

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ТАМБОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



Темнов Михаил Сергеевич

**КИНЕТИКА И АППАРАТУРНО-
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОФОРМЛЕНИЕ
ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ
ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

Специальности 05.17.08 – Процессы и аппараты химических технологий,
03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук,
профессор Дворецкий Д.С.

Москва - 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Современное состояние процессов и аппаратов производства эфиров жирных кислот	11
1.1 Актуальность создания производства эфиров жирных кислот из микроводорослей.....	11
1.2 Проблемы подготовки сырья и аппаратурно-технологического оформления стадий его предварительной переработки.....	14
1.2.1 Аппаратурно-технологическое оформление стадии культивирования...	14
1.2.2 Перспективные методы концентрирования клеток из суспензии.....	23
1.2.3 Перспективные методы разрушения клеток микроводорослей.....	26
1.3 Перспективные методы интенсификации процессов экстракции и этерификации липидов при получении ЭЖК.....	34
1.4 Постановка задач диссертационной работы.....	44
Глава 2. Теоретические и прикладные исследования свойств и режимов технологического процесса подготовки и предварительной переработки сырья	49
2.1 Исследование периодического процесса культивирования микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i> с повышенным содержанием липидов.....	49
2.1.1 Экспериментальное исследование кинетики, свойств и режимов процесса культивирования микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i> с повышенным содержанием липидов.....	49
2.1.2 Математическое моделирование кинетики процесса культивирования микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i> с повышенным содержанием липидов.....	55
2.2 Исследование свойств и режимов процесса концентрирования клеток биомассы микроводорослей из суспензии.....	66
2.3 Исследование процесса разрушения клеток микроводоросли <i>Chlorella</i>	73

<i>vulgaris</i>	
Глава 3. Теоретические и прикладные исследования свойств и режимов технологического процесса экстракции и этерификации липидов	91
3.1 Процесс экстракции внутриклеточных липидов из микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	91
3.2 Математическое моделирование процесса экстракции липидов.....	101
3.3 Процесс этерификации липидов для производства эфиров жирных кислот.....	151
Глава 4. Аппаратурно-технологическое оформление производства эфиров жирных кислот из микроводорослей <i>Chlorella vulgaris</i>	156
4.1 Аппаратурно-технологическое оформление технологического процесса подготовки и предварительной обработки сырья.....	156
4.2 Аппаратурно-технологическое оформление технологического процесса экстракции внутриклеточных липидов.....	166
4.3 Практические рекомендации по проектированию производства эфиров жирных кислот из микроводорослей.....	174
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	179
Список сокращений и условных обозначений	181
Список литературы	182
ПРИЛОЖЕНИЯ	
Приложение А. Результаты обзора исследований по подбору условий экстракции внутриклеточных липидов из микроводорослей.....	202
Приложение Б. Определение вида и соотношения растворителей с помощью методики Ч. Хансена.....	205
Приложение В. Расчет материального баланса производства эфиров жирных кислот из микроводорослей	210
Приложение Г. Расчет теплового баланса экстрактора	216
Приложение Д. Акты о внедрении результатов работы.....	219

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

В соответствии со «Стратегией развития химического и нефтехимического комплекса на период до 2030 года»^{*} и «Комплексной программой развития биотехнологий в Российской Федерации до 2020 года»^{*} одной из ключевых проблем химической и биотехнологической промышленности РФ являются высокие цены на сырьё и отсутствие его необходимого ассортимента. Для решения этой проблемы предлагается создание новых экономически эффективных, экологически безопасных, энерго-и ресурсосберегающих химических производств, основанных на использовании новых видов сырья, в частности микроводорослей. Этот вид сырья имеет целый ряд преимуществ перед другими видами растительного сырья: высокий выход с единицы площади, возможность получения больших объемов круглый год.

Другой актуальной проблемой развития экономики страны является создание технологий производства возобновляемых источников энергии. В качестве альтернативы жидкому органическому топливу могут рассматриваться эфиры жирных кислот (ЭЖК), получаемые из растительного сырья. Перспективным сырьем для производства ЭЖК являются микроводоросли с повышенным содержанием липидов. Создание таких производств тормозится сложностью и недостаточной изученностью механизмов и кинетики процессов концентрирования суспензии микроводорослей вследствие малого размера клеток, экстракции и этерификации липидов микроводорослей, низким выходом липидов при

^{*} Стратегия развития химического и нефтехимического комплекса на период до 2030 г. (утв. приказом Минпромэнерго России №172 от 8.04.2014 г.); Комплексная программа развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года (утв. приказом Правительством РФ от 24.04.2012 г. №1853п-П8)

^{*} Стратегия развития химического и нефтехимического комплекса на период до 2030 г. (утв. приказом Минпромэнерго России №172 от 8.04.2014 г.); Комплексная программа развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года (утв. приказом Правительством РФ от 24.04.2012 г. №1853п-П8)

традиционном проведении стадии экстракции из-за наличия прочной клеточной стенки (4..5 % массовых).

Вследствие этого изучение свойств и режимов технологического процесса получения ЭЖК из микроводорослей, исследование механизмов и кинетики дезинтеграции клеточных стенок, экстракции и этерификации липидов, а также интенсификация и совершенствование аппаратного оформления стадий производства ЭЖК из микроводорослей на основе использования современных машин и аппаратов являются актуальными задачами в научном и техническом плане.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания (проект № 1983) «Разработка технологии комплексной переработки биоразлагаемых отходов» и программы «У.М.Н.И.К» (договор № 6406 ГУ/2015) «Разработка технологии получения биомассы *Chlorella vulgaris* для комплексной переработки».

Целью работы является исследование механизмов и кинетики процессов культивирования микроводорослей, дезинтеграции клеточных стенок, экстракции липидов, совершенствование аппаратного оформления производства ЭЖК из микроводорослей.

В рамках поставленной цели решались следующие **задачи**:

- анализ проблемы совершенствования и создания эффективных технологических схем производства ЭЖК из микроводорослей на основе использования современных машин и аппаратов, методов системного анализа, математического и физического моделирования;

- теоретические и экспериментальные исследования свойств и режимов технологического процесса подготовки и обработки сырья, механизмов и кинетики процессов культивирования и разрушения клеток микроводорослей;

- теоретические и экспериментальные исследования свойств и режимов, механизмов и кинетики процессов экстракции и этерификации липидов;

- экспериментальное исследование закономерностей воздействия СВЧ-излучения, ферментов, антибиотиков, вихревого слоя ферромагнитных частиц, осмотического шока и технологических условий осуществления процесса дезинтеграции клеток микроводорослей на интенсификацию процесса экстракции липидов;

- математическое моделирование кинетики процессов культивирования клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР №111 и экстракции внутриклеточных липидов;

- разработка рекомендаций по аппаратурно-технологическому оформлению процессов культивирования микроводорослей, разрушения клеточных стенок и экстракции внутриклеточных липидов.

Объектом исследования являются процессы и аппараты получения ЭЖК из микроводорослей.

Предметом исследования являются механизмы и кинетика процессов получения ЭЖК из биомассы микроводорослей, условия их эффективного осуществления, методы физического и математического моделирования процессов и аппаратов получения ЭЖК из микроводорослей.

Научная новизна. На основе методов системного анализа, математического и физического моделирования выполнены теоретические и прикладные исследования свойств и режимов функционирования химико-технологического процесса получения эфиров жирных кислот, оснащенного современными машинами и аппаратами.

Разработаны оригинальные математические модели процессов культивирования микроводорослей и экстракции внутриклеточных липидов, отличающиеся: учетом энергетических факторов (уровня освещенности и температуры при культивировании), этапностью (выделено три этапа) процесса экстракции, на каждом из которых определены лимитирующие

процессы массопереноса липидов через поры и отверстия целых или погибших клеток микроводорослей. Для различных видов клеток микроводорослей определены кинетические коэффициенты процесса экстракции внутриклеточных липидов из микроводорослей. Модели позволяют рассчитывать изменение массы микроводорослей, содержание внутриклеточных липидов и концентрацию липидов в жидкой фазе (неполярном экстрагенте).

Экспериментально определены условия эффективного осуществления:

- а) процесса культивирования микроводорослей: начальная концентрация штамма, питательная среда, температура, уровень освещенности, время культивирования до стресса и время стрессовых условий;
- б) комбинированного способа дезинтеграции клеток: количество и соотношение ферментов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин г3х», мощность и время воздействия СВЧ-излучения, обеспечивающие максимальное количество разрушенных и погибших клеток в пасте микроводорослей;
- в) процессов экстракции и этерификации: температура, содержание щелочного катализатора, соотношения количеств полярного и неполярного экстрагентов, биомассы и смеси экстрагентов, этанола и липидов, обеспечивающие максимальный выход липидов и ЭЖК.

Практическая значимость. Изучены свойства и режимы технологического процесса получения ЭЖК из микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 с высоким уровнем энерго- и ресурсосбережения.

На основе экспериментального исследования влияния химического состава питательной среды, температуры, интенсивности света, вида источника азота, способа создания стрессовых условий на кинетику процесса роста биомассы микроводорослей и внутриклеточных липидов разработаны новый способ подготовки микроводорослей с повышенным содержанием липидов (Пат. РФ № 2569149) и оригинальные конструкции аппаратов (фотобиореактора и дезинтегратора) для осуществления биотехнологического и физико-химического процессов подготовки сырья:

1) культивирования микроводорослей (патент РФ № 151576); 2) разрушения клеток микроводорослей (патент РФ № 169598).

На базе методов физического и математического моделирования изучено влияние типов экстрагентов, температуры, соотношения количества микроводорослей и экстрагентов на кинетику процесса экстракции липидов из микроводорослей, выполнен технологический расчет экстрактора и определены рациональные режимы его функционирования, обеспечивающие выход внутриклеточных липидов на уровне 23 %.

Разработаны технологическая схема производства ЭЖК из микроводорослей и практические рекомендации по совершенствованию аппаратного оформления биотехнологических и физико-химических процессов подготовки сырья, экстракции и этерификации внутриклеточных липидов.

Математические модели процессов подготовки сырья (микроводорослей) и кинетики экстракции внутриклеточных липидов, практические рекомендации по совершенствованию аппаратного оформления процессов получения жирных кислот, технологическая схема производства ЭЖК из микроводорослей приняты к использованию в ФГБНУ «ВНИИТиН» г. Тамбов, ОАО «Биохим» г. Рассказово, и ОАО «Орбита» г. Тамбов. Математические модели процессов подготовки сырья (микроводорослей) и экстракции внутриклеточных липидов, технология получения липидов и аппаратное оформление процессов получения эфиров жирных кислот используются в учебном процессе Тамбовского государственного технического университета при подготовке дипломированных специалистов, бакалавров и магистров по специальности «Проектирование технологических машин и комплексов» и направлениям «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в нефтехимии, химической технологии и биотехнологии», «Биотехнология».

Научные положения, выносимые на защиту:

- результаты теоретических и экспериментальных исследований особенностей накопления и извлечения липидов из микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 и режимов функционирования химико-технологического процесса получения эфиров жирных кислот;

- кинетика и математические модели процессов культивирования микроводорослей с повышенным содержанием липидов и экстракции внутриклеточных липидов;

- технологическая схема производства ЭЖК из микроводорослей и практические рекомендации по совершенствованию аппаратурного оформления биотехнологического и физико-химического процессов подготовки сырья, экстракции и этерификации внутриклеточных липидов.

Степень достоверности. Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертации подтверждаются: 1) корректным использованием методологии научного исследования, объективных законов природы, методов физического и математического моделирования; 2) согласованностью теоретических результатов и экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов измерения и сертифицированных приборов, с известными литературными данными.

Апробация результатов. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на международных и российских научных конференциях: 13th International Conference on Chemical and Process Engineering (Milan, 2017); 12th International Conference on Chemical & Process Engineering (Milan, 2015); 5th International Conference on Industrial Biotechnology (Bologna, 2016); American-Russian Chemical Engineering scientific School «Modeling and optimization of chemical engineering processes and systems» (Казань, 2016); Международной научной конференции "Математические методы в технике и технологиях" (Тамбов, 2014; Ярославль, 2015; Рязань, 2015), XI Международном Конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии "МКХТ-2015" (Москва, 2015); VI Международной научной конференции Российского химического общества

имени Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов» посвященная 180-летию со дня рождения Д.И. Менделеева, (Москва, 2014) и др.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует пунктам паспорта специальности 05.17.08 -Процессы и аппараты химических технологий: 1)»...физико-химические воздействия на перерабатываемые материалы...»; 2) «решение проблем совершенствования и создания эффективных технологических схем и производств на основе использования современных машин и аппаратов»; 3) «...исследования массообменных процессов и аппаратов»; 4) «...создания ресурсо- и энергосберегающих процессов и аппаратов...»; паспорта специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»: 1) «..Исследование и разработка требований к сырью (включая вопросы его предварительной обработки..», 2) «...Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов... для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма..», 3) «..Изучение и разработка процессов и аппаратов микробиологического синтеза, включая... массо- и теплообмены в аппаратах... экстракции..».

Публикации результатов работы. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 2 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций, 4 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, 2 монографии, 2 патента на полезную модель, 1 патент на изобретение, 2 свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка используемых источников (183 работы отечественных и зарубежных авторов) и 5 приложений. Содержание диссертации изложено на 201 странице машинописного текста, включает 73 рисунка и 38 таблиц.

Глава 1. Современное состояние процессов и аппаратов производства эфиров жирных кислот из растительного сырья

1.1 Актуальность создания производства эфиров жирных кислот из микроводорослей

С целью уменьшения газообразных выбросов в атмосферу, способствующих изменению климата в результате парникового эффекта и глобальному потеплению необходимо развитие производств CO₂-нейтрального жидкого биотоплива. Из-за этих факторов и в связи с постепенным истощением ископаемых источников энергии уже к 2030 году [1] можно прогнозировать присутствие значительного объема топлива, произведенного из возобновляемых источников, на мировом энергетическом рынке. Биоэнергетика является активно развивающимся сектором экономики, который основан на источниках энергии органического происхождения, используемых для производства тепла, электричества и топлив [2].

Получение энергоносителей из микроводорослей, по сравнению с зерновыми культурами, окажет менее негативное воздействие на окружающую среду и продовольственную безопасность.

Можно отметить следующие преимущества микроводорослей [3-9]:

- высокая конверсионная эффективность фотонов (приблизительно 3...8 % против 0.5 % для наземных растений), которая дает возможность получать более высокие урожаи биомассы на гектар, и высокий рост клеток микроводорослей;

- высокая емкость поглощения углекислого газа из атмосферы по сравнению с наземными растениями;

- микроводоросли не требовательны к качеству воды для роста, поэтому для их культивирования можно использовать сточные, загрязненные, соленые и другие воды;

- микроводоросли используют в процессе жизнедеятельности азот и фосфор из сточных вод различных источников (например,

сельскохозяйственные, промышленные и муниципальные сточные воды [9]), обеспечивая снижение негативного влияния на окружающую среду;

– для выращивания микроводорослей можно использовать пахотно непригодные, пустынные и засоленные земли, не подходящие для сельскохозяйственного производства пищевой продукции;

– производство микроводорослей можно организовать таким образом, чтобы оно функционировало круглогодично;

– микроводоросли можно культивировать без использования удобрений и пестицидов;

– микроводоросли могут являться сырьём для широкого спектра продуктов (например, белки, полисахариды, пигменты, биополимеры, корма, удобрения и др.).

Интерес ученых и предпринимателей к переработке биомассы микроводорослей в энергоносители достаточно велик, количество проводимых исследований в данной области активно увеличивается в XXI веке.

Департамент энергетики США реализует программу «*Aquatic Species*», направленную на исследование условий культивирования водорослей с высоким содержанием липидов. Было установлено, что промышленное производство микроводорослей в открытых прудах возможно в Калифорнии, на Гавайях и в Нью-Мексико из-за высокой среднесуточной температуры воздуха + 16 °С (январь) и + 24 °С (июль) [10].

Компания *Honeywell UOP* исследует возможность производства возобновляемых источников топлива для реактивных двигателей. Программа по производству возобновляемого топлива разрабатывается в рамках гранта *U.S. Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA)*. Технология *Honeywell UOP* позволит произвести реактивное биотопливо из различных видов сырья: морские водоросли, рыжик [11].

Green Star Products, Inc. (GSPI) изучает возможность создания экономически конкурентоспособной, экологически чистой технологии по

производству биотоплива из микроводорослей. Топливо, получаемое по разработанной в *Green Star Products, Inc.* технологии, может использоваться без изменения существующего оборудования, с меньшим выбросом углекислого газа. [12].

В 1990 году в *Research Institute of Innovative Technology for the Earth* была создана группа для развития технологии извлечения углекислого газа из атмосферы с помощью фотосинтеза. В результате была изучена возможность развития промышленного производства микроводорослей [13].

Вместе с тем, по данным исследований [14-21], производство энергии из микроводорослей сопряжено с рядом сложностей, обусловленных:

1) высокой энергоемкостью процесса обезвоживания клеток биомассы из суспензии с сохранением их жизнеспособности;

2) наличием прочной стенки у клетки микроводоросли, которая ограничивает извлечение целевых внутриклеточных продуктов и отсутствием дешевого способа разрушения клеточных стенок;

3) высокой себестоимостью экстракции липидов из биомассы.

Проведенный анализ позволяет сделать вывод об актуальности исследований, направленных на теоретические и прикладные исследования свойств и режимов функционирования химико-технологического процесса получения эфиров жирных кислот (ЭЖК) из микроводорослей.

1.2 Обзор аппаратурно-технологического оформления стадий подготовки сырья

1.2.1 Аппаратурно-технологическое оформление стадии культивирования

Одним из перспективных видов микроводорослей, который рассматривается в качестве сырья для производства эфиров жирных кислот (ЭЖК) является *Chlorella vulgaris* [26-28, 30, 31]. Для исследования был выбран штамм *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111, который обладает способностью свободного парения и равномерного распределения в культуральной среде, не осаждаётся в процессе роста, развивается в монокультуру и обладает невосприимчивостью к фагам [125, 138].

Для культивирования микроводорослей используют различные питательные среды, которые содержат макро и микроэлементы, обеспечивающие нормальную жизнедеятельность клеток. Анализ литературных источников [22-28, 126, 127] показал, что выбор вида и количества химических веществ питательной среды, необходимых для культивирования штамма микроводорослей зависит от особенностей жизнедеятельности микроорганизма и может отличаться даже внутри одного вида.

Необходимо отметить, что изменяя состав питательной среды, можно получать продукт желаемого состава с различным соотношением белков и жиров. Так, на среде богатой азотом, *Chlorella vulgaris* может накапливать от 40 до 88 % белка и 5 % жира, а при недостатке азота и избытке углерода в питательной среде, наоборот, – 88 % жира и 5 % белка.

Изучением влияния состава питательной среды на биохимические свойства клеток *Chlorella vulgaris* занимались П. Хелд [28, 29], Н. Б. Аужанова [30] и др. Было установлено, что особенно сильно на химический состав клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* оказывает влияние дефицит азотсодержащих веществ, стимулирующий накопление внутриклеточных

нейтральных липидов - триацилглицеридов (ТАГ) как запасных питательных веществ.

По данным работ [28, 30, 33] количество липидов в клетках микроводорослей при культивировании их в стрессовых условиях (дефицит азотсодержащих сред) увеличивается в 1.7 ... 15.0 раз. Glacio S. Araujo и др. [31] изучали влияние стрессовых условий на процесс культивирования *Chlorella vulgaris* при добавлении в питательную среду *F/2 NaCl*. В результате было определено, что содержание NaCl в культуральной среде имеет большое влияние на количество производимой биомассы и на количество липидов, добываемых из микроводорослей. Установлено, что увеличение содержания NaCl в культуральной среде позволяет значительно (на 35.6 %) увеличить концентрацию липидов в сухой биомассе. Российские ученые Г. Л. Клячко-Гурвич и В. Е. Семененко [32] изучали влияние питательной среды Тамия без азота на рост *Chlorella pyrenoidosa*. Было выяснено, что клетки, лишённые азотсодержащих веществ, увеличивали сухой вес за счет синтеза липидов, при этом около 75 % липидов составляли жирные кислоты. При стрессовом культивировании увеличение содержания липидов происходило за счет увеличения в 11 раз концентрации олеиновой кислоты.

Семененко В. Е. и др. в работах [34, 35] изучали возможность выращивания *Chlorella pyrenoidosa* в условиях освещения импульсным светом. При этом, оказалось, что культура *Chlorella pyrenoidosa* способна расти в условиях освещения импульсным светом при длительности вспышки около 25 мкс (темновой интервал 0.1 с). Установлено, что культуре требуется время на адаптацию, при этом адаптация необходима процессам роста и развития. При этом интенсивность фотосинтеза оставалась одинаковой. В работе [36] изучалась зависимость скорости роста клеток *Chlorella vulgaris* от длины волны используемого освещения. Было установлено, что *Chlorella vulgaris* имеет наибольший темп роста при освещении желтым светом (с низкой энергией). Использование синего,

белого и красного света приводило к более низкой производительности биомассы. Этот факт противоречит результатам работ [37, 38], в которых утверждалось, что использование для освещения синего света позволяет получить более высокие темпы роста и производительности биомассы при более продолжительном периоде роста (10-14 дней) по сравнению с белыми, красными и зелеными световыми волнами. Из работы [39] следует, что максимальное количество биомассы *Chlorella vulgaris* 2.05 ± 0.1 г/л при освещенности в 62.5 мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$) и периоде освещения 16 ч в сутки. Состав жирных кислот существенно изменился при различных световых режимах; максимальный процент насыщенных жирных кислот от общего числа – 33.4 % был зафиксирован при 100 мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$) и периоде освещения 16 ч в сутки, в то время как количество мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот уменьшалось с увеличением освещенности и продолжительности фазы света. Максимальный процент мононенасыщенных жирных кислот от общего количества жирных кислот - 15.93 % и полиненасыщенных жирных кислот - 27.40 % был зафиксирован при освещенности 37.5 мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$) и периоде освещения 8 ч в сутки. В работе [40] было изучено влияние освещенности на содержание жирных кислот в биомассе *Chlorella vulgaris*. Установлено, что общее содержание насыщенных жирных кислот увеличивается, в то время как мононенасыщенных и полиненасыщенных уменьшается с увеличением освещенности и длительности световой фазы периода освещения.

В работе [41] изучались эффекты интенсивности света и величины pH на рост *Chlorella vulgaris* FACHB-1227. Интенсивность света устанавливалась на отметках: 3960, 7920, 11920 лк при величинах pH = 7, 8, 9, 10 для каждого уровня освещенности соответственно. Из анализа результатов следует, что с точки зрения интенсивности света (без контроля уровня pH) плотность клеток при 3960 лк оказалось самой высокой. С учетом величины pH

плотность клеток при 7920 лк была выше по сравнению с другими уровнями освещенности.

Из анализа работ [42 – 44] следует, что низкая интенсивность света вызывает образование полярных липидов, в то время как высокая интенсивность света уменьшает общее содержание полярных липидов с сопутствующим увеличением количества нейтральных липидов, главным образом триацилглицеринов.

Оптимальная температура выращивания биомассы зависит от типа культивируемого штамма *Chlorella vulgaris*. Изменение состава жирных кислот наблюдается при изменении температуры культивирования: с уменьшением температуры увеличивается число ненасыщенных жирных кислот в составе липидов [45]. В работе [46] было установлено, что содержание липидов в микроводорослях зависит от температуры: с увеличением температуры от 25 °С до 30 °С происходит снижение содержания липидов в биомассе *Chlorella vulgaris* с 14.71 % до 5.90 %. При этом максимальная удельная скорость клеток *Chlorella vulgaris* 0.15 сутки⁻¹ наблюдалась в диапазоне температур 25–30 °С, и при температуре 35 °С составила 85 % от максимальной. При температуре 38 °С наблюдалась гибель клеток. В работе [47] было определено, что при температуре 30 °С прирост клеток *Chlorella vulgaris* был максимальным, и составил 35 млн кл/мл на 35 сутки культивирования. В работе [48] было установлено, что максимальная скорость роста *Chlorella vulgaris* достигается при температуре 30 °С при повышенном содержании CO₂ (≈6 %) в газовой смеси. В работе [49] изучалась кинетика роста *Chlorella vulgaris*. Максимальная скорость роста 0.50 сутки⁻¹ была достигнута при pH 6.31–6.84 и температуре 32.4 °С.

По результатам обзора условий культивирования микроводорослей можно сделать вывод, что наибольшее влияние на накопление и химический состав клеток имеют: 1) уровень освещенности; 2) химический состав питательной среды; 3) температура культивирования. При этом для каждого штамма существуют свои индивидуальные условия культивирования, при

определении которых важно учитывать климатические условия существования штамма в природе [174].

Математическое моделирование процесса периодического культивирования биомассы микроводорослей должно описывать процессы накопления клеток микроводорослей (уравнение Ферхюльста), убыли субстрата, накопления целевого продукта [66, 158, 159].

Стадия культивирования микроводорослей осуществляется в реакторах для культивирования открытого и закрытого типа. Открытые реакторы – бассейны и пруды, имеющие небольшую глубину и хорошо освещаемые солнцем, в которые должна быть обеспечена возможность подачи воды, питательных веществ. Реакторы открытого типа перспективны для промышленного производства микроводорослей в регионах с теплым климатом. Открытые реакторы имеют простую конструкцию, дают возможность использовать естественные ресурсы энергии (энергию Солнца). Основным недостатком таких систем культивирования являются сезонные колебания продуктивности биомассы из-за изменения условий культивирования (перепад температуры, уровня освещенности), сложность контроля условий культивирования из-за взаимодействия системы с окружающей средой, возможное загрязнение установки контаминантами-загрязнителями.

Реакторы закрытого типа, как правило, трубчатые и емкостные, обычно используют для получения микроводорослей заданного химического состава [71, 73]. На рис. 1.1 представлена установка с емкостным реактором [70].

Установка состоит из емкости 1, оснащённой источниками дневного света 12 и системой подачи газа. Емкость 1 выполнена из светопрозрачного материала, герметично закрыта крышкой и разделена на две секции вертикальной светоотражающей перегородкой 3, которая не касается дна и крышки емкости.

Герметичность установки преследует две цели: снижение потерь газов в атмосферу и исключение применения пеногасителей при интенсивном

барботировании газа в реакционном пространстве. Перегородка предназначена для периодического переключения световых и темновых периодов освещения суспензии микроводорослей при непрерывном культивировании. Крышка ёмкости оборудована газовым клапаном 5 для сброса излишков газо-воздушной смеси и штуцером 6 для подачи газа по газопроводу 7 из баллона 8.

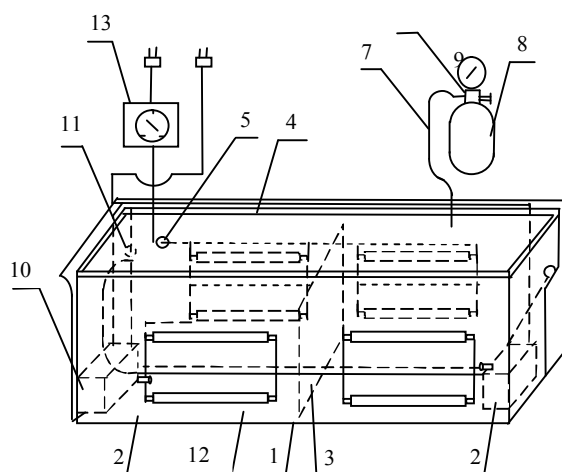


Рисунок 1.1 - Установка культивирования микроводорослей

Для подвода газо-воздушной смеси в торцах емкости установлены водяные насосы 10 с подсосом газов из пространства под крышкой. Помимо постоянного внесения смеси газов в культуральную жидкость, работа насосов обеспечивает барботажное перемешивание суспензии и солей питательной среды. Источники дневного света 12 размещены снаружи емкости, с противоположных сторон каждой секции. Их включение и выключение осуществляется посредством таймера. Для поддержания оптимальных условий культивирования емкость оснащена водонагревателем с терморегулятором. Достоинствами данной установки является её упрощённая конструкция и низкое потребление энергии на единицу продукции. Недостатки можно отметить следующие: недостаточный уровень освещённости в толще жидкости, особенно при повышении концентрации клеток в суспензии; большие габаритные размеры данной установки при промышленном культивировании микроводорослей.

