

*II РЕГИОНАЛЬНЫЙ ФЕСТИВАЛЬ
ТВОРЧЕСКИХ ОТКРЫТИЙ И ИНИЦИАТИВ
«ЛЕОНАРДО»*

«Биология»

проектная работа

«Получение жидкого биотоплива из целлюлозосодержащего
сырья»

Автор(ы):

Сергеенков Станислав Владимирович,

10а класс

Руководитель(и):

Бронч М.Б.

учитель химии

первой квалификационной категории

<i>Оглавление</i>	
Оглавление.....	2
Аннотация.....	3
Сокращения и обозначения применяемые в данной работе	3
Введение	4
Основная часть	5
Глава 1. Биотопливо как замена углеводородам нефти	5
Глава 2. Методы деструкции целлюлозы, замкнутые целлюлозные циклы	6
Глава 3. Повышение эффективности биологических методов деструкции, разработка полного цикла.....	7
3.1 Концепция применения микроорганизмов в деструкции целлюлозы	7
3.2 Культура первого этапа.....	7
3.3 Культура второго этапа	9
3.4 Выделение и очистка биотоплива.....	9
3.5 Сохранение полученных культур	10
Заключение	11
Список литературы использованной при выполнении работы	13

Аннотация

В работе сформулирована проблема использования нефти и нефтепродуктов, представлены методы её переработки. Кратко охарактеризованы методы деструкции целлюлозы. Описан предполагаемый порядок цикла переработки.

Сокращения и обозначения применяемые в данной работе

ДВС – двигатель внутреннего сгорания

КГА – картофельно-глюкозный агар

КГБ – картофельно-глюкозный бульон

п.с. – питательная среда

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

КМЦ – карбоксиметилцеллюлозная

ДМСО - диметилсульфоксид

Введение

На сегодняшней повестке дня многих технологически развитых стран, в том числе и России, стоит вопрос «озеленения» энергетики, и других сфер человеческой деятельности. 7 мая 2018 года президент России В. Путин подписал указ «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года», устанавливающий и утверждающий национальные проекты России, в том числе и Национальный проект «Экология». В рамках него реализуется огромное количество программ по развитию России в этом вопросе. Но очень важно, чтобы «зелёная революция» не сопровождалась масштабными денежными потерями и выделением новых отходов. К примеру, на данный момент, большинство автомобилей используют в качестве основного вида топлива дизельное, бензин или иные продукты переработки нефти (потребление – 8 479 тыс. тонн только в 2019 году [1]). При этом автомобилей, использующих газ или электроэнергию значительно меньше. Это значит, что переход на газообразные или иные виды «экологического» топлива (газ, электроэнергия) потребует полного переоборудования или замены огромного количества машин, что экономически и ресурсно не выгодно как для государства, так и для конечных пользователей. Возникнет и необходимость увеличения количества газозаправочных и электростанций и утилизации ДВС.

Жидкое биотопливо на основе спиртов – эффективная альтернатива бензину и дизелю для применения в транспортной сфере. Сегодня, преимущества биотоплива в целом, позволяют утверждать, что оно будет являться «переходным» компонентом в цепи от нефти к электричеству.

Несмотря на все достоинства применения биотоплива, есть много недоработанных аспектов. К примеру, методы получения биотоплива. Их существует неисчислимое количество, но исходя из концепции углеродной экономики замкнутого цикла, следует производить биотопливо из растений. Наиболее экономически выгодно делать это из целлюлозосодержащих отходов бумажного и иных производств, а также вторсырья.

Основная цель данной работы – получение чистой культуры микроорганизма, способного эффективно перерабатывать целлюлозосодержащие отходы в жидкое биотопливо, описание и исследование свойств культуры, а также апробация культуры в модели технологического цикла.

Задачи:

1. Описание существующих методов, анализ
2. Выделение чистых культур из образцов почвы и субстратов
3. Определение эффективности применения культур (измерение ферментативной активности)
4. Моделирование технологического цикла

Глава 1. Биотопливо как замена углеводородам нефти

Использование нефти в качестве источника энергии, может быть оправдано только тем, что при её переработке возможно получение широкого спектра конечных продуктов: пластмасс, лаков, спиртов, газов, жирных кислот и др. В остальном этот вид полезного ископаемого уступает иным видам сырья.

Нефть (тур. *neft* - от перс. нефт), горючая маслянистая жидкость, распространенная в осадочной оболочке Земли; важнейшее полезное ископаемое. Сложная смесь алканов, некоторых цикланов и аренов, а также кислородных, сернистых и азотистых соединений [2].

В качестве топлива применяют не цельную нефть, а некоторые из её фракций. Фракционная перегонка нефти осуществляется на особых устройствах для фракционной дистилляции.

