

## **Информация о проекте, выполненного в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности**

Задание № 13.74.2014/К от 17.07.2014 г.

Тема: Исследование ферментативно катализируемого процесса алкоголиза триглицеридов жирных кислот в реакторах с неподвижным слоем катализатора

Приоритетное направление: Рациональное природопользование

Критическая технология: Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии

Период выполнения: 17.07.2014 г. – 31.12.2016 г.

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет) имени И.М. Губкина» (Кафедра физической и коллоидной химии)

Ключевые слова: липазы, иммобилизация ферментов и клеток микроорганизмов, биодизельное топливо, метанолиз

Научный руководитель: Винокуров Владимир Арнольдович

**1. Цель проекта:** Целью проекта является разработка способа биокаталитического получения биодизельного топлива в реакторах с неподвижным слоем катализатора и оптимизация условий проведения процесса переэтерификации растительных масел низшими спиртами.

**2.** В 2014-2016 гг. были проведены следующие работы:

- Изучение особенностей технических решений современных биореакторов для проведения процесса получения биодизельного топлива.

- Исследование процесса получения биокатализаторов для получения биодизельного топлива.

- Исследование каталитических свойств изготовленных биокатализаторов в модельных системах.

- Установление зависимостей активности полученных биокатализаторов от условий проведения реакции переэтерификации триглицеридов жирных кислот.

- Установление влияния дисперсности и природы носителя биокатализатора на перепад давления в биореакторе с неподвижным слоем биокатализатора.

- Установление зависимости выхода биодизельного топлива, его качественного и количественного состава от условий функционирования биореактора и применяемого биокатализатора.

- Исследование процесса получения биодизельного топлива в биореакторе.

- Исследование факторов, оказывающих влияние на процесс получения биодизельного топлива в реакторах с неподвижным слоем катализатора.

- Выявление и исследование применимости субстратов для биокаталитического процесса получения биодизельного топлива.

**3. Основные результаты по проекту:**

- Изучены особенности технических решений современных биореакторов для проведения процесса получения биодизельного топлива, сформированы критерии выбора реактора для биотехнологического процесса и предложены рекомендации для его масштабирования.

- Нарботаны лабораторные образцы биокатализаторов на основе ковалентно и адсорбционно иммобилизированной липазы *Candida rugosa* на диатомитовых носителях, анионообменных смолах, силикагеле, носителе на основе оксида алюминия и кремнеземе. Нарботаны лабораторные образцы биокатализаторов на основе клеток грибов *Aspergillus niger*, иммобилизированных на полиуретановой губке и керамзите и дрожжей *Yarrowia lipolytica*, иммобилизированных на керамзите. Поверхность полученных биокатализаторов исследована методами световой и сканирующей электронной микроскопии.

- Проведенные испытания лабораторных образцов биокатализаторов продемонстрировали высокую ферментативную активность по отношению к триглицеридам жирных кислот и стабильность работы в широком интервале температур (24-50 °C). Нарботанные образцы исследованы в реакции метанолиза подсолнечного масла, максимальный выход составил 62,2 %.

- Исследованы каталитические свойства биокатализаторов в биореакторе с неподвижным слоем катализатора. Определено влияние дисперсности и природы носителя биокатализатора на перепад давления в биореакторе с неподвижным слоем биокатализатора и установлена зависимость выхода биодизельного топлива от условий функционирования биореактора и применяемого биокатализатора.

- На основании результатов исследования физико-химических свойств образцов биодизельного топлива разработаны рекомендации по применению различных типов биокатализаторов в процессах получения биодизельного топлива.

- На основании результатов экспериментальных исследований было установлено, что *A. niger* и *Y. lipolytica* стабильны в широких диапазонах температур (24-40 °C) и pH среды с оптимумом при 28 °C и pH 8,5 и 5,5 соответственно, оптимальное содержание воды в реакционной смеси – 10 и 5 %об. соответственно.