В работе [72] предложена оригинальная конструкция емкостного реактора (рис. 1.2). Рабочая емкость реактора ограничена двумя боковыми поверхностями, выполненными из эластичного прозрачного материала. Длину емкости выбирают, исходя из обеспечения заданной производительности. Рабочая емкость 1,2 помещена в каркас 5, снабжённый устройствами 3, которые могут размещаться в различных конфигурациях. На концевых участках рабочая емкость снабжена натягивающими элементами 4. При заполнении рабочей емкости культуральной жидкостью боковые поверхности реактора натягиваются. Удержание емкости происходит за счёт опорных устройств 3. Долив и слив культуральной жидкости, подвод газа и др. осуществляется посредством коммуникаций, которые подключаются к концевым участкам емкости 4. Для распределения газо-воздушной смеси рабочая емкость может быть снабжена перфорированным шлангом по всей длине. К достоинствам данной конструкции следует отнести: возможность придания реакционному пространству различных конфигураций, в том числе достаточно компактных; тонкий слой реакционного пространства подвергается хорошей инсоляции. Однако, в промышленном масштабе производство данную конструкцию сложно эксплуатировать, поскольку могут возникнуть проблемы с отводом газа и очисткой боковых поверхностей.

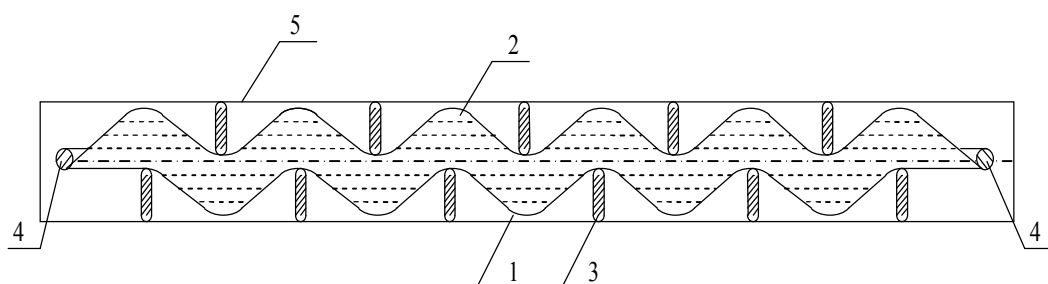


Рисунок 1.2 - Гибкий реактор

На рис. 1. Представлен трубчатый реактор ООО "Фитосила-Биос" [74]. Конструктивно он представляет собой плоскую панель 1, состоящую из параллельных каналов, выполненных из светопрозрачного химически и

биологически инертного материала. Каналы снизу и сверху объединяются в общие емкости 2 и 3, снабжённые портами 4 для приборов КИПиА и штуцерами 5. Подвод газо-воздушной смеси производится через каналы 7, установленные внизу каждого чётного канала светоприёмной плоскости с одной стороны и нечётного канала с другой стороны, что обеспечивает эрлифт как вверх, так и вниз. В верхнем канале установлено устройство механического пеногашения 6. Постоянный магнит сечением, равным сечению канала, располагается внутри реактора. Он приводится в движение внешним магнитным полем и служит для очистки светоприёмных поверхностей от биопленки.

Достоинствами данной конструкции являются улучшенные газообменные характеристики и компактная структура. К недостаткам данной конструкции можно отнести сложность эксплуатации при реализации культивирования в промышленном масштабе из-за недостаточного уровня освещённости в толще жидкости при большом количестве параллельных каналов.

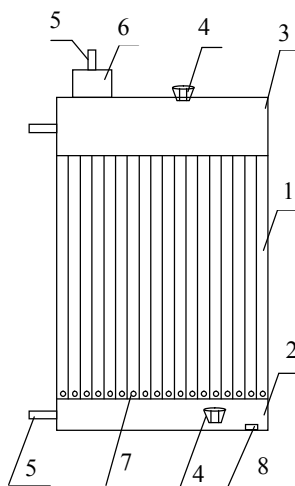


Рисунок 1.3 - Трубчатый реактор

Наиболее известны трубчатые реакторы - разработки компании *Valcent Products Inc.* США (технология *Vertigo*). Технология *Vertigo* аналогична предыдущей конструкции, но предназначена для размещения на открытых площадках. Она состоит из вертикальных реакторов, сделанных из тонких

плёночных материалов, позволяющих проникать солнечному свету внутрь к клеткам микроводорослей [75]. Реакторы корпорации *GreenFuel Technologies* и компании *Arizona Public Service* представляют собой ряд вертикально или под углом расположенных прозрачных труб диаметром 10-20 см для выращивания водорослей. Высота реактора ≈ 2.5 м и выше. Реакторы ориентируются на солнце. Выхлопные газы электростанции закачиваются в реактор, создавая циркуляцию воды и водорослей в реакторе. «Созревшие» водоросли выпадают в осадок на дно реактора. Поглощение CO_2 происходит во время светового дня. Реакторы фирм *BioKing* и *AEN Engineering GmbH&Co* представляют собой систему прозрачных горизонтально расположенных пластиковых труб, по которым принудительно циркулирует культуральная жидкость, содержащая микроводоросли. В жидкость подается углекислый газ и различные добавки, необходимые для роста культуры, и отводится выделяющийся в процессе жизнедеятельности кислород [75].

Сравнение реакторов различной конструкции показывает, что наибольшая среднесуточная урожайность биомассы по сухому веществу в сутки наблюдается при использовании емкостных реакторов закрытого типа или при использовании открытых прудов с теплым климатом (Калифорния). Результаты анализа работы [76] показывают, что на данный момент ни одна система экономически не выгодна, однако культивирование в закрытом реакторе позволяет обеспечить более низкую стоимость липидов. Операционные затраты на выращивание микроводорослей в реакторе открытого типа на 30 % больше, чем в реакторе закрытого типа, что в значительной степени обусловлено затратами на техническое обслуживание и необходимые трудовые ресурсы. По результатам анализа аппаратного оформления стадии культивирования, можно сделать вывод, что для снижения себестоимости микроводорослей необходимо повысить производительность реакторов за счет размещения источников света в толще суспензии микроводорослей.

1.2.2 Перспективные методы концентрирования клеток из суспензии

Сложность концентрирования микроводорослей обусловлена небольшим размером клеток водоросли (2...10 мкм в диаметре) и низкой концентрацией 0.5...5 г/л микроводоросли в суспензии [50].

Существует большое количество методов разделения клеток и культуральной среды [51–55, 80-84]: центрифугирование, седиментационное осаждение, ультрафильтрация, флокуляция, флотация и ультразвуковая обработка. Тем не менее, каждый из этих методов имеет свои недостатки, которые влияют на себестоимость клеток микроводорослей. Недостатком разделения при помощи центрифугирования является высокое потребление энергии [56, 57]. Недостаток фильтрации заключается в частой замене фильтров, мембран и длительного времени проведения процесса. В процессе седиментационного (гравитационного) осаждения тратится наименьшее количество энергии, что является несомненным достоинством данного метода. Однако, длительное время его проведения и низкая степень разделения ограничивает его промышленное применение. Электрофлотация сопряжена с частой заменой электродов и большими затратами электроэнергии [54, 58].

Широко используется способ концентрирования биомассы с использованием флокулянтов [51, 54 59 - 61].

В статье D. Surendhiran and M. Vijay [62] показано исследование влияния восьми различных флокулянтов на эффективность концентрирования морской микроводоросли *Nannochloropsis oculata*. Максимальная эффективность концентрирования наблюдалась при использовании в качестве флокулянта $FeCl_3$ при концентрации 0.4 г/л - 93.80 % на 180-ой минуте, и $Fe_2(SO_4)_3$ при концентрации 0.6 г/л 87.33 % на 180-ой минуте эксперимента. Соли цинка заняли второе место по эффективности флокуляции $ZnCl_2$ (0.6 г / л) – 89.12 % и $ZnSO_4$ (0.8 г/л) – 84.17 % на 210 и 240 минутах соответственно, в то время как соли алюминия показали эффективность флокуляции 85.46% для $AlCl_3$ (0.6 г/л) и 82.27 % для

$Al_2(SO_4)_3$ (0.4 г/л) на 210 и 240 минутах соответственно. При использовании солей магния наблюдался наименьший эффект флокуляции. Соли железа спровоцировали полный лизис клеток, поэтому они были исключены из дальнейшего исследования. Влияние температуры, режима «свет–тьма» также были изучены при одновременном добавлении солей Al и Zn . Результаты исследования показали, что оптимальная температура флокуляции составила 35 °С в условиях освещения. Эффективность осаждения клеток с использованием $ZnCl_2$ и $ZnSO_4$ при освещении суспензии составило 92.3 и 90.5 % и в темноте – 83.1 и 80.1 %, соответственно. Эффективность осаждения с использованием $AlCl_3$ и $Al_2(SO_4)_3$ при освещении суспензии составило 88.5 и 85.5 % и в темноте – 74.8 и 68.8 %, соответственно. Так как при использовании солей алюминия эффективность флокуляции была ниже, рекомендовано использование хлорида цинка.

Nyomi Uduman, Hsueh Lee, Michael K. Danquah и др. исследовали электрокоагуляцию микроводорослей [63]. Процесс электрокоагуляции включает короткий период индукции, в течение которого ионы металлов с анода переходят в суспензию. Затем они адсорбируются микроводорослями и индуцируют флокуляцию. Агломераты микроводорослей переносятся на поверхность пузырьками водорода, которые образуются на катоде. Эксперименты показали успешность данного метода для концентрирования биомассы микроводорослей при использовании всех типов электродов. При этом наибольшая эффективность электрокоагуляции получена при использовании в качестве материала анода алюминия. Использование алюминия позволяет обеспечить более высокую эффективность процесса электрокоагуляции, чем использование нержавеющей стали в качестве материала анода, при меньшей величине концентрации ионов в растворе. Это связано с тем, что ион алюминия имеет заряд 3+, что обуславливает большую вероятность образования агломератов за счет нейтрализации поверхностного заряда клеток.

В работе [64] установлено, что в качестве химического коагулянта можно использовать тетрахлорид титана в концентрации 0.001 %, а также 10 %-ный раствор сернокислого марганца.

Эффективно действует на клетки водорослей гашеная известь, 1 %-ный раствор которой через 4...6 ч после добавления в суспензию в соотношении 50...70 мл/л вызывал почти полное осаждение клеток микроводорослей на дно бассейна. По мнению Н. П. Арутюняна [65], кальций действует на оболочку клеток и тем самым изменяет их проницаемость. Ион OH^- при действии на оболочку вызывает гидролиз коллоидных веществ. Все это способствует образованию агломератов и ускорению процесса седиментации в растворе [24].

Можно сделать вывод, что отделение биомассы водорослей от культуральной жидкости при помощи центрифугирования, сепарирования, электрокоагуляции сложно и энергоемко. Применение этих способов осаждения клеток целесообразно при использовании микроводорослей в производствах, требующих растительного сырья высокой частоты, когда важно получить клетки хорошего качества без загрязнений. Для производства ЭЖК целесообразно исследовать комплексные способы осаждения, например, с использованием химических коагулянтов и флокулянтов для увеличения размеров осаждаемых частиц и процесса центрифугирования.

1.2.3 Перспективные методы разрушения клеток микроводорослей

Для интенсификации извлечения компонентов из клетки необходимо разрушить ее стенки. Дезинтеграция клеток может быть выполнена в одну или несколько стадий [77, 88]. При подборе методов дезинтеграции следует учитывать структуру клеточных оболочек, их механические и биохимические характеристики (сопротивление нагрузке, деформации, разрушению; формообразование и т.д.) [66].

При использовании физических методов дезинтеграции на клетки оказывается воздействие физическим полем (гидродинамическим, акустическим и т.д.), что приводит к разрушению клеточной стенки. При баллистическом воздействии разрушение клеточной оболочки происходит при непосредственном механическом контакте мелющих тел и клеток в шаровых мельницах. Недостатком такого способа является низкая производительность и энергоемкость оборудования.

При воздействии СВЧ-излучения осуществляется взаимодействие между полярными молекулами внутри клетки, в результате чего молекулы, вращаясь относительно своей оси, вызывают значительное межмолекулярное трение, приводящее к вскипанию внутриклеточной воды и разрыву клеточной оболочки.

При экструзионном методе, реализуемом с помощью инжекторных сопел и гомогенизаторов, суспензия клеток продавливается через узкие отверстия под высоким давлением в камеры низкого давления, в результате чего возникают сдвиговые напряжения, приводящие к разрыву клетки. При сушке клеток возникающий дегидрационный шок приводит к появлению разрывов и трещин в клетке, а сами клетки погибают.

Воздействие ультразвуком приводит к разрушению клеточной стенки оболочки из-за возникающих различных физических и физико-химических явлений, которые имеют кавитационную природу [67, 68].

Химические методы воздействия на клетку подразумевают воздействие веществ различной природы. При «осмотическом шоке» разрыв клеточной

оболочки происходит под давлением воды, проникающей внутрь клетки при резком изменении осмотического давления из-за повышения (снижения) концентрации соли или сахара в окружающей среде. Наибольшую эффективность осмотический шок проявляет при дезинтеграции клеток с малопрочной и проницаемой клеточной оболочкой. Применение химических реагентов предполагает воздействие щелочей, кислот, солей, хелатных агентов и органических растворителей. Эти реагенты, воздействуя на клеточную оболочку, вызывают денатурацию и коагуляцию белков, окисление компонентов клеточной стенки, разрушение мембранной структуры. Недостатком метода является воздействие реагентов на другие клеточные структуры, что вызывает разрушение целевого продукта.

При ферментном лизисе осуществляется обработка суспензии клеток гидролитическими ферментами или ферментными комплексами, разрушающими связи между веществами клеточной стенки.

При воздействии антибиотиков реализуются различные механизмы разрушения [69]. Например, воздействие антибиотиков на ферменты клеточной стенки приводит к их связыванию, в результате чего клетка теряет способность к образованию новых компонентов стенки, в результате чего микроорганизм гибнет. Также, при взаимодействии активного центра антибиотиков с липидами цитоплазматической мембраны в ней образуются повреждения – поры.

В патенте [104] описывается одношаговый процесс лизиса стенок клеток микроводорослей с использованием гидрофильной ионной жидкости, 1-бутил-3-метилимидазолия и отделения клеточных липидов. Гидрофильная ионная жидкость разрушает клеточные стенки и образует две несмешивающиеся фазы, одна из которых состоит из липидов. После смешивания гидрофильной ионной жидкости с суспензией клеток микроводорослей, гидрофобная фаза липидов, из-за действия силы тяжести оказывается сверху, где она удаляется из смеси и очищается. Гидрофильную ионную жидкость возвращают для лизирования новых клеток из суспензий

микроводорослей. Способ извлечения липидов из суспензии микроводорослей, включает следующие стадии: а) смешивание некоторого количества указанной суспензии клеток микроводорослей с хлоридом 1-бутил-3-метилимидазолия при температуре 100...140 °С в течение времени, достаточного для того, чтобы разрушить клетки микроводорослей для получения лизата; б) выдержка лизата в течение некоторого времени, достаточного для того, чтобы вода испарилась из лизата; в) отделение липидной фазы от гидрофильной фазы для получения липидного экстракта из клеток микроводорослей.

В патенте [105] описываются способы и устройства для обработки водорослей, в которых гидрофильная ионная жидкость используется для лизиса клеток водорослей при более низких температурах, чем в традиционных методах обработки водорослей. В качестве агента разделения употребляется соль или раствор соли. Сравнительно низкие температуры лизиса и обработки ионной жидкости и соли уменьшают воздействие на клетки при обработке водорослей. Лизис проводят при температуре 25...105 °С. Способность разрушать водоросли при более низких температурах уменьшает количество энергии, необходимой для обработки клеток водорослей и снижает или предотвращает их термическое разложение. Например, 1-этил-3-метилимидазолия ацетат, 1-этил-3-метилимидазолия хлорид, хлорид 1-бутил-3-метилимидазолия, хлорид 1-гексил-3-метилимидазолия и 1-гексил-3-метилимидазолия йодид полностью лизируют клетки суспензии *Chlorella vulgaris*, с концентрацией ниже, чем 20 % (масс.) в течение 60 минут при внесении в соотношении 20 : 1 (об.) ионной жидкости к навеске микроводорослей.

В патенте [106] описывается процесс выделения липидов из водорослей для производства топлива, который состоит из двух этапов: 1) разрушение клеток водорослей; 2) выделение липидов из разрушенных клеток. Разрушение клеток осуществлялось с помощью ультразвукового

устройства, которое использует низкие энергетические звуковые волны, имеющие максимальную частоту 2 МГц.

Выбор способа дезинтеграции клетки обуславливается составом клеточной стенки микроорганизма. Клетка микроводоросли *Chlorella vulgaris* (рис. 1.4) содержит клеточную стенку, в составе, представленном в табл. 1.1 [50, 133].

Таблица 1.1 – Состав клеточной стенки *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111

Слой	Толщина, нм	Состав	Преобладающие химические связи между мономерами	Энергия связей, кДж/моль
Пластичная полимерная мембрана	20-40	1. Вода 2. Жесткие компоненты мембраны – микрофибриллы – состоят из хитиноподобного гликана (поли-β-1,4 –D-N-ацетилглюкозамин), микрофибриллы сшиты водородными связями. 3. Матрикс состоит из сложных полисахаридов мономеры: уроновая кислота, рамноза, арабиноза, ксилоза, фукоза, манноза, галактоза, глюкоза, содержится гемицеллюлоза, присутствуют пектиноподобные вещества, белки.	Водородные ковалентные полярные	Ковалентная 40-700 Водородная 6-28
Плазматическая мембрана	6-10	Фосфолипиды, эргостерол, гликолипиды, белки-переносчики, гликопротеины	Гидрофобные взаимодействия водородные связи	Ковалентная 40-700 Водородная 6-28 Гидрофобные 1-4

Из анализа состава клеточной стенки этой микроводоросли следует, что для разрушения этого штамма микроводорослей перспективны следующие способы разрушения: 1) воздействие СВЧ-излучения (наличие в клетке воды и полярных молекул); 2) использование ферментов, разрушающих гемицеллюлозу и пептидные связи белков-переносчиков; 3) воздействие кавитационных эффектов (местное понижение давления,

вызывающего разрыв клеточной стенки); 4) воздействие антибиотика, нарушающего синтез хитиноподобного гликана; 5) «осмотический шок».

Перспективным может быть комплексное воздействие на клеточную стенку, включающее комбинацию различных способов дезинтеграции.

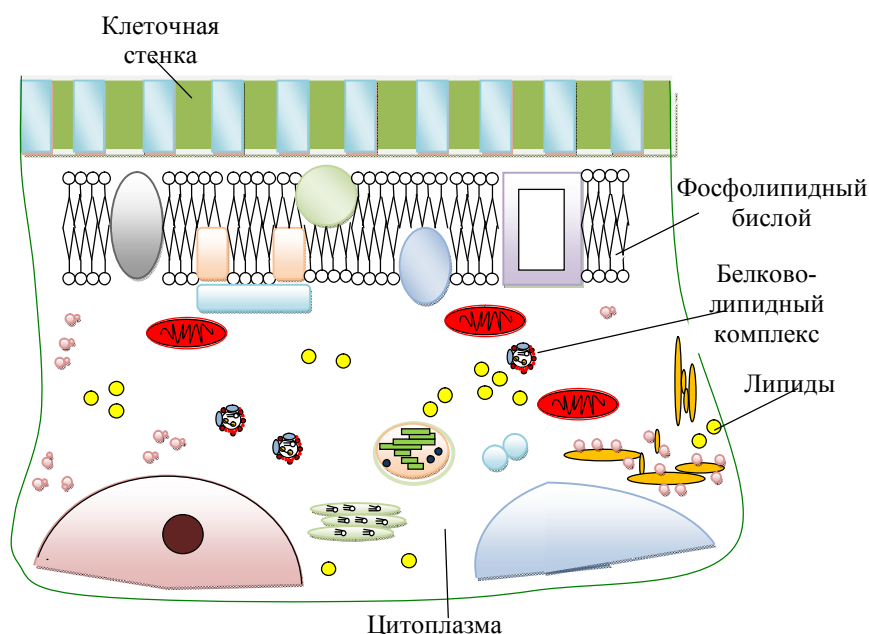


Рисунок 1.4 - Структура клетки *Chlorella vulgaris*

Для разрушения клеточных стенок в промышленных условиях широко используются гомогенизаторы высокого давления фирмы «Мантон-Гален» [85]. Разрушения клеточных стенок в таком дезинтеграторе происходит за счет продавливания клеток через специальные клапаны. Этот метод разрушения клеточных стенок неэффективен из-за наличия у микроводорослей крепкой стенки и необходимости переработки очень больших объемов биомассы.

Достаточно широко применяются шариковые гомогенизаторы, например, баллистический дезинтегратор (ФУГ) выпускался СКБ биологического приборостроения АН СССР [78]. Принцип работы прибора основан на перемешивании клеток и антифрикционных полимерных мелющих тел, движущихся в мощном поле центробежных сил [78].

Известен баллистический дезинтегратор [86], принцип работы которого заключается в следующем: (рис. 1.6) через канал 3 в камеру 1, охлаждаемую рубашкой 8, вводят материал, подлежащий дезинтеграции в виде суспензии, которая заполняет ее объем. Затем включают привод и приводят во вращение вал 6 и установленный на нем активатор перемешивания мелющих тел 7. Последний сообщает мелющим телам кинетическую энергию, отбрасывая их центробежными силами на периферию камеры 1. При низкой частоте вращения активатора 7 (до 100 об/мин) мелющие тела концентрируются в кольцевой полости 2, освобождая при этом центральную и уплощенную зоны камеры 1. При оптимальной частоте вращения активатора 7 (например, 1500 – 2000 об/мин) мелющие тела 9 уплотняются в полости 2 мощным полем центробежных сил и вовлекаются в послойное круговое вращение, а также во вращение относительно друг друга, в результате чего при гидродинамическом трении осуществляется упругий фрикционный контакт мелющих тел, вследствие чего происходят сдвиговые деформации оболочек клеток и их разрыв.

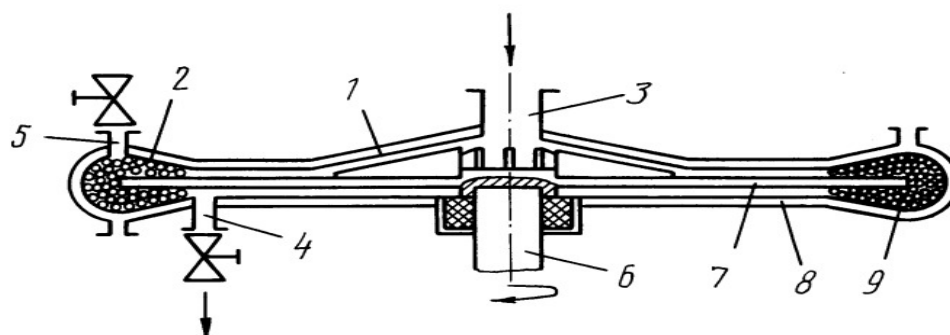


Рисунок 1.5 - Баллистический дезинтегратор микроорганизмов

Применение данных дезинтеграторов в переработке биомассы микроводорослей ограничено их низкой производительностью.

Известен способ дезинтеграции [87], который включает воздействие ударно-волновыми акустическими импульсами и импульсным электрическим полем на клетки. Амплитуда напряженности электрического поля превышает значение напряженности пробоя цитоплазматической мембраны. Устройство

для реализации способа состоит из кюветы 1 с электродами 2, 3 либо плоской (рис. 1.6), либо цилиндрической формы (рис. 1.7). Electrodes могут иметь или непосредственный контакт со средой, или отделены от среды слоем изоляции с малой диэлектрической проницаемостью. Кюветы сопряжены с устройством формирования в среде ударно-волнового акустического импульса 4, в качестве которого может быть использован любой известный генератор ударно-волновых акустических импульсов, например пьезоэлектрический, электромагнитный, электрогидравлический, лазерный и т.д.

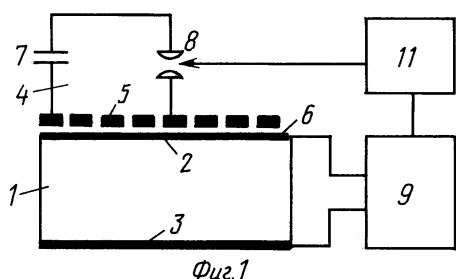


Рисунок 1.6 – Устройство с электродами плоской формы для дезинтеграции биологических клеток

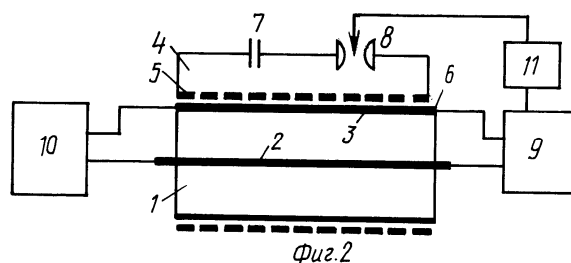


Рисунок 1.7 - Устройство с электродами цилиндрической формы для дезинтеграции биологических клеток

На рисунках 1.6 и 1.7 показаны варианты с использованием электромагнитного генератора, состоящего из спиральной катушки 5 либо плоской формы (рис. 1.7) или цилиндрической (рис. 1.8), металлической мембраны 6, которая одновременно может выполнять функцию электрода и разрядного контура, состоящего из последовательно включенных конденсатора 7, управляемого разрядника 8 и катушки 5. К электродам 2, 3 подключен генератор импульсного электрического напряжения 9. Сущность предлагаемого технического решения заключается в следующем: при возбуждении в среде ударно-волнового акустического импульса биологические клетки, находящиеся в среде, подвергаются сжатию, сменяющемуся растяжением. При действии ударно-волнового акустического импульса фаза сжатия сменяется фазой растяжения под действием

отрицательного давления, образовавшегося в положительную фазу давления. Пора клетки в отрицательной фазе расширяется под действием растягивающих усилий, если амплитуда отрицательного давления превышает некоторую критическую величину, определяемую силами поверхностного натяжения и начальным радиусом поры. При достаточной продолжительности фазы растяжения пора расширится до размеров порядка диаметра клетки, процесс станет необратимым, т.е. восстановление целостности мембраны будет невозможным. Эффект ударно-волнового акустического импульса, возникающий при использовании данного вида дезинтегратора, перспективен для разрушения клеточных стенок микроводорослей и обработки больших объемов биомассы.

Анализ аппаратурно-технологического оформления стадии дезинтеграции микроводорослей позволяет сделать вывод о том, что для разрушения клеток *Chlorella vulgaris*, имеющих прочную стенку, перспективно использование химических (ферменты, антибиотик, «осмотический шок») и физических (воздействие электромагнитного поля) способов дезинтеграции.

1.3 Перспективные методы интенсификации процессов экстракции и этерификации липидов при получении ЭЖК

Процесс экстракции липидов из клеток микроводорослей характеризуется высокими затратами энергии, что в сильной степени затрудняет использование микроводорослей в качестве сырья для производства широкого спектра химических продуктов [89, 90]. Липиды могут находиться в клетке в виде капель, это триацилглицериды – неполярные липиды, основная функция которых депонирование энергии. Они могут быть извлечены с помощью неполярного растворителя, за счет возникающего между молекулами дисперсионного взаимодействия. Существуют липидные капли, покрытые белками, такие капли могут находиться в цитоплазме или входить в состав хлоропласта [136, 142]. В составе клетки липиды могут находиться в комплексе с белками и полярными липидами [91], например, в составе клеточных мембран, а также в виде растворимых в цитоплазме белково-липидных комплексов, примерная схема которых представлена на рис. 1.8 [135, 143]. Состав среднестатистического белково-липидного комплекса [144] взят по аналогии с липопротеином низкой плотности, который транспортирует эндогенные триацилглицериды [165], в связи с хорошим уровнем изученности данных липопротеинов (табл. 1.2).