Выделяют дизельную, керосиновую, лигроиновую, бензиновую, петролейную фракции. К нелетучим фракциям относят мазут [3].

Иногда мазут тоже подвергают ректификации, но происходит она под вакуумом. Получают вакуумный газойль и гудрон.

В качестве топлива для транспорта наиболее применимы бензиновая, лигроиновая, керосиновая и дизельные фракции.

Если отойти от «экологического» аспекта использования нефти, основным её недостатком, становится невозобновляемость. В конечном итоге её запасы могут иссякнуть или уменьшиться настолько, что стоимость производимой продукции возрастет в разы. Человечеству будет необходимо спешно изменять огромное количество технологических циклов и целых производств.

Глава 2. Методы деструкции целлюлозы, замкнутые целлюлозные циклы

Существует большое количество методов деструкции целлюлозы, основанных на различных принципах. Грубо выделяют физические, химические, биологические и смешанные методы деструкции.

Термическая деструкция целлюлозы [4] начинается от 150°C (точная температура зависит от степени полимеризации молекул, примесей и других факторов, может достигать до 210-230°C), происходит с выделением различных органических и неорганических веществ. Реакция термической деструкции целлюлозы основана в первую очередь на расщеплении молекулярных цепей, но не ограничивается им. Также происходит дегидратация и окисление. Целлюлоза, как полисахарид деструкцируется по механизму трансгликозилирования с образованием так называемой «фракции смолы», основным компонентом которой является левоглюкозан. Параллельно происходят процессы дегидратации звеньев, с образованием ненасыщенных соединений, к примеру фурфурола, левоглюкозенона, 3-дезоксиглюкозенона. Продукты этого процесса обычно содержатся как в смоляной, так и в летучей фракции.

Также при некотором повышении температуры и наличии воздуха, могут образовываться летучие карбонильные соединения: уксусный альдегид, глиоксаль, акролеин.

Электронно-пучковая деструкция [5]. Малораспространённый метод. В первую очередь это связано со сложностью процесса. При обработке образца, его температура не поднимается до пиролизной, соответственно процесс термической деструкции в нём не идет. С точки зрения механизмов работы, процесс схож с пиролизом, но при этом отличается. Ионы низкотемпературной плазмы попадают в молекулу целлюлозы, локально увеличивают энергию её элементарных звеньев. Основное отличие в том, что при пиролизе энергия передаётся всей молекуле сразу, тогда как при воздействии плазмы – локально. Все побочные продукты, образующиеся при деструкции, удаляются из камеры вакуумным насосом. Таким методом можно более точно контролировать степень полимеризации молекулы.

Существует ещё большое количество физических методов деструкции целлюлозы, к примеру радиационно-химическая [6], механическая деструкции.

Гидролитическая деструкция – разрыв гликозидных связей. В месте разрыва гликозидной связи 1-4 у 1-го атома С образуется свободный гликозидный гидроксил, а у 4-го атома С – спиртовой гидроксил. В качестве конечного продукта глубокой деструкции целлюлозы образуются простые углеводы.

Гидролитическая деструкция применяется сегодня с применением концентрированных серной и соляной, а также фосфорной кислот (в них целлюлоза растворяется) или же разбавленных серной и соляной кислот (в них не растворяется). В первом случае процесс деструкции идёт в гомогенной среде, его скорость выше.

Ферментативный гидролиз целлюлозы может протекать по двум основным путям. Первый осуществляется под действием пары ферментов Эндоглюконаза-β-гликозидаза или Целлобиогидролаза-целлобиаза. Применяемые ферменты зависят непосредственно от культуры, а иногда и штамма микроорганизма.

Глава 3. Повышение эффективности биологических методов деструкции, разработка полного цикла

3.1 Концепция применения микроорганизмов в деструкции целлюлозы

Целлюлаз-активными микроорганизмами можно назвать широкий спектр плесневых грибов (начиная от грибов рода *Penicillium* и заканчивая такими активными деструкторами как *Trichoderma*), а также бактерий (к примеру, *Clostridium thennocellum*). Большинство из них обитает в почве, на растениях, в древесных субстратах. Наиболее изученным является грибок вида *Trichoderma viride*.

Для непосредственного получения биотоплива необходимо либо получение простого углевода (глюкозы) с последующей переработкой другим микроорганизмом (например, *Saccharomyces cerevisiae*), либо прямая переработка целлюлозы в спирты. Наиболее экономически выгодным можно назвать именно второй вариант, поскольку требуется всего один цикл ферментации, очистки.

В качестве биотоплива для обычных автомобилей прекрасно подходит этанол (требуется некоторая перенастройка двигателя), а также его смесь с бензином в соотношении по массе: 30% биотоплива, 70% бензина (E30). Для автомобилей способных работать на «гибком» топливе наиболее распространённой на сегодняшний день маркой топлива можно назвать E85.

