING OF YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE

In the production of a biodiesel there is a byproduct – glycerol, the excess of which in the commodity market leads to the necessity to look for new ways of application of technical glycerol. It is possible to use of glycerin obtained as a by-product of biodiesel production as substrate for the growth of yeast culture saccharomyces cerevisiae. When comparing the kinetic parameters of growth revealed that the growth of the yeast culture using glycerol after biodiesel production as substrate is higher than the growth on chemically pure glycerine and close kinetic indicators to growth on glucose. This phenomenon can be explained by the presence in glycerol as a by-product of biodiesel production residues of unreacted products of transesterification, as well as trace elements trapped in the oil from vegetative raw materials. These components are satisfy more fully the needs of a growing culture in nutrient. Therefore deep purification of glycerol from unreacted components does not require, except for the removal of excess ethanol by evaporation and neutralization of the alkali, making the best utilization of technical glycerol. The study confirms that glycerol can be used in the production of fodder yeast.

Keywords: *biodiesel, glycerine, yeast, triglycerides, transesterification, saccharomyces cerevisiae.*

В последние годы все большее внимание уделяется производству альтернативных источников энергии, в том числе биотопливам [1–3]. Одним из таких видов биотоплив является биодизель, представляющий собой смесь эфиров жирных кислот и низкомолекулярных спиртов. Процесс получения биодизеля из растительных масел заключается в переэтерификации масел и спирта. Побочным продуктом производства является глицерин [4–7]. После проведения переэтерификации полученный эфир и глицерин разделяют расслаиванием. Избыток спирта, оставшегося в фазе глицерина, обычно удаляют отгонкой [8, 9]. В том случае, если в качестве сырья для производства биодизеля используют не чистое растительное масло, а пищевые отходы (отработанные растительные масла), то в глицериновую фазу могут попадать небольшие количества продуктов термического разложения триглицеридов [10–12]. В настоящее время мировое производство глицерина из биодизеля

превышает потребность в его использовании. Поэтому целесообразно перерабатывать глицерин в другие коммерческие продукты, что позволило бы сделать технологию получения биодизеля малоотходной.

Как побочный продукт, глицерин может содержать остатки спирта, масла или эфиров жирных кислот. Важно найти пути применения глицерина, которые не требовали бы его глубокой очистки после процесса переэтерификации.

Кроме того, создание малоотходной технологии – один из основных показателей рентабельности процесса получения биодизеля. Пока что менее распространенным, но достаточно перспективным способом применения глицерина является его использование в пищевой и фармацевтической промышленности [13]. Перспективным направлением является диверсификация продукции на основе глицерина, т.е. получение разнообразных полезных продуктов, за счет применения различных вариантов его биотрансформации. В настоящее время исследования в этом направлении быстро расширяются. Еще одним способом утилизации глицерина является использование его как субстрата для выращивания кормовых добавок [14–16]. В данной работе для этих целей рассматривается возможность переработки глицерина методами биотехнологии с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Экспериментальная часть

Для оценки возможности использования глицерина в качестве основного субстрата для получения микробной биомассы клеток были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Микроорганизмы хранились на скошенном агаре, содержащем дрожжевой экстракт (20 г/л), пептон (10 г/л), глюкозу (10 г/л) и агар (20 г/л) при 4 °С.

Посевной материал был подготовлен переносом клеток петлей в колбы Эрленмейера на 125 мл, содержащие 50 мл питательной, селективной для дрожжей, среды Ридер, которая состояла из чистого глицерина (20 г/л), сульфата аммония (3 г/л), сульфата магния (0,7 г/л), хлорида натрия (0,5 г/л), нитрата кальция (0,4 г/л), фосфата калия однозамещенный (1 г/л), фосфата калия двузамещенного (0,1 г/л) и дрожжевого экстракта (1 г/л). Начальное значение рН среды доводили до 5,5 удобным объемом фосфорной кислоты. Культуру инкубировали в роторной качалке (170 об/мин) при 30 °С в течение 24 ч, центрифугировали, дважды промывали, ресуспендировали и затем использовали в качестве посевного материала в процессе культивирования.