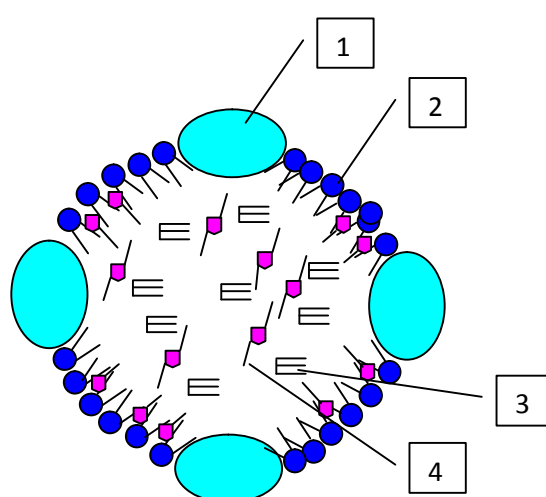


Рисунок 1.8 – Схематичное изображение белково-липидного комплекса: 1 - амфифильные аполипопротеины; 2 - фосфолипиды, сфинголипиды; 3 – триацилглицериды; 4 – эргостерол (растительный аналог холестерина)

Таблица 1.2 – Примерный состав белково-липидного комплекса

Вещество	Содержание, % (масс.)
Триацилглицериды	50
Белок	10
Фосфолипиды, сфинголипиды	20
Эргостерол	7

Различают экстракцию липидов из микроводорослей с высокой влажностью, при которой извлечение целевого продукта затруднено наличием культуральной жидкости, что приводит к невысокому выходу продукта в процессе экстракции. Известен также процесс экстракции липидов из микроводорослей в виде порошка, недостатком которого являются высокие затраты энергии на осушку клеток. Экономические затраты при проведении одного цикла производства липидов из пасты микроводорослей при использовании на стадии экстракции различного количества экстрагента состоят в затратах на покупку экстрагента и его отгонку [150-152].

Метод экстракции с использованием смеси хлороформа и метанола (1:1 (об.)) описан в работах [91, 109-110, 129]. Хлороформ, однако, обладает высокой токсичностью, и его использование нежелательно. По этой причине его эффективность при экстракции липидов из биомассы микроводорослей нуждается в научном обосновании. Также используется смесь с соотношением метанола и хлороформа 2 : 1 (об.) – метод Блайя и Дайера. В качестве замены хлороформа используют дихлорметан в соотношении метанол и дихлорметан 1:2 (об.) – метод Чена. Смесь растворителей с низкой токсичностью гексан и изопропанол 3 : 2 (об.) предложена в качестве замены смеси хлороформ и метанол [91]. После двухфазного разделения легкая органическая фаза (гексан с некоторым количеством изопропанола) содержит большую часть липидов (нейтральных и полярных), а нижняя водная фаза (вода с некоторым количеством изопропанола) содержит белки и углеводы. Результаты исследований по подбору условий экстракции внутриклеточных липидов из микроводорослей приведены в приложении А.

В патенте [102] предложен метод экстракции липидов в производстве топлива. В качестве экстрагента используется смесь, по крайней мере, из одной жидкости с полярными ковалентными молекулами и одной ионной жидкости. Массовое отношение жидкости с полярными ковалентными молекулами к общей ионной жидкости может быть 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5 или 1:1. В качестве жидкости с полярными ковалентными молекулами могут быть использованы диметилсульфоксид, карбоновая кислота, амид, спирт, кетон, алкилгалогенид, сложный эфир и амин. Ионная жидкость представляет собой смесь катионов и анионов (например, соль), в которой размеры катиона и аниона существенно различаются.

В патенте [103] описана система и способ экстракции липидов различной полярности из маслянистого материала, в том числе водорослей. Экстракция липидов из суспензии микроводорослей проводится экстрагентами различной полярности с использованием ряда мембранных фильтров. Преимуществом данного способа является отсутствие осушки и дезинтеграции клеточных оболочек. Экстракция и фракционирование могут быть выполнены в одну стадию с последующей мембранной очисткой. Мембрана может быть сделана из следующих материалов: полиэфирсульфон (*PES*), полиамид (*PA*), поливинилидендифторид (ПВДФ), полиимид (*PI*) и полиакрилонитрил (*PAN*); в качестве водорастворимого растворителя используется спирт.

Fajardo и другие в работе [107] изучали кинетику экстракции липидов из клеток микроводорослей. Во время 24-часовой экстракции большинство липидов (60...70 % всех экстрагируемых липидов) извлекалось в течение первых 8 ч. Сделан вывод о том, что увеличение времени экстракции более чем на 12 ч не улучшает общий выход липидов.

Важными факторами при экстракции липидов из микроводорослей являются: соотношение органического растворителя (мл) и высушенной биомассы (г) микроводорослей Z . Соответствующее значение Z для каждого штамма микроводорослей варьируется в зависимости от содержания липидов

и внутреннего взаимодействия растворителя и клетки. Важно найти оптимальное значение Z для конкретного штамма микроводоросли. При этом выявлена следующая тенденция: при увеличении соотношения Z наблюдается чрезмерное потребление органического растворителя, в то время как его снижение приводит к повышенным энергозатратам при извлечении экстрагента и неполной экстракции. Brian McConnell и другие в работе [108] исследовали возможность замены гексана, как экстрагента, на гептан, который менее опасен, а также исследовали кинетику процесса экстракции липидов гексаном и гептаном при разных Z . Установлено, что при $Z = 5:1$ максимальный выход липидов для гексана составляет 2.75 % (масс.), для гептана – 1.8 % (масс.). При $R = 30:1$ максимальный выход липидов для гексана равен 3.9 % (мас.), для гептана – 2.6 % (мас.). Сделан вывод о том, что для конкретной Z процесс экстракции гептаном осуществляется быстрее, но при экстракции гексаном достигается больший выход липидов.

Температура процесса экстракции оказывает сильное влияние на выход липидов. По данным работы [91] увеличение температуры от 30 °C до 60 °C приводит к повышению скорости экстракции липидов из клеток, однако рост температуры выше 70 °C приводит к окислительной деградации термолабильных компонентов, что приводит к снижению выхода липидов.

Осуществить подбор экстрагентов для извлечения липидов из клеток микроводорослей возможно с помощью методики Ч. Хансена [145], которая ориентировано на тот факт, что полная энергия сцепления молекул растворителя и целевого продукта (E) количественно подразделяется на три составляющие: дисперсионные взаимодействия (E_D), индукционные взаимодействия (E_P) и ориентационные взаимодействия (E_H):

$$E = E_D + E_P + E_H. \quad (1.1)$$

Величина полной энергии E равна количеству энергии, необходимой для испарения жидкости (растворенного вещества или растворителя).

Разделив обе части уравнения (1.1) на молярный объем V , получаем три компонента параметров растворимости Ч. Хансена:

$$E/V = E_D/V + E_P/V + E_H/V, \quad (1.2)$$

$$E/V = \delta^2, E_D/V = \delta_D^2, E_P/V = \delta_P^2, E_H/V = \delta_H^2, \quad (1.3)$$

$$\delta^2 = (\delta_D)^2 + (\delta_P)^2 + (\delta_H)^2, \quad (1.4)$$

где δ - суммарный показатель растворимости Гильдебранда; δ_D - параметр дисперсионного взаимодействия молекул, МПа^{1/2}; δ_P - параметр индукционного взаимодействия, МПа^{1/2}; δ_H - параметр ориентационного взаимодействия, МПа^{1/2}; δ_D - параметр взаимодействия, возникающего между неполярными молекулами в результате постоянного движения электронов, которые могут оказаться сосредоточенными с одной стороны молекулы, т. е. неполярная частица становится полярной, это вызывает перераспределение зарядов в соседних молекулах и между ними устанавливаются слабые взаимодействия. Энергия такого взаимодействия называется энергией Лондона [146]. δ_P - параметр взаимодействия, возникающего при условии, что рядом с неполярной молекулой оказывается полярная. При этом нейтральная молекула поляризуется под действием внешнего поля. Под действием заряженных концов полярной молекулы электроны неполярной молекулы движутся в сторону положительно заряженной части полярной молекулы (наведение диполя). В результате две молекулы начинают притягиваться друг к другу. Энергия притяжения между постоянным и наведенным диполем называется энергией Дебая [146]; δ_H - параметр взаимодействия, возникающего между полярными молекулами. Молекулы такого типа – диполи, центры положительного и отрицательного заряда у которых не совпадают. Они ориентируются в пространстве таким образом, чтобы рядом находились концы молекул с противоположными зарядами. Энергия притяжения между ними называется энергией Кеезома [146].

Параметры растворимости липидов (*HSP* характеристика) в данной теории удобно визуализируется с помощью сферы с центром (δ_D ; δ_P ; δ_H) и радиусом растворимости (R_0). Растворитель характеризует расчетная величина R_a , которая определяется по формуле (1.6). Она оценивает расстояние до растворителя из центра сферы растворимости: хорошие растворители находятся в пределах сферы, а плохие лежат вне этой сферы.

$$R_a^2 = 4 \cdot (\delta_{DS} - \delta_{DP})^2 + (\delta_{PS} + \delta_{PP})^2 + (\delta_{HS} + \delta_{HP})^2, \quad (1.6)$$

где δ_{DS} , δ_{PS} , δ_{HS} – параметры дисперсионного, индукционного, ориентационного взаимодействий для растворителя; δ_{DP} , δ_{PP} , δ_{HP} параметры дисперсионного, индукционного, ориентационного взаимодействий для растворенного вещества. Относительная разность энергий (*RED*) – численное представление этой графической визуализации. Согласно данной теории наилучший растворитель должен иметь минимальное значение $RED < 1$:

$$RED = R_a / R_0. \quad (1.7)$$

Сложность применения этой методики заключается в том, что внутри клетки липиды присутствуют как в чистом виде (триацилглицериды, содержащие различные жирные кислоты), так и в составе белково-липидных комплексов. Сложность расчета параметров растворимости триацилглицеридов разного состава и белково-липидных комплексов затрудняет подбор экстрагентов.

Реакция получения эфиров жирных кислот (ЭЖК) протекает между жирными кислотами липидов и спиртом. Катализатором данной реакции является алкогольат, который образуется в результате взаимодействия спирта с основанием. Алкоголят подвергает нуклеофильной атаке карбонильную группу алифатической кислоты. Несмотря на то, что промежуточные стадии процесса этерификации в присутствии кислотного и щелочного катализатора различны, в обоих процессах имеет место нуклеофильная атака спиртом или алкогольатом карбонильной группы алифатической кислоты. При этом, поскольку алкогольат обладает более сильными нуклеофильными свойствами,

чем спирт, скорость процесса этерификации в присутствии основного катализатора выше, чем в присутствии кислотного катализатора [111- 115].

Однако в последнее время резко возрос интерес к гетерогенным катализаторам, как основного, так и кислотного типа. Так, в работе [116] применялись катализаторы на основе $Na/\gamma-Al_2O_3$, $NaOH/\gamma-Al_2O_3$ и $Na/NaOH/\gamma-Al_2O_3$ для этерификации соевого масла в биодизельное топливо. При этом в неоптимальных условиях выход продуктов реакции был в среднем на 20 % меньше, чем в случае использования гомогенного основного катализатора. При оптимизации процесса (мольное соотношение масло к спирту 1:9) был достигнут выход ЭЖК на уровне 94 %.

Этерификация соевого масла была осуществлена также в присутствии оксида стронция и стронция, как основных катализаторов [117]. Выход продуктов реакции составил более 95 % при температуре 70 °С, при этом катализатор обладал большим ресурсом и высокой термостойкостью.

В работе [118] приводятся результаты испытания катализатора на основе $NaOH/\gamma-Al_2O_3$, обеспечивающего почти 100 %-ную этерификацию рапсового масла. Авторы проанализировали экстракцию щелочи из катализатора в реакционную среду и установили, что только 5 % от общего количества $NaOH$ переходит в раствор. На основании полученного результата был сделан вывод о незначительном влиянии гомогенного катализа на процесс этерификации.

Рассматривая вопрос использования кислотных катализаторов в процессе этерификации, прежде всего, следует отметить такие недостатки гомогенных кислотных катализаторов, как более низкие скорости реакции, чем у основных катализаторов, необходимость поддержания более высокой температуры процесса, значительный коррозионный износ оборудования и необходимость решения экологических вопросов при использовании концентрированных кислот [119]. Все это обусловило значительный интерес к процессам этерификации в присутствии гетерогенных кислотных

катализаторов. Примером таких катализаторов являются цеолиты – кристаллические алюмосиликаты как природного, так и искусственного происхождения [120]. Основными достоинствами цеолитовых катализаторов является их высокая механическая прочность, а также возможность варьирования их кислотных свойств в широких пределах за счет ионного обмена [121].

На практике реализована технологическая схема производства ЭЖК при взаимодействии масла со спиртом в присутствии щелочного катализатора, которая представлена на рис. 1.9. Кроме ЭЖК в производстве получается глицерин.

На первой стадии спирт (метанол или этанол) смешивают с маслом в мольном отношении 1 к 6 в реакторе с мешалкой (поз. 1). Реакцию обычно проводят при температуре 60 °С и атмосферном давлении в присутствии щелочных катализаторов *NaOH* или *KOH* в количестве 1.0 % от массы масла. В реактор заливают масло, а затем к нему добавляют спирт с катализатором.

К концу реакции мешалку отключают, происходит сепарация продуктов реакции: полное расслоение эфирной и глицериновой фаз. Эфирную фазу направляют на следующую стадию реакции во второй реактор (поз. 2), где происходит простое смешивание со спиртом и катализатором в течение нескольких минут до завершения процесса. После сепарации продуктов реакции эфирную фазу пропускают через испаритель (поз. 5) для удаления спирта, в аппарате (поз. 6) происходит нейтрализация остатков катализатора кислотой с последующей промывкой, а в аппарате (поз. 7) осуществляется окончательная сушка эфиров.

Глицериновую фазу сливают из реактора (поз. 2), удаляют из нее остатки спирта в реакторе (поз. 3) и промывают в промывном аппарате (поз. 4). После этого сырой глицерин поступает на дальнейшую переработку.

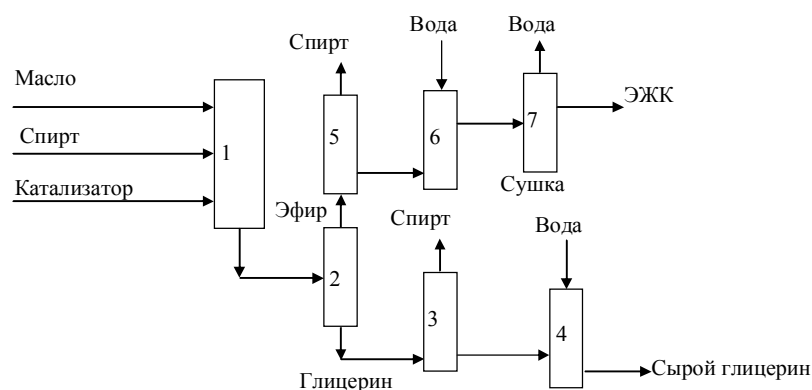


Рисунок 1.9 - Структурная схема технологии получения биодизельного топлива: 1, 2, 3 – реакторы; 4 – промывной аппарат; 5 – испаритель; 6 – разделитель, 7 – аппарат с мешалкой и нагревателями

Для достижения более высокого выхода используют двухстадийный процесс с извлечением глицерина после каждой стадии. Преимуществом традиционной технологии является относительная простота технологического процесса. К недостаткам традиционной технологии можно отнести: невысокий выход ЭЖК (от 85 до 95 % от теоретического), длительное время реакции (до 8 ч.), невозможность проведения непрерывного процесса получения биодизельного топлива, большая масса и габариты установки.

Фирма *AXENS* [122, 123] разработала новую технологию с применением вместо гомогенного катализатора (щелочного или кислотного) гетерогенного катализатора. Данная технология в отличие от классической позволяет получать сразу чистый глицерин и метиловый эфир, который не нужно очищать от остатков гомогенного катализатора.

Также была разработана бескаталитическая циклическая технология производства ЭЖК (рис. 1.10) [124]. Производство по данной технологии основано на использовании растворителей (тетрагидрофурана), которые добавляют в спирт. В результате улучшается растворимость алкоholes в масле, из-за чего время реакции сокращается до 5...10 мин и отпадает необходимость в катализаторе. Использование тетрагидрофурана объясняется тем, что его температура кипения близка к температуре кипения

спирта. После реакции остаточный спирт и тетрагидрофуран легко удаляются из испарителя.

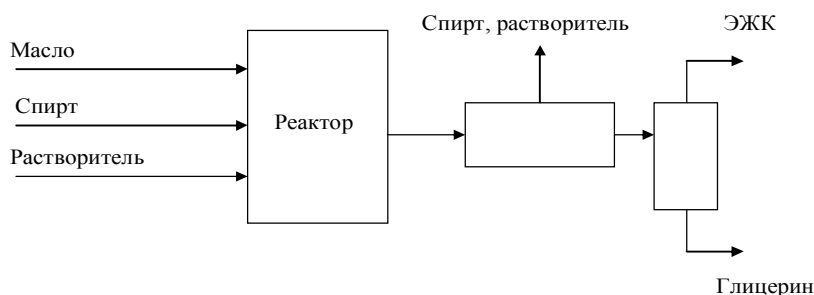


Рисунок 1.10 - Структурная схема бескаталитической технологии производства ЭЖК

К преимуществам технологии относятся: отсутствие катализатора, а следовательно, необходимость его утилизации, быстрота реакции (5...10 мин.), низкая температура реакции (30 °С), простота извлечения из конечного продукта тетрагидрофурана и спирта. Недостатками являются: сложность и дороговизна технологической линии, высокая стоимость растворителя, высокая агрессивность растворителя к атмосфере. В качестве спирта для проведения реакции этерификации чаще всего используют метанол и этанол. Получаемые этиловые и метиловые эфиры почти одинаковы по энергоемкости. Вязкость этиловых эфиров немного выше, чем у метиловых эфиров. Тесты на двигателях демонстрируют, что метиловый эфир дает немного более высокую выходную мощность и вращающий момент, чем этиловый [173]. При этом метанол является ядом, что создает сложности при его применении в промышленности, поэтому в качестве спирта в исследовании был выбран этанол.

Снижение величины уровня рН до нейтрального значения при использовании щелочного катализатора осуществляется реакцией нейтрализации, например 1 %-ным раствором лимонной кислоты, который добавляется в смесь в соотношении от 4 до 6 мл водного раствора кислоты на 100 мл ЭЖК. Смесь ЭЖК подвергается очистке водной промывкой (пузырьковой (пенной), аэрозольной и объемной) [154-157].

1.4 Постановка задач диссертационной работы

Из представленного в параграфах 1.1-1.3 анализа современного состояния процессов и аппаратов технологий производства ЭЖК из растительного сырья как альтернативы жидкому органическому топливу следует актуальность создания ресурсо- и энергосберегающего технологического процесса получения ЭЖК из микроводорослей, оснащенного современными машинами и аппаратами и обладающего предпосылками эффективного управления и автоматизации. Для этого необходимо выполнить комплекс теоретических и экспериментальных работ, включающих новые научно обоснованные технические, технологические, математические и иные решения и разработки, имеющие существенное значение для развития химического комплекса и биотехнологий в Российской Федерации.

Ключевыми вопросами, связанными с созданием производства ЭЖК из микроводорослей, являются: 1) изучение свойств и режимов технологических процессов подготовки и обработки сырья (процесса культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* с повышенным содержанием липидов), экстракции и этерификации липидов микроводоросли *Chlorella vulgaris* для получения ЭЖК; 2) теоретическое и экспериментальное исследование механизмов и кинетики процессов культивирования и разрушения клеток микроводорослей, экстракции и этерификации липидов; 3) математическое моделирование процессов культивирования микроводорослей и экстракции липидов; 4) аппаратурное оформление технологического процесса получения ЭЖК из микроводорослей.

Для решения сформулированных ключевых вопросов и достижения цели работы необходимо решить следующие задачи.

1. Анализ проблемы совершенствования и создания эффективных технологических схем производства ЭЖК из микроводорослей на основе использования современных машин и аппаратов, методов системного

анализа, математического и физического моделирования. Решение этой проблемы связано с уменьшением газообразных выбросов в атмосферу, способствующих изменению климата в результате парникового эффекта и глобального потепления. Из-за этих факторов и в связи с постепенным истощением ископаемых источников энергии можно прогнозировать присутствие значительного объема топлива, произведенного из возобновляемых источников, на мировом энергетическом рынке [1]. Получение энергоносителей из микроводорослей, по сравнению с зерновыми культурами, окажет меньшее отрицательное воздействие на окружающую среду и продовольственную безопасность. Высокая конверсионная эффективность фотонов (приблизительно 3...8 % против 0.5 % для наземных растений) дает возможность получать более высокие урожаи биомассы на гектар. Микроводоросли обладают высокой емкостью поглощения углекислого газа и совершенно не требовательны к качеству воды для их роста.

Вместе с тем, производство энергии из микроводорослей имеет ряд сложностей: высокая энергоемкость процесса обезвоживания клеток биомассы из суспензии с сохранением их жизнеспособности; наличие прочной стенки у клетки микроводоросли, которая ограничивает извлечение целевых внутриклеточных продуктов, и отсутствие дешевого способа разрушения клеточных стенок; высокая себестоимость экстракции липидов из биомассы.

Решение задачи совершенствования и создания эффективных технологических схем производства ЭЖК из микроводорослей на основе использования современных машин и аппаратов, методов системного анализа, математического и физического моделирования позволит определить новые научно обоснованные технические, технологические, математические и иные решения и разработки, имеющие существенное значение для развития отрасли.

2. Теоретические и экспериментальные исследования свойств и режимов технологического процесса подготовки и обработки сырья, механизмов и кинетики процессов культивирования и разрушения клеток микроводорослей;

Наибольшее влияние на накопление и химический состав клеток имеют: 1) уровень освещенности; 2) химический состав питательной среды; 3) температура культивирования. При этом, для каждого штамма существуют свои индивидуальные условия культивирования, при определении которых важно учитывать климатические условия, в которых штамм существовал в природе.

Для разрушения микроводорослей, имеющих прочную стенку, перспективно использование химических (ферменты, антибиотик, «осмотический шок») и физических (воздействие электромагнитного поля) способов дезинтеграции, а также их комплексное воздействие на клеточную стенку.

3. Теоретические и экспериментальные исследования свойств и режимов, механизмов и кинетики процессов экстракции и этерификации липидов;

Наибольшее влияние на выход внутриклеточных липидов и себестоимость процесса экстракции оказывают: 1) тип используемого экстрагента (или смеси экстрагентов); 2) соотношение массы микроводорослей и объема экстрагента, взятых для экстракции; 3) температура экстракции.

На процесс этерификации липидов наибольшее влияние имеет: 1) соотношение липидов и спирта, взятое для проведения реакции; 2) вид и количество катализатора, взятого для проведения реакции; 3) температура проведения процесса этерификации.

4. Экспериментальное исследование закономерностей воздействия СВЧ-излучения, ферментов, антибиотиков, вихревого слоя ферромагнитных частиц, осмотического шока и технологических условий осуществления

процесса дезинтеграции клеток микроводорослей на интенсификацию процесса экстракции липидов;

Выбор условий проведения стадии разрушения клеток микроводорослей зависит от химического состава клеточной стенки, который может отличаться в зависимости от того, какой штамм микроводорослей используется для производства ЭЖК. Экспериментальное исследование по подбору оптимальных условий последовательного и комплексного воздействия химических и физических способов разрушения позволит установить наиболее эффективный способ разрушения клеток, его механизм и закономерности его воздействия на выход внутриклеточных липидов.

5. Математическое моделирование кинетики процессов культивирования клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР №111 и экстракции внутриклеточных липидов.

Математическая модель процесса культивирования должна учитывать энергетические факторы воздействия на клетки (уровень освещенности, температуру культивирования), химический состав питательной среды.

Математическая модель процесса экстракции внутриклеточных липидов должна учитывать особенность клеток микроводорослей, из которых осуществляется экстракция липидов (разрушенные, погибшие, но сохранившие форму, целые), температуру проведения процесса, вид экстрагентов.

6. Разработка рекомендаций по аппаратурно-технологическому оформлению процессов культивирования микроводорослей, разрушения клеточных стенок и экстракции внутриклеточных липидов.

В результате проведенного комплекса теоретических и экспериментальных исследований должны быть предложены рекомендации по совершенствованию технологической схемы производства ЭЖК из микроводорослей штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 с использованием современных энерго- и ресурсосберегающих машин и аппаратов.

Выводы по главе 1:

По результатам анализа данных литературно-патентного обзора свойств, кинетики, механизмов, системных связей и закономерностей осуществления процессов подготовки сырья, экстракции и этерификации липидов в производстве ЭЖК можно сделать выводы о необходимости проведения: 1) комплекса теоретических и экспериментальных исследований свойств и режимов, механизмов и кинетики процессов культивирования микроводорослей, экстракции и этерификации липидов; 2) экспериментального исследования закономерностей воздействия СВЧ-излучения, ферментов, антибиотика, вихревого слоя ферромагнитных частиц, «осмотического шока», и технологических условий осуществления процесса дезинтеграции клеток микроводорослей на интенсификацию процесса экстракции липидов; 3) исследования и теоретического обоснование проведения процесса экстракции липидов: вида экстрагентов, соотношения биомассы микроводорослей и экстрагентов, температуры проведения процесса, при которых достигается максимальный выход липидов; 4) математического моделирования кинетики процессов культивирования микроводорослей, экстракции внутриклеточных липидов; 5) проведение исследований по подбору условий проведения реакции этерификации: соотношения липидов и спирта, типа и количества вносимого катализатора, температуры реакции этерификации для получения максимального выхода ЭЖК.

Глава 2. Теоретические и прикладные исследования свойств и режимов технологического процесса подготовки и предварительной переработки сырья

2.1 Исследование периодического процесса культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* с повышенным содержанием липидов

2.1.1 Экспериментальное исследование кинетики, свойств и режимов процесса культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* с повышенным содержанием липидов

Как показали результаты литературно-патентного обзора, возможен подбор условий (режимов), позволяющих значительно повысить содержание внутриклеточных липидов. Для достижения этой цели были поставлены и решены задачи определения режимов: химического состава питательной среды, температуры, уровня освещенности для накопления максимального количества микроводорослей; условий для стимулирования накопления в клетках липидов.

Эксперименты проводились при следующих фиксированных условиях: 1) посевной материал составлял 5-10 % от общего объема суспензии; 2) величина pH устанавливалась в пределах 6.2...8.0; 3) во всех экспериментах барботаж суспензии осуществлялся газовой смесью с содержанием углекислого газа 0.03 % и расходом 80 л/ч для интенсивного перемешивания слоев суспензии; 4) фотопериод составлял 24 часа; 5) каждые четверо суток в суспензию добавлялся источник азота в том же соотношении, в котором он вносился для приготовления питательной среды.

Культивирование осуществлялось в лабораторной установке (рис. 2.1). В нижней части реактора 1, изнутри равномерно освещаемого с помощью светодиодных лент 2, смонтировано барботажное устройство 3, через которое подается газоздушная смесь, состоящая из CO_2 , подаваемого из баллона 7, и воздуха, нагнетаемого компрессором 5. Газоздушная смесь предварительно подогревается с помощью нагревательного элемента 4 и смешивается с солями питательной среды из бункера 6.