3.2 Культура первого этапа

Для получения микроорганизмов первого этапа был выбран природный субстрат, в котором эти микроорганизмы обитают – почва. Были отобраны образцы почвы в лесных, лесопарковых зонах города и пригорода, охлаждены до 4°C и доставлены в лабораторию. Первичный посев осуществлялся путём приготовления почвенной вытяжки (100 мл изотонического раствора на 100г почвы, циклическое перемешивание 150 об/мин в течение не менее чем 30 минут при t° образца 4°C - 15°C) и высадки гомогенной вытяжки на питательные среды в асептических условиях ламинарного бокса. Так как обнаружению планировалось подвергнуть как грибковую культуру, так и бактериальную, посев решено было проводить на набор питательных сред: п.с. КГА, п.с. Питательный агар. Инкубация также проводилась в разных условиях: грибки на п.с. КГА t°=27°C в течение 5 суток, бактерии на п.с. Питательный агар t°=37°C в течение 48 часов.

Все работы с культурами микроорганизмов проводились в условиях бокса микробиологической безопасности 2 класса.

Для дальнейшего выбора микроорганизмов по признаку активности в отношении целлюлозы все культуры пересеивались на агаризованную п.с. Гетчинсона с добавлением МКЦ (5г/л) и инкубировались в стандартных условиях. Все культуры, способные к росту на описанной питательной среде подвергались дальнейшему анализу и идентификации по ряду признаков.

Стоит упомянуть и методы стерилизации. Для удаления споровых и иных жизнеспособных форм микроорганизмов, применялось автоклавирование (134°C 5 мин), за исключением п.с. КГА, стерилизация этой питательной среды проводилась при более низкой температуре и уменьшенном времени (110°C 10 мин). Вся посуда стерилизовалась сухим жаром (180°C 60 мин). Отработанные культуры и посуда автоклавировались (134°C 5 мин).

Для определения ферментативной активности можно применять множество методов. Было выбрано несколько методов, основанных на различных принципах.

Первый заключается в инкубации полоски фильтровальной бумаги в пептонной воде с добавлением культуры микроорганизмов, с последующим измерением концентрации глюкозы в растворе глюкозооксидазным методом.

Второй – в выращивании культуры микроорганизмов на подкрашенной питательной среде следующего состава: изотонический раствор, КМЦ и краситель бромкрезоловый пурпурный. После инкубации измеряется диаметр той области питательной среды, которая изменила цвет.

В результате отбора культур было выделено несколько культур: 126501, 126500, 126437, 126533, 126540, 126598.

Идентификация штаммов проводилась по набору признаков. Для бактерий:

1. Культуральные (описание внешнего вида и структуры колоний)
2. Морфологические (описание внешнего вида, размера, признаков (по окрашиванию) отдельных клеток, а также их взаимного расположения)
3. Биохимические (качественный анализ наличия/отсутствия отдельных ферментов)
4. Генетические (анализ генетических признаков ли последовательности определённых участков генома)

Для грибов:

1. Культуральные (описание внешнего вида и структуры колоний)
2. Морфологические (описание внешнего вида, размера, отдельных клеток, а также их взаимного расположения)
3. Генетические (анализ генетических признаков ли последовательности определённых участков генома)

Для упрощения работы с культурами разработаны бланки описания культур.

Наибольшую точность представляют биохимические и молекулярно-генетические методы идентификации.

Биохимические основаны, в первую очередь, на определении ферментов, выделяемых микроорганизмом. Самым распространённым методом является «пёстрый ряд». Он заключается в посеве микроорганизма в ряд питательных сред, содержащих единственный углевод и подкрашенных реактивом Андраде. При наличии у микроорганизма фермента для конкретного углевода, среда меняет цвет на красный. Также в расширенном ряде детектируют выделение индола и сероводорода в пептонной воде.

Определялась и каталазная активность.

Для идентификации бактерий применялся пёстрый ряд со следующими углеводами: Декстроза, лактоза, манноза, сахароза.

Генетическая идентификация основывается на амплификации необходимого для работы фрагмента генома, его очистка и последующее секвенирование. Данный метод при правильном подборе праймеров позволяет определять культуру до штамма.

