

На правах рукописи

СОРОКОДУМОВ
Сергей Николаевич

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ СПИРТООБРАЗОВАНИЯ И
УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА**

Специальность: 03.00.23 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва

2005

Работа выполнена в Российском химико-технологическом университете
им. Д.И. Менделеева

Научный руководитель: Кандидат технических наук, доцент
доцент А.Е. Кузнецов

Научный консультант: Доктор технических наук
профессор А.А. Кухаренко

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук
профессор Г.И. Эль-Регистан
Доктор технических наук
В.В. Лалов

Ведущая организация: Государственное Научное Учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии
РАСХН, г. Москва

Защита состоится " 22 " ноября 2005 г. в 12³⁰ на заседании
диссертационного совета ДМ.212.204.13 в Российском химико-
технологическом университете им. Д.И. Менделеева (125047, Москва,
Миусская пл., 9) в ауд. ____.

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-библиотечном
центре РХТУ им. Д.И. Менделеева

Автореферат разослан " 20 " октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ДМ.212.204.13



И.В. Шакир

2006-4
16865

218 4038

1

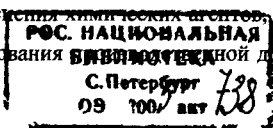
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В современных экономических условиях и с учетом сложившихся традиций в отечественной спиртовой промышленности преобладающее количество пищевого этилового спирта получают на основе микробиологической переработки крахмалсодержащего сырья, в частности, зернового сырья. Вместе с тем с усилением конкуренции между производителями спирта и экологических ограничений, в биотехнологии этилового спирта возрастает актуальность решения таких научно-технических задач, как увеличение выхода этанола из исходного сырья, улучшение качества выпускаемого этанола, а также разработка эколого-эффективных способов утилизации отходов и методов очистки сточных вод. Решение этих задач предлагаемыми для спиртовой промышленности способами зачастую требует существенной модернизации действующих производств, немалых капиталовложений и как следствие повышения себестоимости продукции.

Зарубежный опыт и тенденции показывают, что целенаправленная работа по модернизации и совершенствованию технологий с целью обеспечения более экологически чистого производства без увеличения себестоимости, при обеспечении требуемого качества продукции и повышения интенсивности процессов, требует использования превентивных мер. Примечательно к биотехнологии получения этанола из зерносырья такими мерами, в частности, могут быть: совершенствование процессов подготовки зерносырья с уменьшением потери сбраживаемых сахаров, получение чистой культуры дрожжей с высокой бродильной активностью и обеспечение доминирования культуры в условиях неасептической ферментации с целью уменьшения накопления побочных продуктов брожения и как следствие – уменьшения затрат на очистку этанола на стадии ректификации, ресурсо- и энергосберегающая переработка и обезвреживание зерновой барды – основного отхода спиртового производства.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы заключалась в совершенствовании биотехнологии этилового спирта и разработке новых подходов, не требующих существенной модернизации действующего производства и направленных на повышение конкурентоспособности производства этилового спирта из зерносырья, повышения его экономической и экологической эффективности путем решения следующих задач:

- совершенствование этанольного брожения в результате более эффективных режимов ферментативной обработки при приготовлении сусла;
- исследование и апробация применения химических агентов, в частности, пероксида водорода, для обеспечения доминирования биотехнологической дрожжевой культуры и



уменьшения содержания побочных продуктов без потери бродительной активности дрожжей при сбраживании зернового суслу в неасептических условиях;

- исследование процесса анаэробного сбраживания зерно-спиртовой барды с использованием современных высокопроизводительных анаэробных реакторов нового поколения, в частности, UASB-реактора, для удаления основной массы загрязнений из зерно-спиртовой барды ресурсо- и энергосберегающим анаэробным методом;

- получение исходных данных, необходимых для расчета опытно-промышленной установки для биоутилизации зерно-спиртовой барды в UASB-реакторе и создания экологически чистого производства этилового спирта.

Научная новизна. Проведенные исследования позволили применительно к промышленным условиям производства этилового спирта из зерна обосновать рациональные режимы ферментативной обработки при приготовлении суслу, что обеспечило улучшение технологических свойств готового суслу, повышение содержания спирта в готовой бражке на 0,15 % об. и выход спирта на 1,2–1,3 дал из 1 т усл. крахмала.

Впервые предложено и научно обоснована возможность использования пероксида водорода для улучшения характеристик спиртового брожения. Экспериментально установлено, что в условиях постоянного селективного давления на популяцию дрожжей-сахаромицетов, вызываемого пероксидом водорода, возможен отбор популяций, устойчивых к относительно большим дозам вносимого H_2O_2 и сохраняющих высокую активность при сбраживании углеводов в этанол.

На основе проведенных исследований с производственной культурой предложены режимы внесения H_2O_2 , позволяющие снизить уровень инфицированности посторонней микрофлорой на стадии получения условно-чистой дрожжевой культуры (засевного материала) без последующего падения бродительной активности дрожжей-продуцентов. В частности, установлено, что для дрожжей, предварительно адаптированных к пероксиду водорода, оптимальные дозы внесения H_2O_2 при выращивании посевного материала в периодических условиях составляют не более 1,0 г/л (по 100% H_2O_2), при этом H_2O_2 необходимо вносить на стадии активного роста при концентрации клеток дрожжей не менее 0,2–0,5 г асд/л.

Впервые исследованы процессы метаногенного сбраживания зерно-спиртовой барды в UASB-реакторе. Показана возможность достижения производительности UASB-реактора (по удаляемой ХПК) 9000–12000 мг/л.сут, а удельной активности анаэробного ила (по убыли ХПК) 40000–50000 мг/л ила в сут, что в 3–6 раз (по удельной производительности объема реактора) превышает производительность метантенков классического

типа, при этом степень удаления органических загрязнений из барды составляет не менее 75-85%.

Найдены критические условия в отношении нагрузок и организации циркуляционных потоков в UASB-реакторе при переработке зерно-спиртовой барды. Впервые показана целесообразность использования режима с циклическим изменением скорости восходящего потока жидкости при нагрузках на реактор до 1500-2000 мг/л.ч.

Получены основные данные, необходимые для расчета опытно-промышленной установки для сбраживания зерно-спиртовой барды в UASB-реакторе.

Практическая значимость. Рассмотренные научно-технические задачи решались применительно к ФГУП "Биотехнологический завод" (пос. Серебряные Пруды, Московская обл.) производительностью 2000 дал/сутки по этиловому спирту. Проведенные исследования являются важной составляющей проекта технической модернизации и совершенствования спиртового производства с целью его интенсификации и решения эколого-биотехнологических задач.

Результаты, полученные в ходе исследований спиртового брожения с внесением пероксида водорода, создают предпосылки для получения условно-чистой культуры и уменьшения инфицированности бражки при проведении спиртового брожения вместо традиционных для спиртовой промышленности средств термической стерилизации и закисления культуры серной кислотой.