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера на 250 мл с 100 мл стерильной среды для культивирования, содержащей предварительно обработанный глицерин (50 г/л), сульфат аммония (3 г/л), сульфат магния (0,7 г/л), хлорид натрия (0,5 г/л), нитрат кальция (0,4 г/л), фосфат калия однозамещенный (1 г/л), фосфат калия двухзамещенный (0,1 г/л) и дрожжевой экстракт (1 г/л) при первоначальном рН 5,5. Колбы инокулировали по отдельности 0,05 г/л в экспоненциальной фазе роста культуры и инкубировали на роторной качалке (170 об/мин) при 30 °С в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием (4000 об/мин, 15 мин), дважды промывали стерильной дистиллированной водой, центрифугировали и повторно суспендировали для определения концентрации клеток. Эксперименты проводились с трехкратным повторением.

Концентрацию клеток определяли по оптической плотности (OD) при 580 нм, используя фотометр фотоэлектрический VI1501 (аналог – фотометр КФК-3). Значения оптической плотности коррелировали с концентрацией клеток (г/л). Для определения концентрации глицерина использовали анализатор общегоорганического углерода ТОС-L, для идентификации продуктов биосинтеза был использован метод ИК-спектроскопии.

Очистка сырого глицерина. Основной целью очистки глицерина было устранение метанола, эфира катализатора (в основном олеата калия), ацилглицеридов и жирных кислот, образующихся в процессе переэтерификации при производстве биодизельного топлива. В глицерине, полученном после производства биодизеля, могут содержаться примеси, попавшие из исходного сырья или образовавшиеся в ходе химических реакций [15].

В настоящем исследовании добавление 2,5 мл 98 % (мас.) фосфорной кислоты в 50 мл сырого глицерина позволило произвести полное разделение мыла и свободных жирных кислот. Культивирование дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* проводили на модифицированной среде Ридер. В качестве единственного углеродного субстрата для микробиологической переработки был использован глицерин ($C_3H_8O_3$ – 10 г) как побочный продукт производства биодизеля. В состав питательной среды входят следующие соли: сульфат аммония – 0,75 г; сульфат магния – 0,175 г; хлорид натрия – 0,125 г; нитрат кальция – 0,1 г; фосфат калия однозамещенный – 0,25 г; фосфат калия двухзамещенный – 0,025 г; дрожжевой экстракт – 1 г. В состав питательной среды входят все микро- и макроэлементы, необходимые для построения клеточной биомассы и осуществления ее жизнедеятельности.

Культивирование дрожжей проводили в разных модификациях: на классической среде Ридер с глюкозой в качестве источника углерода; на модифицированной среде Ридер с заменой источника углерода в эквивалентном количестве на глицерин Х.Ч. и на среде Ридер с заменой источника углерода на глицерин, полученный после производства биодизеля. Данные эксперимента позволяют установить, могут ли дрожжи использовать глицерин как источник углеродного питания, наряду с глюкозой. Результаты опытов представлены в виде кривых роста (рис. 1, 2).

