

Тема 13-14. Біотехнологія виробництва етилового спирту і розчинників

Мета: сформувати знання про особливості біотехнології отримання етилового спирту, органічних розчинників і паливного етанолу, мікроорганізмів-продуцентів, що використовуються в промисловому виробництві; поглибити знання студентів щодо фізіології мікроорганізмів-збудників спиртового бродіння, хімізму спиртового бродіння, засвоєних з курсу «Мікробіологія».

План

1. Біотехнологія отримання етилового спирту.
2. Одержання паливного етанолу.
3. Біотехнологія отримання розчинників.

Основні терміни і поняття: етанол, бродильні технології, дріжджі, меляса, оцукрювання сировини, ректифікація, органічні розчинники.

5.1. Виробництво етилового спирту

Виробництво етанолу – це найбільше біотехнологічне виробництво за витратами сировини в світі. Однак за вартістю продукту займає 3 місце серед великотоннажних.

Етанол широко використовують у якості розчинника, як сировину для хімічного синтезу, у медицині. Етанол можна застосовувати як екстрагент і антифриз, він є субстратом для виготовлення барвників, мастильних матеріалів, миючих засобів, смол, синтетичних волокон тощо.

Одержання етанолу – одна з найстаріших біотехнологій. Добре вивчена біохімія спиртового бродіння. Енергія субстрату в процесі бродіння розподіляється таким чином: 90 % переходять в етанол і по 5 % у біомасу й тепло.

Спиртове бродіння здійснюють дріжджі-сахароміцети (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. rosei*), деякі міцеліальні гриби (*Aspergillus oryzae*), бактерії (*Zymomonas mobilis*, *Z. anaerobia*, *Sarcina ventricula*, *Ervinia amylovora*, *Clostridium thermocellum*). Проте в якості продуцентів у спиртовому виробництві використовують тільки дріжджі.

Сировина для виробництва спирту:

- крохмалевмісна сировина – зерно (жито, пшениця, кукурудза, ячмінь, овес, просо);
- картопля;
- меляса (відходи цукрової промисловості),
- солод, солодове молоко;
- сусло;
- гідролізат деревини.

Існує декілька технологій отримання етанолу. Виробництво спирту включає низку стадій.

1. Спочатку сировину подрібнюють і розварюють з метою гідролізу крохмалю. Оскільки крохмаль не зброджується дріжджами (у них відсутня амілаза), розварену масу обробляють амілолітичними ферментами солоду або мікроорганізмів (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloplitica*). В останні роки використовують готові ферментні препарати амілаз.

Оцукрена у такий спосіб суміш містить вуглеводи (мальтозу, глюкозу, декстрини). Крім того, у ній є пептиди, амінокислоти, фосфорорганічні сполуки, мінеральні солі, мікроелементи.

2. Наступна стадія – зброджування оцукреної маси. З цією метою використовують чисті культури дріжджів, які вирощують у спеціальних дріжджових відділеннях. Для пригнічення розвитку в них бактерій зброджувальну суміш, охолоджену до 30°C, підкислюють сульфатною водою до рН 3,8-4,0.

Продуценти – дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* раса XII. Добре зброджують фруктозу, сахарозу, мальтозу, дещо слабше рафінозу і галактозу (нагромаджують до 11 % спирту в середовищі).

Вимоги до дріжджів-продуцентів:

- вони повинні мати високу бродильну активність;
- швидко й повністю зброджувати цукри;
- використовувати інші компоненти середовища в анаеробних умовах;
- бути стійкими до продуктів свого обміну (особливо до спирту);
- добре протистояти інфекції.