Для работы с бактериями применялись следующие праймеры:

Название	последовательность	Направление
fBD1	HAATHYGTGCCAGCAGC	Прямой
rBD1	GTCRTCCYDCCTCCTC	Обратный
fD1 (8–27f)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Прямой
rD1(1541–1525r)	AAGGAGGTGATCCAGCC	Обратный

Таблица 1. Праймеры для генетической идентификации бактерий. [7]

Для работы с грибами применялись следующие праймеры:

ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Прямой
ITS4	TCCTCCGCTTATTTGATATGC	Обратный

Таблица 2. Праймеры для генетической идентификации грибов. [8]

3.3 Культура второго этапа

В качестве культуры второго этапа в экспериментах применялся промышленный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Разведение штамма проводилось в шейкер-инкубаторе в течение 48 часов при 27°C, 100 об/мин, на п.с. КГБ.

3.4 Выделение и очистка биотоплива

После всех этапов синтеза, смесь, содержащую непосредственно сам продукт синтеза, продукты жизнедеятельности микробионтов, а также самих микроорганизмов, необходимо подвергнуть стерилизации, так, чтобы конечные продукты не видоизменились. Только потом смесь очищается и выделяется конечный продукт.

Стерилизация может потребоваться не во всех случаях. К примеру, при биосинтезе этанола, культура сама погибает при достижении определённой концентрации спирта.

Очистка от механических примесей (в основном клетки живых и мёртвых дрожжей) также нужна не всегда. Всё зависит от дальнейших методов очистки. Её можно добиться несколькими способами. Первый – обычное отстаивание в течении некоторого времени. Под действием гравитации, крупные частицы просто опускаются на дно, мелкие же сначала подвергаются агрегации и только потом оседают. Данный метод отличается большой длительностью процесса.

Второй – проточное центрифугирование. Существуют особые проточные центрифуги – аппараты, позволяющие отделять механические примеси принципом центрифугирования, основанном на различающемся поведении частиц и жидкости в центробежном поле.

Третий – микрофльтрация. Аналог обычной фильтрации, за исключением того, что в качестве задерживающего элемента применяется особый микрофильтр, с точно измеренным размером пор. Применим не во всех случаях, так как при большом объёме осадка может засориться, но зато при правильно подобранном размере пор может применяться для стерилизации (так называемая стерилизация фильтрованием).

Также в промышленности применяются флотация, процеживание и другие методы.

Наиболее простым и эффективным методом выделения этанола из смеси, является дистилляция, но данный метод не применим в качестве основного для получения биотоплива. Дело в том, что метод позволяет получить продукт с большим содержанием воды, что недопустимо для применения в ДВС.

Выходом, может послужить применение более технологичного метода выделения – ректификация. Ректификация – это метод разделения легкокипящей смеси, посредством теплообмена в особом устройстве – ректификационной колонне. Таким методом можно получить этанол концентрацией до 96%, при минимальном количестве примесей, в качестве которых могут выступать различные спирты и эфиры, которые не могут помешать в применении продукта в качестве компонента жидкого биотоплива.

Для проведения дальнейших экспериментов была подготовлена конструкторская документация для сборки биореактора, включающего в себя, ферментёр и ректификационную колонну.

Так как элементы бака ферментёра будут подвергаться воздействию повышенного давления, были проведены прочностные расчёты конструкции.

Для расчётов и проектирования применялась учебная версия САПР Компас-3D.

3.5 Сохранение полученных культур

Хранить культуры бактерий и грибов можно различными способами. Наиболее простой и распространённый – частый пересев культуры на новые чашки петри. Это допустимо для кратковременного хранения, но не для длительного, так как он не обеспечивает генетическую однородность сохраняемого образца. Это связано с высокой трудоёмкостью процесса, большим расходом питательных сред и частотой пересевов (1-2 дня).

Для увеличения этого времени можно прибегнуть к изменению условий хранения: некоторого понижения температуры (4-5°C), заливки культуры тонким слоем стерильного вазелинового масла. Таким образом время хранения становится в разы больше (4-5 лет).

Существуют и методы, с применением и более низких температур. Так, самым известным является простая шоковая заморозка в жидком азоте (температура кипения -196°C). Азот быстро испаряется, поэтому культуры также хранят в электрических морозильных камерах при -80°C, -20°C и иногда в сухом льде (при транспортировке) при -76°C. При таком хранении важно, чтобы в клетках не образовались кристаллы льда, которые способны разорвать клетку. Этого можно избежать как шоковой заморозкой (работает только с очень маленькими клетками и клетками с низким содержанием воды) или применением криопротекторов. Выделяют проникающие и непроникающие криопротекторы.

В нашем случае использовалось два типа смесей-криопротекторов. Первая смесь применялась для заморозки цельных клеток бактерий, вторая для заморозки спор грибов.

Состав смеси 1 включал в себя проникающие криопротекторы глицерол и ДМСО, а также непроникающий криопротектор сахароза.

Состав смеси 2 включал в себя только сахарозу.