Промышленное внедрение сбраживания зерно-спиртовой барды в UASB-реакторе позволит не только обезвреживать избыток зерно-спиртовой барды наиболее совершенным энерго- и ресурсосберегающим способом, но и одновременно получать анаэробный гранулированный ил в качестве товарного продукта для использования в качестве стартового материала при загрузке промышленных анаэробных реакторов нового поколения, внедряемых на предприятиях пищевой, пивоваренной, ликероводочной отраслей промышленности для анаэробно-аэробной очистки сточных вод с высоким содержанием органических загрязнений.

Новый способ использования пероксида водорода для совершенствования спиртового брожения защищен патентом РФ. Положительные результаты проведенных исследований подтверждены актом производственных испытаний.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были доложены на V Международном конгрессе "Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес и экологическое образование" (2000 г., Самара – Астрахань – Самара), научно-практической конференции "Передовые технологии на пороге XXI века" (2000 г., Киши-

нев, Молдова), научно-практической конференции "Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликеро-водочной промышленности" (2000 г., Казань), 3-ей Международной научно-практической конференции "Научно-технический прогресс в спиртовой и ликероводочной отрасли" (2001 г., Москва), 3-ем Международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (2005, Москва).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 1 учебное пособие, 4 статьи, 8 тезисов сообщений, 1 патент РФ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы с описанием результатов экспериментальных исследований и их обсуждением, выводов и списка литературы, включающего 195 источников. Работа изложена на 182 стр. машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками, 16 таблицами. В приложении представлены протоколы и акты испытаний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В опытах с ферментативной обработкой зерносырья, предназначенного для последующего этанольного сбраживания промышленной расой дрожжей, использовался ячмень с крахмалистостью 52 % и ферментный препарат амила-субтилин ГЗХ (АС = 1300 ед./г), глюкоамилаза жидкая (ГЛС = 5800 ед./г), а также прото-субтилин ГЗХ с протеолитической активностью 70 ед./г и амилалитической активностью 300 ед./г.

При изучении спиртового брожения использовалась производственная культура термотолерантных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Meyen расы Т 985 с морфологическими признаками и физиологическими свойствами штамма по ТУ 9182-400-00008064-2000, сбраживающего глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу и на 1/3 рафинозу. Оптимальная температура роста дрожжей от 30 до 36°C, pH среды 3,6-4,2. Контроль за качеством чистой культуры дрожжей осуществляли в соответствии с технологическими инструкциями. В качестве питательной среды использовалось зерновое сусло, приготовленное в условиях производства, а также модельная среда с сахарозой и минеральными компонентами – источниками азота, фосфора, калия, магния.

Используемый в ряде опытов пероксид водорода вносился в виде пергидроля (33% H₂O₂) непосредственно в ходе процесса культивирования, подбирая его оптимальную концентрацию в среде.

При изучении метаногенного брожения использовался фильтрат спиртовой барды с содержанием загрязнений по ХПК ~30000 мг/л, pH 4,2-4,4, полученный фильтрацией производственной спиртовой барды с содержанием сухих веществ 6,7-8,4%, в том числе

белка и аминокислот 0,17 – 0,4%, аммонийного азота 1,4%, безазотистых экстрактивных веществ 3,4 – 3,8%. При необходимости барду подщелачивали 2н раствором NaOH. При сбраживании барды использовался анаэробный гранулированный ил, отобранный с очистных сооружений пивоваренного завода.

Методы. Исследования по культивированию микроорганизмов проводились на базе кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева. Дрожжи выращивали в периодическом режиме в аэробных или анаэробных условиях. В опытах на колбах (объем колб 250 мл, объем среды 30-100 мл) в условиях аэрации дрожжи выращивали на термостатируемой качалке с числом оборотов 180-200 об/мин при температуре 24-32°C, pH 3,0-5,0. Для изучения брожения в анаэробных условиях использовались колбы объемом 0,5 л и 1 л с отводом для CO₂ при малых оборотах (40 об/мин) мешалкой с магнитным приводом. Объем посевного материала составлял в зависимости от постановки опыта от 2 до 10 % объема среды.

Культивирование дрожжей также проводили в аэробных и анаэробных условиях в лабораторном ферментере "Фермус-3" (изготовитель НИЦ "Биоавтоматика", г. Н. Новгород) общим объемом 4,5 л, с модифицированной системой регистрации и контроля параметров культивирования с использованием программного обеспечения "Биодром-1", разработанного на кафедре биотехнологии РХТУ.

За ходом процесса следили по изменению pH, pO₂, Eh, оптической плотности суспензии, микроскопированием проб, измерением текущих концентраций субстратов (рефрактометрическим методом), а также измеряли бродильную активность по скорости выделения CO₂ из ферментера или в отобранных аликвотах.

Метаногенное сбраживание барды проводили в двух анаэробных UASB-реакторах со слоем гранулированного ила и восходящим потоком жидкости (рис.1). Реакторы рабочим объемом 2,75 л каждый были изготовлены из стеклянных цилиндров диаметром 90 мм, имели коническое днище из нержавеющей стали, а также сепарационное устройство в верхней части для разделения жидкой, твердой и газовой фаз и вывода сброженной и осветленной барды из реактора. В каждом реакторе имелся контур для рециркуляции безиловой жидкой фазы, отбираемой над слоем ила в точке на ½ высоты реактора. Рециркуляция осуществлялась с целью повышения массообмена в слое гранулированного ила для интенсификации брожения. Реакторы были помещены в термостат для сбраживания в мезофильном режиме при 34-39°C.

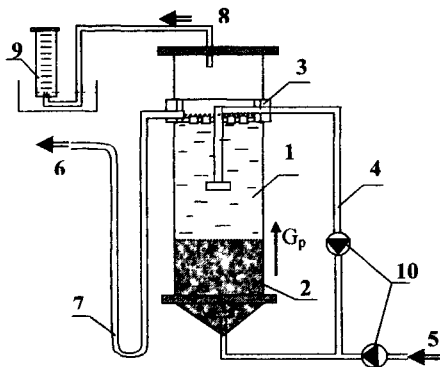


Рис. 1. UASB-реактор.

1 Реактор объемом 2,7 л. 2. Слой гранулированного ила. 3. Сепарационное устройство. 4. Циркуляционный контур. 5. Подвод барды. 6. Отвод сброженной барды. 7 Гидрозатвор. 8. Отвод биогаза. 9. Измерительный цилиндр. 10. Перистальтические насосы.

При сбраживании барды в UASB-реакторах задавали степень разбавления, скорость подачи и скорость рециркуляции барды, контролировали объем ила, pH среды на входе реактора, определяли скорость выделения биогаза, долю CH_4 в биогазе (по разнице объемов, замеренной после поглощения CO_2 2н р-ром KOH), pH на выходе из реактора, содержание взвешенных веществ (турбидиметрически), концентрацию ХПК бихроматным методом, аммонийного азота (с использованием тест-системы Sera). Содержание сухих веществ в иле определяли гравиметрическим методом.