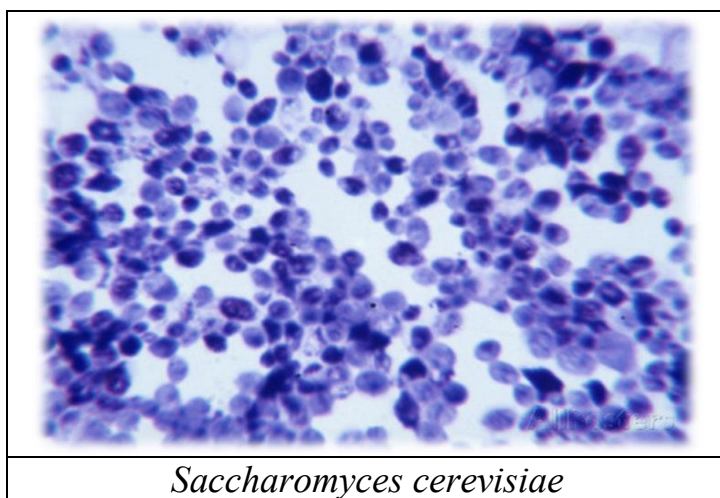


Рисунок 5.1 – Чиста культура *Saccharomyces cerevisiae*

Одержання етанолу з меляси

Схема двопоточного способу зброджування меляси передбачає приготування окремих середовищ для одержання дріжджів (вміст сухої речовини 8-12 %) і для зброджування (32-36 % сухої речовини).

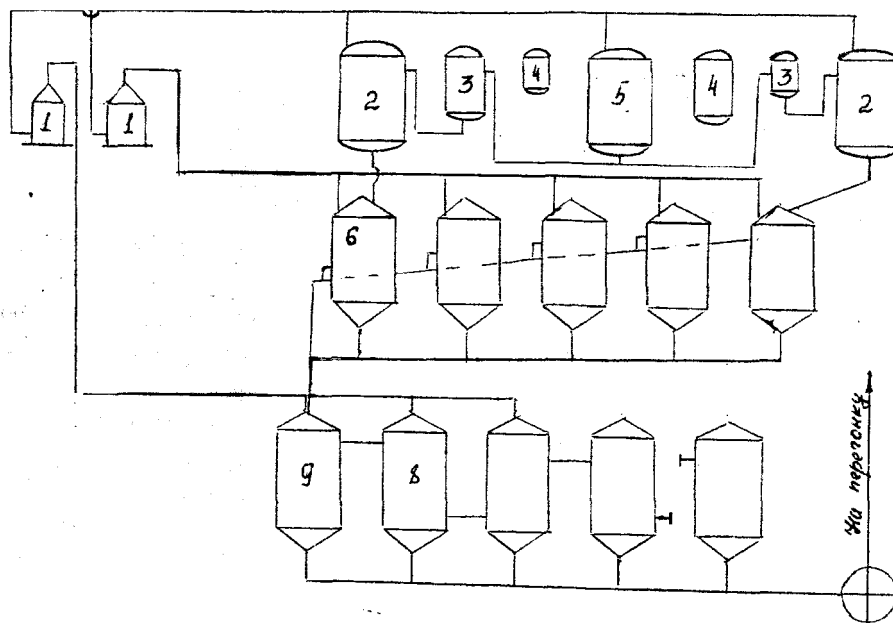


Рисунок 5.2 – Апаратурно-технологічна схема одержання етанолу з меляси: 1 – розсиропники; 2–4 – апарати чистої культури; 5 – стерилізатор; 6 – дріжджегенератор; 7 – насос; 8 – бродильний апарат; 9 – головний бродильний апарат

1. У дріжджегенераторах застосовують аерацію. Об'єм повітря, що подається – 3-4 м³ на годину. Це слабка аерація. Температура в дріжджегенераторах підтримується на рівні 28-30°C, а рН 4,2-4,5. Концентрація етанолу в дріжджегенераторах досягає 2,8-3,5%, дріжджів – 2,5-6,5% сухої речовини.

2. Вирощені дріжджі із дріжджегенератора за верхніми лініями відбору направляють до головного бродильного апарата, куди одночасно надходить поживне середовище з концентрацією сухої речовини 32–36 %.

3. Після заповнення головного апарата культуральна рідина послідовно проходить бродильні апарати і з останнього потрапляє на перегонку. Температура бродіння 29-31°C. Концентрація сухої речовини в першому бродильному апараті 7,5-8,5 %, у другому – 8-9 %, у третьому – 9-9,5 % і в останньому 5-6,5 %. Система працює без поновлення дріжджів 7-10 діб.