Состав 1	
Глицерол	40%
ДМСО	30%
Сахароза	5%
Состав 2	
Сахароза	10%

Таблица 3. Массовое соотношение компонентов криопротекторов

Данные криопротекторы опробованы на тестовой культуре при температуре -20°C в течение месяца.

Заключение

Стоит сказать, что одним из важнейших аспектов жизни сегодня, является развитие нашего общества. Маленький вклад каждого, выливается в большое дело – развитие человеческой цивилизации. Без осознанного подхода к окружающему миру во всех смыслах этого слова, невозможно развиваться как личности, так и всему сообществу.

В рамках этой работы выделена культура – компонент большой цепочки технологического цикла. В дальнейшем, я планирую опробовать найденную и подготовленную для использования культуру, в более крупном лабораторном стенде.

Практическая часть работы выполнена на базе [детского технопарка «Кванториум НЭЛ»](#), а также технопарка высоких технологий «Рамеев» под контролем руководителя работы Бронч М.Б. и педагога дополнительного образования Тимирбаевой Ю.Д.

Список литературы использованной при выполнении работы

1. Транспорт в России. 2020: Стат.сб./Росстат. – Т65 М., 2020. – 108 с.
2. Нефть. — Текст : электронный // Большой энциклопедический словарь : [сайт]. — URL: <https://rus-big-enc-dict.slovaronline.com/> (дата обращения: 06.12.2021).
3. Фракции нефти. — Текст : электронный // Онлайн-справочник по геологии : [сайт]. — URL: <https://www.geolib.net/> (дата обращения: 06.12.2021).
4. Фенгел, Д. Древесина химия, ультратрструктура,реакции / Д. Фенгел, Г. Вегенер. — Москва : Лесная промышленность, 1988. — 512 с. — с.266-267.
5. Чухчин, Д. Г. ХИМИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ДРЕВЕСИНЫ / Д. Г. Чухчин, Н. А. Матонина, О. М. Соколов. — Текст : непосредственный // "Лесной журнал". — 2010. — № 4. — С. 74-83.
6. Петров, В. А. Модификация структуры и свойств целлюлозы / В. А. Петров. — Казань : КНИТУ, 2016. — 168 с.
7. Универсальные 16S рРНК праймеры VD1 для описания генетического разнообразия сообщества почвенных прокариот / Е. В. Коростик, А. Г. Пинаев, Г. А. Ахтемова, Е. Е. Андронов. — Текст : непосредственный // Экологическая генетика. — 2006. — № 4. — С. 32-37.
8. МОЛЕКУЛЯРНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ ПОРЯДКА MUCORALES В СООТВЕТСТВИИ С ГЛОБАЛЬНЫМИ РЕКОМЕНДАЦИЯМИ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ МУКОРМИКОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) / А. Е. Тараскина, И. М. Пчелин, С. М. Игнатъева [и др.]. — Текст : непосредственный // Проблемы медицинской микологии. — 2020. — № 1. — С. 3-14.

Приложения
Приложение 1.