Проводили статистическую обработку результатов по общепринятым методам с использованием критерия Стьюдента при уровне значимости $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсификация процесса спиртового брожения путем изменения режимов приготовления сусла.

На первом этапе исследований рассматривалась возможность улучшения показателей брожения путем подбора более эффективных режимов предобработки зерносырья при приготовлении сусла.

ФГУП "Биотехнологический завод" работает по Мичуринской схеме разваривания зерна, предварительно размолотого и смешанного с водой. Осахаривание – непрерывное в совмещенном испарителе-осахаривателе ($V=20 \text{ м}^3$). Видимая концентрация сусла после осахаривания составляет 15,5 – 16,5 % СВ. Брожение периодическое, 3-х суточное.

В условиях действующего производства апробировались различные режимы осахаривания разваренного ячменя ферментными препаратами: амилосубтилином ГЗХ, протосубтилином ГЗХ, глюкоамилазой (препаратом "Диазим Х4"), и с учетом специфики процесса на ФГУП "Биотехнологический завод" было предложено использовать доосахаривание непосредственно в режиме брожения. Кроме того, апробировалась ферментативная обработка сырья, обработанного ультразвуком.

Недостатком общепринятых методов ферментативной обработки зерна в спиртовом производстве является накопление низкомолекулярных сахаров, ингибирующих амилитические ферменты, а также торможение растворения крахмала зерна растворенным крахмалом и продуктами гидролиза, присутствующими в сусле. В результате остается нерастворенным от 1 до 3,5% крахмала, введенного в производство с сырьем, и соответственно, снижается выход спирта. Поскольку при удалении углеводов, например при их сбраживании, скорость гидролиза оставшихся олигосахаридов может увеличиваться, то это может привести к уменьшению потерь углеводов. Однако в этом случае осахаривание должно идти при температуре брожения, что снижает скорость гидролиза используемыми в спиртовом производстве термостабильными ферментами, оптимум каталитической активности которых лежит выше 40°C. В то же время в условиях ФГУП "Биотехнологический завод" брожение продолжается несравненно дольше, чем осахаривание, поэтому падение каталитической активности ферментов может оказаться несущественным для завершения процесса гидролиза. Кроме того, такому совмещенному процессу может благоприятствовать использование термофильных штаммов дрожжей, в частности *S. cerevisiae* Т 985.

В результате проведенных исследований было установлено, что наибольший эффект при использовании предложенного варианта обработки зерносырья и брожения наблюдается при применении Протосубтилина ГЗХ в концентрации 1 кг/т условного крахмала. При этом заметно улучшались технологические свойства готового сусла: в начальный период брожения снизилось пенообразование в бродильных чанах; сусло стало менее вязким. В ходе брожения особых отличительных моментов не наблюдалось, однако содержание спирта в готовой бражке повысилось в среднем на 0,15 % об. и по итогам 2-х месяцев испытаний увеличение в выходе спирта составило 1,2–1,3 дал из 1 т усл. крахмала. Ферментативный гидролиз сырья, обработанного ультразвуком с использованием преобразователя "Афалина" при частоте 22 кГц, средней плотности энергии 2 кВт/м³, приводил к увеличению скорости накопления глюкозы на 30–35%, однако обработка ультразвуком приводит к повышенным затратам (стоимость генератора, энергозатраты) при подготовке

сырья, что требует дополнительной технико-экономической проработки для применения в производственных условиях.

Использование пероксида водорода для уменьшения инфицированности процесса брожения при сохранении высокой бродильной активности дрожжей.

Благодаря эколого-гигиеническим преимуществам пероксид водорода находит все большее применение в различных отраслях промышленности в качестве дезинфицирующего агента, в водоподготовке и водоочистке, несмотря на его относительную высокую стоимость. Известно применение H_2O_2 и в качестве источника кислорода в технологии высокоплотного культивирования микроорганизмов, в частности, генетически-модифицированных штаммов с целью получения лекарственных препаратов, а также при биоремедиации загрязненных почв.

Общеизвестно, что H_2O_2 угнетает развитие микроорганизмов, в относительно небольших дозах вызывая у них окислительный стресс, а в больших – гибель клеток. Вместе с тем в последние годы появились данные о важной биохимической и позитивной роли H_2O_2 как регулятора внутриклеточных процессов. В водных экосистемах H_2O_2 участвует в процессах самоочищения. Так, на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева было показано, что при биологической очистке сточных вод его внесение в аэротенк с активным илом, адаптированным к H_2O_2 , может приводить к улучшению очистки, снижению остаточного загрязнения выходящей с очистных сооружений воды, а при культивировании дрожжей (р. *Candida*) – к повышению выхода биомассы и снижению остаточных концентраций неутилизованных субстратов и метаболитов. Учитывая двойственное действие пероксида водорода – как дезинфицирующего средства, с одной стороны, а с другой – как агента, улучшающего в определенных условиях показатели биосинтеза, в диссертационной работе было предложено его использование для подготовки засевного материала с целью улучшения характеристик спиртового брожения. Важный этап этих исследований – выяснение принципиальной возможности получения линии дрожжей-сахаромицетов, устойчивой к относительно большим дозам H_2O_2 , и в то же время сохраняющей высокую бродильную активность. В условиях неасептического процесса при выращивании устойчивых к окислительному стрессу дрожжей внесение H_2O_2 в среду позволило бы, угнетая развитие посторонней микрофлоры, снижать обсемененность дрожжевой культуры, улучшить качество бражки и в целом показатели брожения.

Данный раздел работы включал следующие исследования:

- исследование влияния различных концентраций H_2O_2 на производственную культуру дрожжей в неасептических условиях,

- подбор оптимальных режимов внесения H_2O_2 при выращивании посевного материала и последующем сбраживании субстрата (зернового сусла),
- селекционный отбор и получение линии дрожжей, устойчивой к H_2O_2 ,
- определение основных показателей процесса брожения при использовании H_2O_2 ,

В табл. 1 приведены результаты роста дрожжей в колбах в неасептических условиях при последовательном пересеве на среду с зерновым суслом (разбавленным в 30 раз) без внесения (контроль) и при внесении H_2O_2 .

Таблица 1

Показатели роста дрожжей при последовательном пересеве с внесением и без внесения H_2O_2 .