- Установлены оптимальные значения параметров для подготовки биокатализатора на основе *A. niger*: культивирование в течение 72 часов при температуре 30 °C на среде, содержащей подсолнечное масло (13,2 г/л), дрожжевой экстракт (6,2 г/л), и соевую муку (7,4 г/л).

- Установлены оптимальные значения параметров получения биодизельного топлива на используемых биокатализаторах: оптимальная температура процесса получения биодизельного топлива с использованием биокатализаторов на основе иммобилизированных клеток микроорганизмов в проточном реакторе с неподвижным слоем катализатора составляет 28 °C, pH среды 8,5, оптимальное содержание воды в реакционной смеси 10 %об. При этом необходимо использование рафинированного масла в качестве сырья, так как наличие фосфолипидов и восков в сырье приводит к образованию осадка в процессе переэтерификации и нарушает проточность реактора.

- В результате проведенного скрининга отобраны перспективные культуры базидиомицетов – продуценты липидов, перспективных для использования в качестве сырья для получения биодизельного топлива. Штаммы *Fomes fomentarius* МТ–30.04 и *Russula*

*puellaris* МТ–32.06 признаны наиболее перспективными культурами по количеству извлекаемых липидов для получения биодизельного топлива.

- В результате исследования жирнокислотного состава наиболее перспективными олеогенными культурами в качестве источников липидного сырья для получения биодизельного топлива выделены культуры *Piptoporus betulines* МТ–30.04 и *Russula puellaris* МТ–32.06.

### **Публикации по проекту:**

В результате выполнения работ по проекту в 2014–2016 годах были опубликованы следующие статьи:

1) Метанолиз подсолнечного масла с использованием иммобилизованных клеток грибов в качестве биокатализатора. Альмяшева Н.Р., Копицын Д.С., Винокуров В.А., Новиков А.А. // Химия и технология топлив и масел. 2014. № 6 (586). С. 5-6. (переводная версия статьи N.R. Almyasheva, D.S. Kopitsyn, V.A. Vinokurov, A.A. Novikov (2015) Methanolysis of Sunflower Oil Using Immobilized Fungal Cells as Biocatalyst // Chemistry and Technology of Fuels and Oils. 2015. Т. 50. № 6. С. 449-452. DOI: 10.1007/s10553-015-0547-3 – индексируется в WoS и Scopus);

2) Липиды базидиальных грибов как сырье для получения биодизельного топлива. Альмяшева Н.Р., Шарипова Д.А., Барков А.В., Караханов Э.А., Куликов А.Б., Максимов А.Л., Винокуров В.А. // Химия и технология топлив и масел. 2015. № 4 (590). С. 46-51 (переводная версия статьи N.R. Al'myasheva, D.A. Sharipova, A.V. Barkov, E.A. Karakhanov, A.B. Kulikov, A.L. Maksimov, V.A. Vinokurov (2015) Lipids of Basidial Fungi as Feedstock for Biodiesel Fuel Production // Chemistry and Technology of Fuels and Oils, 51, p. 411-421. DOI:10.1007/s10553-015-0619-4 – индексируется в WoS и Scopus).

3) Ю.В. Самойлова, А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина, А.С. Розанов, С.Е. Пельтек, А.А. Новиков, Н.Р. Альмяшева, В.Н. Пармон (2015) Применение иммобилизованной рекомбинантной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 для получения метиловых эфиров жирных кислот // Катализ в промышленности, 15, с. 90-96. (переводная версия статьи Yu.V. Samoilova, A.S. Piligaev, K.N. Sorokina, A.S. Rozanov, S.E. Pel'tek, A.A. Novikov, N.R. Almyasheva, V.N. Parmon (2015) Properties of a Biocatalyst Based on Immobilized Recombinant Lipase *Geobacillus stearothermophilus* G3 in Synthesis of Methyl Esters of Fatty Acids // Catalysis in Industry, 15, с. 90-96. DOI:10.18412/1816-0387-2015-6-90-96 – индексируется в WoS и Scopus).