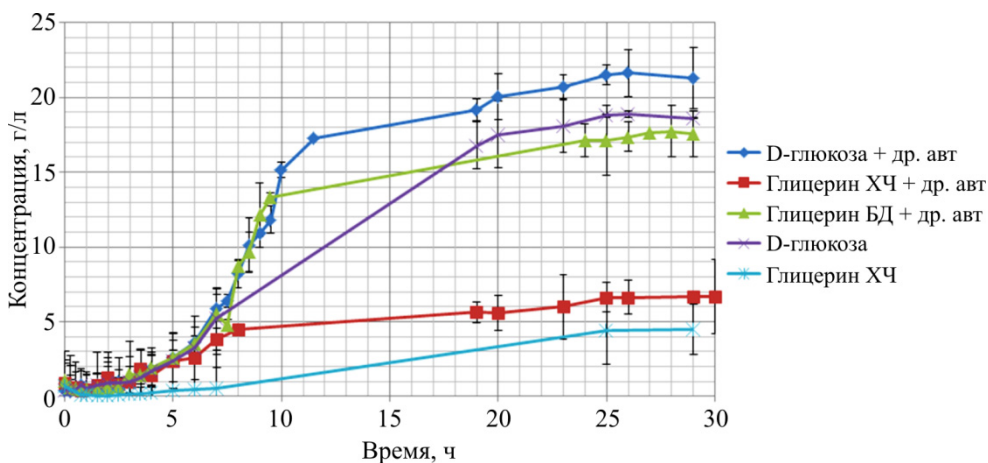


Рис. 1. Кривые роста микробной биомассы дрожжей и кривые потребления субстрата

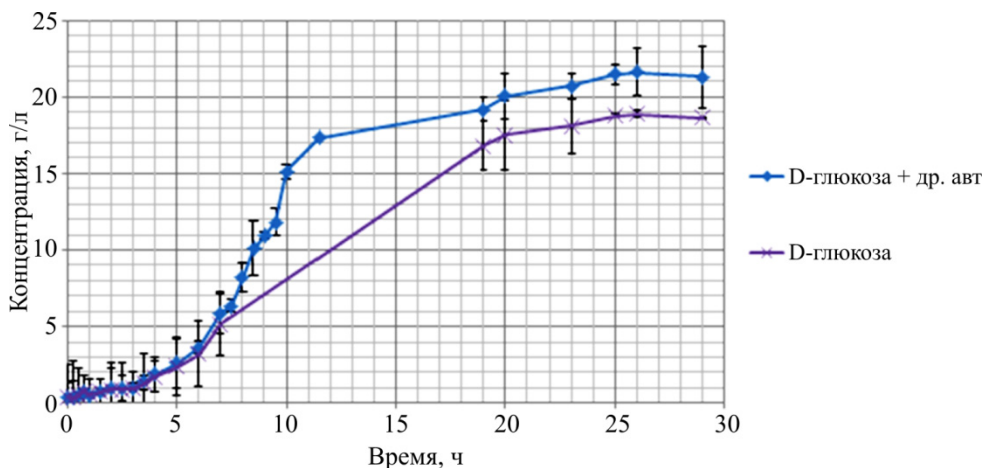


Рис. 2. Роль добавок дрожжевого экстракта при культивировании биомассы

Для использования побочных продуктов каких-либо производств в качестве субстрата желательно свести к минимуму затраты на создание среды. Как правило, это заключается в снижении добавок питательных веществ. В связи с этим культивирование дрожжей проводили как без включения, так и с включением дрожжевого экстракта в среды, содержащие обработанный глицерин в качестве источника углерода. Во-первых, в экспериментах с использованием синтетических сред с химически чистым глицерином и без добавления дрожжевого экстракта, роста клеток дрожжей не наблюдалось.

С другой стороны, исследуемые дрожжи были способны использовать обработанный глицерин от биодизельного производства, вероятно, это связано с наличием микроэлементов, таких как фосфор, сера, магний, кальций, азот и натрий, как описано ранее. Концентрации биомассы X АСБ (г/л), достигнутые в каждом случае, а также μ_{\max} (1/ч) – удельная скорость роста микроорганизмов приведены в таблице.

Основные показатели процесса культивирования дрожжей на различных субстратах после 30 ч

Условия культивирования	X вл, г/л	X АСБ, г/л	μ_{\max} , 1/ч	$\mu_{\text{ср}}$, 1/ч
Глюкоза	18,90	4,16	0,29	0,27
Глюкоза + дрожжевой экстракт	21,63	4,76	0,50	0,29
Химически чистый глицерин	4,50	0,99	0,40	0,06
Химически чистый глицерин + + дрожжевой экстракт	6,67	1,47	0,46	0,12
Глицерин биодизельного производства + + дрожжевой экстракт	17,75	3,90	0,50	0,22

Добавки дрожжевого экстракта оказывают значительное положительное влияние на рост дрожжевых клеток, это показывает, что некоторые соединения, содержащиеся в дрожжевом экстракте, вероятно, это аминокислоты и витамины, имеют важное значение для эффективного усвоения глицерина.

Результаты культивирования представлены в виде кривых роста микробной биомассы дрожжей. На диаграмме видно, это на глицерине от биодизельного производства дрожжи растут значительно лучше, чем на химически чистом глицерине. Этот факт объясняется тем, что в неочищенном глицерине содержится ряд веществ, образующихся в результате производства биодизеля. Это микроэлементы из растительного сырья, продукты нейтрализации, остатки масла, растворимые эфиры жирных кислот, этанол. И в совокупности все эти вещества спо-

способствуют лучшему усвоению глицерина и действуют как косубстрат. Рост культуры на среде с источником углерода в виде глицерина осуществляется немного медленнее, чем на среде с глюкозой, о чем говорят значения удельной скорости роста. Рост биомассы на глицерине от биодизеля уступает росту биомассы на глюкозе, но, тем не менее, показывает неплохие параметры культивирования, в результате чего удастся накопить достаточное количество биомассы.