№ пассажа	$C_{H_2O_2}$ г/л	2	4*	5	6	7	8	9*	10	11	12
Время роста, ч		17	50	23	24	46	22	28	49	21	21
D_0^{**} , опт. ед.		0,22	0,30	0,14	0,33	0,37	0,35	0,35	0,42	0,26	0,32
$\Delta D_{\text{контроль}}$	0	2,99	2,55	3,11	2,97	2,97	2,18	2,07	0,15		
$\frac{\Delta D}{\Delta D_{\text{контроль}}}$, %	0,5- 0,7	<u>0,256</u> 8,6	<u>1,3</u> 51,0	<u>2,86</u> 92,0	<u>3,10</u> 104,4	<u>2,99</u> 100,7	<u>2,37</u> 108,7	<u>3,32</u> 160,4			<u>2,49</u>
$\frac{\Delta D}{\Delta D_{\text{контроль}}}$, %	1,4- 2,0		<u>1,8</u> 70,6	<u>0,03</u> 1,1	<u>3,0</u> 101,0	<u>2,95</u> 99,3	<u>2,21</u> 101,4				
$\frac{\Delta D}{\Delta D_{\text{контроль}}}$, %	2,8- 5,0	<u>-0,08</u> -2,7				<u>2,8</u> 94,3	<u>1,99</u> 91,3	<u>3,06</u> 147,8	<u>2,94</u>	<u>2,67</u>	<u>2,64</u>
$\frac{\Delta D}{\Delta D_{\text{контроль}}}$, %	7,0- 10,0		<u>0,51</u> 20,0			<u>2,06</u> 69,4	<u>1,1</u> 50,5	<u>2,61</u> 126,1			

*Рост при 23-24°C, ** D_0 – исходная концентрация биомассы, ΔD – прирост биомассы за время культивирования, оптич. ед. (1 оптич. ед. $\approx 0,7$ г асд/л).

По мере увеличения числа пассажей в контроле происходило увеличение бактериальной обсемененности и уменьшение прироста биомассы, обусловленное вытеснением культуры дрожжей дикой микрофлорой и развитием сукцессии. При пересеве дрожжей на среду в условиях добавления H_2O_2 по мере увеличения числа пассажей культура адаптировалась к возрастающим концентрациям пероксида, при этом дрожжи оставались доминирующими в микроценозе, а уровень бактериальной обсемененности оставался в пределах 1-10 клеток бактерий в поле зрения микроскопа. К 10-13 пассажам дрожжи могли выдерживать разовое внесение 15-30 г/л H_2O_2 без существенного уменьшения уровня накопления биомассы по истощении субстрата (рис. 2). Устойчивость популяции дрожжей возрастала при увеличении количества посевного материала и была наибольшей в экспоненциальной фазе роста. Таким образом, в неасептических условиях при постоянном селективном давлении на популяцию дрожжей-сахаромицетов, вызываемого перексидом

водорода, возможен отбор популяций дрожжей, доминирующих в ценозе и устойчивых к относительно большим дозам вносимого H_2O_2 .

В целом, внесение H_2O_2 в популяцию адаптированных дрожжевых клеток приводило к торможению их роста (рис. 2, вариант А), но вместе с тем конечный выход биомассы повышался на 10-17% (рис. 2, вариант Б). Эффект повышения выхода биомассы сохранялся и после прекращения добавления H_2O_2 в среду культивирования на протяжении не менее 4-х пассажей.

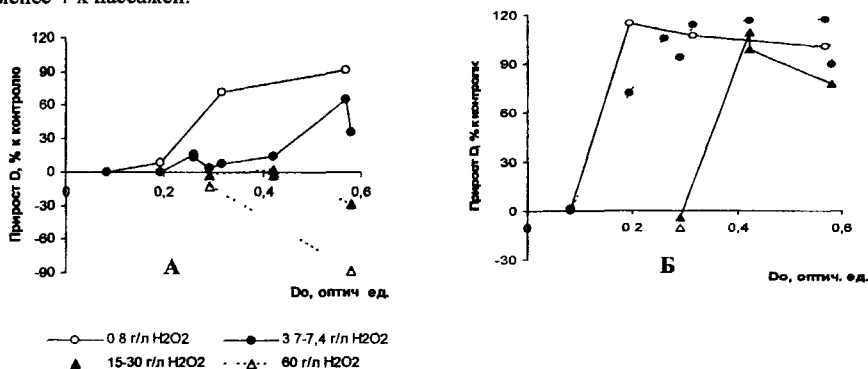


Рис. 2. Влияние дозы H_2O_2 на прирост дрожжевой массы.

Использовались дрожжи 10-13 пассажей; А – прирост после 5 ч культивирования, Б – прирост после 21 ч культивирования.

По результатам экспериментов оптимальная разовая доза внесения H_2O_2 при выращивании посевного материала в аэробных периодических условиях составляет не более 1 г/л (по 100% H_2O_2), при этом H_2O_2 необходимо вносить на стадии активного роста при концентрации клеток дрожжей не менее 0,2-0,5 г асд/л.

С полученными адаптированными линиями дрожжей была проведена серия экспериментов по сбраживанию суслу. На рис. 3 представлены результаты брожения с использованием культуры 9-го пассажа (см. табл. 1) в сравнении с культурами, выросшими без внесения H_2O_2 . Видно, что в варианте с адаптированной линией рост дрожжей и сбраживание субстрата происходят более активно.

Таким образом, можно полагать целесообразным использование в процессе спиртового брожения метода получения условно-чистой культуры на основе дрожжей, адаптированных к перексиду водорода, с целью уменьшения инфицированности процесса и повышения их бродильной активности.

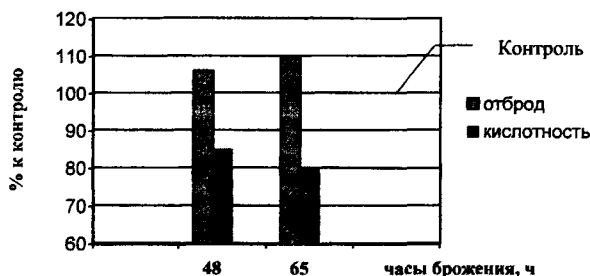


Рис. 3. Сравнение показателей брожения адаптированных к H_2O_2 дрожжей и неадаптированных (контроль) в тестовых экспериментах.

Исследование метаногенного сбраживания зернно-спиртовой барды в UASB-реакторе

Следующим разделом работы явились исследования по биoutilизации основного отхода спиртового производства – барды. Представляло интерес выяснить возможность переработки нативного фильтрата барды, максимальные возможности UASB-реактора (рис. 1) по сбраживающей мощности и количеству удаляемых веществ (по ХПК), устойчивость анаэробного процесса к нерегулярности подачи барды, а также оптимальные входные параметры, условия проведения процесса и показатели на выходе.