Использование в качестве источника освещения светодиодных лент позволяет экономить электроэнергию и подбирать длину волн излучения, оптимальную для протекания процесса фотосинтеза.

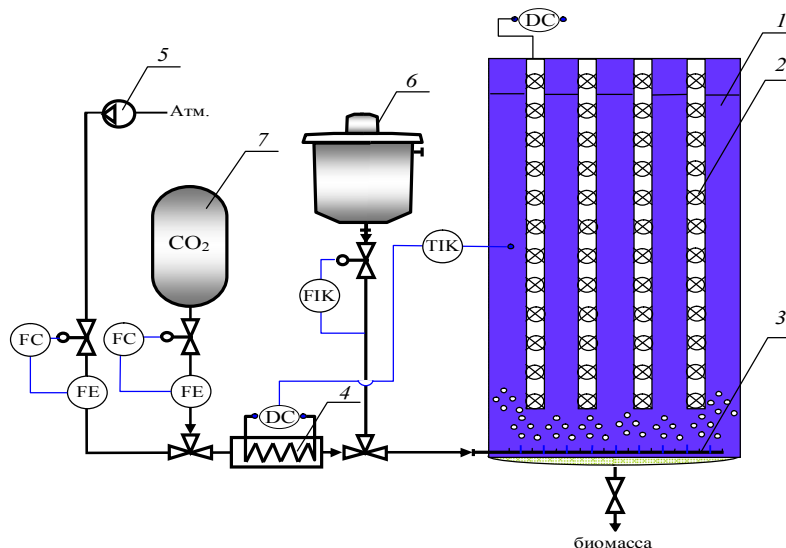


Рисунок 2.1 - Принципиальная схема лабораторной установки культивирования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*: 1 – реактор, 2 – светодиодный кабель, 3 – устройство для подачи питательной среды и барботажа; 4 – нагреватель; 5 – компрессор; 6 – емкость для подачи питательной среды; 7 – баллон с CO₂

Как следует из анализа параграфа 1.2.1 сначала необходимо подобрать состав питательной среды, который позволит накопить наибольшее количество микроводорослей. Было проведено экспериментальное исследование по оценке влияния химического состава питательной среды на эффективность прироста клеток микроводорослей. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.2. Анализ графика показывает, что для культивирования данного штамма в наибольшей степени подходит *среда Тамийя*.

Затем, осуществлялся подбор вида источника азота, как наиболее важного элемента для культивирования штамма *Chlorella vulgaris*. В качестве источников азота в питательной среде использовались нитрат калия (5 г/л), хлорид аммония (2.64 г/л) и мочевины (1.5 г/л). Результаты эксперимента (рис.2.3) показывают, что в качестве источника азотсодержащих соединений

для накопления микроводорослей штамма *Chlorella vulgaris* в наибольшей степени подходит нитрат калия, обеспечивающий двукратный прирост биомассы на седьмой день культивирования.

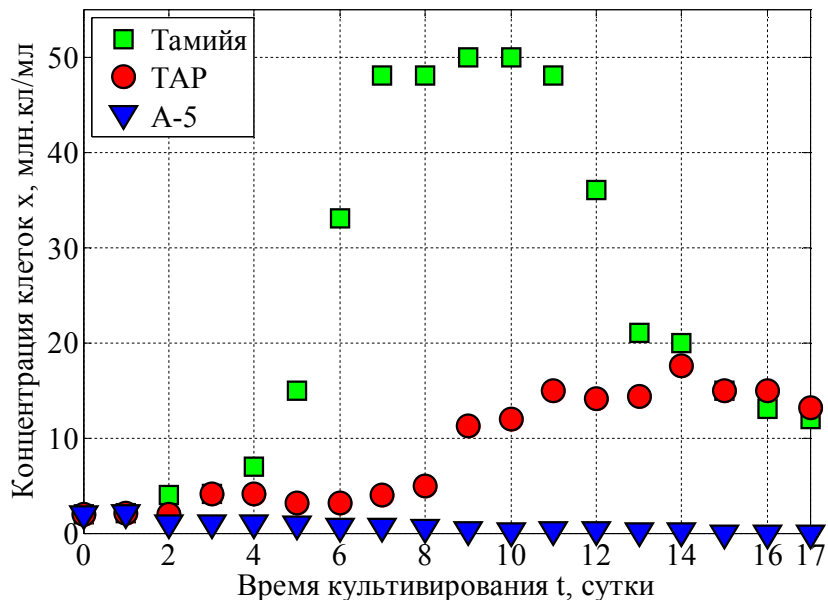


Рисунок 2.2 - Динамика прироста микроводорослей на различных питательных средах

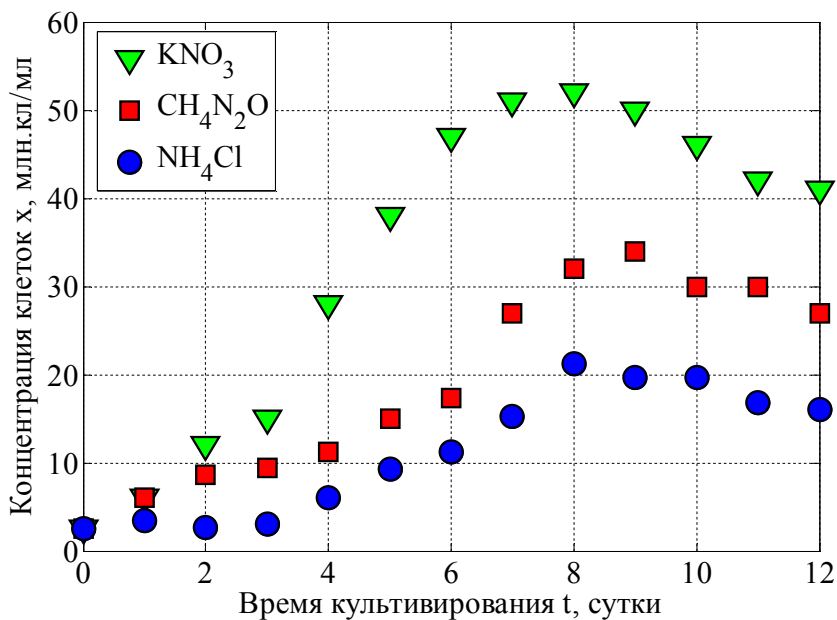


Рисунок 2.3 - Динамика прироста микроводорослей на питательной среде Тамийя с различными источниками азота

В ходе эксперимента установлено, что при культивировании штамма и использовании в качестве источника азота мочевины, на 4–5 день культивирования аммонийная форма азота может достигать в среде высоких значений (до 50 %), что приводит к подкислению среды и вызывает замедление роста клеток. При этом использование на практике *среды Таммийя* с нитратом калия также выявило ряд существенных недостатков: рост величины рН в процессе культивирования клеток (рис. 2.4 (а, б)) и избыток практически всех макро- и микроэлементов (магния, серы, фосфора, калия, марганца, цинка и бора), которые при избыточном потреблении проявляют токсические свойства.

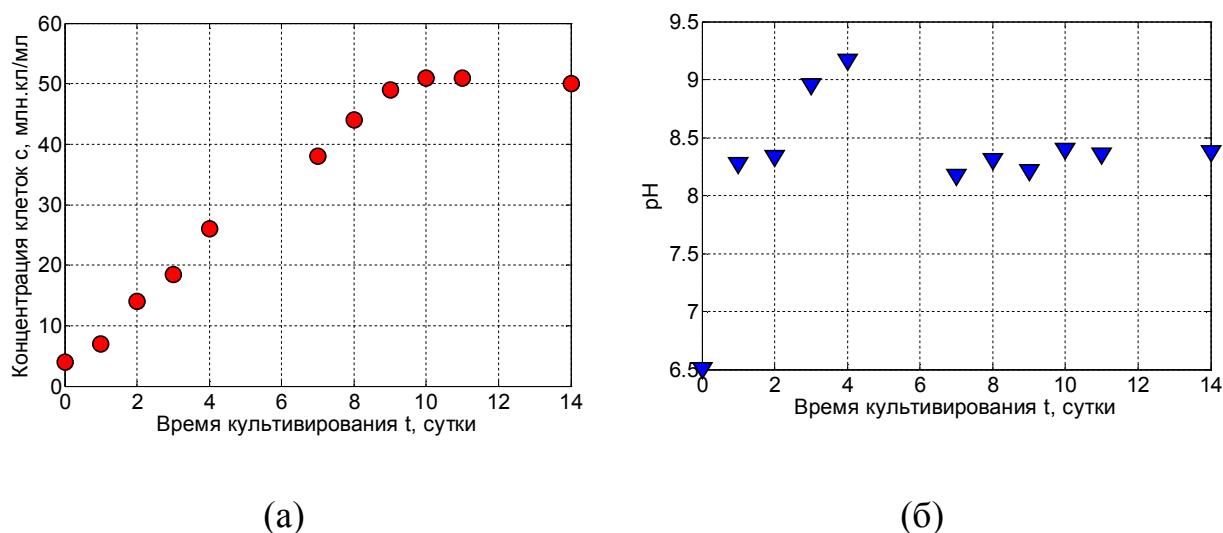


Рисунок 2.4 – Изменение концентрации микроводорослей (а) и уровня рН (б) в процессе культивирования

В эксперименте осуществлялся подбор уровня освещенности 3 клк, 7 клк и 14 клк суспензии при культивировании штамма на *среде Таммийя*. Из анализа графика на рис. 2.5 следует, что оптимальным уровнем освещенности является 14 клк ($250 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$), что позволяет штамму микроводоросли достичь стационарной фазы на седьмые сутки культивирования.

Экспериментальное исследование по определению температуры, показало, что максимальный прирост клеток штамма (51 млн кл/мл) наблюдался на восьмые сутки культивирования при температуре суспензии

30 °С (рис. 2.6). Анализ результатов эксперимента по подбору расстояния между элементами освещения для культивирования штамма микроводорослей показал, что уровень освещенности на глубине суспензии ≈ 40 см составляет всего лишь 7 % от величины освещенности на поверхности реактора (рис. 2.7). Поэтому необходимо обеспечить интенсивный барботаж суспензии в реакционном пространстве, чтобы все клетки достаточное время находились в области с высоким уровнем освещенности.

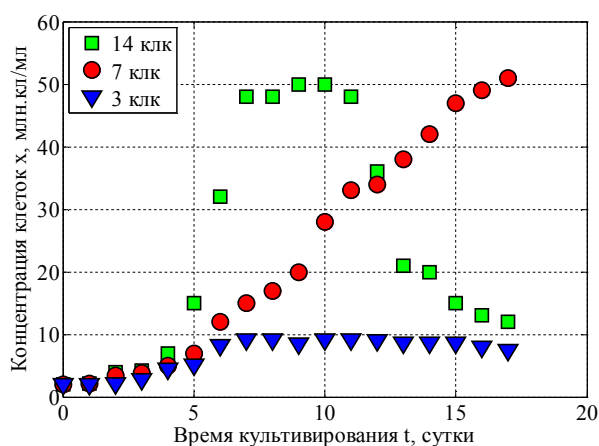


Рисунок 2.5 - Динамика прироста микроводорослей при различном уровне освещенности

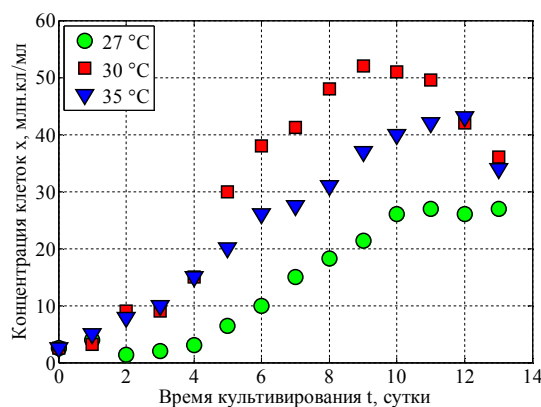


Рисунок 2.6- Динамика прироста микроводорослей в зависимости от температуры

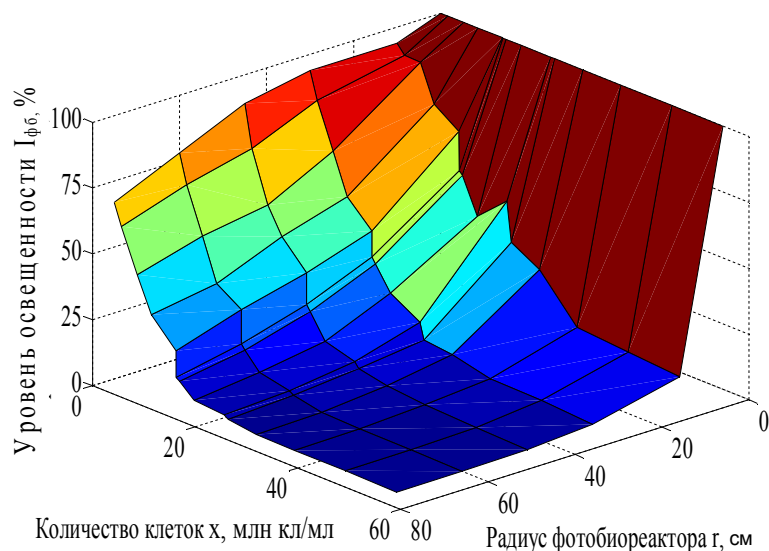


Рисунок 2.7 - Зависимость уровня освещенности от радиуса реактора и концентрации клеток в суспензии

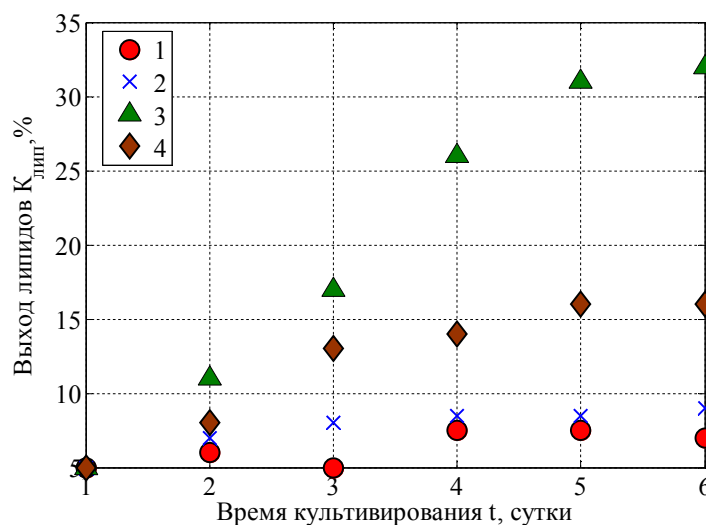


Рисунок 2.8 - Динамика накопления липидов после создания стресса:

1 – контрольный образец; 2 – добавлением хлорида натрия 2 г/л;

3 – дефицитом азота; 4 – освещенностью 32 клк

Далее проводился эксперимент по исследованию влияния стрессовых условий при культивировании *Chlorella vulgaris* на накопление внутриклеточных нейтральных липидов. В качестве стрессовых воздействий использовались: 1) добавление в суспензию хлорида натрия в концентрации 2 г/л; 2) поддержание дефицита азота в питательной среде на уровне 50–100 мг/л; 3) повышение уровня освещенности до 32 клк (что

соответствует режиму фотоокислительного стресса). По результатам эксперимента (рис. 2.8) можно сделать вывод о том, что наибольшая концентрация внутриклеточных липидов (до 31 % от сухого вещества) наблюдается в клетках, культивируемых в условиях дефицита азота (менее 100 мг нитрат-анионов/л суспензии), что в 7–8 раз выше по сравнению с контрольным образцом. Остальные виды стрессовых воздействий привели к незначительному увеличению содержания липидов по сравнению с контрольным образцом.

По результатам проведенных исследований был предложен способ культивирования микроводорослей, характеризующийся следующими условиями: начальная концентрация штамма составляет 2-4 млн. кл/мл; питательная среда Тамийя; температура 30 °С; уровень освещенности 14 клк (250 мкмоль фотонов/(м²·с); толщина слоя суспензии микроводорослей не более 0.4 м; время культивирования до стресса 7-8 суток до концентрации 50-55 млн. кл/мл; создание стрессовых условий в течение 6-7 суток путем создания дефицита нитрата калия (менее 100 мг нитрат-анионов/л суспензии).

2.1.2 Математическое моделирование кинетики процесса культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* с повышенным содержанием липидов

На основании проведенных экспериментальных исследований при разработке математической модели кинетики роста микроводорослей и накопления липидов внутри клетки приняты следующие допущения:

1. Процесс культивирования биомассы *Chlorella vulgaris* состоит из двух периодов: накопления клеток, в течение которого не происходит образование и накопления липидов; создания стрессовых условий, при которых происходит образование и накопление липидов.

2. Гидродинамический режим в рабочем объеме реактора близок к режиму идеального перемешивания, поскольку процесс культивирования осуществляется периодическим способом при интенсивной аэрации среды

газовоздушной смесью. Подвод пузырьков газовой смеси к клетке не затруднен.

3. Кислород, углекислый газ и соли питательной среды равномерно распределены по рабочему объему биореактора и их количества вполне достаточно для осуществления клетками процессов метаболизма.

4. Освещение в рабочем объеме реактора осуществляется равномерно.

5. Возраст клеток не учитывается при моделировании процесса образования липидов.

6. Основным лимитирующим субстратом являются азотсодержащие соли.

7. При создании стрессовых условий в питательной среде поддерживается низкая концентрация азотсодержащих солей.

8. Процесс культивирования осуществляется в интервале значений pH, оптимальных для накопления биомассы.

9. Процессы питания, фотосинтеза, размножения и другие происходят одновременно.

10. Влияния на скорость роста факторов освещения и концентрации азотсодержащих солей независимы друг от друга.

Структурная схема стадии интенсивного культивирования микроводорослей, представлена на рис. 2.9. Входные переменные включают T_k – температуру культивирования, S – количество азотсодержащего субстрата, I – уровень освещенности. К внутренним параметрам относятся K_s – константа полунасыщения по субстрату, K_{ing} – константа ингибирования по субстрату, K_I – константа полунасыщения по освещенности; μ – удельная скорость роста, E_n – емкость популяции. Выходные переменные включают: x – концентрация клеток микроводоросли в суспензии; c_{lip} – количество внутриклеточных липидов в биомассе клеток.

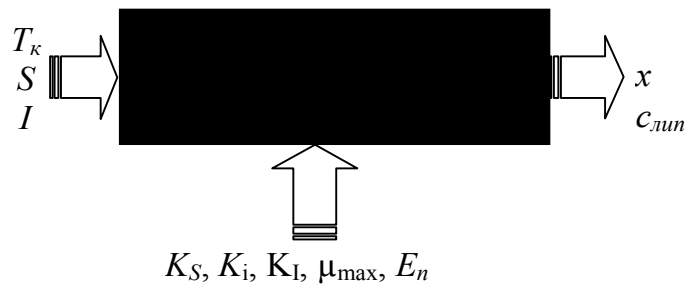


Рисунок 2.9 – Структурная схема стадии интенсивного культивирования микроводорослей

Экспериментально полученная зависимость накопления биомассы микроводорослей от времени культивирования представлена на рис. 2.10. Характер кинетической кривой соответствует логистическому уравнению Ферхюльста для ограниченного роста популяции:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \cdot \left(1 - \frac{x}{E_n}\right), \quad (2.1)$$

где x – концентрация биомассы клеток, млн кл./мл; μ – удельная скорость роста, 1/сут; E_n – емкость популяции, млн кл./мл.

Процесс убыли субстрата при периодическом культивировании микроводорослей описывается уравнением:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dc_{lip}}{dt} + m_s x, \quad (2.2)$$

где Y_{XS} – коэффициент, показывающий количество образующейся биомассы Δx при количестве затраченного субстрата ΔS за время Δt , рассчитывается по экспериментальным данным (млн кл·л)/(мл·г); Y_{PS} – коэффициент, показывающий количество образующихся липидов c_{lip} при количестве затраченного субстрата ΔS за время Δt , рассчитывается по экспериментальным данным; c_{lip} – количество липидов, %; m_s – коэффициент поддержания жизнедеятельности.

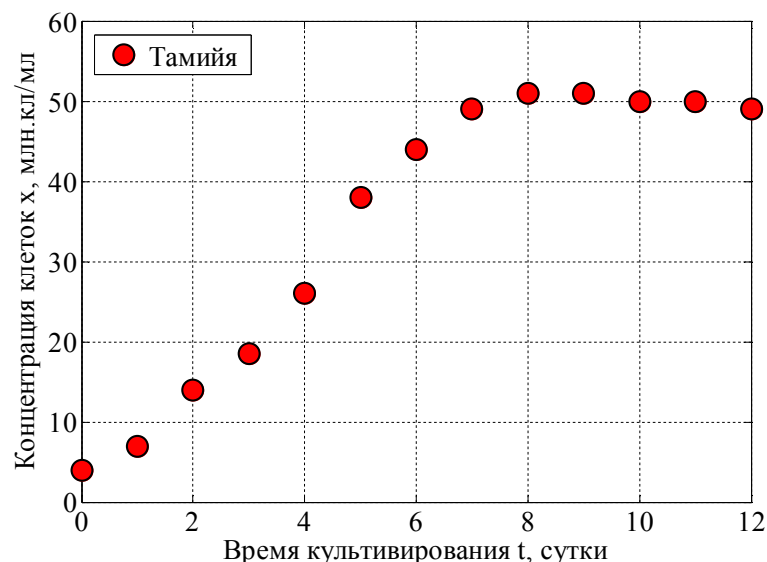


Рисунок 2.10 – Кинетическая кривая роста микроводорослей

В соответствии с допущением 7 расходование азотсодержащего субстрата не происходит при накоплении продуктов метаболизма, поэтому второе слагаемое из уравнения (2.2).

Для неэнергетических субстратов, таких как азот, $m_s = 0$. Таким образом, уравнение (2.2) преобразуется к виду (2.3):

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{xs}} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (2.3)$$

Количество образующихся липидов $c_{лин}$ пропорционально величине концентрации x накопленной биомассы микроводорослей. Для образования липидов необходимо создание стрессовых условий – пониженного содержания субстрата S (азотсодержащей соли), т.е. количество $c_{лин}$ должно быть пропорционально $1/S^r$, где r_s – коэффициент, характеризующий величину прироста липидов в зависимости от количества нитрат-анионов в суспензии. Концентрация биомассы микроводорослей x достигает максимального значения E_n , после чего дальнейший прирост прекращается. Можно предположить, что аналогичным образом будет прекращаться рост количества образующихся липидов. Максимально возможное количество липидов будет определяться величиной $c_{лин}^{(max)}$. С учетом вышесказанного,

уравнение для расчета количества образующихся липидов может быть записано в следующем виде:

$$\frac{dc_{\text{лин}}}{dt} = \frac{q_p}{S^{U_s}} \cdot x \cdot \left(1 - \frac{c_{\text{лин}}}{c_{\text{лин}}^{(\text{max})}} \right), \quad (2.4)$$

где q_p – величина, характеризующая максимальный прирост липидов в единицу времени, 1/сут; $c_{\text{лин}}^{(\text{max})}$ – максимальное количество накопленных липидов, %.

Коэффициенты, входящие в уравнения (2.1), (2.3), (2.4), определялись по экспериментальным данным. Величина максимальной емкости популяции $E_n=50$ млн кл/мл определялась из графика, представленного на рис. 2.10, и соответствовала максимальной концентрации клеток биомассы при использовании питательной среды Тамийя.

Факторы, в наибольшей степени, влияющие на величину удельной скорости роста μ : температура T_k , уровень освещенности I , концентрация азотсодержащих солей S , т.е.:

$$\mu = \mu(T_k, I, S)$$

Влияние каждого из факторов рассматривалось при фиксированных и оптимальных значениях других факторов. Были проведены экспериментальные исследования, по культивированию микроводоросли *Chlorella vulgaris* в питательных средах при различных значениях концентраций нитрата калия. [128].

Анализ графика, представленного на рис. 2.11, позволяет сделать вывод о том, что процесс ингибирования роста биомассы повышенными концентрациями субстрата S может быть описан уравнением Эндрюса:

$$\mu(S)_{I=\text{const}} = \mu_{\text{max}} \left(\frac{S}{K_s + S + S^2 / K_{\text{ing}}} \right), \quad (2.5)$$

где $\mu_{\text{max}} = 1.1 \text{ сут}^{-1}$ – максимальная удельная скорость роста микроорганизмов; S – количество субстрата (азотсодержащие соли), г/л; $K_s=1.06$ г/л – константа

полунасыщения; $K_{ing} = 8.4$ – константа ингибирования, г/л, $I=5600$ лк. Величины μ_{max} , K_s , K_{ing} определены с использованием методик [175].

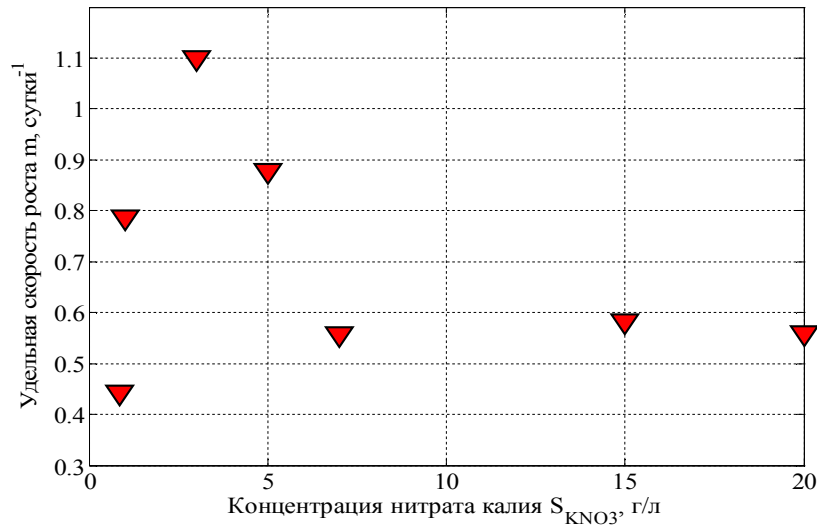


Рисунок 2.11 - Зависимость удельной скорости роста биомассы μ от количества субстрата S

Из параграфа 1.1 следует, что влияние уровня освещенности I на кинетику прироста микроводорослей (рис. 2.12) наиболее часто описывается уравнением Михаэлиса-Ментена:

$$\mu(I)_{S=\text{const}} = \mu_{\max} \left(\frac{I}{K_I + I} \right), \quad (2.6)$$

где $K_I = 15000$ лк – константа полунасыщения по освещенности.

В процессе культивирования микроводоросли от температуры T_K зависит максимальная удельная скорость роста μ_{\max} , входящая в формулы для расчета $\mu(S)_{I=\text{const}}$, $\mu(I)_{S=\text{const}}$. Величины K_s и K_{ing} в меньшей степени зависят от температуры T_K , поэтому формула для расчета максимальной удельной скорости роста μ_{\max} может быть записана в виде степенной зависимости от температуры культивирования T_K :

$$\mu_{\max}(T) = A_0 + A_1 \cdot T + A_2 \cdot T_K^2, \quad (2.7)$$

где $A_0 = -1,3 \cdot 10^3$, $A_1 = 8,6$, $A_2 = -0,01$, – коэффициенты.