4) Лой, Н.Н.; Санжарова, Н.И.; Кузнецов, А.А.; Молин, А.А.; Винокуров, В.А. (2015) The efficiency of pre-sowing seed treatment of crops by processed products obtained as a result of radiation technologies (Эффективность предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур продуктами переработки, полученными в результате радиационных технологий) // Dostizheniya nauki i tekhniki APK; Выпуск:5; Стр.:29-32 (индексируется в РИНЦ).

5) D.A. Sharipova, D.S. Kopitsyn, M.Yu. Ziangirova, A.A. Novikov, V.A. Vinokurov (2016) Fatty Acid Composition of Basidiomycetes Lipids - a Promising Feedstock for Obtaining Biodiesel // Chemistry and Technology of Fuels and Oils (ISSN: 0009-3092), V. 52, Is. 3, pp 255–260, DOI: 10.1007/s10553-016-0701-6 (индексируется в WoS и Scopus);

6) E.R. Naranov, A.S. Badeeva, A.A. Sadovnikov, S.V. Kardashev, A.L. Maksimov, S.V. Lysenko, V.A. Vinokurov, E.A. Karakhanov (2016) Hydrogenation of aromatic hydrocarbons over nickel–tungsten sulfide catalysts containing mesoporous aluminosilicates of different nature // *Petroleum Chemistry*, V. 56, Is. 7, pp 599–606, DOI: 10.1134/S0965544116070124 (индексируется в WoS и Scopus);

7) N.R. Almyasheva, M.I. Shuktueva, D.A. Beskorovaynaya, D.S. Kopitsyn, A.A. Novikov, V.A. Vinokurov (2016) Biodiesel fuel production by *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst in optimized medium // *Mycoscience* (в печати) (ISSN 1340-3540, индексируется в WoS и Scopus).

8) A.A. Shnyreva, E.Y. Kozhevnikova, A.V. Barkov, A.V. Shnyreva (2016) Solid-state cultivation of edible oyster mushrooms, *Pleurotus* spp. under laboratory conditions // *Advances in Microbiology (AiM)*, ISSN Print: 2165-3402, ISSN Online: 2165-3410, Website: <http://www.scirp.org/journal/aim>, Paper ID: 2270825, Submission Date: 2016-09-01 (2017, в печати).

Принято участие в следующих российских и международных конференциях:

1) Almyasheva N.R., Beskorovaynaya, D.A., Kopitsyn D.S., Novikov A.A., Vinokurov V.A. (2014) Comparison of different carriers and methods for the lipase immobilization for the oil processing // *12<sup>th</sup> EuroFedLipid Congress*, Montpellier, France, 14-17 сентября 2014 г. Номер доклада: LAMI-127 [https://gdch.enterprise-ems.de/tms/frontend/index.cfm?l=4569&id=0&dat\\_h=&sp\\_id=2&modus=](https://gdch.enterprise-ems.de/tms/frontend/index.cfm?l=4569&id=0&dat_h=&sp_id=2&modus=)

2) Альмяшева Н.Р., Копицын Д.С., Жигалова Л.В. (2015) Получение биодизельного топлива с использованием клеток грибов в качестве катализаторов // XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, Россия, 13-17 апреля 2015 г.

3) Гамидов И.Г., Альмяшева Н.Р., Копицын Д.С. (2015) Переэтерификация растительного масла с использованием иммобилизованных клеток грибов в качестве биокатализатора // 69-ая Международная молодежная научная конференция «НЕФТЬ И ГАЗ – 2015, Москва, Россия, 14-16 апреля 2015 г., Сборник тезисов, том 2, с.136.