В опытах в UASB-реакторе №1, в котором содержалось гранулированного ила ($V_{\text{ил}}$) 90-130 мл/л (4,0-5,9 г асв/л), максимальная скорость выделения биогаза ($V_{\text{газ}}$) составила 300-350 мл/ч (110-130 мл/л.ч) при скорости подъема жидкости (G_p) 0,25-1,35 м/ч, а в реакторе №2 ($V_{\text{ил}}$ = 50-90 мл/л) – 80-100 мл/ч (рис. 4). При малом содержании загрязнений во входном потоке (ХПК до 6000 мг/л) выделение биогаза увеличивалось пропорционально объемному прогоку (скорости разбавления D) среды через реактор вплоть до $D=1 \text{ сут}^{-1}$. При ХПК на входе $\sim 10000 \text{ мг/л}$ выделение биогаза максимально при $D=0,6-0,8 \text{ сут}^{-1}$. При $\text{ХПК}_{\text{вх}} = \sim 30000 \text{ мг/л}$ оптимальное $D = 0,4-0,6 \text{ сут}^{-1}$ (рис. 5). Таким образом, с повышением $\text{ХПК}_{\text{вх}}$ наблюдалось смещение оптимальной величины протока в меньшую сторону. Это можно объяснить тем, что при одинаковых величинах D бродильная активность ила и скорость выделения биогаза возрастают с повышением $\text{ХПК}_{\text{вх}}$, при этом с увеличением $V_{\text{газ}}$ растет нестабильность слоя гранул ила, и как показали наблюдения, при $V_{\text{газ}} > 130 \text{ мл/л}$ выделяющиеся пузырьки биогаза коалесцируют в слои ила, а образующиеся газовые пузыри разрушают его. Это приводит к повышенному уносу ила из реактора и уменьшению его производительности. При таком критическом значении $V_{\text{газ}}$ максимальные нагрузки на реактор достигали 14000-16000 мг/л.сут (по ХПК).

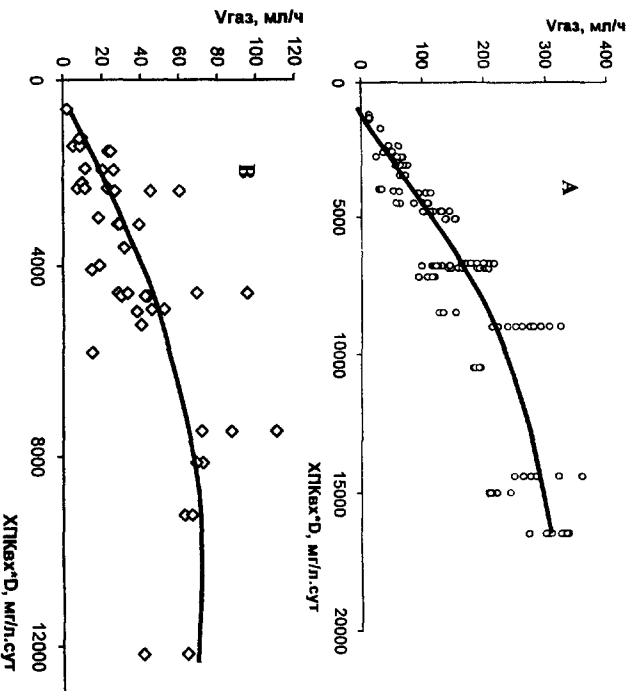


Рис. 4. Изменение скорости выделения биогаса $V_{гвз}$ при увеличении нагрузки по ХПК на реактор.

А. Реактор №1,

$D = 0,24-0,9$ сут⁻¹,

$G_p = 0,0-0,7$ м/ч,

$V_{кисл} = 90-130$ мл/л

В. Реактор №2,

$D = 0,2-1,35$ сут⁻¹,

$G_p = 0,25-1,35$ м/ч,

$V_{кисл} = 50-90$ мл/л

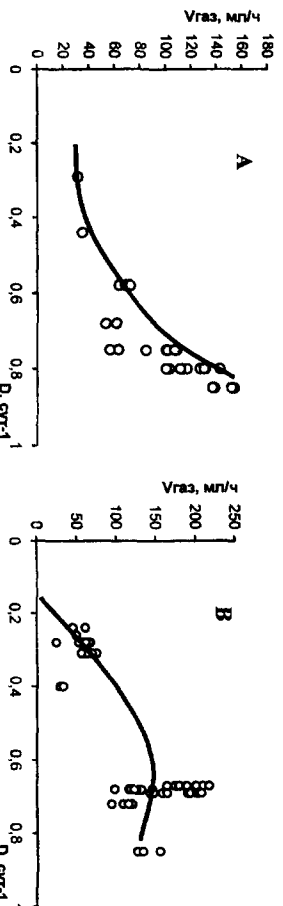


Рис. 5. Изменение скорости выделения биогаса $V_{гвз}$ при увеличении скорости подачи бар-ды в UASB-реактор (№1).

А. $XПК_{гвз} = 6000 \pm 1000$ мг/л, $G_p = 0,0-$

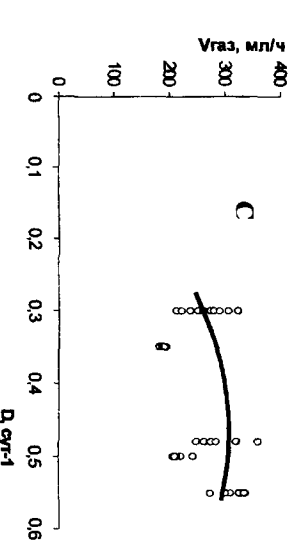
$0,4$ м/ч, $V_{кисл} = 105-130$ мл/л

В. $XПК_{гвз} = 10000 \pm 2000$ мг/л, $G_p = 0,4-$

$0,7$ м/ч, $V_{кисл} = 90-130$ мл/л

С. $XПК_{гвз} = 30000 \pm 5000$ мг/л, $G_p = 0,5$

м/ч, $V_{кисл} = 110-130$ мл/л



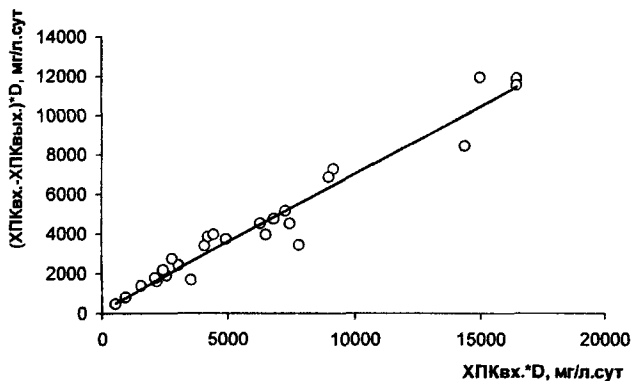


Рис. 6. Изменение сбраживающей мощности UASB-реактора (№1) при увеличении нагрузки по ХПК.

$D = 0,05-0,9 \text{ сут}^{-1}$,

$G_p = 0,0-0,7 \text{ м/ч}$,

$V_{\text{ила}} = 90-130 \text{ мл/л}$

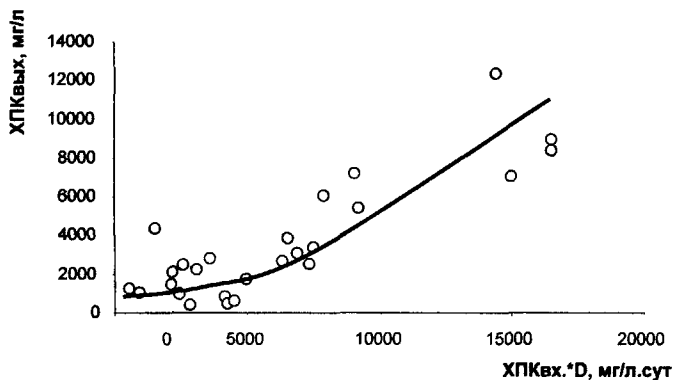


Рис. 7. Изменение ХПК в стоке на выходе из UASB-реактора (№1) при увеличении нагрузки по ХПК.