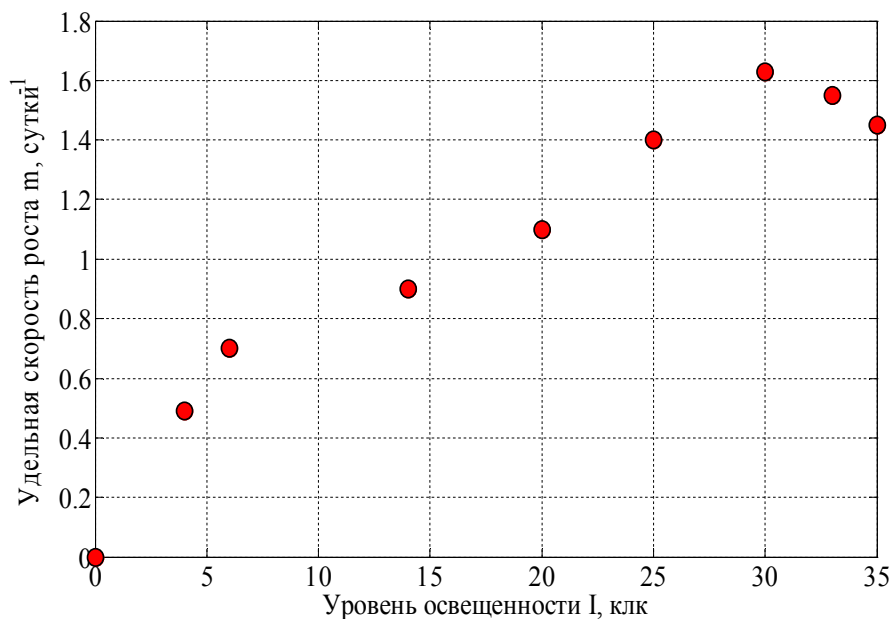


Рисунок 2.12 - Зависимость удельной скорости роста μ от освещенности I

В соответствии с допущением 10 принимаем зависимость удельной скорости роста от концентрации азотсодержащего субстрата и уровня освещенности в следующем виде:

$$\mu = 0,5 \cdot (\mu(S)_{I=\text{const}} + \mu(I)_{S=\text{const}}). \quad (2.8)$$

Величина Y_{XS} находится как среднее значение, полученное в результате обработки экспериментальных кривых накопления биомассы микроводорослей $x(t)$ и количества субстрата $S(t)$, по формуле:

$$Y_{XS} = \frac{x_n - x_0}{S_0 - S_n}, \quad (2.9)$$

где $0, n$ – номера первого и последнего дня эксперимента, $Y_{XS} = 6.05$ (млн кл· л)/(мл·г).

Величина удельной скорости биосинтеза продуктов q_p рассчитывалась по аналогии с формулой для расчета удельной скорости роста клеток по следующей формуле:

$$q_p = \frac{\ln(c_{\text{лин}})_n - \ln(c_{\text{лин}})_{n-1}}{S_n - S_{n-1}}. \quad (2.10)$$

Величины $q_p = 1.5$, $c_{\text{лин}} = 31\%$ и $r = 2$ определены в результате обработки экспериментальных данных кинетических кривых накопления липидов.

Решение системы обыкновенных дифференциальных уравнений (2.1), (2.3), (2.4) с найденными коэффициентами $E_n = 50$ млн кл/мл; $K_s = 1.06$ г/л; $K_{\text{инг}} = 8.4$ г/л; $K_I = 15000$ лк; $A_0 = -1.3 \cdot 10^3$, $A_1 = 8.6$, $A_2 = -0.01$; $Y_{XS} = 6.05$ (млн кл · л)/(мл · г); $q_p = 1.5$; $c_{\text{лин}} = 31\%$; $r = 2$ и начальными условиями $x(0) = 2$, $S(0) = 5$, $c_{\text{лин}}(0) = 4$ осуществлялось методом Рунге-Кутты четвертого порядка точности в среде *Matlab* (свидетельство № 2015617096). Результаты решения представлены на рис. 2.13 – 2.15.

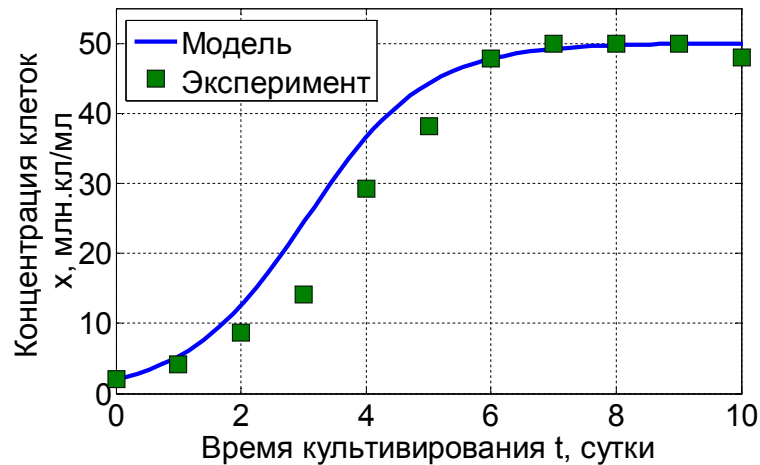


Рисунок 2.13 - Зависимость роста количества клеток микроводорослей x от времени культивирования t

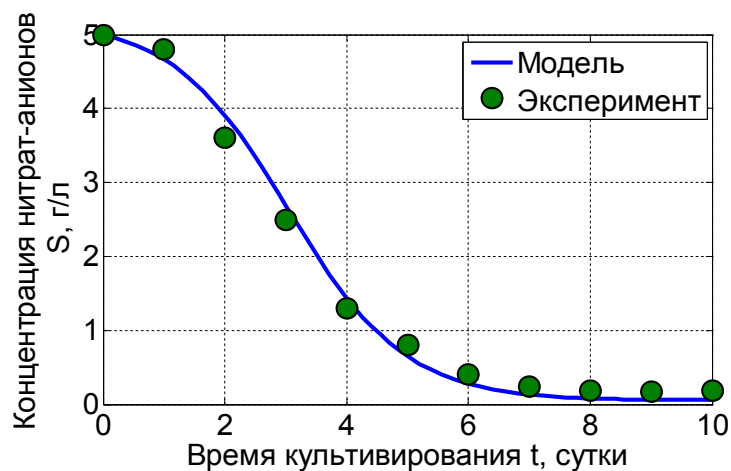


Рисунок 2.14 - Зависимость концентрации субстрата S от времени культивирования t

Анализ графиков на рис. 2.13-2.15 позволяет заключить, что максимальный прирост клеток наблюдается в первые 8 суток культивирования, а накопление внутриклеточных липидов в период с 8 по 14 сутки, после чего необходимо переходить к стадии разрушения клеток.

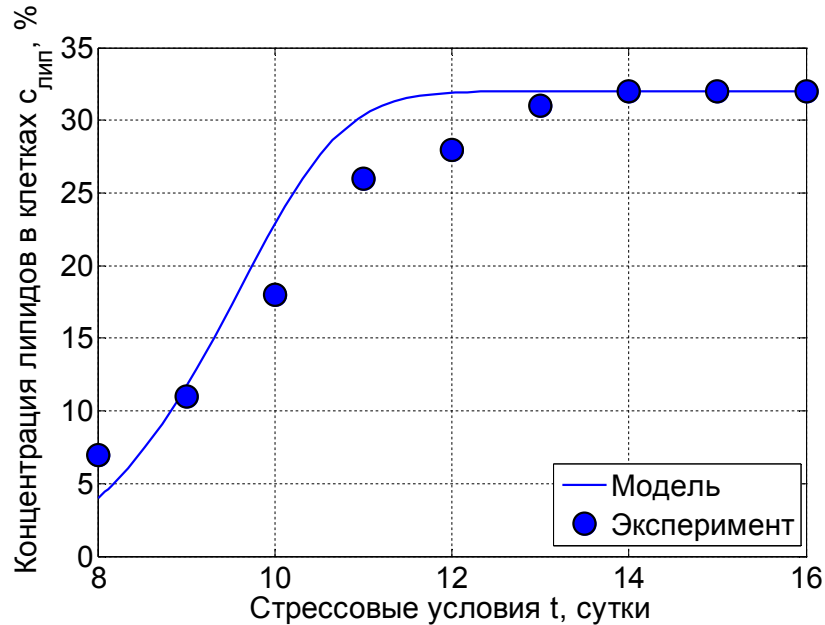


Рисунок 2.15 - Кривая зависимости изменения концентрации липидов в клетках $c_{лип}$ от времени создания стрессовых условий t

График, описываемый уравнением Эндрюса (рис. 2.11), имеет явный экстремум, который наблюдается на экспериментальной зависимости. По этой зависимости можно определить при каком количестве лимитирующего субстрата удельная скорость роста будет максимальной, используя необходимое условие экстремума функции, найдем производную функции $\mu(S)$ по переменной S и приравняем ее к нулю:

$$\frac{d\mu}{dS} = 0 = \mu_{\max} \frac{S \left(1 + 2 \frac{S^2}{K_i} \right) - \left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)^2},$$

$$S + 2 \frac{S^2}{K_i} - K_s - S - \frac{S^2}{K_i} = 0,$$

откуда:

$$S_{\text{opt}} = \sqrt{K_s K_i} = \sqrt{1.06 \cdot 8.4} = 3.2 \text{ г/л}.$$

С использованием рассчитанной концентрации нитрата калия в среде (3.2 г/л), используя соотношения макро и микроэлементов, предложенные в [23], определим состав оптимизированной среды (табл. 2.1).

Таблица 2.1 - Состав питательной среды для культивирования микроводорослей *Тамийя OPTIMUM*

Соль (макроэлементы)	Количество, г/л	Соль (микроэлементы)	Количество, г/л
KNO_3	3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.8
$NaH_2PO_4(KH_2PO_4)$	0.2 (0.22)	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.1
$MgSO_4$	0.125	$CuSO_4$	0.8
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.013	MoO_3	0.018
ЭДТА	0.044	H_3BO_3	0.28
		NH_4VO_3	0.023

Поэлементное сравнение питательных сред *Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM* представлено в табл. 2.2.

Таблица 2.2 - Поэлементное сравнение питательных сред *Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM*

Элемент	Минимальный уровень обеспеченности биомассы, мг/ л	Максимальный уровень обеспеченности биомассы, мг/л	Содержание элементов в среде Тамийя, мг/л	Содержание элементов в среде Тамийя OPTIMUM, мг/л
<i>N</i>	85	850	700	444
<i>P</i>	12	120	285	50
<i>K</i>	11	110	2294	1248
<i>Mg</i>	5	50	247	25
<i>S</i>	7	70	325	33.75
<i>Fe</i>	0.5	5	0.6	2.5
<i>Mn</i>	0.02	0.2	0.5	0.1
<i>Zn</i>	0.004	0.04	0.05	0.02
<i>Cu</i>	0.002	0.02	–	0.01
<i>Mo</i>	0.002	0.02	0.011	0.01
<i>B</i>	0.01	0.1	0.5	0.05

Из анализа составов сред следует, что новая питательная среда содержит в избытке всего один элемент – калий, в то время как среда *Тамийя* избыточна по семи элементам.

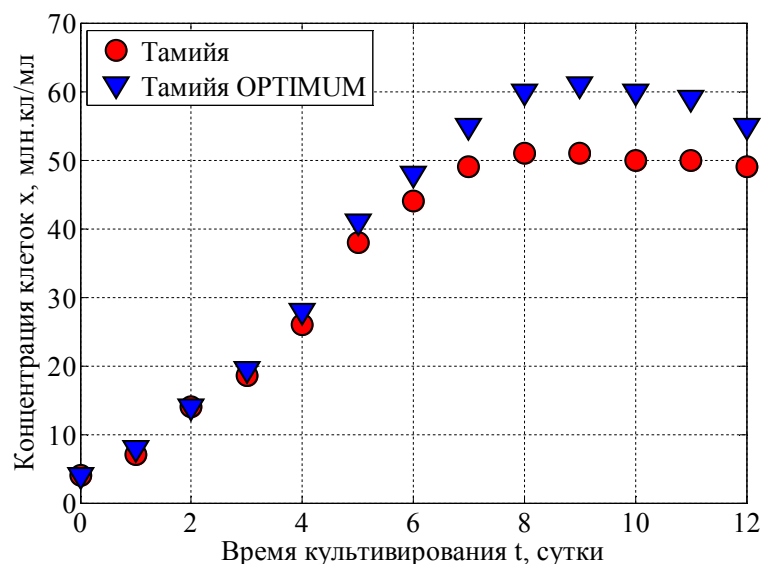


Рисунок 2.16 – Сравнение скоростей роста клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 на питательных средах *Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM*

Максимальная концентрация клеток микроводорослей на оптимизированной среде выше максимальной концентрации на питательной среде Тамийя на 9-14 % (рис. 2.16), при этом себестоимость одного кубического метра новой питательной среды в 1.92 раза ниже по сравнению со средой Тамийя [166-168].

2.2 Исследование свойств и режимов процесса концентрирования клеток биомассы микроводорослей из суспензии

Микроводоросли имеют маленький размер, их диаметр составляет 2...10 мкм. При гравитационном осаждении скорость осаждения можно найти по схеме $d \rightarrow Ar \rightarrow Re \rightarrow \omega_{oc}$ с использованием номограммы, описывающей зависимость критерия Рейнольдса от критерия Архимеда:

$$Ar = \frac{d^3 \cdot (\rho_{кл} - \rho_в) \cdot \rho_в \cdot g}{\mu_в^2}, \text{ где}$$

d - диаметр клетки, м.

Вычислим значение критерия Архимеда при заданных условиях: плотности клеток микроводоросли $\rho_{кл}=1.01 \text{ г / мл} = 1010 \text{ кг/м}^3$;

Плотность воды $\rho_в$ при температуре $20 \text{ }^\circ\text{C}$ $\rho_в = 998.2 \text{ кг/м}^3$; коэффициенте динамической вязкости $\mu_в$ воды при температуре $20 \text{ }^\circ\text{C}$ $\mu_в = 1004 \cdot 10^{-6} \text{ Па}\cdot\text{с}$: $Ar = 25 \cdot 10^{-9}$.

С помощью номограммы определили критерий Рейнольдса, т.е $Re < 0.2$.

При $Re < 0.2$ и $Ar < 33$ скорость осаждения частиц можно найти по закону Стокса:

$$\omega_{oc} = \frac{d^2 \cdot (\rho_к - \rho_с) \cdot g}{18 \cdot \mu_с} = \frac{(6 \cdot 10^{-6})^2 \cdot (1010 - 998.2) \cdot 9.8}{18 \cdot 1004 \cdot 10^{-6}} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ м/с} \approx 17 \text{ мм/сут.}$$

При больших объемах суспензии процесс гравитационного осаждения займет большое количество времени, поэтому для укрупнения осаждаемых частиц в суспензию добавляют флокулянты (0.4 – 2 % от твердой фазы). Для слипания клеток микроводорослей необходимо нейтрализовать отрицательный заряд, сосредоточенный на клеточной стенке, поэтому для экспериментального исследования был выбран катионный полиакриламидный флокулянт *Flopat FO 4550 SH*, а также, соли, имеющие большой положительный заряд катиона. Количество добавляемого коагулянта составляло 0.4 – 2 % от твердой фазы по рекомендациям работы [79, 163].

Эффективность осаждения оценивали по величине оптической плотности суспензии, взятой из средней части объема суспензии до и после добавления химических веществ, вызывающих осаждение клеток. Измерение оптической плотности производилось на фотоколориметре КФК 03-01 ($\lambda = 621$ нм). Степень осаждения S определялась по формуле:

$$S = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \cdot 100 \%,$$

где A_0 , A – оптическая плотность суспензии до и после обработки флокулянтами, коагулянтами или центрифугирования.

Цель эксперимента заключалась в подборе химического коагулянта или флокулянта, позволяющего осадить наибольшее количество клеток из суспензии микроводорослей.

Методика проведения эксперимента заключалась в следующем:

1. Суспензия микроводорослей одинаковой оптической плотности разливается в пробирки по 20 мл.
2. В пробирки добавляется химическое вещество - коагулянт в различной концентрации (см. табл. 2.3 и 2.4).
3. Через 24 часа производится оценка оптической плотности суспензии.

Результаты и условия эксперимента представлены в табл. 2.3, 2.4. Из анализа данных следует, что наилучший результат получен при добавлении к суспензии химических коагулянтов: 1) сульфата цинка, что позволило добиться осаждения 49% клеток; 2) гидроксида алюминия $\sim 70\%$ клеток. При этом качество суспензии резко снижалось, что затрудняло ее дальнейшую переработку. Выход липидов K_{lip} из биомассы микроводорослей после использования химических коагулянтов резко уменьшался (почти на порядок) по сравнению с контрольным образцом (4.5-5 %).

Таблица 2.3 - Результаты эксперимента по влиянию химических веществ на коагуляцию клеток микроводорослей

Добавляемое вещество	До эксперимента, A_0	После эксперимента, A	Описание изменений	Степень осаждения, %
1	2	3	4	5
Хлорид калия (0.5% от жидкой фазы)	1.661	0.517	Осадок темно-зеленого цвета (3 мм), надосадочная жидкость светло-зеленая, мутная, на поверхности хлопья	68.9
Щелочь (0.5% от жидкой фазы)	1.661	0.774	Осадок темно-зеленого цвета (2 мм), надосадочная жидкость мутно-зеленая, границы раздела фаз нет, на поверхности слой слипшихся клеток биомассы (12 мм) (общий слой жидкости 80 мм)	53.4
Уксусная кислота (0.5% от жидкой фазы)	1.661	0.751	Осадок темно-зеленого цвета (1 мм), надосадочная жидкость буро-зеленая, границы раздела фаз нет, наблюдается выделение газа (общий слой жидкости 75 мм)	54.8
Гашеная известь (0.5% от жидкой фазы)	1.661	0,621	Осадок зеленого цвета (2 мм), надосадочная жидкость мутная, нет четкой границы раздела фаз, наблюдается образование хлопьев на поверхности (общий слой жидкости 55 мм)	62.6
Перманганат калия (0.2н) (0.5% от жидкой фазы)	1.661	0.521	Осадок темно-зеленого цвета (4 мм), надосадочная жидкость светлая, четкой границы раздела фаз нет (общий слой жидкости 77 мм)	68.6
Квасцы (0.5% от жидкой фазы)	1.661	0.517	Осадок зеленого цвета (3 мм), надосадочная жидкость мутно-зеленая, на поверхности наблюдается образование скоагулированной биомассы	68.87

Добавление флокулянта позволяло получить агломераты микроводорослей диаметром 4 мм. При этом вязкость и плотность жидкой фазы значительно изменялись уже через 3 мин после внесения флокулянта в суспензию, в результате взаимодействия положительного заряженного катионного флокулянта с клеточными стенками микроводорослей, которые имеют на поверхности отрицательный заряд. Скорость осаждения таких агломератов в течение 3 мин определим по схеме $d \rightarrow Ar \rightarrow Re \rightarrow \omega_{oc}$.

Вычислим значение критерия Архимеда:

$$Ar = \frac{d^3 \cdot (\rho_c - \rho_c) \cdot \rho_c \cdot g}{\mu_c^2} = \frac{(4 \cdot 10^{-3})^3 \cdot (1010 - 998.2) \cdot 998.2 \cdot 9.8}{(1004 \cdot 10^{-6})^2} = 7.36 \cdot 10^3.$$

По номограмме определим критерий Рейнольдса $Re=20$. При $Re=20$ и $Ar=7360$ наблюдается переходный режим. В результате было установлено, что значение критерия Рейнольдса находим по формуле [79, 163]:

$$Re = 0.152 \cdot Ar^{0.715},$$

$$Re = 0.152 \cdot (7360)^{0.715} = 88,$$

откуда скорость осаждения рассчитывается как

$$\omega = \frac{\mu_c \cdot Re}{d \cdot \rho_c} = \frac{1004 \cdot 10^{-6} \cdot 88}{4 \cdot 10^{-3} \cdot 998.2} = 0.022 \text{ м/с}.$$

Далее, осаждение прекращалось в связи вследствие того, что плотность жидкой фазы (1200 -1500 кг/м³) превышала плотность клеток. Следовательно, для концентрирования агломератов требовалось введение дополнительной стадии центрифугирования при факторе разделения $F_r=500-600$. Таким образом, через 24 часа максимальная степень осаждения (87 %) наблюдалась при добавлении катионного флокулянта *Flopat FO 4550 SH* (при дальнейшем использовании центрифугирования).

Следующим проводился эксперимент по определению выхода липидов $K_{лип}$ из микроводорослей, сконцентрированных с помощью катионного флокулянта и центрифугирования при $F_r=500-600$. Экстракция липидов из микроводорослей проводилась этанолом и петролейным эфиром в

соотношении 1:2 (об.) при температуре 50 °С.

Таблица 2.4 - Результаты эксперимента по влиянию химических веществ на коагуляцию клеток микроводорослей

Вещество	Масса коагулянта, г	0 часов	24 часа	S, %
1	2	3	4	5
Контроль	–	0.772	0.708	8
$FeSO_4$	0.001	0.772	0.497	36
$FeSO_4$	0.004	0.772	0.825	–
$FeSO_4$	0.006	0.772	0.639	17
$FeSO_4$	0.009	0.772	1.096	–
Контроль	–	0.772	0.708	8
$CuSO_4$	0.011	0.772	0.682	12
$CuSO_4$	0.019	0.772	1.148	–
$CuSO_4$	0.024	0.772	0.870	–
$CuSO_4$	0.028	0.772	1.050	–
Контроль	–	0.772	0.708	8
$MgSO_4$	0.002	0.772	0.752	3
$MgSO_4$	0.005	0.772	0.560	27
$MgSO_4$	0.006	0.772	0.635	18
$MgSO_4$	0.008	0.772	0.456	41
Контроль	–	0.772	0.708	8
$ZnSO_4$	0.004	0.772	0.524	32
$ZnSO_4$	0.006	0.772	0.585	24
$ZnSO_4$	0.007	0.772	0.940	–
$ZnSO_4$	0.009	0.772	0.395	49
Контроль	–	0.278	0.157	43
Al_2O_3	0.001	0.278	0.108	61
Al_2O_3	0.003	0.278	0.115	58
Al_2O_3	0.006	0.278	0.116	60

Продолжение таблицы 2.4

1	2	3	4	5
Al_2O_3	0.009	0.278	0.082	71
Контроль	–	0.278	0.157	43
$Al(OH)_3$	0.001	0.278	0.075	73
$Al(OH)_3$	0.003	0.278	0.078	72
$Al(OH)_3$	0.006	0.278	0.084	70
$Al(OH)_3$	0.009	0.278	0.095	66
Контроль	–	0.278	0.157	43
$K_3[Fe(CN)_6]$	0.001	0.278	0.086	69
$K_3[Fe(CN)_6]$	0.003	0.278	0.067	76
$K_3[Fe(CN)_6]$	0.006	0.278	0.060	78
$K_3[Fe(CN)_6]$	0.009	0.278	0.067	76
Контроль	–	0.278	0.157	43
$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.001	0.278	0.089	68
$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.003	0.278	0.100	64
$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.006	0.278	0.077	72
$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0.009	0.278	0.149	46
Контроль	–	0.278	0.157	43
$K_3[Co(NO_2)_6]$	0.001	0.278	0.154	45
$K_3[Co(NO_2)_6]$	0.003	0.278	0.176	37
$K_3[Co(NO_2)_6]$	0.006	0.278	0.138	50
$K_3[Co(NO_2)_6]$	0.009	0.278	0.254	9
Контроль	–	0.278	0.157	43
<i>Flopat FO 4550 SH</i>	0.001	0.278	0.046	83
<i>Flopat FO 4550 SH</i>	0.003	0.278	0.038	86
<i>Flopat FO 4550 SH</i>	0.006	0.278	0.037	87
<i>Flopat FO 4550 SH</i>	0.009	0.278	0.053	81

Было определено, что при использовании для осаждения клеток флокулянта и центрифугирования выход липидов составил $K_{лип}=3.6\%$ что на 24 % ниже по сравнению с контрольным образцом $K_{лип}$ (микроводоросли, осажденные с помощью центрифуги).

Следующим проводился эксперимент, цель которого заключалась в подборе параметров центрифугирования, позволяющих осадить наибольшее количество клеток из суспензии микроводорослей без добавления флокулянта.

Методика проведения эксперимента заключалась в следующем:

1. Суспензия микроводорослей одинаковой оптической плотности разливается в стаканчики по 20 мл.
2. Клетки осаждаются из суспензии методом центрифугирования (см. табл. 2.5).
3. Производится оценка оптической плотности фугата и вычисляется степень осаждения.

Результаты и условия эксперимента представлены в табл. 2.5. После осаждения микроводорослей с помощью центрифугирования была проведена экстракция липидов из микроводорослей этанолом и петролейным эфиром в соотношении 1:2 (об.) при температуре экстракции 50 °С. Выход липидов составил $K_{лип}=5\%$, что в 1.4 раза выше по сравнению с выходом липидов при осаждении микроводорослей с использованием катионного флокулянта.

Таблица 2.5 - Влияние времени обработки на эффективность концентрирования биомассы

Параметры	Длительность центрифугирования, мин				
	3	4	5	8	10
A_0	0.626	0.626	0.626	0.626	0.644
A	0.112	0.143	0.178	0.101	0.049
x_0 , млн кл./мл	8.50	8.50	8.50	8.50	9.00
x , млн кл./мл	1.50	1.00	0.50	0.20	0.01
S , %	82.4	88.2	94.1	97.6	99.8

Из анализа данных эксперимента можно сделать следующий вывод: осаждение биомассы под действием центробежных сил ($F_r = 1000$ в течение 5 мин) является наиболее эффективным способом осаждения жизнеспособных клеток 99.5 % от исходного количества.

2.3 Исследование процесса разрушения клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Как следует из критического анализа параграфа 1.2.3 наиболее перспективными способами разрушения клеточной стенки данного вида микроорганизма являются: 1) воздействие СВЧ-излучения (наличие в клетке воды и полярных молекул); 2) использование ферментов, разрушающих гемицеллюлозу и пептидные связи белков - переносчиков; 3) воздействие кавитационных эффектов (местного понижения давления, вызывающего разрыв клеточной стенки); 4) воздействие антибиотика, нарушающего синтез хитиноподобного гликана; 5) «осмотический шок». В связи с этим целью исследования было определение наиболее эффективного способа разрушения клеточных стенок микроводорослей для интенсификации процесса извлечения липидов. Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи: 1) подбор оптимальных условий каждого способа разрушения; 2) сравнение альтернативных способов и выбор наиболее эффективного; 3) определение наиболее эффективного комбинированного способа дезинтеграции клеточных стенок.

Было проведено экспериментальное исследование по подбору условий различных способов разрушения клеток для интенсификации процесса экстракции липидов из микроводорослей. В качестве ферментных препаратов для разрушения клеток микроводорослей, были выбраны: ферментный комплекс «Целлолюкс А», содержащий в своем составе бета-глюканазу, ксиланазу, целлюлазу, альфа-амилазу (диффундирует к поверхности клетки и расщепляет гемицеллюлозу (рис. 2.18), входящую в состав матрикса клеточной стенки), и «Протосубтилин г3х» (расщепляет

высокомолекулярные белки, входящие в состав фосфолипидного бислоя 2 на рис. 2.17, а также белково-липидные комплексы, находящиеся в цитоплазме клетки).

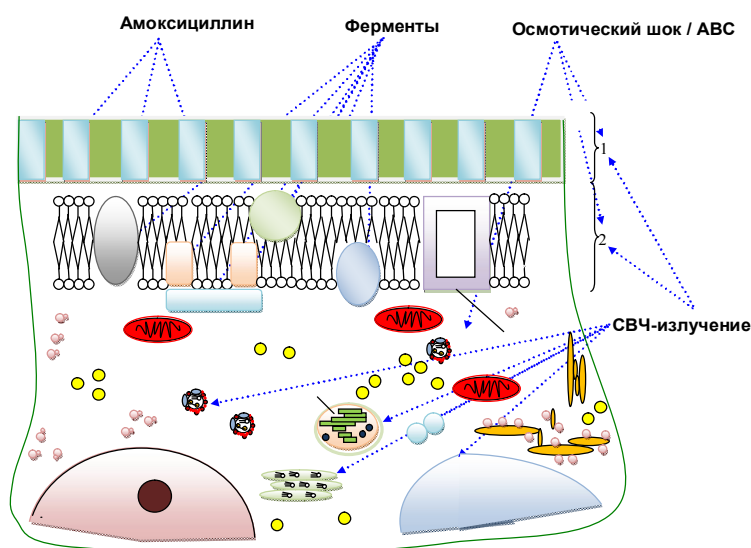


Рисунок 2.17 - Схема клетки микроводоросли

Для достижения поставленной цели по подбору оптимальных условий разрушения микроводорослей с помощью выбранных ферментов были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) обосновать увеличение выхода липидов после действия ферментов на микроводоросли;
- 2) подобрать соотношения выбранных ферментов, позволяющие извлечь максимальное количество липидов;
- 3) определить время воздействия смеси ферментов на клетки микроводорослей, которое позволит извлечь максимальное количество липидов.