3. Перед перегонкою із бражки виділяють хлібопекарські або кормові дріжджі (рис. 5.2).

4. Спирт, отриманий у результаті дріжджевого бродіння, містить сивушні масла (пропанол, 2-бутанол, 2-метилпропанол), аміловий та ізоаміловий спирти.

Це побічні продукти обміну ізoleyцину, лейцину і валіну. Відділити сивушні масла можна тільки шляхом *ректифікації*.

Одержання технічного спирту

Технічний спирт одержують на гідролізатах деревини та інших рослинних відходах. Деревина листяних і хвойних порід містить від 40 до 75 % полісахаридів. Рослинну сировину гідролізують. Одержаний гідролізат містить 3,5 % цукри (переважно глюкозу), целобіозу і манозу, а також пентози – ксилозу, арабінозу, рамнозу. У результаті бродіння утворюється до 1,5 % етанолу. Гідролізний спирт (ректифікат) містить до 0,1 % метанолу, дещо більшу кількість кислот, складних ефірів, альдегідів.

Відходами целюлозного виробництва є сульфітні гідролізати, які використовують для одержання сульфітного етилового спирту. Гідролізний етанол може містити до 8 % метанолу.

Ямомото (Японія) довів, що одержаний із мікроміцетів роду *Rhizopus* ферментний препарат, який має високу амілазну та пектиназну активність, добре переводить крохмаль з розтертої маси картоплі в етанол. Процес відбувається при рН 4,2 і температурі 25°C. Тут не потрібно розварювати картоплю й оцукрювати масу.

Значний інтерес, як продуценти етанолу, представляють аеротолерантні бактерії *Zymomonas mobilis*. Вони, на відміну від дріжджів, характеризуються низькою чутливістю до етанолу. Крім того, гранична швидкість споживання глюкози й утворення етанолу в 2-3 рази вища. Ця бактерія здатна утилізувати глюкозу, сахарозу. Недоліком є повільне зростання біомаси, що знижує продуктивність системи. Значних успіхів при культивуванні *Z. mobilis* для одержання етанолу було досягнуто в Канаді, де в результаті селекції одержані штами, що дають 200 г/л. При одержанні етанолу хімічним шляхом із етилену продуктивність складає 80 г/л.

5.2. Одержання паливного етанолу

Етиловий спирт є гарним екологічно чистим паливом для двигунів внутрішнього згорання й альтернативою дефіцитному бензину. Використання чистого етанолу або в суміші з бензином (газохолом) суттєво знижує забруднення оточуючого середовища вихлопними газами. Тому в країнах з великими запасами природної рослинної сировини і відповідними ґрунтово-кліматичними умовами, що забезпечують високі врожаї, стає доречним орієнтувати виробництво моторного палива на процеси мікробіологічного бродіння.

У якості пального спирт почали використовувати в США і Німеччині в 30-40 рр. минулого століття. Попит на етанол у якості палива різко виріс у 70-ті роки, зокрема в Бразилії. У 1980 р. у США в продаж поступила суміш із 6-9 частин бензину й 1 частини етанолу («газохол»). У Японії наприкінці 90-х років експорт нафти скоротився з 72 до 49 % за рахунок отримання спирту на базі іммобілізованих мікробних клітин.

Головним завданням, яке потрібно вирішувати при отриманні спиртів технічного призначення, це заміна крохмалевмісних субстратів дешевою сировиною нехарчового призначення. Для країн Латинської Америки такою сировиною можуть бути відходи цукрової тростини – багас, маніок, батат, солодке сорго, топінамбур. Для регіонів з помірним кліматом зі значними масивами лісів, доцільним є використання гідролізатів відходів деревини, а також соломи, торфу, рогозу тощо. Зокрема підраховано, що 1 т деревини може замінити близько 0,6 т зерна або 1,7 т картоплі, при цьому можна отримати до 180 л етанолу і 40 кг дріжджів.