$D = 0,05-0,9 \text{ сут}^{-1}$,

$G_p = 0,0-0,7 \text{ м/ч}$,

$V_{\text{ила}} = 90-130 \text{ мл/л}$

В области устойчивой работы UASB-реактора, когда слой ила не разрушается, его сбраживающая мощность растет пропорционально (до 9000-12000 мг/л.сут) с увеличением нагрузки до 14000-16000 мг/л.сут, (рис. 6). При подаче в реактор неразбавленной барды максимальная сбраживающая мощность была достигнута при $D=0,3-0,5 \text{ сут}^{-1}$, однако при $D>0,3 \text{ сут}^{-1}$ и высоких $\text{ХПК}_{\text{вх}}$ возрастает остаточное ХПК в выходном стоке – от 5000 до 12000 мг/л (рис. 7). При максимальной сбраживающей мощности реактора 9000-12000 мг/л.сут и использованном количестве ила максимальная удельная сбраживающая активность ила составляет (по убыли ХПК) 40000-50000 мг/л.сут (1500-3000 мг/г асв ила в сутки), что даже несколько превышает максимальные значения, приведенные в литературе.

Минимальные критические величины $\text{ХПК}_{\text{вх}}$ составляют 1500-2000 мг/л, а минимальные критические нагрузки – 500-1000 мг/л.сут (рис. 4). Полученные критические величины также согласуются с цифрами, приводимыми в литературе для реакторов UASB-типа.

При изменении скорости рециркуляции жидкости в UASB-реакторе и соответственно скорости восходящего потока G_p при относительно малых нагрузках по ХПК 1200-2400 мг/л.сут (рис. 8) наблюдается кратковременное (на 1-2 ч) возрастание броидильной активности в 1,5-3 раза. Можно предположить, что в условиях неравномерного распределения потока вдоль профиля биореактора и в толще гранул ила при небольших нагрузках и слабом перемешивании частиц ила функционирует только часть популяции метаногенной ассоциации, остальная часть находится в режиме голодания по субстрату. Увеличение скорости рециркуляции жидкости приводит к перераспределению структуры потока и более равномерному распределению концентрации субстрата на короткое время, при этом вовлекается в работу большая часть метаногенной ассоциации. Затем вновь формируются концентрационные профили с локальными зонами голодания по субстрату и активность ила возвращается на прежний уровень.

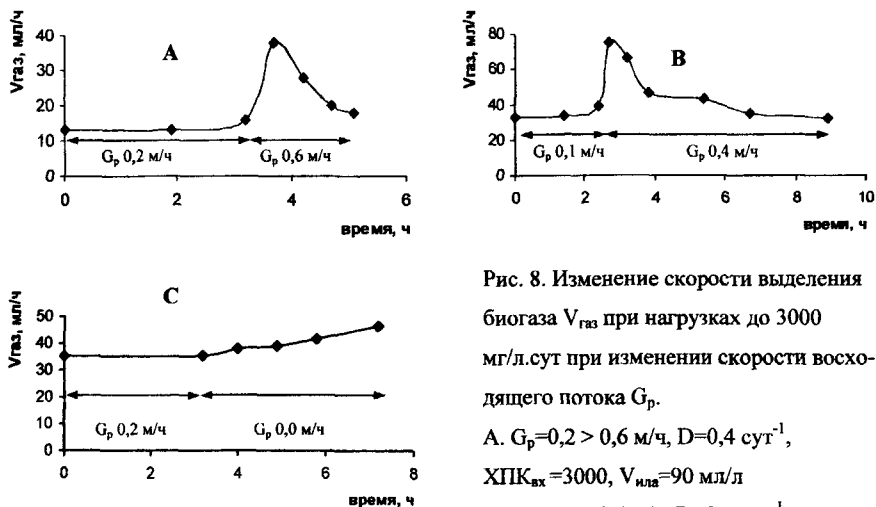


Рис. 8. Изменение скорости выделения биогаза $V_{газ}$ при нагрузках до 3000 мг/л.сут при изменении скорости восходящего потока G_p .

А. $G_p=0,2 > 0,6$ м/ч, $D=0,4$ сут⁻¹,

ХПК_{вх}=3000, $V_{ила}=90$ мл/л

В. $G_p=0,1 > 0,4$ м/ч, $D=0,3$ сут⁻¹,

ХПК_{вх}=6000, $V_{ила}=105$ мл/л

С. $G_p=0,2 > 0,0$ м/ч, $D=0,4$ сут⁻¹,

ХПК_{вх}=6000, $V_{ила}=105$ мл/л

При больших нагрузках по ХПК (>4000 мг/л.сут) структура потока в макромасштабе биореактора более равномерная; в режиме голодания находится существенно меньшая часть популяции и метаногенез лимитируется диффузией субстрата вглубь гранул, при этом наблюдается возрастание броидильной активности с увеличением скорости восходя-

шего потока вследствие уменьшения толщины пограничного слоя на границе жидкость-гранула и соответственно возрастания потока субстрата к поверхности гранулы. Скорость восходящего потока 1,0-1,3 м/ч является критической для данного типа реактора и перерабатываемого стока. При этой концентрации с течением времени наблюдается вымывание ила из реактора вследствие повышенного его уноса с восходящим потоком, возрастание содержания взвешенных веществ в выходящем потоке (рис. 9) и постепенное снижение производительности реактора.

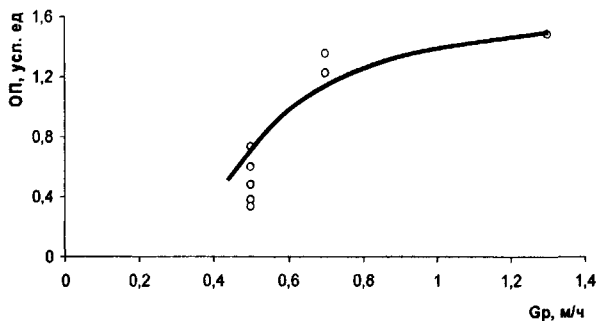


Рис. 9. Влияние скорости восходящего потока G_p в реакторе на содержание взвешенных веществ (по оптической плотности) в потоке на выходе из реактора.

$XPK_{вх} = 6000-10000$ мг/л.

Таким образом, при нагрузках по $XPK < 1800-2000$ мг/л.сут в биореакторе целесообразно периодически – 1 раз в 2-3 ч менять скорость рециркуляции жидкости в интервале 0,0-0,6 м/ч. При нагрузках по $XPK > 4000$ мг/л.сут скорость восходящего потока целесообразно поддерживать в интервале 0,4-0,7 м/ч. $G_p > 1-1,3$ м/ч является критической для UASB-реактора при переработке спиртовой барды.