Для проведения эксперимента по определению влияния воздействия ферментов на интенсификацию процесса экстракции липидов использовались микроводоросли влажностью 95 %; ферментные препараты целлюлолитического и протеолитического действия «Целлолюкс-А» и «Протосубтилин г3х». Количество ферментных препаратов выбиралось на основании нормы расхода из технических условий [171]. Дезинтеграция

клеточных стенок проводилась в следующих условиях: при температуре 50–55 °С в течение 25 мин. Затем проводилась экстракция органическими растворителями этанолом и петролейным эфиром в соотношении 1:2 (об.) в течение 24 ч. По результатам эксперимента можно сделать вывод, что выход липидов после обработки биомассы микроводорослей ферментами увеличился до 9 %, что в 1.8 раза выше по сравнению с контрольным образцом (5 %).

Для определения влияния соотношения 2-х ферментных препаратов на выход липидов проводилось экспериментальное исследование, в котором использовались микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР С-111 влажностью 95 %; ферменты целлюлолитического и протеолитического действия «Целлолюкс А» и «Протосубтилин г3х». Количество ферментных препаратов вносилось на основании нормы расхода из технических условий [171]. Дезинтеграция клеточной стенки проводилась при температуре 55 °С. Использовались следующие соотношения ферментных препаратов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин г3х»: образец №1 – 100 %:0 %, образец №2 – 75 %:25 %, образец №3 – 50 %:50 %, образец №4 – 25 %:75 %, образец №5 – 0 %:100 %. Затем проводилась экстракция органическими растворителями в течение 24 часов. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.18. Наибольший выход липидов 9 % наблюдался при воздействии на клетки ферментами, взятыми в соотношении 75 %:25 % (образец №2).

Эксперимент по определению оптимального времени воздействия ферментов, взятых в соотношении 75 % «Целлолюкса А» и 25 % «Протосубтилина г3х», проводился с использованием микроводорослей *Chlorella vulgaris* влажностью 95 %. Количество ферментных препаратов вносилось на основании нормы расхода из технических условий [171]. Дезинтеграция клеточных стенок проводилась при температуре 50-55 °С в течение времени: образец №1 – 1 мин, образец №2 – 5 мин, образец №3 – 10 мин, образец №4 – 15 мин и образец №5 – 20 мин. Затем проводилась экстракция органическими растворителями: этанолом-

петролейным эфиром в соотношении 1:2 (об.) в течение 24 ч. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.19. Анализ данных эксперимента позволяет сделать вывод, что максимальный выход липидов при их экстракции из микроводорослей наблюдался при воздействии ферментных препаратов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин г3х», взятых в соотношении 3 к 1 в течение 10 мин и составил 9 %.

Из анализа экспериментальных данных следует, что при использовании ферментных препаратов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин г3х» в соотношении 0.012 мг/мл – 0.004 мг/мл и выдержки 10 мин при температуре $T=50-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ выход липидов увеличивается в 1.8 раза по сравнению с контрольным образцом (целые микроводоросли).

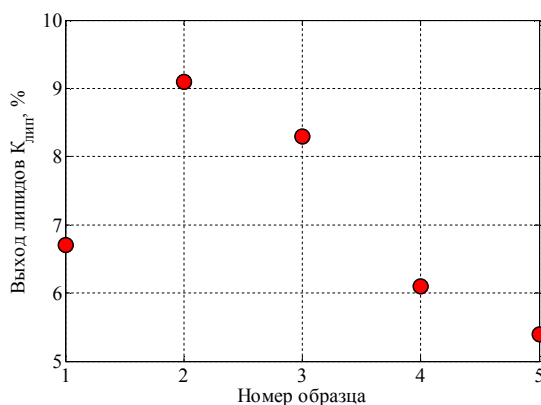


Рисунок 2.18 – Зависимость выхода внутриклеточных липидов от используемой смеси ферментов для разрушения клеток

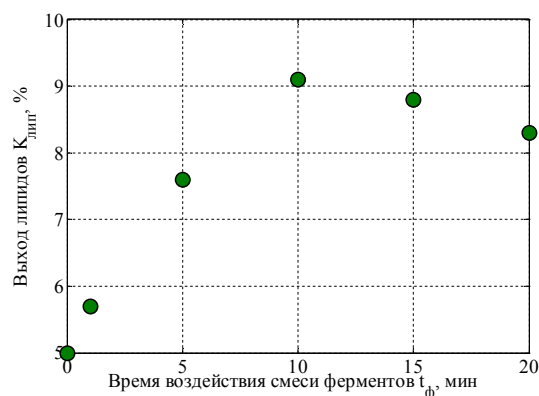


Рисунок 2.19 – Зависимость выхода внутриклеточных липидов от времени воздействия ферментного комплекса

Для экспериментального исследования разрушения клеточных стенок микроводорослей с помощью антибиотика была выбрана группа антибиотиков пенициллинов, поскольку антибиотики этой группы нарушают синтез хитиноподобного гликана, входящего в состав клеточной стенки *Chlorella vulgaris*. В этой группе для проведения экспериментов был выбран антибиотик «Амоксициллин», который имеет более высокую биодоступность по сравнению с пенициллином и ампициллином.

Целью экспериментального исследования являлось определение оптимальных условий воздействия антибиотика «Амоксициллин» на

клеточные стенки микроводорослей для интенсификации процесса экстракции липидов. Для достижения поставленной цели по подбору оптимальных условий разрушения микроводорослей с помощью выбранного антибиотика решались следующие задачи:

1) экспериментальное подтверждение факта увеличения выхода липидов после воздействия на микроводоросли антибиотиком;

2) подбор дозы антибиотика, которая позволит извлечь максимальное количество липидов;

3) определение времени воздействия антибиотика на клетки микроводорослей, позволяющее извлечь максимальное количество липидов.

В эксперименте по определению влияния воздействия «Амоксициллина» на интенсификацию процесса экстракции липидов использовались микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР С-111 влажностью 95 %; антибиотик «Амоксициллин», взятый в концентрации 5 мг/л суспензии. Антибиотик добавляли в суспензию. Суспензия выдерживалась 24 часа при температуре 20 °С. Затем проводили экстракцию липидов органическими растворителями этанолом-петролейным эфиром в соотношении 1:2 (об.) в течение 24 ч. По результатам эксперимента установлено, что выход липидов после обработки биомассы микроводорослей антибиотиком «Амоксициллин» увеличился до 9 %, что в 2 раза выше по сравнению с контрольным образцом (5 %).

Эксперимент по определению оптимальной дозы антибиотика для интенсификации процесса экстракции липидов проводился с использованием микроводоросли влажностью 95 %. Введение в суспензию раствора антибиотика «Амоксициллин» осуществлялось в виде мелкодисперсного порошка доз 1, 2, 3, 4, 5 и 7 мг/л суспензии соответственно. Суспензия выдерживалась 24 ч при температуре 20 °С. Затем проводилась экстракция липидов органическими растворителями: этанолом-петролейным эфиром в соотношении 1:2 (об.) в течение 24 ч. По результатам эксперимента установлено, что наибольший выход липидов наблюдался при добавлении к

суспензии порошка антибиотика «Амоксициллин» в концентрации 5 мг/л суспензии (рис. 2.20).

Далее определялось необходимое время воздействия антибиотика для достижения максимального выхода липидов. В эксперименте использовались микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР С-111 влажностью 95 %; антибиотик «Амоксициллин», взятый в концентрации 5 мг/л. Антибиотик добавлялся в суспензию. Суспензия выдерживалась от 1 до 24 часов при температуре 20 °С. Затем проводили экстракцию липидов органическими растворителями этанолом-петролевым эфиром в соотношении 1:2 (об.) в течение 24 ч. По результатам эксперимента установлено, что наибольший выход липидов наблюдался при времени воздействия антибиотика (5 мг/л) на клетки микроводоросли в течение 24 ч (рис. 2.21).

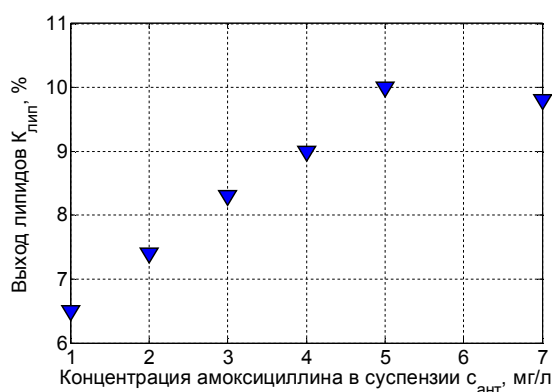


Рисунок 2.20 – Зависимость выхода липидов от концентрации антибиотика «Амоксициллин» в суспензии микроводорослей

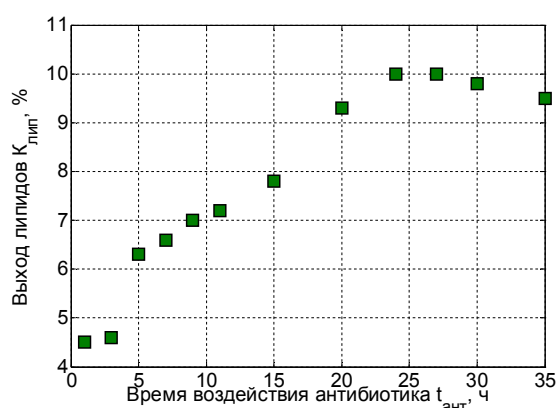


Рисунок 2.21 – Зависимость выхода липидов от времени воздействия антибиотика (5 мг/л)

По результатам проведенных исследований можно сделать следующий вывод: при использовании антибиотика «Амоксициллин» в концентрации 5 мг/л суспензии в течение 24 ч при температуре 20 °С выход липидов увеличивается в 2 раза по сравнению с контрольным образцом (целые микроводоросли).

СВЧ-излучение с частотой 2450 МГц – один из наиболее перспективных способов разрушения клеточных стенок *Chlorella vulgaris*, этот вид излучения оказывает комплексное воздействие на все компоненты

клеток, обладающих дипольным моментом (молекулы воды, полярные молекулы) или ионной проводимостью (ионы солей, растворенных в цитоплазме). Механизм воздействия заключается в выстраивании диполей или ионов по линиям внешнего электромагнитного поля [134]. При СВЧ - воздействии внешнее поле постоянно изменяет свое направление, в результате чего диполи перестраиваются и приходят в движение, что вызывает межмолекулярное трение и повышение температуры среды. Воздействие внешнего поля создает колебательные движения ионов, что приводит к столкновению их друг с другом и также к повышению температуры. В результате образуются микроскопические локальные центры перегрева вблизи молекул, которые обладают дипольным моментом или ионной проводимостью. Микроскопические центры перегрева вызывают образование водяного пара, увеличение внутриклеточного давления и разрыв клеточной стенки. В локальных центрах перегрева также возможна денатурация белковых молекул, нарушение целостности клеточной и субклеточных стенок из-за нарушения гидрофобных взаимодействий.

Цель экспериментального исследования заключалась в определении условий воздействия СВЧ-излучения на клеточные стенки микроводоросли с целью предварительной обработки сырья для последующей интенсификации процесса экстракции липидов. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) теоретическое обоснование и экспериментальное определение температурного режима обработки микроводорослей;
- 2) определение мощности СВЧ-излучения и времени обработки микроводорослей с учетом температурного режима обработки, позволяющих извлечь наибольшее количество липидов из микроводорослей.

В эксперименте использовались микроводоросли влажностью 98 %, СВЧ-излучение с мощностью излучения 280 Вт и частотой 2450 МГц, температура микроводорослей после предварительной обработки составляла

от 20 до 70 °С (рис. 2.22). Экстракцию липидов проводили органическими растворителями этанолом и петролейным эфиром в соотношении 1:2 (об.) в течение 24 ч. Наибольший выход липидов наблюдался при температуре пасты микроводорослей после предварительной обработки ≈50 °С.

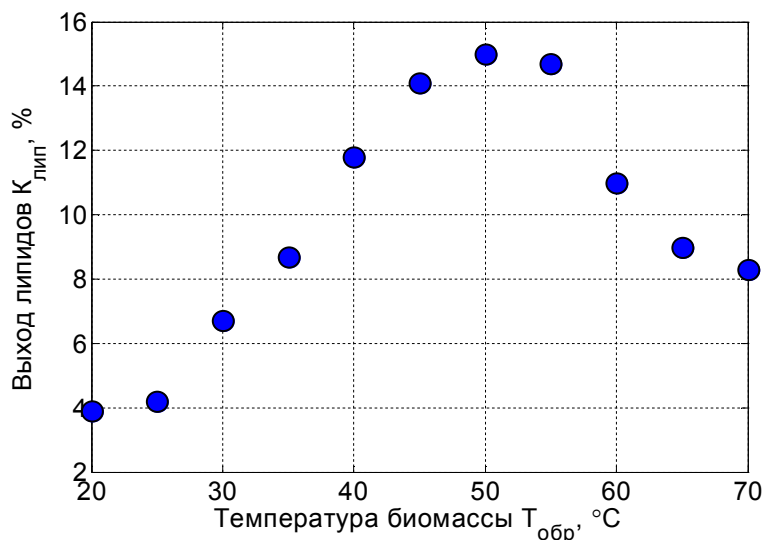
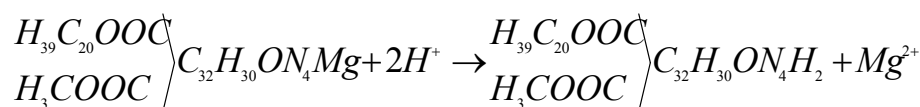


Рисунок 2.22 - Зависимость выхода липидов от температуры пасты микроводорослей после предварительной обработки СВЧ-излучением

В процессе разрушения клеточной стенки с помощью СВЧ-излучения возможно окисление липидов. Активация окисления липидов может наблюдаться: 1) при разрушении вакуолей и пероксисом, в результате чего клеточный сок, содержащий органические кислоты, выходит в цитоплазму; 2) при разрушении хлорофилла с образованием феофитина при повышении температуры выше 50-55 °С [137]; при этом ионы магния в молекуле хлорофилла замещаются двумя молекулами водорода кислот клеточного сока, которые поступают в цитоплазму из вакуолей и разрушаются при повышении температуры. Образовавшиеся в результате активные ионы меди или магния – катализаторы окисления;



3) из-за разрушения термолабильных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, которая разрушается при воздействии ионов металлов.

Все эти факторы стимулируют окисление липидов, поэтому можно сделать предположение, что количество сообщенной энергии 1 молю пасты влажностью 98-99 % не должно превышать 6 кДж/моль, а температура пасты не должна превышать 50-55 °С .

Энергия, которая была сообщена 1 см³ пасте влажностью 98 % за 1 с при воздействии СВЧ-излучения, рассчитывалась по формуле:

$$W = (E^2 \cdot \varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \omega \cdot \operatorname{tg}(\delta)) / (4 \cdot \pi), \quad (2.11)$$

где E – напряженность поля СВЧ-излучения, В/м; ε – относительная диэлектрическая проницаемость материала ($\varepsilon = 80$); ε_0 – абсолютная диэлектрическая проницаемость, Ф/м ($\varepsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м); ω – угловая частота СВЧ-излучения, Гц; $\operatorname{tg}(\delta)$ – тангенс угла диэлектрических потерь для вещества материала ($\operatorname{tg}(\delta) = 0.1$ [139, 140]). При этом, $\omega / 2 \cdot \pi = 2.45 \cdot 10^9$ Гц, $E = 8500$ (В/м) при $P = 280$ Вт [141].

Таким образом, мощность, которая будет рассеиваться в единице объема пасты влажностью 98%, будет равна:

$$W = (E^2 \cdot \varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \omega \cdot \operatorname{tg}(\delta)) / (4 \cdot \pi) = (8500)^2 \cdot 80 \cdot 8.85 \cdot 10^{-12} \cdot 2.45 \cdot 10^9 \cdot 0.1 \cdot 0.5 = 6.3 \frac{\text{Вт}}{\text{см}^3}.$$

В течение 30 с воздействия СВЧ-излучения на 1 см³ пасты получит энергию $6.3 \cdot 30 = 189$ Дж. Учитывая, что в пасте объемом 1 см³ (≈ 1 г) содержится 98 % - воды, 2 % - биомассы, то количества вещества воды составит $n_{\text{воды}} = 0.054$ моль, а количества вещества биомассы микроводорослей $n_{\text{биомассы}} = 0.02 / 24.6 = 0.001$ моль, отсюда рассчитаем общее количество вещества воды и биомассы $n_{\text{общ}} = 0.054 + 0.001 = 0.055$ моль. Тогда каждый моль пасты микроводорослей в течение 30 с воздействия СВЧ-излучения мощностью 280 Вт и частотой 2450 МГц получает 0.189 кДж / 0.055 моль = 3.4 кДж/моль энергии, учитывая потери на теплопередачу окружающему воздуху от образца в количестве 0.0065 Вт, на тепловое излучение - 0.06 Вт, общие потери за 1 с будут равны 0.067 Вт, а в течение 30 с потери составят $0.067 \cdot 30 = 2.01$ Дж. Таким образом, объему пасты

микроводорослей 1 см^3 сообщится 187.0 Дж . С учетом вышеназванных потерь каждый моль пасты микроводорослей за 30 с воздействия СВЧ-излучения мощностью 280 Вт и частотой 2450 МГц получает $0.187 \text{ кДж}/0.055 \text{ моль} = 3.39 \text{ кДж/моль}$ энергии. На рис. 2.24 представлены графики зависимостей количества энергии, полученной одним молем пасты микроводорослей от времени СВЧ-воздействия мощностью $280\text{-}700 \text{ Вт}$ в течение $30\text{-}330 \text{ с}$ посчитано с помощью программы пакета *Matlab* [160].

Количество энергии, которое получит каждый моль пасты микроводорослей при СВЧ-воздействии мощностью $280\text{-}700 \text{ Вт}$ в соответствии с расчетами по формуле (2.11).

Анализ графика на рисунке 2.23 показывает, что для обработки пасты необходимо использовать СВЧ-излучение мощностью $280\text{-}420 \text{ Вт}$.

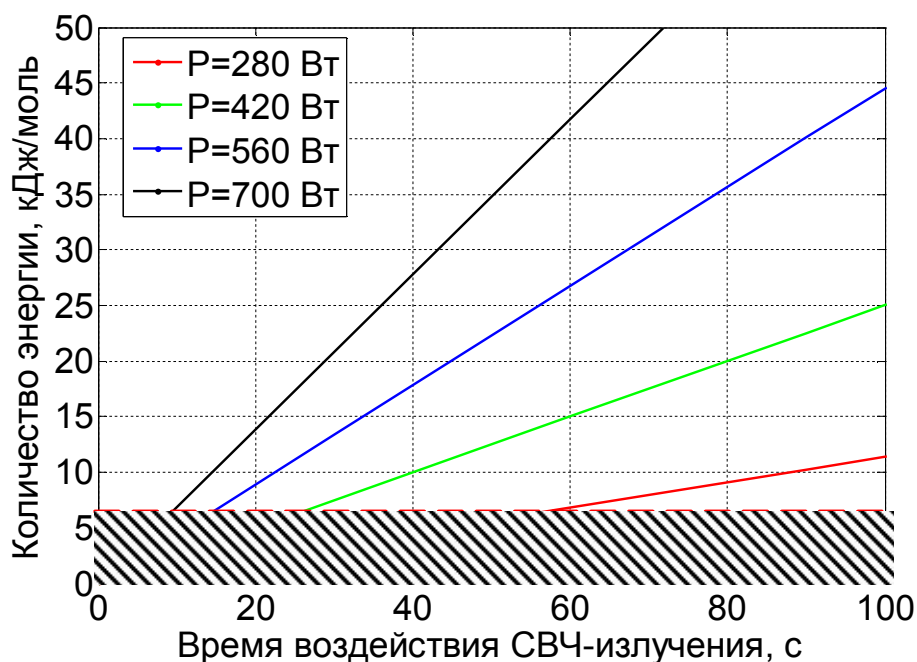


Рисунок 2.23 – Зависимость поглощенной пастой микроводорослей энергии от длительности воздействия СВЧ-излучения

Данные об изменении температуры пасты микроводоросли в зависимости от мощности СВЧ-излучения и времени обработки представлены в табл. 2.6 (при начальной температуре пасты микроводорослей $16 \text{ }^\circ\text{C}$).

Таблица 2.6 – Зависимость температуры биомассы микроводорослей от мощности СВЧ-излучения и времени обработки

Время τ , с	Мощность P , Вт			
	280	420	560	700
10	21.7 °C	22.7 °C	24.4 °C	25.8 °C
20	30.7 °C	32.7 °C	38.5 °C	39.6 °C
30	32.7 °C	41.8 °C	44.5 °C	51.1 °C
40	41.1 °C	53.7 °C	56.3 °C	60.5 °C
50	51.6 °C	54.8 °C	58.8 °C	-

Из анализа экспериментальных данных по разрушению клеток с помощью СВЧ-излучения различной мощности следует, что температура микроводоросли после обработки СВЧ-излучением не должна превышать 50-55 °C, наибольший выход липидов достигается при СВЧ-излучении мощностью 280 – 420 Вт в течение 35-45 с (рис. 2.24).

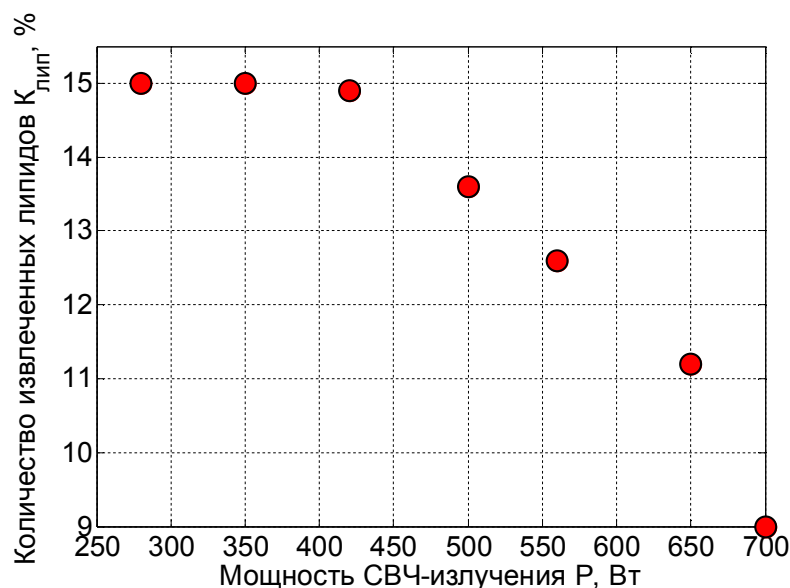


Рисунок 2.24 - Зависимость выхода липидов от мощности СВЧ-излучения

Это можно объяснить тем, что сообщение большего количества энергии в единицу времени приводит к микроскопическим перегревам, что способствует локальному повышению температуры и стимулированию окислительных процессов.

Для экспериментального исследования разрушения клеточных стенок микроводорослей с использованием кавитационных эффектов и электромагнитного поля использовался аппарат с вихревым слоем (АВС)

ферромагнитных частиц. Воздействие вихревого слоя ферромагнитных частиц на клетки пасты микроводорослей возникает в результате хаотичного движения ферромагнитных частиц (в жидкости возникают явления гидродинамической кавитации) и влияния переменного электромагнитного поля на клетки микроводоросли.

Проводились эксперименты по определению оптимального времени воздействия вихревого слоя ферромагнитных частиц в течение 5–35 с. При увеличении времени воздействия вихревого слоя ферромагнитных частиц свыше 35 с наблюдалось увеличение температуры суспензии выше 55 °С. Параметры обработки во всех экспериментах составляли: начальная температура суспензии 20 °С, соотношение длины и диаметра ферромагнитных частиц $l/d_{\text{ч}}=12$, коэффициент заполнения аппарата $\nu=0.9$.

Максимальный выход липидов $K_{\text{лип}} = 12\%$ при минимальных энергозатратах наблюдался при воздействии вихревого слоя в течение 15 с (рис. 2.25).

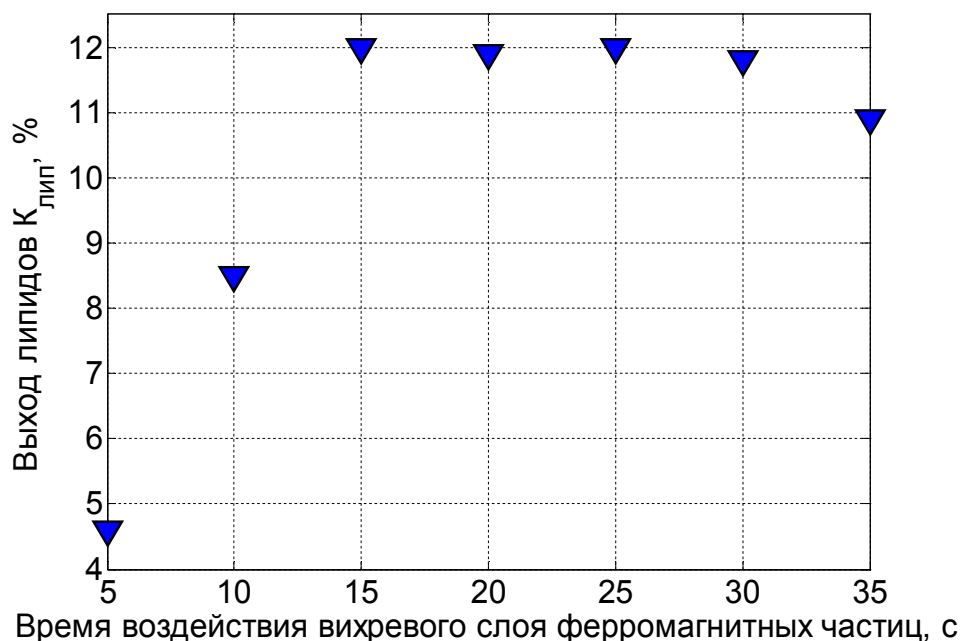


Рисунок 2.25 - Зависимость количества извлеченных липидов от времени воздействия вихревого слоя ферромагнитных частиц

Для экспериментального исследования разрушения клеточных стенок микроводорослей с использованием механизма «осмотического шока»

использовался раствор хлорида натрия. При добавлении к суспензии микроводорослей 15 % (мас.) раствора хлорида натрия создается высокое осмотическое давление, в клетках наблюдается явление плазмолиза - выхода воды из клетки в суспензию для понижения осмотического давления. Затем, через 24 ч производилось понижение осмотического давления разбавлением суспензии водой в 10-15 раз, что приводило к возникновению явления, противоположного плазмолизу, плазмоптизу, которое характеризуется поступлением воды внутрь клетки для выравнивания осмотического давления. Избыточное поступление воды внутрь клетки приводит к разрыву клеточной стенки [91]. Выход липидов $K_{лип}$ при разрушении клеточных стенок с использованием процесса «осмотического шока» составлял 7 %.