Результаты культивирования дрожжей на среде, не содержащей источника углерода, показывают, что роста микроорганизмов не происходит ($\mu_{\max} = 0,034 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_{\text{ср}} = 0,464 \cdot 10^{-3} \text{ ч}^{-1}$), а это значит, что рост дрожжей лимитирован источником углерода.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что глицерин от биодизельного производства, в отсутствие других источников углерода, может использоваться в качестве субстрата для роста дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*.

В данной работе для анализа продуктов метаболизма дрожжей был использован метод ИК-спектроскопии. Образцом для анализа служила отфильтрованная культуральная жидкость, отобранная на начальной и конечной стадиях культивирования. Данные ИК-спектров представлены ниже на рис. 3, 4.

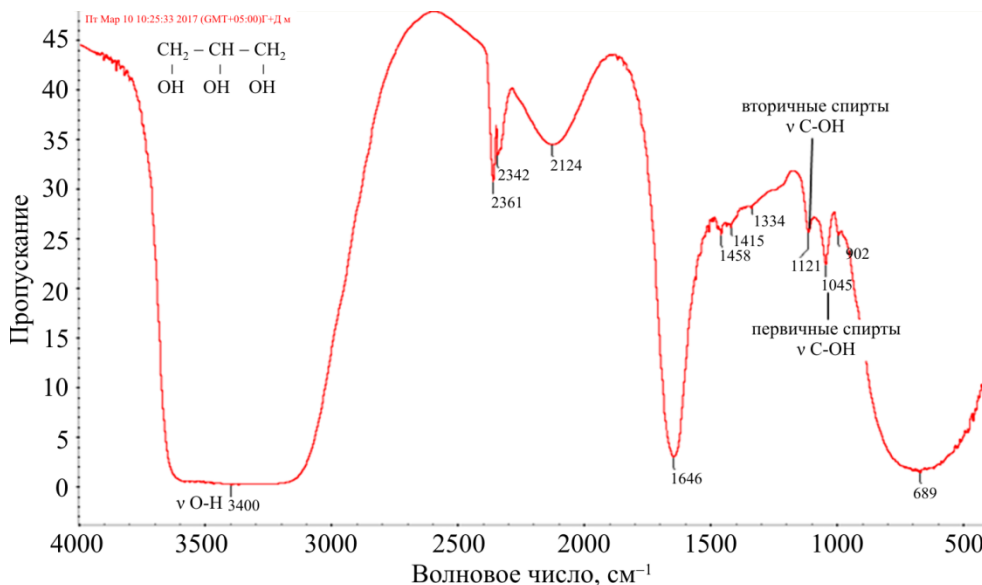


Рис. 3. ИК-спектр осветленной культуральной жидкости в начале культивирования дрожжей на глицерине с дрожжевым экстрактом