Рисунок 1. Схема устройства для фракционной дистилляции

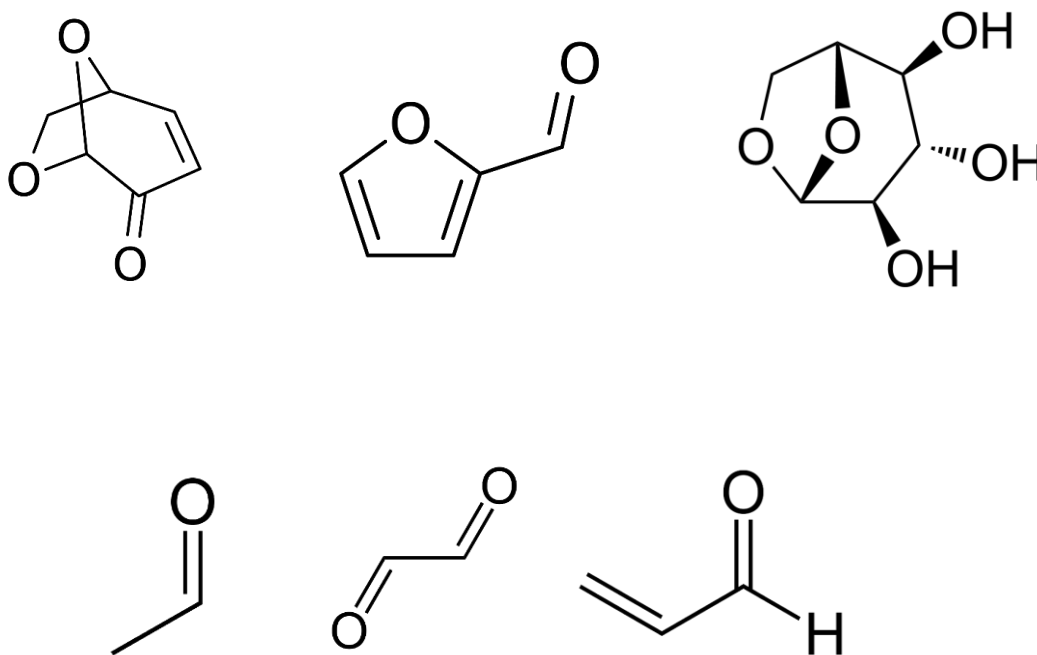


Рисунок 2. Левоглюкозенон

Рисунок 3. Фурфурол

Рисунок 4. Левоглюкозан

Рисунок 5. Уксусный альдегид

Рисунок 6. Глиоксаль

Рисунок 7. Акролеин

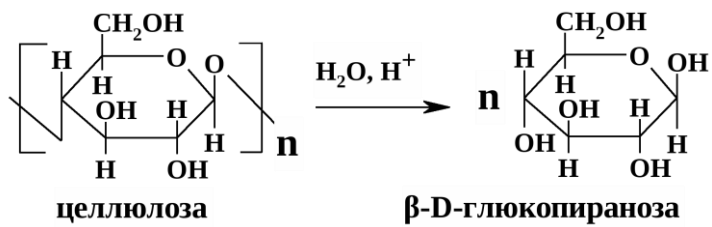


Рисунок 8. Схема гидролитической деструкции

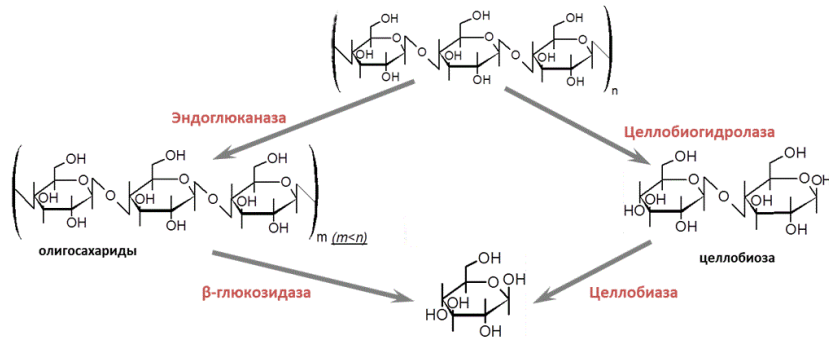