Сравнение всех способов разрушения клеточных стенок микроводорослей в оптимальных условиях осуществлялось с помощью расчета количества разрушенных и целых клеток, находящихся в суспензии после дезинтеграции клеток микроводорослей, также с помощью дальнейшей экстракции липидов из обработанных микроводорослей.

Анализ состояния клеток после обработки позволил выделить три группы клеток, изображенных на рис. 2.26, 2.27: 1) целые - *A*; 2) утратившие жизнеспособность, но сохранившие форму - *B*; 3) разрушенные клетки - *C*.

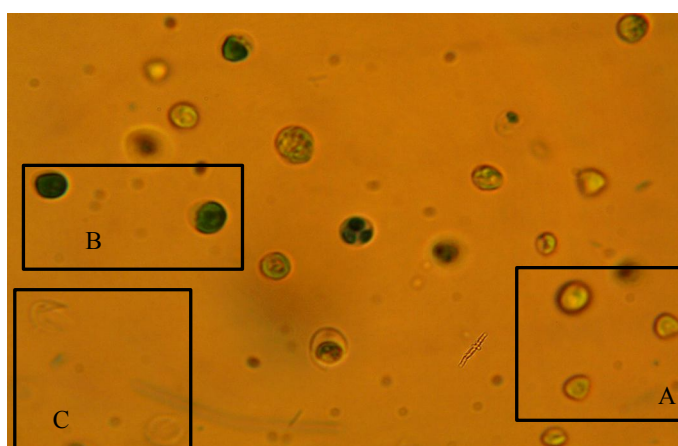


Рисунок 2.26 - Микроскопия клеток *Chlorella vulgaris* после воздействия повреждающего фактора

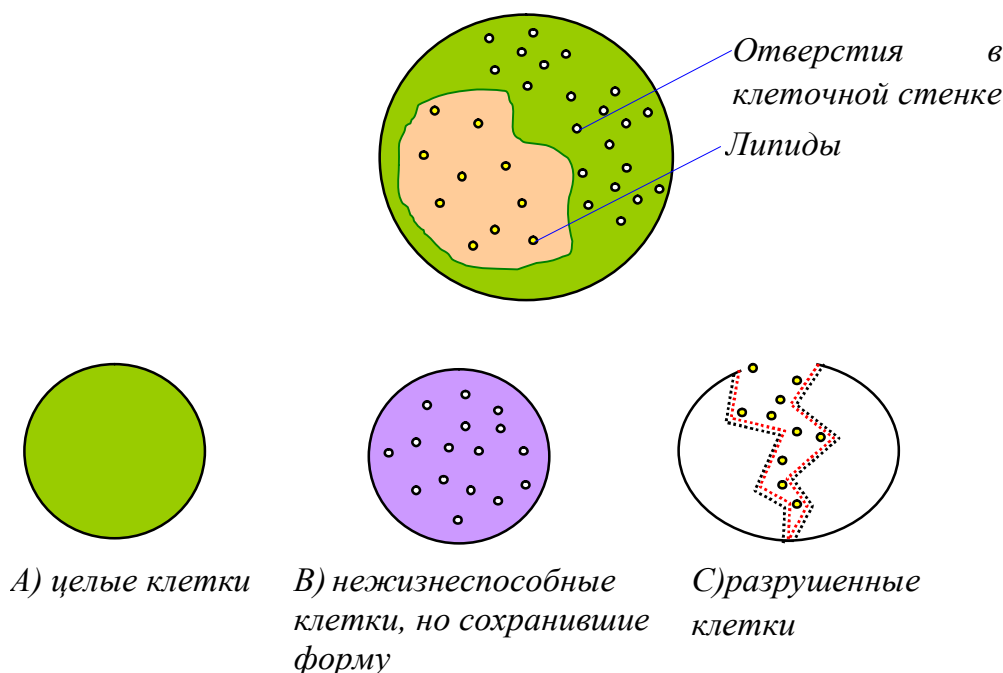


Рисунок 2.27 – Классификация клеток *Chlorella vulgaris* после разрушения

По результатам измерений наименьшее количество клеток осталось целыми при обработке микроводорослей СВЧ-излучением (табл. 2.7), поэтому можно сделать вывод, что это наиболее эффективный способ разрушения клеточных стенок *Chlorella vulgaris*. Комплексное воздействие СВЧ-излучения на все структуры клетки вызывает гибель наибольшего количества клеток - 60 %.

Таблица 2.7 - Соотношение различных видов клеток в биомассе микроводорослей после воздействия различных способов разрушения

Способ разрушения	Целые клетки (А), %	Погибшие, но сохранившие форму клетки (В), %	Разрушенные клетки (С), %
СВЧ-излучение	40.0	32.0	28.0
Ферменты	81.0	10.0	9.0
АВС	79.0	12.0	9.0
Осмотический шок	76.1	17.9	6.0
Амоксициллин	88.6	5.4	6.0

Эффективность воздействия СВЧ-излучения на микроводоросли подтверждается дальнейшей экстракцией липидов из клеток. Для данного эксперимента использовались микроводоросли, выращенные в стрессовых

условиях при дефиците азотсодержащих веществ в течение трех суток. Затем микроводоросли (60 млн кл/мл) концентрировались с помощью центрифугирования и определялось содержание сухих веществ, которое составило 3.5 % (мас.). Полученные клетки подвергались воздействию различных факторов, вызывающих дезинтеграцию клеточных стенок. После этого к микроводорослям добавляли смесь экстрагентов: этанол и петролейный эфир 1:2 (об.), экстракция проводилась настаиванием в течение 24 ч. Через 24 ч экстрагент с извлеченными веществами отфильтровывался от клеток и полученные экстракты подвергались анализу. На первом этапе проводился анализ по качественному определению липидов в экстрактах с помощью метода тонкослойной хроматографии (рис. 2.28). По результатам обработки трека была получена хроматограмма, при анализе которой можно выделить пик при $R_f = 0.30...0.35$, который соответствует триацилглицеридам [131]. Таким образом, доказано, что в экстракте присутствует целевой продукт.

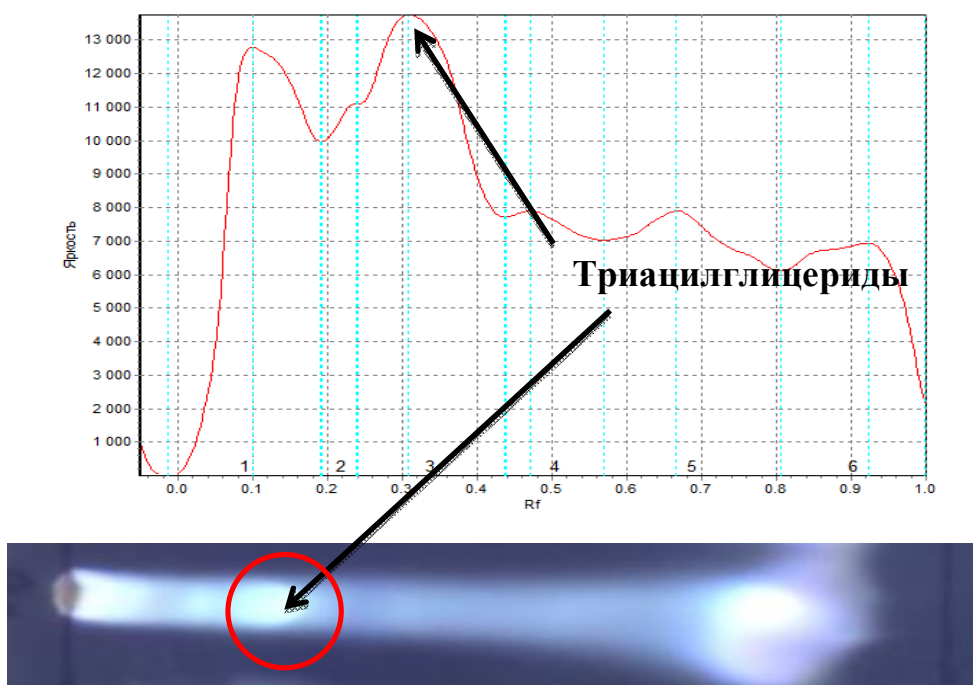


Рисунок 2.28 - Хроматограмма экстракта из биомассы, обработанной СВЧ-излучением

В экстрактах были обнаружены вещества, представленные в табл. 2.8.

Таблица 2.8 - Результаты анализа экстрактов с помощью метода тонкослойной хроматографии

Пик	Фактор удерживания R_f	Описание
1	0.1	Стерины
2	0.24	Кофермент Q
3	0.31	Триацилглицериды
4	0.47	Витамин K
5	0.67	Метилловые эфиры жирных кислот
6	0.92	Сквален

Количественное содержание в экстрактах липидов определялось с помощью метода Цоллнера–Кирша [132]. По результатам эксперимента можно сделать вывод, что наибольший выход липидов наблюдался при разрушении клеточных стенок с помощью СВЧ-излучения (табл. 2.9).

Таблица 2.9 - Результаты экстракции липидов в зависимости от способа разрушения клеток *Chlorella vulgaris*

Метод разрушения	Выход липидов, %
Антибиотик	10.0
Ферменты	9.0
СВЧ-излучение	15.0
АВС	12.0
«Осмотический шок»	7.0

Анализ результатов эксперимента по разрушению клеток с помощью химических и физических способов разрушения позволяет предположить, что перспективным может быть комплексное воздействие этих способов на клеточную стенку. Ослабление клеточной стенки с помощью антибиотика «Амоксициллин», смеси ферментов или «осмотического шока» должно привести к усилению воздействия СВЧ-излучения или вихревого слоя ферромагнитных частиц из-за ослабления или разрушения химических связей между компонентами клеточной стенки.

Для оценки влияния воздействия на клеточную стенку двух видов разрушения был проведен эксперимент по комплексному разрушению клеточных стенок микроводорослей влажностью 98 %. Эксперимент был спланирован и осуществлен по схеме, представленной в табл. 2.10. Экстракция липидов из обработанных микроводорослей проводилась смесью экстрагентов: этанол и петролейный эфир 1 : 2 (об.) в течение 24 ч

настаиванием. Через 24 ч экстрагент с извлеченными веществам отфильтровывался от клеток и полученные экстракты подвергались анализу.

Таблица 2.10 – Схема комбинированных способов разрушения клеток

№ образца	1 способ дезинтеграции	2 способ дезинтеграции
1	Ферменты	СВЧ-излучение
2	Амоксициллин	СВЧ-излучение
3	Осмотический шок	СВЧ-излучение
4	Вихревой слой (АВС)	СВЧ-излучение
5	Вихревой слой (АВС)	Осмотический шок
6	Вихревой слой (АВС)	Амоксициллин
7	Вихревой слой (АВС)	Ферменты
8	-	-

Результаты эксперимента представлены в табл. 2.11.

Таблица 2.11 - Результаты по экстракции липидов в зависимости от способа разрушения клеток *Chlorella vulgaris*

Способ	<i>Chlorella vulgaris</i> ИФР № С-111							
Без разрушения	-	-	-	-	-	-	-	-
Осмотический шок	-	-	+	-	+	-	-	-
Ферменты	+	-	-	-	-	-	+	-
Амоксициллин	-	+	-	-	-	+	-	-
Вихревой слой (АВС)	-	-	-	+	+	+	+	-
СВЧ-излучение	+	+	+	+	-	-	-	-
Выход липидов $K_{лип}$, %	23.0	21.0	18.1	18.0	17.8	17.5	17.5	5.0

Из анализа экспериментальных данных следует, что для максимального извлечения внутриклеточных липидов необходимо использовать комплексное воздействие смеси ферментов «Целлолюкс А» – «Протосубтилин г3х», взятых в соотношении 0.012 мг/мл : 0.004 мг/мл при выдержке в течение 10 мин при температуре 50–55 °С и СВЧ-излучения мощностью 280-420 Вт и с частотой 2450 МГц. Выход внутриклеточных липидов при комплексном воздействии составил 23 %, что в 1.5 раза выше по сравнению с изолированным воздействием СВЧ-излучения.

Выводы по главе 2:

По результатам теоретических и прикладных исследований механизмов и кинетики, свойств и режимов технологического процесса подготовки и предварительной обработки сырья можно сделать следующие выводы:

1. Культивирование клеток микроводоросли необходимо проводить при следующих условиях: начальная концентрация клеток микроводоросли составляет 2–4 млн кл/мл, в качестве питательной среды следует использовать оптимизированную среду *Тамийя OPTIMUM* при температуре 30 °С; интенсивность света должна составлять ≈ 250 мкмоль фотонов/(м²·с); толщина слоя суспензии не должна превышать 0.4 м; необходимо поддерживать стрессовые условия путем создания дефицита нитрата калия менее 100 мг нитрат-анионов/л суспензии, начиная с 7–8-х суток культивирования в течение 6–7 суток.

2. Концентрирование микроводорослей необходимо осуществлять центрифугированием суспензии ($F_r = 1000$ в течение 5 мин) для получения пасты микроводорослей влажностью 95–99.5 %.

3. Один кубический сантиметр пасты микроводорослей влажностью 98 % должен получить 0.187 кДж/см³ энергии за один период обработки СВЧ-излучением. При этом температура пасты после обработки не должна превышать 50–55 °С для того, чтобы не допустить окисления липидов. Проводить процесс дезинтеграции клеток необходимо с помощью СВЧ-излучения мощностью 280–420 Вт.

4. Разрушение клеточных стенок необходимо проводить комплексным воздействием смеси ферментов «Целлолюкс А– Протосубтилин ГЗх», взятых в соотношении 0.012 мг/мл – 0.004 мг/мл и выдержке в течение 10 мин при температуре 50–55 °С и СВЧ-излучения мощностью 280–420 Вт и с частотой 2450 МГц. При этом выход липидов достигает 23 %, что в 5.75 раз выше по сравнению с контрольным образцом (целые клетки).

5. Разработана математическая модель и экспериментально определены кинетические коэффициенты процесса культивирования микроводорослей.

6. Разработан способ культивирования *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 для получения сырья с повышенным содержанием липидов (патент РФ № 2569149).

Глава 3. Теоретические и прикладные исследования свойств и режимов технологического процесса экстракции и этерификации липидов

Согласно сформулированным заданиям диссертационной работы в параграфе 1.4 в главе 3 проводится исследование свойств, кинетики, механизмов, системных связей и закономерностей осуществления процессов экстракции и этерификации внутриклеточных липидов в производстве ЭЖК из микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Описываются результаты комплекса выполненных теоретических и экспериментальных исследований:

1) оптимальных условий проведения процесса экстракции при которых достигается максимальный выход внутриклеточных липидов: типа экстрагентов, температуры процесса, соотношения биомассы микроводорослей и смеси экстрагентов, влажности растительного сырья;

2) математического моделирования кинетики процесса экстракции внутриклеточных липидов;

3) оптимальных условий проведения процесса этерификации: температуры, соотношения липидов и этанола, вид и количество вносимого катализатора, при которых достигается максимальный выход ЭЖК.

3.1 Процесс экстракции внутриклеточных липидов из микроводоросли *Chlorella vulgaris*

В данном параграфе описаны результаты решения следующих задач:

1) экспериментального определения влажности растительного сырья, при которой достигается максимальный выход липидов при их экстракции из клеток;

2) теоретического обоснования и экспериментального подтверждения выбора типа экстрагентов, с помощью которого можно извлечь максимальное количество липидов из клеток;

3) определения технологических условий, при которых наиболее экономично проводить процесс экстракции липидов (температуры экстракции и соотношения биомассы и экстрагентов с учетом

экономического критерия).

С целью определения целесообразности введения стадии сушки пасты микроводорослей после стадии центрифугирования был проведен эксперимент, в котором было взято четыре образца микроводорослей по 50 мл с влажностью 99.7 %. Образцы концентрировали методом центрифугирования в течение 5 минут при $F_r=1000$. Затем два образца помещали в сушильный шкаф. Сушка проводилась при температуре 50 °С до остаточной влажности 15 %, после чего из двух образцов микроводорослей с влажностью 99.7 % и двух высушенных образцов экстрагировались липиды. В качестве экстрагентов использовались этанол и петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.), 10 мл:20 мл, Z=1 г сухой биомассы:20 мл смеси этанола и петролейного эфира.

Анализ полученных данных (табл. 3.1) позволяет сделать вывод о том, что введение после центрифугирования стадии сушки при 50 °С до остаточной влажности 10-15 % увеличивает выход липидов при экстракции до 5.3 %, что несколько больше по сравнению с экстракцией из пасты микроводорослей влажностью 98- 99 % с целыми клетками группы А. Объяснить этот факт можно появлением микротрещин в стенках клеток, что облегчает доступ экстрагентов внутрь клеток. Однако при этом себестоимость 1 г липидов возрастает на 50 % (табл. 3.2) из-за необходимости обеспечения специальных условий сушки биомассы и недопущения изменения химического состава клеток микроводорослей.

Таблица 3.1 – Влияние влажности растительного сырья на выход липидов при экстракции

Вид микроводорослей	№ образца	Выход липидов, %
Сухая	1	5.4
	2	5.2
Влажная	3	4.9
	4	5.1

Расчет себестоимости 1 г липидов в зависимости от вида микроводорослей (влажность, разрушенные или целые клетки), используемых на стадии экстракции, представлен в табл. 3.2.

Таблица 3.2 – Себестоимость получения и обработки 1 м³ биомассы микроводорослей с сушкой до остаточной влажности 10-15 % и без сушки

Стадия	С сушкой без дезинтеграции, у.е.	С сушкой и дезинтеграцией, у.е.	Без сушки и дезинтеграции, у.е.	Без сушки, но с дезинтеграцией, у.е.
Накопление клеток	181	181	181	181
Создание стресса	38	38	38	38
Центрифугирование	14	14	14	14
Комплексная дезинтеграция	-	17	-	17
Сушка	497	497	-	-
Экстракция + отгонка растворителя	31	31	120	120
Итого:	761	778	353	370
Количество липидов, г	159	690	150	690
Себестоимость 1 г липидов, у.е	4.8	1.12	2.4	0.5

Из анализа экспериментальных данных следует, что на стадии экстракции растительного сырья целесообразно использование растительного сырья с разрушенными клеточными стенками и влажностью 98 %. При этом, себестоимость 1 г липидов составляет 0.5 у.е., что свидетельствует об экономической целесообразности комплексного воздействия смеси ферментов и СВЧ-излучения.

Для подбора оптимального экстрагента, с помощью которого можно извлечь максимальное количество липидов из клеток, необходимо проанализировать, в каком виде целевой продукт находится внутри клетки. Как следует из параграфа 1.3 липиды могут находиться в форме капель в цитоплазме клетки, а также в составе белково-липидных комплексов, в которых белки и липиды соединены с помощью водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Липиды, входящие в состав белково-липидных комплексов, могут быть извлечены только при наличии полярного растворителя, так как энергия водородных связей между белками и липидами выше, чем возникающее дисперсионное взаимодействие между липидами и неполярным растворителем.

Полярный растворитель способен разрушить белково-липидные

взаимодействия путем образования водородных связей с полярными частями этих комплексов.

В связи с этим важно определить соотношение полярного и неполярного растворителей, которое подбиралось с помощью методики Ч. Хансена. При этом важно, чтобы выбранный экстрагент позволял извлечь как триглицериды, так и липиды, входящие в состав белково-липидных комплексов.

С помощью хроматографического анализа было определено, что в состав триацилглицеридов (ТАГ) клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*, главным образом, входят жирные кислоты, состав которых представлен в табл. 3.3.

Таблица 3.3 - Состав жирных кислот триацилглицеридов, извлеченных из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*

Название	Состав*	Содержание, %
Пальмитиновая	<i>C16:0</i>	11.8
Стеариновая	<i>C18:0</i>	17.9
Олеиновая	<i>C18:1</i>	12.5
Линолевая	<i>C18:2</i>	5.8
Бегеновая	<i>C22:0</i>	5.3
Эруковая	<i>C 22:1</i>	4.2

* В составе живых организмов встречаются жирные кислоты только с четным числом атомов углерода. За маргариновую кислоту в процессе анализа приняли трудно разделяемую смесь равных количеств пальмитиновой *C₁₆* и стеариновой *C₁₈* кислот, а по результатам химического анализа этой смеси получается формула *C₁₇H₃₄O₂*.

С учетом хроматографического анализа и известных параметров растворимости для некоторых видов триацилглицеридов [147, 149]: триолеина ($\delta_D = 16.4 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 3.2 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 4.1 \text{ МПа}^{1/2}$), тристеарина ($\delta_D = 16.4 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 2.6 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 3.8 \text{ МПа}^{1/2}$) и трипальмитина ($\delta_D = 16.3 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 3.1 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 3.8 \text{ МПа}^{1/2}$) определим параметры растворимости усредненного триацилглицерида микроводоросли как среднее арифметическое параметров растворимости триолеина, тристеарина, трипальмитина, так как процентное содержание именно этих жирных кислот

в составе триацилглицеридов преобладает.

Параметры растворимости для усредненного триацилглицерида имеют следующие значения: $\delta_D = 16.4 \text{ МПа}^{1/2}$, $\delta_P = 3 \text{ МПа}^{1/2}$, $\delta_H = 4 \text{ МПа}^{1/2}$, $R_0 = 4.7$.

Параметры растворимости для усредненного липида биомассы микроводорослей определим из следующих рассуждений. Липиды микроводоросли состоят из фосфолипидов и гликолипидов (53 %), триглицеридов (45 %) и небольшого количества свободных жирных кислот (2 %). Параметры усредненного триацилглицерида определены выше, а параметры растворимости фосфолипидов и гликолипидов [147, 149] представлены в табл. 3.4. Параметры растворимости среднестатистической жирной кислоты определим как среднее арифметическое известных параметров растворимости [147]: стеариновой кислоты ($\delta_D = 16.3 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 3.0 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 4.9 \text{ МПа}^{1/2}$), олеиновой кислоты ($\delta_D = 16.2 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 3.6 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 5.2 \text{ МПа}^{1/2}$) и пальмитиновой кислоты ($\delta_D = 16.3 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 2.9 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 4.5 \text{ МПа}^{1/2}$) (табл. 3.4).

Таблица 3.4 – Параметры растворимости полярных липидов и жирных кислот

фосфолипиды + гликолипиды	Жирные кислоты
$\delta_D = 16.1 \text{ МПа}^{1/2}$ $\delta_P = 4.1 \text{ МПа}^{1/2}$ $\delta_H = 4.2 \text{ МПа}^{1/2}$ $R_0 = 4.7$	$\delta_D = 16.3 \text{ МПа}^{1/2}$ $\delta_P = 3.12 \text{ МПа}^{1/2}$ $\delta_H = 4.9 \text{ МПа}^{1/2}$ $R_0 = 4.7$

Параметры растворимости усредненного липида можно вычислить с использованием формулы (1.8) параграфа 1.3:

$$\delta_D = 0.45 \cdot 16.4 + 0.02 \cdot 16.3 + 16.1 \cdot 0.53 = 16.2 \text{ МПа}^{1/2},$$

$$\delta_P = 0.45 \cdot 3.03 + 0.02 \cdot 3.12 + 0.53 \cdot 4.1 = 3.6 \text{ МПа}^{1/2},$$

$$\delta_H = 0.45 \cdot 4.05 + 0.02 \cdot 4.9 + 0.53 \cdot 4.2 = 4.14 \text{ МПа}^{1/2}.$$

При определении параметров растворимости белково-липидных комплексов были использованы параметры растворимости белка, который сходен по структуре с белком, входящим в состав белково-липидного комплекса [148]: $\delta_D = 22.4 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 9.8 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 19.4 \text{ МПа}^{1/2}$; $R_0 = 11.9$.

В качестве параметров растворимости эргостерола использовались параметры растворимости холестерола - животного аналога эргостерола [147]: $\delta_D = 20.4 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_P = 2.8 \text{ МПа}^{1/2}$; $\delta_H = 9.4 \text{ МПа}^{1/2}$; $R_0 = 12.6$.

С учетом соотношения веществ в белково-липидном комплексе, представленном в [91] и использовании для расчета формулы 1.8 параграфа 1.3, значения параметров растворимости белково-липидного комплекса будут равны:

$$\delta_D = 0.5 \cdot 164 + 0.2 \cdot 163 + 0.2 \cdot 204 + 0.1 \cdot 224 = 177.4;$$

$$\delta_P = 0.5 \cdot 3.03 + 0.2 \cdot 4.1 + 0.2 \cdot 2.8 + 0.1 \cdot 9.8 = 3.88;$$

$$\delta_H = 0.5 \cdot 4.05 + 0.2 \cdot 4.2 + 0.2 \cdot 9.4 + 0.1 \cdot 19.4 = 6.69;$$

$$R_0 = 0.5 \cdot 4.7 + 0.2 \cdot 4.7 + 0.2 \cdot 12.6 + 0.1 \cdot 11.9 = 7.$$

Расчеты по подбору различных видов экстрагентов приведены в приложении Б, а итоговые результаты представлены в табл. 3.5.

В качестве полярного экстрагента был выбран этанол как наиболее распространенный безопасный растворитель. В качестве неполярного растворителя - петролейный эфир - растворитель, представляющий собой смесь легких алифатических углеводородов, получаемую из попутных нефтяных газов и легких фракций нефти. Этот растворитель имеет наименьшую температуру кипения (табл. 3.6) среди возможного перечня неполярных растворителей, поэтому на его отгонку требуется наименьшее количество энергии, кроме того, при использовании данного растворителя возможно проводить экстракцию при температуре 50–55 °С, не вызывающей активацию окисления липидов.

Теоретические расчеты были проверены с помощью экспериментальных данных, полученных в серии экспериментов по экстракции липидов с различными соотношениями количеств этанола и петролейного эфира из пасты микроводорослей с влажностью 98 % при температуре экстракции 50 ± 1 °С. Соотношение Z количества смеси экстрагентов (мл) к количеству взятой биомассы (г) составляло 20 (мл):1 (г).

Таблица 3.5 - Подбор экстрагентов для извлечения липидов с помощью теории растворимости Ч. Хансена

№	Экстрагент	<i>RED</i> для ТАГ	<i>RED</i> для усредненной молекулы липида	<i>RED</i> для белково-липидного комплекса
1	Этанол (Э)	3.5	3.43	2.02
2	Э/П. Э (4:1 об/об)	2.61	2.54	1.47
3	Э/П. Э (2:1 об/об)	2.17	2.10	1.21
4	Э/П. Э (3:2 об/об)	1.74	1.67	0.97
5	Э/П. Э (1:1 об/об)	1.33	1.26	0.82
6	Э/П. Э (2:3 об/об)	0.96	0.89	0.75
7	Э/П. Э (1:2 об/об)	0.7	0.65	0.7
8	Э/П. Э (1:4 об/об)	0,69	0.94	0.94
9	Петролейный эфир (П.Э)	1.3	1.33	1.4

■ - смесь растворителей не подходит; □ - смесь растворителей подходит

Таблица 3.6 – Температура кипения распространенных неполярных растворителей

Экстрагент	$T_{кип}, ^\circ C$
Гексан	68
Нефрас С2 80/120	от 80 до 120
Петролейный эфир	от 60 до 80
АИ-92	от 33 до 205

Экспериментальные исследования подтвердили теоретические расчеты: максимальное количество липидов 23 % из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*, обработанных смесью ферментов и СВЧ-излучением, было извлечено при соотношении полярного экстрагента этанола и неполярного экстрагента петролейного эфира 1:2 (об.) (рис.3.1).