Максимальные величины нагрузки и сбраживающей мощности, полученные в данной диссертационной работе, не могут быть повышены путем адаптации ила к стоку, поскольку обусловлены не биологическими причинами, а механическим разрушением слоя гранул ила. Дальнейшее повышение сбраживающей мощности реактора может быть обусловлено только существенными изменениями его принципа работы и конструкции.

Эксперименты показали, что в области устойчивой работы биореактора резкое увеличение XPK в стоке на входе и соответственно нагрузки приводит к пропорциональному росту скорости выделения биогаза с выходом на более высокий стабильный уровень за 1-3 сут (рис. 10). Этот рост обусловлен прежде всего активизацией накопленной в реакторе ацидогенной и метаногенной микрофлоры, а не новообразованной биомассой, поскольку за это время ее прирост составляет не более 25-30% от находящейся в биореакторе.

После перерыва в подаче барды в пределах 1-2 сут анаэробный ил восстанавливает свою бродильную активность спустя 6-7 ч. При перерывах в подаче барды в пределах 2-3

недель активность ила восстанавливается за 0,5-2 сут. Таким образом, процесс отличается достаточно быстрым восстановлением активности ила после длительных перерывов в подаче спиртовой барды в биореактор. Это свойство анаэробного ила весьма удобно с практической точки зрения, поскольку позволяет эксплуатировать анаэробный реактор в режимах малых нагрузок или вовсе его останавливать на длительное время.

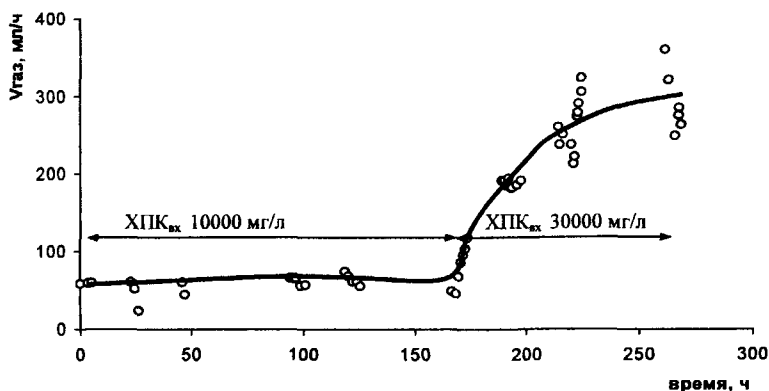


Рис. 10. Изменение скорости выделения биогаза $V_{газ}$ с течением времени при увеличении ХПК среды на входе в реактор.

$$G_p = 0,5 \text{ м/ч}, D = 0,26-0,48 \text{ сут}^{-1}, V_{ила} \approx 110-130 \text{ мл/л}.$$

При сбраживании несбраженной барды содержание метана в биогазе составило 49,4-52,2% масс — при нагрузках 7000-8000 мг/л.сут. и 37,3-42,6 % масс. — при нагрузке 16000 мг/л.сут. Содержание аммонийного азота возрастало с увеличением убыви ХПК после сбраживания, достигая 1000-1200 мг/л при сбраживании несбраженной барды, при этом в первую очередь сбраживались углеводные компоненты барды, а лишь затем — белковые и другие азотсодержащие соединения.

pH среды в реакторе в высокоинтенсивном режиме сбраживания изменялось в диапазоне 7,0-8,8 и практически не зависело от pH среды на входе в реактор, т.е. pH в процессе анаэробного сбраживания в достаточной степени авторегулируется ацидогенной и метаногенной популяцией биореактора, поэтому подщелачивания барды, закисленной в ходе хранения, в принципе, не требуется.

Эксперименты показали, что при переработке барды по схеме анаэробное сбраживание — аэробная доочистка с целью более глубокого снижения ХПК_{вых} перед аэробной очисткой можно использовать 2-х ступенчатый анаэробный процесс по последовательной схеме с двумя UASB-реакторами.

Исследования процесса сбраживания зерно-спиртовой барды в UASB-реакторе позволили определить основные данные, необходимые для расчета опытно-промышленной установки, с одностадийным анаэробным сбраживанием:

- сбраживаемый материал фильтрат нативной барды либо барда, разбавленная до 5 раз

для неразбавленного фильтрата барды:

- максимальная нагрузка по ХПК _{вх} , мг/л.сут	14000-16000
- минимальная нагрузка по ХПК _{вх} , мг/л.сут	500-1000
- рабочая нагрузка по ХПК _{вх} , мг/л.сут	8000-10000
- максимальная сбраживающая мощность реактора по убыли ХПК, мг/л.сут	9000-12000
- максимальная сбраживающая активность единицы объема ила по убыли ХПК, мг/л.сут	40000-50000
- максимальная сбраживающая активность единицы массы ила по убыли ХПК, мг/г.сут	1500-3000
- рабочая сбраживающая мощность реактора по убыли ХПК, мг/л.сут	7000-9000
- время пребывания барды в реакторе	3-5 сут.
- ХПК среды на входе в реактор, мг/л	1500-30000
- ХПК среды на выходе из реактора, мг/л	400-8000
- степень удаления загрязнений (по ХПК), %	75-85
- содержание N-NH ₄ ⁺ на выходе	50-1200
- содержание взвешенных веществ на выходе из реактора, г/л	0,2-2
- количество образующегося биогаза, м ³ /м ³ .ч	до 0,13
- содержание CH ₄ в биогазе, % масс.	37-52
- максимальная скорость восходящего потока, м/ч	1,0-1,3
- рабочая скорость восходящего потока, м/ч	0,4-0,7
- рабочая концентрация ила в реакторе, кг асв/м ³	4-6
- количество образуемого избыточного ила, кг асв/сут.м ³	0,3-0,4
- количество образуемого избыточного ила, кг асв/кг ХПК _{вх}	0,05-0,07
- удельная скорость роста ила, сут ⁻¹ (при ХПК _{вх} 10000 мг/л)	0,05-0,09
- температура сбраживания, °C	33-39
- pH среды в реакторе	7,0-8,8
- pH барды, подаваемой в реактор	4,5-7,5

- подщелачивание барды	не требуется
- режим рециркуляции жидкости в реакторе:	
- при нагрузках по ХПК выше 4000 мг/л.сут	непрерывный
- при нагрузках по ХПК ниже 2000 мг/л.сут	переменный со сменой скорости восходящего потока в интервале 0,0-0,6 м/ч 1 раз в 2-3 ч
- время восстановления бродильной активности:	
- после перерывов в подаче барды выше 2 недель, сут	0,5-2
- после перерывов в подаче барды в пределах 1-2 сут, сут	0,25-0,5
- температура среды и ила при перерывах в подаче барды и консервации ила, °С	+4 – +37

Приведенные показатели производительности и сбраживающей мощности могут быть, в принципе, существенно улучшены при более высоких уровнях накопления ила в реакторе, в 3-5 раз превышающих использованные в экспериментах с достижением эффективности очистки по ХПК 90-95%.