4) Жигалова Л.В., Альмяшева Н.Р., Копицын Д.С. (2015) Исследование липолитической активности клеток грибов для получения биодизельного топлива // 69-ая Международная молодежная научная конференция «НЕФТЬ И ГАЗ – 2015, Москва, Россия, 14-16 апреля 2015 г., Сборник тезисов, том 2, с.151.

5) Альмяшева Н.Р., Бескоровайная Д.А., Копицын Д.С., Барков А.В., Новиков А.А. (2015) Получение биодизельного топлива с использованием клеток грибов для прямой конверсии в качестве биокатализаторов // Третий Международный Микологический Форум, Москва, Россия, 14-15 апреля 2015 г.

6) Almyasheva N.R., Kopitsyn D.S., Beskorovaynaya D.A., Novikov A.A. (2015) Immobilized biocatalysts for biodiesel fuel production // FEMS 2015, Maastricht, Netherlands, 7-11 июня 2015 г.

7) L.V. Zhigalova, N.R. Almyasheva, A.A. Novikov (2016) Optimization of the Process for Biodiesel fuel production using the fungal cells as a catalyst // Congress book «East meets West», стр. 39, Krakow, Poland, 20-22 апреля 2016 г.

8) N.R. Almyasheva, D.S. Kopitsyn, D.A. Beskorovaynaya, A.A. Novikov (2016) «Transesterification of vegetable oil by immobilized *Aspergillus niger* mycelium» CBM2016 – 3rd Congress of Baltic Microbiologists, Вильнюс, Литва, 18-21 октября 2016 г.

Подана заявка на полезную модель «Устройство для получения биодизельного топлива» (Заявка на патент РФ № 2016152705 от 30.12.2016 г.).

Членом научного коллектива Кожевниковой Е.Ю. защищена кандидатская диссертация по теме «Разработка технологических основ получения биоэтанола с использованием базидиальных грибов», Основная специальность: 05.17.07 Химическая технология топлива и высокоэнергетических веществ (хим.). По результатам заключения диссертационного совета Д 212.200.04 от «08» декабря 2016 г. присуждена степень кандидата химических наук.

#### **4. Назначение и предполагаемое использование результатов проекта:**

Разработаны критерии применимости исходных субстратов для биокаталитического получения биодизельного топлива в заданных условиях. На основании изучения жирнокислотного состава рассмотрена применимость различных липидсодержащих субстратов для получения биодизельного топлива с использованием биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток-продуцентов липолитических ферментов. Проведена оптимизация условий получения биокатализатора на основе *A. niger* по липолитической активности. Нарботаны лабораторные образцы биодизельного топлива и изучены физико-химические свойства лабораторных образцов биодизельного топлива, полученного в оптимизированных условиях.

С точки зрения потребительских свойств, при сопоставимой энергетической эффективности биодизельное топливо обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционным топливом: экологичность и безопасность производства, экологичность использования (снижение содержания токсичных компонентов в отработанных газах, отсутствие ароматических соединений и серы), биоразлагаемость. Преимуществом применения биодизельных смесей является отсутствие необходимости внесения изменений в двигатель автомобиля, а условия транспортировки и хранения те же, что и для дизельного топлива. Внедрение ферментативных технологий производства биодизельного топлива позволит повысить качество и экологичность дизельного топлива на российском рынке, а также снизить риски резкого повышения цен на топливо в России. Результаты, полученные на данном этапе реализации проекта, представляют собой научно-техническую основу для дальнейшего выполнения исследований по представленной тематике.

Наиболее перспективным направлением развития исследований в области разработки технологии получения биодизельного топлива биокаталитическим способом представляется использование мембранных систем для разделения продуктов метанолиза, что позволит получать продукт высокого качества, увеличить сроки эксплуатации биокатализаторов в результате снижения ингибирующего воздействия метанола и глицерина на липазы, а также упростить процесс получения биодизельного топлива за счет одновременного осуществления синтеза метиловых эфиров жирных кислот и выделения продуктов реакции.