Збільшити виробництво етанолу можна наступними шляхами:

1) використовувати безперервну ферментацію замість періодичної. Це підвищує продуктивність системи в 2 рази. Вихід етанолу збільшується за умови використання флокулюючих рас дріжджів, рециркуляції біомаси й іммобілізації клітин;

2) проведення вакуумної ферментації при розрідженні 32-35 мм рт. ст. для видалення етанолу;

3) здійснення флеш-ферментації, при якій частина культуральної рідини періодично потрапляє до вакуумної камери для видалення етанолу;

4) селекція етанолотолерантних штамів мікроорганізмів, здатних утворювати високі концентрації етанолу.

Економічні переваги виробництва етанолу залежать від низки умов: структури сільськогосподарських культур, собівартості сировини; капіталовкладень на будівництво заводів; цінової політики. Країни, що не мають виходу до моря, зацікавлені в заміні нафти на інші види палива.

5.3. Біотехнологія отримання розчинників

Органічні розчинники – **ацетон** і **бутанол** широко використовуються не тільки в хімічній промисловості, але й в інших областях народного господарства.

Ацетоно-бутилове бродіння є анаеробним процесом і викликається бактеріями *Clostridium acetobutylicum*.

Сировина для ацетоно-бутилового бродіння – меляса і рослинні гідролізати. Ацетон і бутанол одержують зброджуючи зернові, мелясно-зернові суміші або мелясу.

Технологічна схема отримання ацетону і бутанолу:

1. Якщо готують із зерна (кукурудзи), борошно грубого помелу спочатку змішують із водою (6-8 кг борошна на 100 л води). Потім суміш варять 2 години під тиском 200 кПа і стерилізують.

2. Охолоджену до 37-42⁰ С масу зброджують протягом 2-х діб при рН 5-7. У процесі бродіння з глюкози утворюється суміш, яка містить 6 частин бутанолу, 1 частину етанолу й 3 частини ацетону. З 3-х кг крохмалю можна одержати 1 кг органічних розчинників.

3. На першому етапі ацетон-бутилового бродіння утворюються оцтова і масляна кислоти, водень і CO₂. Потім масляна кислота відтворюється до

бутилового спирту. Ацетон утворюється з ацетооцтової кислоти при її декарбоксілюванні.

4. Основну ферментацію проводять у періодичному, напівперіодичному і безперервному режимах. Через 12 годин рН з 6,0 знижується до 4,5-4,2. Встановлено, що при низьких значеннях рН активуються ферменти, що каталізують трансформацію ацетоацетил-СоА в ацетон.

5. Після завершення процесу ацетоно-бутилово барду піддають сепаруванню, дистилят наполовину упарюють, після чого ацетон відділяють від етанолу і бутанолу перегонкою при різних температурах. Ацетон кипить при 56,2°C, етанол – 78,4°C, чистий бутанол – при 117,7°C.

Ацетон і бутанол широко застосовується в хімічній промисловості. Відходами виробництва є водень і діоксид вуглецю, а також ацетон-бутилова барда. Газу уловлюють і використовують для синтезу аміаку і метанолу. Барду після відділення розчинників концентрують десятиразово у вакуум-випарювальних апаратах і висушують у розпилювальних сушарках. Одержують сухий концентрат, що містить 60-100 мгк/л рибофлавіну. Вміст сухих речовин, переважно азотистих, у барді складає 3-5 %, тому її використовують для вирощування кормових дріжджів і отримання кормового препарату вітаміну В₁₂.

Ацетоно-бутилова барда, крім ацетону, бутилового й етилового спиртів, містить ряд побічних продуктів, для розділення яких застосовують ректифікацію.

Розроблено метод біосинтезу органічних розчинників на основі синтетичного газу. Реалізований двох етапний безперервний процес. Спочатку із СО₂ утворюють органічні кислоти за допомогою *Butyribacterium methylotropicum*. Потім кислоти й водень газу перетворюється в бутанол, етанол, ацетон. На першій стадії процес регулюється вимірюванням рН. Він повинен бути в інтервалі 6,5-5,0. При більш низькому рН утворюється більше бутанолу, ніж ацетону. Одержано мутант, який дає вихід розчинників 22,7 %, концентрація бутанолу в середовищі 13 г/л.