Рисунок 9. Схема гидролиза ферментативного гидролиза целлюлозы до глюкозы

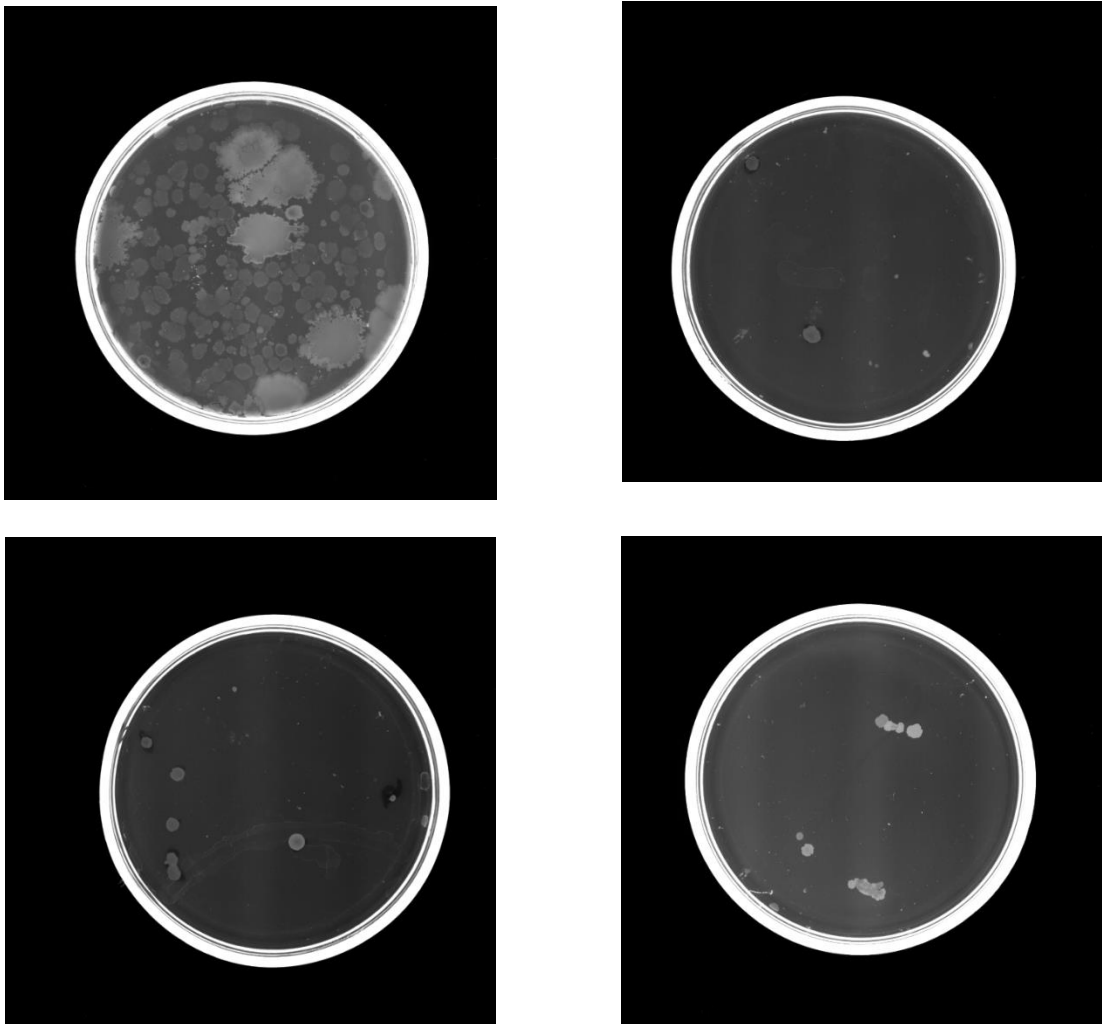


Рисунок 10. Сники выделенных чистых культур с применением геле-документирующей системы Vilber



Рисунок 11. Одна из культур плесневых грибов рода Penicillium

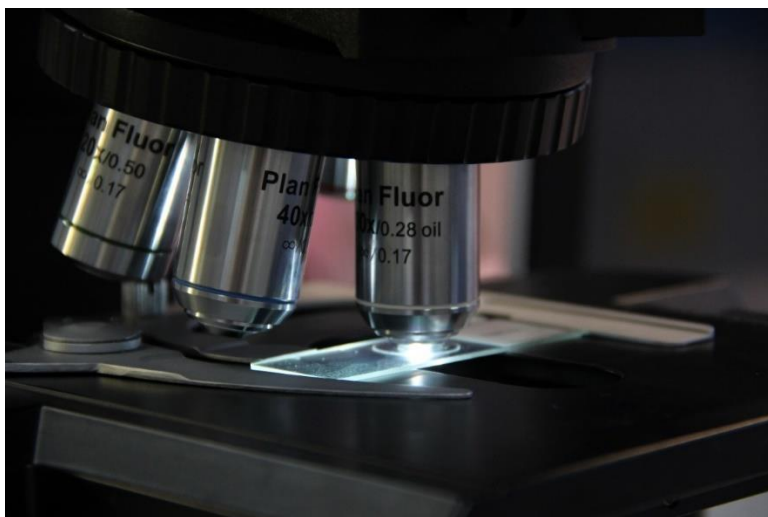


Рисунок 12. Исследование одной из культур методом иммерсионной светлой микроскопии