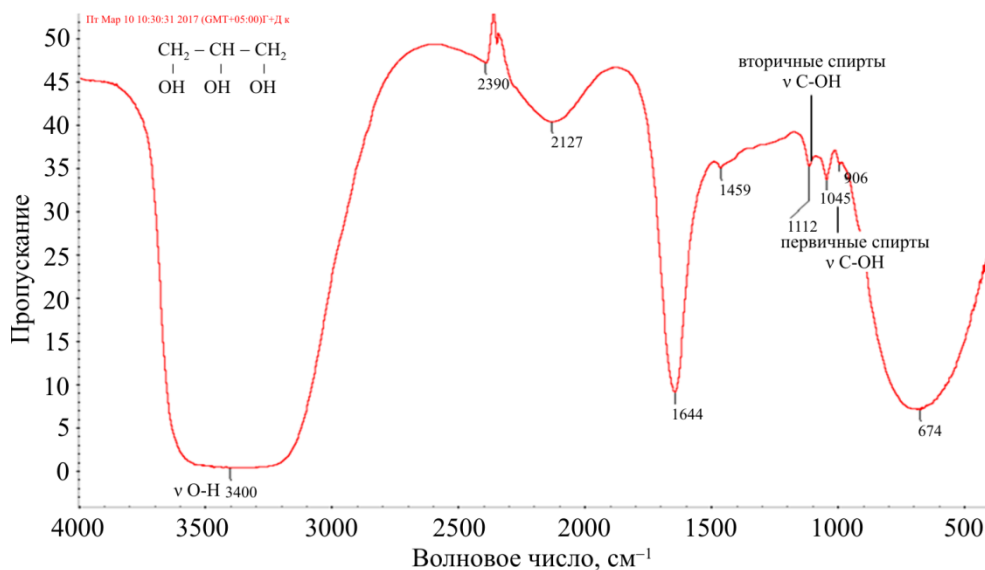


Рис. 4. ИК-спектр осветленной культуральной жидкости в конце культивирования дрожжей на глицерине с дрожжевым экстрактом

Из полученных результатов следует, что в культуральной жидкости не произошло значительных изменений. Видны изменения размеров пиков, отвечающих за связи в глицерине. Они уменьшаются, следовательно, концентрация глицерина в среде падает. Пики, отвечающие за связи в органических кислотах, практически не изменились, что говорит о том, что в ходе культивирования кислоты не образовывались. Об этом также свидетельствуют показания рН-метра – питательная среда в ходе культивирования не закислялась.

Результаты исследования показывают возможность использования глицерина в качестве субстрата для накопления биомассы дрожжей. Утилизация глицерина подтверждается данными ИК-спектроскопии. Сравнение результатов исследования свидетельствуют о высокой скорости роста культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на среде, субстратом которой является глицерин, полученный после производства биодизеля. При этом показатели роста на глицерине, полученном в ходе производства биодизеля, оказались выше, чем аналогичные показатели роста на химически чистом глицерине. Таким образом, глицерин как побочный продукт производства с успехом может использоваться в биотехнологических производствах в качестве субстрата для роста микроорганизмов.

Список литературы

1. Oner C., Altun S. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine // *Applied Energy*. – 2009. – Vol. 86. – P. 2114–2216.
2. Mendow G., Veizaga N.S., Querini C.A. Ethyl ester production by homogenous alkaline transesterification: influence of the catalyst // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102. – P. 6385–6391.
3. Биодизельное топливо: состав, получение, продуценты, современная биотехнология (обзор) / Е.П. Феофилова, Я.Э. Сергеева, А.А. Ивашечкин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 4. – С. 405–415.
4. Balat M. Prospects for worldwide biodiesel market development // *Energy Sources*. – 2009. – Vol. 4. – P. 48–58.
5. Ma F., Hanna M.A. Biodiesel production: a review // *Bioresour Technol*. – 1999. – Vol. 70. – P. 1–15.
6. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis / Y. Zhang, M.A. Dube, D.D. McLean, M. Kates // *Bioresour Technol*. – 2003. – Vol. 90. – P. 229–240.
7. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization / J.M. Encinar, J.F. Gonzalez, A. Rodriguez-Reinares // *Fuel Processing Technology*. – 2007. – Vol. 88. – P. 513–522.
8. Enweremadu C.C., Mbarawa M.M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil: a review // *Renewable and sustainable energy reviews*. – 2009. – Vol. 13. – P. 2205–2224.
9. Demirbas A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats // *Energy Conversion and Management*. – 2008. – Vol. 49. – P. 125–130.
10. Физико-химическое исследование реакций этерификации и переэтерификации в системе триацилглицерина – олеиновая кислота – этанол в условиях кислотного катализа / И.А. Пермякова, В.В. Вольхин, Д.А. Казаков // *Бутлеровские сообщения*. – 2012. – Т. 29, № 2. – С. 51–52.
11. Chhetri A.B., Watts K.C., Islam M.R. Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production // *Energies*. – 2008. – Vol. 1. – P. 3–18.
12. Heterogeneous esterification of oil with high amount of free fatty acids / J.M. Marchetti, V.U. Miguel, A.F. Errazu // *Fuel*. – 2007. – Vol. 86. – P. 906–910.

13. Biotechnological Utilization of Biodiesel-Derived Glycerol for the Production of Ribonucleotides and Microbial Biomass / J.D. Rivaldi, B. Sarrouh, R. Branco // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – № 167. – P. 2054–2067.

14. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* / K. Yu, W. Kim, S. Han // *Bioresource Technology.* – 2010. – № 101. – P. 4157–4161.

15. Thompson J.C., He B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks // *Applied Engineering in Agriculture.* – 2006. – № 22. – P. 261–265.

16. A kinetic study of the esterification of free fatty acids (FFA) in sunflower oil / M. Berrios, J. Siles, M.A. Martin, A. Martin // *Fuel.* – 2007. – Vol. 86. – P. 2383–2388.

References

1. Oner C., Altun S. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. *Applied Energy*, 2009, vol. 86, pp. 2114-216.

2. Mendow G., Veizaga N.S., Querini C.A. Ethyl ester production by homogenous alkaline transesterification: influence of the catalyst. *Bioresource Technology*, 2011, vol. 102, pp. 6385-6391.

3. Feofilova E.P., Sergeeva Ia.E., Ivashechkin A.A. Biodizel'noe toplivo: sostav, poluchenie, produtsenty, sovremennaiia biotekhnologiia (obzor) [Biodiesel fuel: composition, production, products, contemporary biotechnology (review)]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 2010, vol. 46, no. 4, pp. 405–415.

4. Balat M. Prospects for worldwide biodiesel market development. *Energy Sources*, 2009, vol. 4, pp. 48-58.

5. Ma F., Hanna M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 1999, vol. 70, pp. 1–15.

6. Zhang Y., Dube M.A., McLean D.D., Kates M. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresource Technology*, 2003, vol. 90, pp.229–240.

7. Encinar J.M., Gonzalez J.F., Rodriguez-Reinares A. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. *Fuel Processing Technology*, 2007, vol.88, pp. 513-522.

8. Enweremadu C.C., Mbarawa M.M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil. A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 2009, vol. 13, pp.2205-2224.

9. Demirbas A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*, 2008, vol. 49, pp.125-130.

10. Permiakova, I.A., Vol'khin V.V., Kazakov D.A. Fiziko-khimicheskoe issledovanie reaktsii eterifikatsii i pereeterifikatsii v sisteme triatsilglitseriny – oleinovaia kislota – etanol v usloviakh kislotnogo kataliza [Physico-chemical study of the reactions of esterification and transesterification in the system of triacylglycerols – oleic acid – ethanol under conditions of acid catalysis]. *Butlerovskie soobshcheniia*, 2012, vol.29, no. 2, pp. 51-52.

11. Waste cooking oil as an alternative feedstock for biodiesel production. *Energies*, 2008, vol. 1, pp. 4-5.

12. Marchetti J.M., Miguel V.U., Errazu A.F. Heterogeneous esterification of oil with high amount of free fatty acids. *Fuel*, 2007, vol. 86, pp. 906-910.

13. Rivaldi J.D., Sarrouh B., Branco R. Biotechnological Utilization of Biodiesel-Derived Glycerol for the Production of Ribonucleotides and Microbial Biomass. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, no. 167, pp. 2054-2067.

14. Yu K., Kim W., Han S. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 2010, no. 101, pp. 4157–4161.

15. Thompson J.C., He B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 2006, no. 22, pp. 261-265.

16. Berrios M., Siles J., Martin M.A., Martin A. A kinetic study of the esterification of free fatty acids (FFA) in sunflower oil. *Fuel*, 2007, vol. 86, pp. 2383-2388.

Получено 17.10.2017

Об авторах

Воронина Наталья Сергеевна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры химии и биотехнологии, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: natalia_voronina@inbox.ru).

Пермякова Ирина Александровна (Пермь, Россия) – ст. преподаватель кафедры химии и биотехнологии, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: zernina88@mail.ru).

Вольхин Владимир Васильевич (Пермь, Россия) – доктор химических наук, профессор кафедры химии и биотехнологии, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: vvv@pstu.ru).

About the authors

Natalia S. Voronina (Perm, Russian Federation) – Undergraduate Student Department of Chemistry and biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., 614990, Perm, e-mail: natalia_voronina@inbox.ru).

Irina A. Permyakova (Perm, Russian Federation) – Senior lecturer of the Department of Chemistry and biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., 614990, Perm, e-mail: zernina88@mail.ru).

Vladimir V. Volkhin (Perm, Russian Federation) – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Department of Chemistry and biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., 614990, Perm, e-mail: vvv@pstu.ru).