При запуске очистных сооружений с промышленным анаэробным биореактором объемом 2000 м³ (стандартный объем для очистки стоков потенциальных потребителей анаэробного гранулированного ила) и использовании в качестве посевного (затравочного) материала 20% ила от его количества в рабочем режиме работы в реактор необходимо загрузить около 2000 кг ила (по асв). Такое количество ила может быть получено при переработке около 2000 м³ фильтрата зерно-спиртовой барды. При переработке 250 м³/сут барды – количества, которое образуется на ФГУП "Биотехнологический завод", необходимая масса ила может быть накоплена за 20-30 сут.

ВЫВОДЫ:

1. В условиях промышленного производства этилового спирта из зерна подобраны режимы ферментативной обработки при приготовлении сусла, позволяющие улучшить технологические свойства готового сусла, содержание спирта в готовой бражке на 0,15 % об. и выход спирта на 1,2–1,3 дал из 1 т усл. крахмала.

2. Показана перспективность использования H₂O₂ для снижения уровня инфицированности условно-чистой дрожжевой культуры (засевного материала) без падения бродильной активности дрожжей-продуцентов. Для дрожжей, адаптированных к пероксиду водорода,

оптимальные дозы внесения H_2O_2 при выращивании посевного материала составляют 0,1-1 г/л (по 100% H_2O_2) при концентрации клеток дрожжей не менее 0,2-0,5 г асд/л, при этом H_2O_2 необходимо вносить на стадии активного роста дрожжей.

3. Показано, что в условиях постоянного селективного давления на популяцию дрожжей-сахаромицетов, вызываемого пероксидом водорода, возможен отбор популяций, устойчивых к относительно большим дозам вносимого H_2O_2 и сохраняющих высокую активность в отношении сбраживания углеводов в этанол.

4. При анаэробном сбраживании зерно-спиртовой барды как основного отхода спиртового производства показана возможность достижения производительности UASB-реактора (по удаляемой ХПК) 9000-12000 мг/л.сут, а удельной активности анаэробного ила (по убыли ХПК) 40000-50000 мг/л ила в сут. при степени удаления органических загрязнений 75-85%, при этом впервые показана целесообразность использования режима с циклическим изменением скорости восходящего потока жидкости при нагрузках на реактор до 1500-2000 мг/м³.ч. Полученные величины производительности близки к максимальным для зарубежных аналогов, и в 3-5 раз (по объему реактора) превышают производительность метантенков классического типа.

5. Сбраживание в UASB-реакторе перспективно для переработки зерно-спиртовой барды с одновременным получением анаэробного гранулированного ила и последующем его использованием в качестве инокулята для загрузки анаэробных промышленных биореакторов нового поколения при очистке сточных вод пищевой, пивоваренной и родственных отраслей промышленности. Для более широкого использования обезвреживания барды передовыми анаэробными методами целесообразна разработка высокоинтенсивных методов удаления аммонийного азота после ее сбраживания

6. Получены исходные данные для расчета опытно-промышленной установки по сбраживанию зерно-спиртовой барды в UASB-реакторе и получения гранулированного ила, планируемой к созданию на ФГУП "Биотехнологический завод".

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сорокодумов С.Н., Бельчаков И.В. Экологические проблемы производства этилового спирта. // Экология и промышленность России, № 8, 2000, с. 23-25.

2. Кухаренко А.А., Сорокодумов С.Н., Бельчаков И.В. Безотходная технология пищевого этилового спирта из зернового сырья. // В сб.: Тезисы докладов V Международного конгресса "Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес и экологическое образование", Самара – Астрахань – Самара, 2000, с. 58,59.

3. Кухаренко А.А., Сорокодумов С.Н., Бельчаков И.В. Получение биологически-активных веществ на отходах спиртового производства. // В сб. Передовые технологии на пороге XXI века: Материалы научно-практической конференции, г. Кишинев, 2000 г., с. 143,144

4. Кухаренко А.А., Сорокодумов С.Н. Способ переработки отхода спиртового производства в кормовой продукт. // В сб. Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликеро-водочной промышленности: Тезисы докладов научно-практической конференции, г. Казань, 2000г., с. 42,43.

5. Кухаренко А.А., Сорокодумов С.Н., Сорокодумова С.В. Подготовка сырья ультразвуком при производстве этилового спирта. // В сб. Научно-технический прогресс в спиртовой и ликероводочной отрасли промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 2001, с. 114-118.

6. Кухаренко А.А., Сорокодумов Н.В., Сорокодумов С.Н. Решение безотходной технологии спирта на основе логистики. // В сб. Научно-технический прогресс в спиртовой и ликероводочной отрасли промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 2001, с. 132-139.

7. Винаров А.Ю., Сорокодумов С.Н. Получение органических удобрений из барды спиртового производства. // В сб.: Тезисы докладов VI Международного конгресса "Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес и экологическое образование", Самара – Астрахань – Самара, 2001, с. 78,79.

8. Сорокодумов С.Н., Сорокодумова С.В. Опыт применения аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа "Кристалл 2000М" при анализе этилового спирта. // В сб. Тезисы докладов Международной конференции "Определение содержания токсичных металлов и микропримесей в пищевых продуктах", М.: Пищепромиздат, 2001, с. 80-84.

9. Сорокодумов С.Н., Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Кузнецов А.Е. Биотехнология этилового спирта из зернового сырья. // Учебное пособие. – М.: Новые технологии, 2004. – 76с.

10. Сорокодумов С.Н., Кухаренко А.А., Винаров А.Ю. Повышение эффективности производства пищевого этанола за счет комплексного использования сырья и отходов. // Пищевая промышленность, № 4, 2005, с. 60, 61.

11. Винаров А.Ю., Соколов Д.П., Смирнов В.Н., Сорокодумов С.Н. Промышленная биотехнология и оборудование для переработки спиртовой барды в кормовой белок. // В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 3-го Международного конгресса (Москва, 14-18 марта 2005 г.). – М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2005, ч. 1, с. 323.

12. Кузнецов А.Е., Сорокодумов С.Н., Каленов С.В., Винаров А.Ю. Использование перекиси водорода для совершенствования процессов культивирования микроорганизмов. // В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 3-го Международного конгресса (Москва, 14-18 марта 2005 г.) – М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2005, ч. 1, с. 335.

13. Кузнецов А.Е., Энгельхарт М., Сорокодумов С.Н., Чеботаева М.В., Вакар Л.Л., Винтер Дж. Переработка барды спиртового производства в UASB-ректоре. // В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 3-го Международного конгресса (Москва, 14-18 марта 2005 г.). – М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2005, ч. 2, с. 45.

14. Решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2004133957 "Способ получения биомассы дрожжей./Кузнецов А.Е., Сорокодумов С.Н., Винаров А.Ю. и др. Приоритет от 23.11.2004 г.



РНБ Русский фонд

2006-4

16865

№ 18438