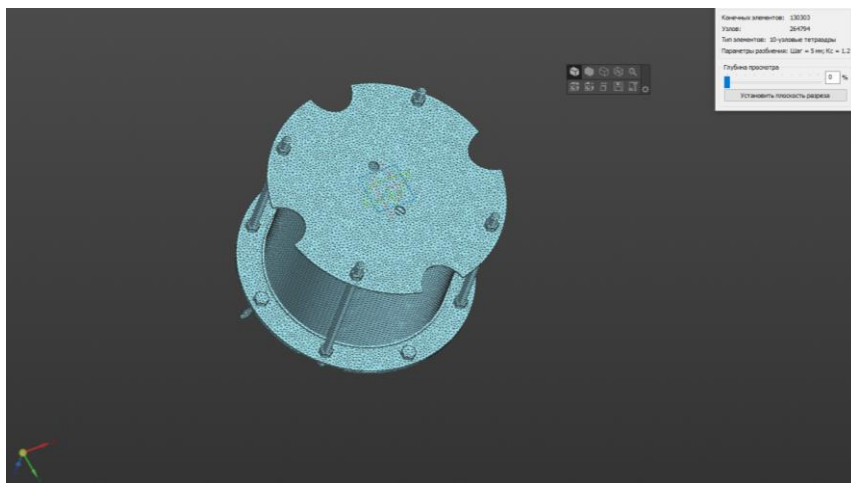


Рисунок 13. Сгенерированная для расчётов КЭ сетка

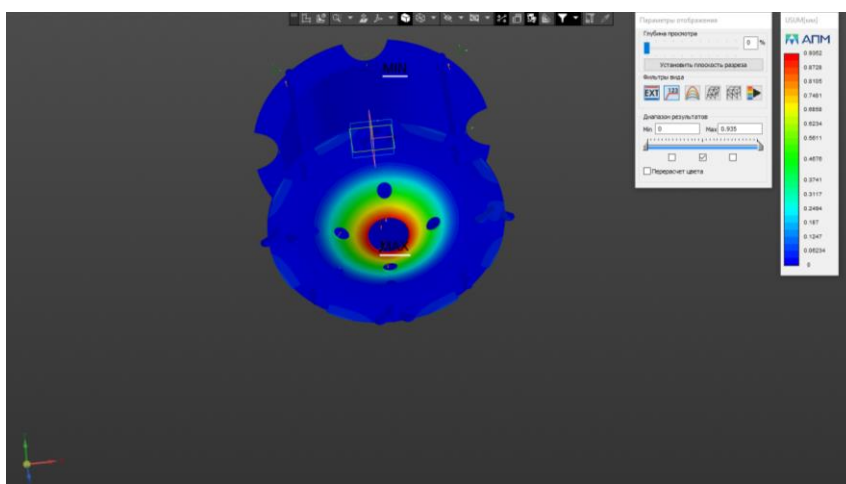


Рисунок 14. Бак ректификационной колонны при нагружении. Цветом показаны перемещения точек объекта, на деформированном объекте

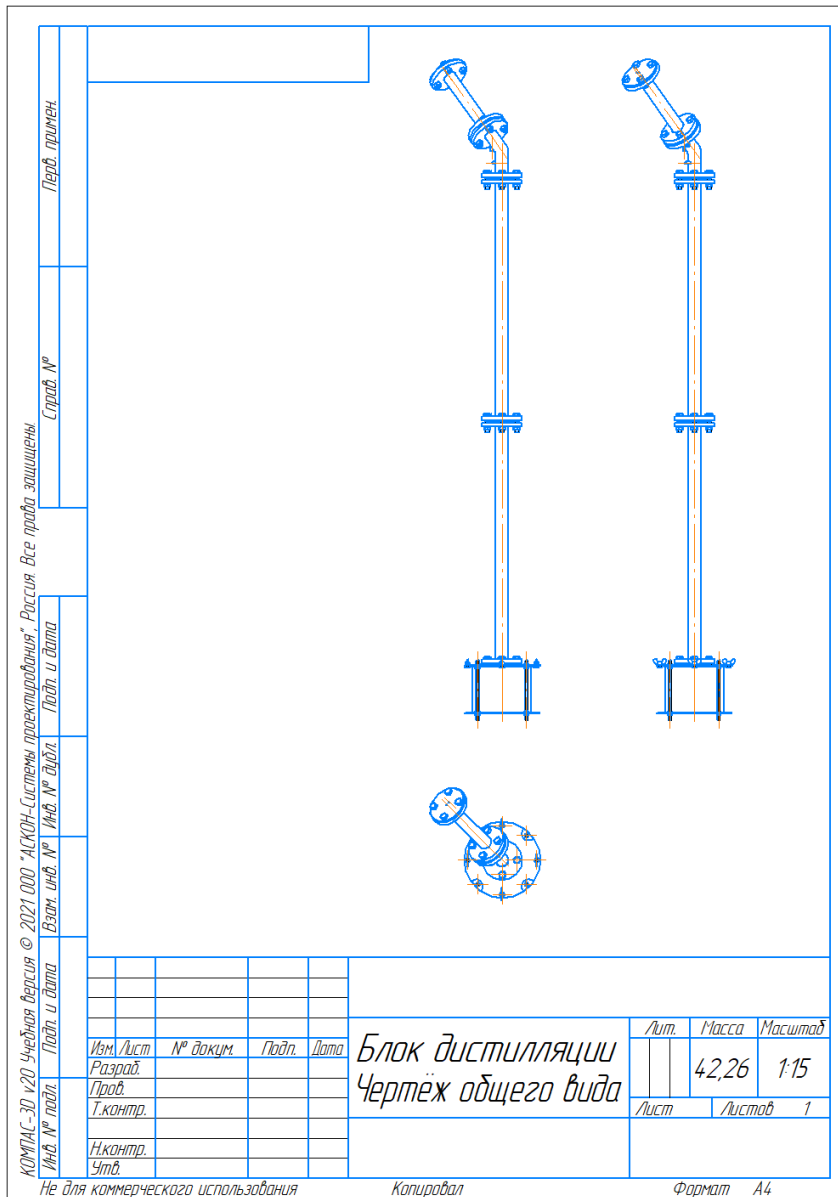


Рисунок 15. Чертеж общего вида блока дистилляции