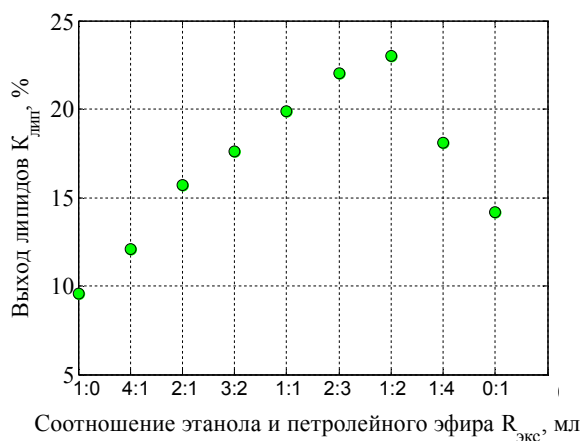


Рисунок 3.1 - Зависимость выхода липидов от типа экстрагента

Температура экстракции $T_{\text{эк}}$ оказывает значительное влияние на выход липидов $K_{\text{лип}}$. Для определения температуры, при которой наблюдается наиболее высокий выход липидов, была проведена серия экспериментов по извлечению липидов из пасты микроводорослей влажностью 98 % с клетками, обработанными смесью ферментов и СВЧ-излучением, экстрагентами петролейный эфир и этанол (в соотношении 2:1 (об.)), взятыми в соотношении 20 мл к 1 г биомассы. Наибольший выход липидов 23 % наблюдался при температуре экстракции 50 °С (рис. 3.2), что согласуется с ранее полученными результатами по температурному режиму обработки клеток СВЧ-излучением (параграф 2.3). При повышении температуры пасты микроводорослей более 50–55 °С наблюдается снижение выхода липидов из-за активации окислительных процессов ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов. Воздействие высокой температуры (выше 50–55 °С) способствует разрушению вакуолей и пероксисом, в результате чего клеточный сок, содержащий органические кислоты, выходит в цитоплазму. Так же при данной температуре происходит разрушение хлорофилла с образованием феофитина [137]; при этом ионы магния в молекуле хлорофилла замещаются двумя молекулами водорода органических кислот клеточного сока, которые поступают в цитоплазму из вакуолей. Образующиеся активные ионы меди или магния способствуют окислению ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов.

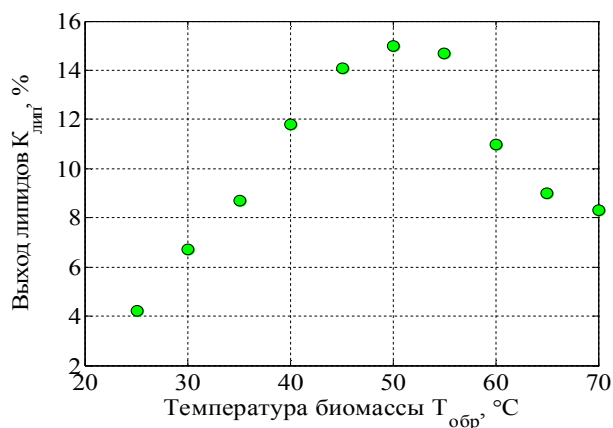


Рисунок 3.2 - Зависимость выхода липидов от температуры процесса экстракции

Подбор соотношения Z взятой биомассы (г) к количеству смеси экстрагентов (мл) осуществлялся с учетом экономического критерия (себестоимости 1 г липидов). Как следует из параграфа 1.3 различия в экономических затратах при проведении одного лабораторного цикла производства липидов из биомассы микроводорослей при использовании на стадии экстракции различного количества экстрагента состоят в затратах на покупку экстрагента и его отгонку. Результаты расчета себестоимости 1 г липидов при разном соотношении Z - 1 г сухой биомассы к количеству взятой смеси экстрагентов (мл) представлены на рис. 3.4.

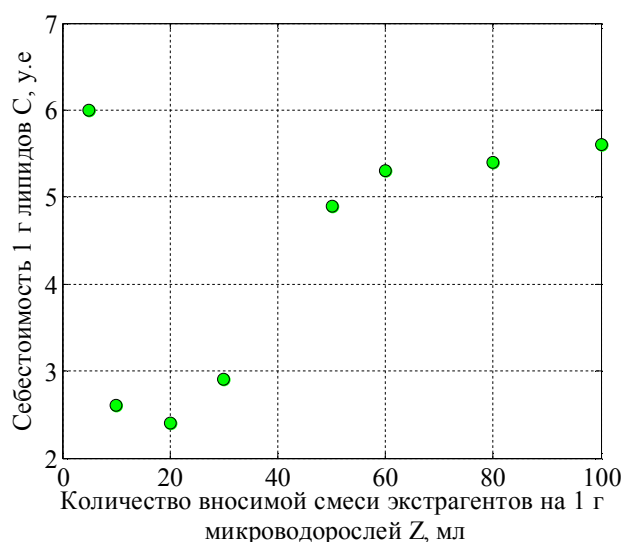


Рисунок 3.3 – Зависимость себестоимости 1 г липидов от количества вносимой смеси экстрагентов на 1 г микроводорослей

Анализ зависимости себестоимости 1 г липидов (у.е.) от количества вносимой смеси экстрагентов (мл) на 1 г микроводорослей позволяет сделать вывод, что минимальная себестоимость липидов 2.4 у.е. за 1 г липидов достигается при соотношении $Z = 1$ (г):20 (мл).

Для определения скорости экстракции липидов из микроводорослей был проведен эксперимент по извлечению липидов в экстракторе с мешалкой. Для эксперимента отбиралось 50 мл суспензии штамма *Chlorella vulgaris* с влажностью 98 %. Биомассу обрабатывали в СВЧ-генераторе при следующих технологических условиях: 2450 МГц, $P=280$ Вт, $\tau = 35$ с,

$T_{нач} = 23,5 \text{ } ^\circ\text{C}$, $T_{кон} = 52 \text{ } ^\circ\text{C}$. В процессе экстракции использовалась смесь экстрагентов - этанол и петролейный эфир (1 : 2 (об.)), $Z = 1:280$ (в связи с тем, что на анализ каждые 30 мин отбиралось по 2 мл мисцеллы), скорость перемешивания составляла 0.4 м/с ($Re > 10000$ (развитый турбулентный режим)), температура экстракции $50 \text{ } ^\circ\text{C}$. Отбор проб производился следующим образом: в течение первого часа через каждые 15 мин, затем через каждые полчаса. Стандарт, необходимый для анализа общих липидов по методу Цоллнера–Кирша, содержал 1 мг/мл. Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей в экстракторе с мешалкой представлена на рис. 3.4.

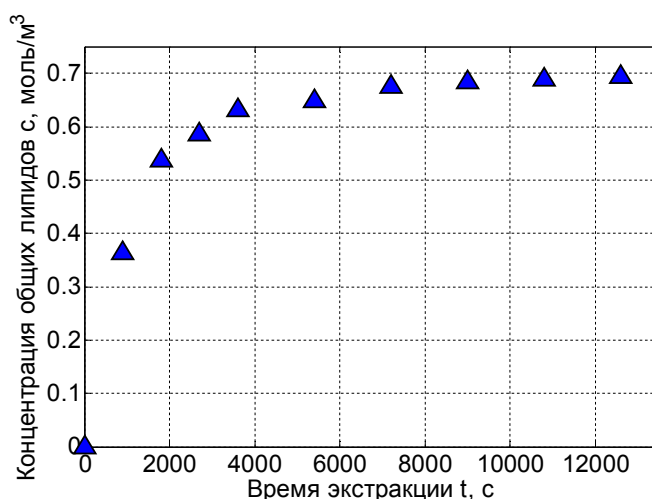


Рисунок 3.4 - Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей

При анализе полученных результатов можно сделать вывод о том, что экстракция липидов смесью растворителей - этанол и петролейный эфир (1 : 2 (об.)) из биомассы микроводорослей влажностью 98 % с разрушенными клетками позволяет извлечь основную массу липидов (до 93 %) за 100-120 мин.

3.2 Математическое моделирование процесса экстракции липидов

Полученные в результате культивирования микроводоросли концентрируются до пасты влажностью 96–99 %. Клетки пасты микроводорослей подвергаются химическому, физическому или комплексному воздействию, в результате чего, часть клеток N остается целыми (группы A), часть клеток R_z разрушается (группы C), и часть клеток $1-(N+R_z)$ сохраняет форму, но теряет жизнеспособность (группы B).

Клетки группы A – это клетки размером 12 мкм с толщиной клеточной стенки 45 нм, которые после химического, физического или комплексного воздействия сохраняют жизнеспособность, т.е. в клетке сохраняется способность регулировать свое внутреннее состояние (гомеостаз), в ней протекают все необходимые для жизнедеятельности процессы катаболизма и анаболизма. Эти клетки имеют в стенке аквапорины – поры через которые в клетку проникает вода, диаметр одного аквапорина составляет 0,28 нм. В клетке находится целевой продукт в виде липидных капель размером 2-250 нм и белково-липидных комплексов размером 5-80 нм.

Клетки группы B – это клетки размером 12 мкм с толщиной клеточной стенки 45 нм, которые утратили гомеостаз. В клеточной стенке таких клеток появляются отверстия, которые привели к гибели клеток, но при этом каркас клеточной стенки остается целым. В клетке находится целевой продукт в виде липидных капель размером 2-250 нм и белково-липидных комплексов размером 5-80 нм.

Клетки группы C – это клетки, которые после химического, физического или комплексного воздействия утратили гомеостаз, при этом их клеточная стенка разрушается более чем на 3/4. В клетке находится целевой продукт в виде липидных капель размером 2-250 нм и белково-липидных комплексов размером 5-80 нм.

Характеристики клеток микроводорослей типов (A , B и C) представлены в табл. 3.7.

Таблица 3.7 – Характеристики различных групп клеток микроводорослей

	Целые клетки (группа А)	Погибшие, но сохранившие форму клетки (группа В)	Разрушенные клетки (группа С)
Размер клетки, мкм	12	12	12
Толщина клеточной стенки, нм	45	45	45
Площадь поверхности аквапорина или отверстий в клетке	$6,15 \cdot 10^{-20} \text{ м}^2$	$70 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$	-
Величина площади поверхности всех пор и отверстий в клетке, м^2	$2.6 \cdot 10^{-12}$	$70 \cdot 10^{-12}$	-
Диаметр липидной капли, нм	2-250	2-250	2-250
Диаметр белково-липидных комплексов, нм	5-80	5-80	5-80

Паста микроводорослей влажностью 98 % после обработки СВЧ-излучением содержит целые клетки (группа А) – 40 %; погибших, но сохранивших форму (группа В) -32 %; разрушенных (группа С) – 28 %.

К пасте микроводорослей добавляли смесь экстрагентов: этанол-петролейный эфир в соотношении (1:2 (об.)).

В системе наблюдается 3 фазы: фаза 1 – внутриклеточное пространство; фаза 2 - межклеточная вода + этанол; фаза 3 – капли петролейного эфира.

Можно вдвинуть следующую гипотезу по механизму извлечения липидов из клеток:

1. Липиды из разрушенных клеток (группа С), оказываются в фазе 2 рядом с каплями петролейного эфира в результате конвекции и диффузии. Между молекулами липидов и петролейного эфира возникают дисперсионные взаимодействия (силы ван-дер-Вальса) и молекулы липидов начинают диффундировать внутрь капель петролейного эфира.

2. Молекулы этанола, растворенные в межклеточной воде в результате

конвекции и диффузии оказываются рядом с целыми (группа *A*) и погибшими и сохранившими форму клетками (группа *B*). Клетки группы *B* имеют отверстия в клеточной стенке, через которые этанол проникает внутрь клетки. В течение 10-20 мин вязкость фазы 1 (внутриклеточное пространство) и фазы 2 (межклеточная вода+ этанол) уравниваются, и липиды начинают диффундировать в фазу 2, что подтверждено экспериментально. Целью эксперимента было определение кинетики извлечения липидов из клеток группы *B* в межклеточную воду и этанол (фаза 2). В эксперименте использовали СВЧ-дезинтегратор, биомассу микроводорослей, петролейный эфир, этанол, серную кислоту, фосфованилиновый реактив.

Предварительная обработка суспензии микроводоросли с концентрацией 55 млн кл/мл (1 г сухого вещества клеток с содержанием липидов 31 %) осуществлялась СВЧ-излучением частотой 2450 мГц, мощностью 280 Вт в пять стадий по 20 секунд. Температура суспензии после обработки составляла 50 °С.

С использованием камеры Горяева определено, что после воздействия СВЧ-излучения концентрация клеток в суспензии составила 53.4 млн кл/мл (т.е. количество клеток группы *C* менее 3 %), при этом погибших, но сохранивших форму клеток в суспензии более 95 %.

Далее в биомассу с погибшими но сохранившими форму клетками добавлялся этанол в количестве 93 мл. Через каждые 10 минут проводился отбор 1 мл фазы 2 и измерялась концентрация липидов с помощью метода Цольнера-Кирша.

Полученные экспериментальные данные представлены на рис. 3.5.

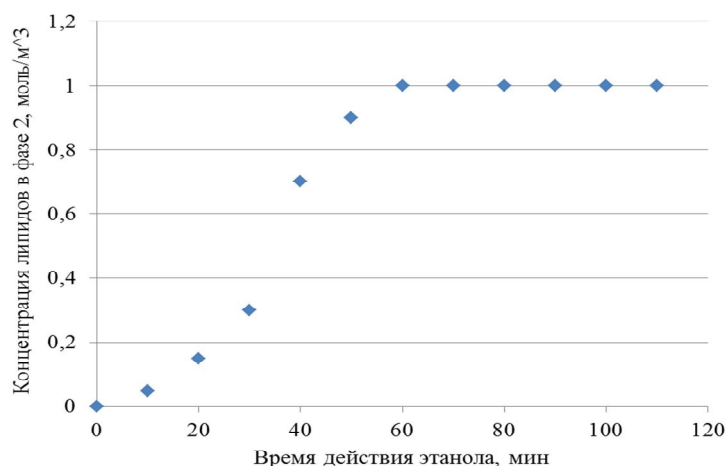


Рисунок 3.5 – Зависимость изменения концентрации липидов, диффундирующих из клеток группы *B*, в фазе 2 от времени воздействия этанола

Из анализа результатов эксперимента следует, что значимое количество липидов (более 0.1 моль/м^3) в фазе 2 появляется через 15-20 мин воздействия этанола и далее растет до 60 мин.

Для определения части липидов, которую возможно извлечь при данном виде клеток (остальная часть липидов остается внутри клеток), был проведен эксперимент. Целью эксперимента было определение коэффициента извлечения липидов из клеток группы *B*.

Методы и материалы эксперимента включали СВЧ-дезинтегратор, аппарат Сокслета, ротационный испаритель, термометр, микроскоп, ферменты, краситель (метиленовый синий), петролейный эфир, этанол.

В ходе эксперимента проводилась исчерпывающая экстракция липидов из микроводорослей в аппарате Сокслета в течение 8 ч. Концентрация липидов в экстракте определялась по методике Цольнера-Кирша.

Далее осуществлялась обработка суспензии микроводоросли с концентрацией 55 млн кл/мл СВЧ-излучением мощностью 280 Вт и частотой 2450 МГц в пять стадий по 20 с. Температура суспензии после обработки составляла $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

С использованием камеры Горяева определено, что после воздействия СВЧ-излучения концентрация клеток в суспензии составила 53.4 млн кл/мл

(т.е. количество клеток группы *C* в суспензии менее 3 %), при этом количество клеток группы *B* оказалось более 95 %.

Затем из биомассы с клетками группы *B* проводили экстракцию липидов в аппарате с мешалкой при следующих условиях: в качестве экстрагента использовалась смесь этанол и петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.), $Z=1:280$, температура процесса $T=50$ °С. Концентрацию липидов в экстракте определяли по методике Цоллнера-Кирша.

Результаты эксперимента по экстракции липидов из клеток группы *B* сравнивали с результатом экстракции из микроводорослей в аппарате Сокслета (табл. 3.8, 3.9).

Таблица 3.8 – Выход липидов при экстракции из микроводорослей в аппарате Сокслета

№ опыта	Выход липидов, %
1	33.4
2	31.3
3	29.3
Среднее	31.3

Таблица 3.9 - Выход липидов при экстракции из клеток микроводорослей группы *B*

№ опыта	Выход липидов, %
1	12.8
2	12.4
3	13.4
Среднее	12.8

Коэффициент J , учитывающий степень извлечения липидов из клеток группы *B* равен: $J = 12.8/31.3=0.41$.

Из анализа экспериментальных данных следует, что при экстракции липидов из клеток группы *B* извлекается 41 % липидов от общего их количества, которое находится внутри клеток.

Анализируя влияние этанола на клетки микроводорослей группы *A* можно предположить, что его действие вызывает денатурацию белков клеточной стенки целых клеток микроводорослей (рис. 3.6).

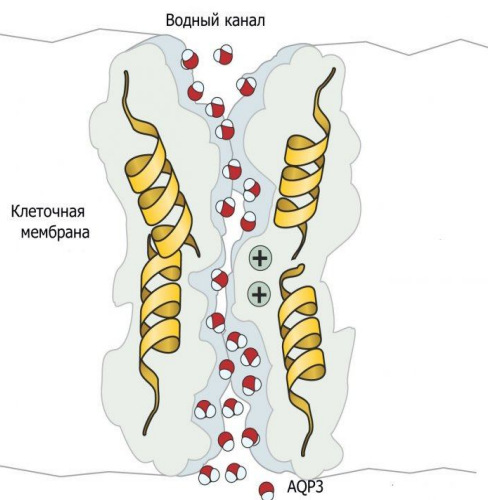


Рисунок 3.6 – Аквапорины клетки

В результате нарушается работа белков, которые контролируют перемещение полярных молекул внутрь клетки, этанол начинает проникать внутрь клетки. Это предположение было подтверждено экспериментально. Целью следующего эксперимента было определение кинетики гибели целых клеток из-за воздействия

этанола (фаза 2). В эксперименте использовали биомассу микроводорослей, петролейный эфир, этанол, метиленовый синий краситель, микроскоп. В ходе эксперимента с использованием камеры Горяева было установлено, что концентрация клеток в суспензии составляла 53.4 млн кл/мл, при этом погибших клеток 30 %. Далее к биомассе с клетками группы А добавляли этанол в количестве 93 мл. Отбор проб (1 мл суспензии) проводился через каждые 10 минут. С помощью метиленового синего красителя проводилась окраска клеток и осуществлялся подсчет погибших клеток. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.7.

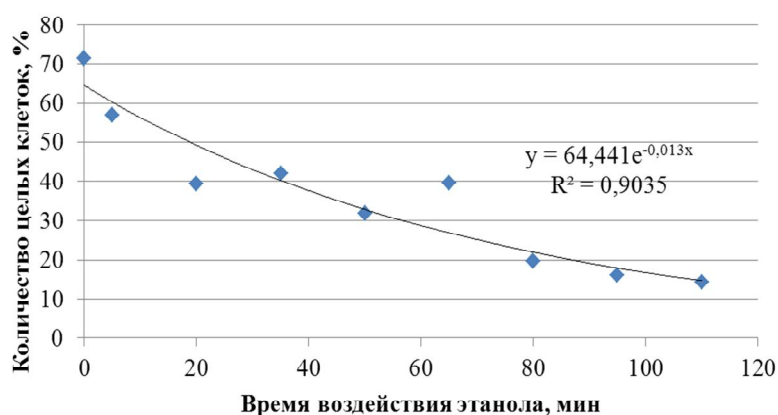


Рисунок 3.7 – Влияние действия этанола на количество жизнеспособных клеток в пасте микроводорослей: x - время воздействия этанола; y – количество целых клеток

Из анализа экспериментальных данных следует, что к 50-ой мин

погибает более половины целых клеток микроводорослей. При этом поры целых клеток микроводорослей увеличиваются в размерах, вязкости фаз 1 и 2 выравниваются, липиды начинают диффундировать из внутриклеточного пространства в межклеточную воду. Для определения максимальной концентрации липидов, которую возможно извлечь из клеток группы А (остальное количество липидов остается внутри клеток), проводили эксперимент, целью которого было определение коэффициента извлечения липидов из целых клеток микроводорослей.

В эксперименте использовали СВЧ-дезинтегратор, аппарат Сокслета, аппарат с мешалкой, ротационный испаритель, термометр, микроскоп, ферменты, краситель (метиленовый синий), петролейный эфир, этанол.

В ходе эксперимента проводилась экстракция липидов из микроводорослей в аппарате Сокслета в течение 8 ч. Концентрация липидов в экстракте определялась по методике Цоллнера-Кирша. Далее проводилась экстракция липидов из целых клеток микроводорослей смесью этанол - петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.), Z=1:280, при температуре $T=50$ °С. Результаты опыта по экстракции липидов из целых клеток микроводорослей сравнивались с результатами опыта по экстракции из микроводорослей в аппарате Сокслета (табл. 3.10, 3.11).

Таблица 3.10 - Выход липидов при экстракции из целых клеток микроводорослей в аппарате Сокслета

№ опыта	Выход липидов, %
1	33.4
2	31.3
3	29.3
Среднее	31.3

Таблица 3.11 - Выход липидов при экстракции из целых клеток микроводорослей в аппарате с мешалкой

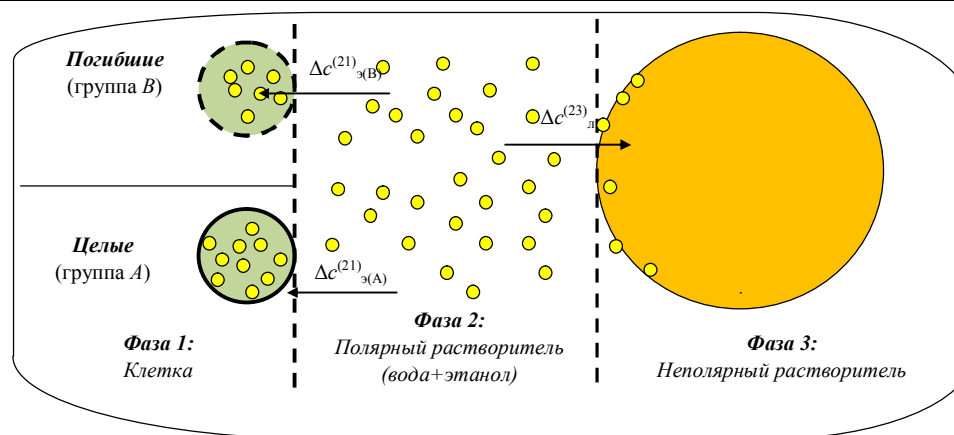
№ опыта	Выход липидов, %
1	4.8
2	5.3
3	5.4
Среднее	5.2

Коэффициент I , учитывающий неполное извлечение липидов из целых клеток, равен $I = 5.2 / 31.3 = 0.17$. Таким образом, при экстракции липидов из целых клеток извлекается 17 % липидов от общего их количества, которое находится внутри клеток.

Можно предположить, что липиды из погибших и целых клеток, оказавшиеся в фазе 2 (межклеточная вода + этанол) в результате конвекции и диффузии оказываются рядом с каплями петролейного эфира. Между молекулами липидов и петролейного эфира возникают дисперсионные взаимодействия (силы Ван-дер-Ваальса) и молекулы липидов начинают диффундировать внутрь капель петролейного эфира. Поскольку капля масла имеет высокое значение поверхностного натяжения ($\sigma_{\text{масло}} = 35,4 \cdot 10^{-3}$ Н/м) по сравнению с петролейным эфиром ($\sigma_{\text{п.э.}} = 18,42 \cdot 10^{-3}$ Н/м), то на границе с полярным растворителем (вода+этанол) будет находиться именно петролейный эфир с целью уменьшения общей энергии системы (принцип минимума энергии). Схема экстракции липидов из клеток микроводорослей, обработанных СВЧ-излучением, и материальный баланс представлены в табл. 3.12.

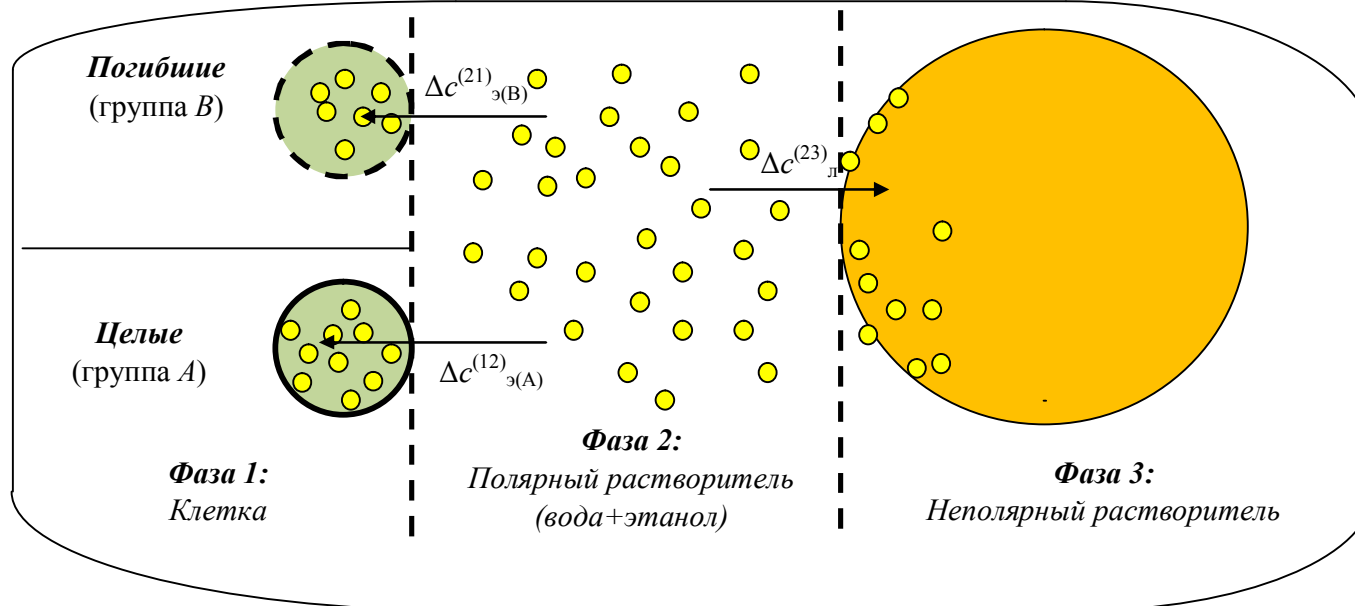
Таблица 3.12 – К объяснению механизма и этапов процесса экстракции липидов из клеток микроводорослей

Время	Фаза 1	Фаза 2	Фаза 3
$\tau=0$ мин	<p>Этанол из фазы 2 диффундирует к поверхности клеток группы <i>A</i> (фазы 1).</p> <p>$c_{э(A)}^{(1)} = 0, c_{э(B)}^{(1)} = 0, c_{л}^{(1)} = c_{л(A)}^{(1)} + c_{л(B)}^{(1)}$,</p> <p>где $c_{э(A)}^{(1)}$ - концентрация этанола в клетках группы <i>A</i>; $c_{э(B)}^{(1)}$ - концентрация этанола в клетках группы <i>B</i>; $c_{л}^{(1)}$ - общая концентрация липидов в фазе 1; $c_{л(A)}^{(1)}$ - концентрация липидов в клетках группы <i>A</i>; $c_{л(B)}^{(1)}$ - концентрация липидов в клетках группы <i>B</i></p>	<p>Этанол из фазы 2 диффундирует через отверстия внутрь клеток группы <i>B</i>. Все липиды из разрушенных клеток переходят в фазу 2.</p> <p>$c_{л}^{(2)} = c_{л(C)}, c_{э}^{(2)} = c_{нач(э)}$,</p> <p>где $c_{л}^{(2)}$ - концентрация липидов в фазе 2; $c_{л(C)}$ - концентрация липидов в разрушенных клетках (группа <i>C</i>); $c_{э}^{(2)}$ - концентрация этанола в фазе 2; $c_{нач(э)}$ - начальная концентрация этанола</p>	<p>Липиды, находящиеся в фазе 2, проникают внутрь капли петролейного эфира (фаза 3), чтобы уменьшить величину поверхностного натяжения капли (принцип минимума энергии).</p> <p>$c_{л}^{(3)} = 0$,</p> <p>где $c_{л}^{(3)}$ - концентрация липидов в фазе 3</p>

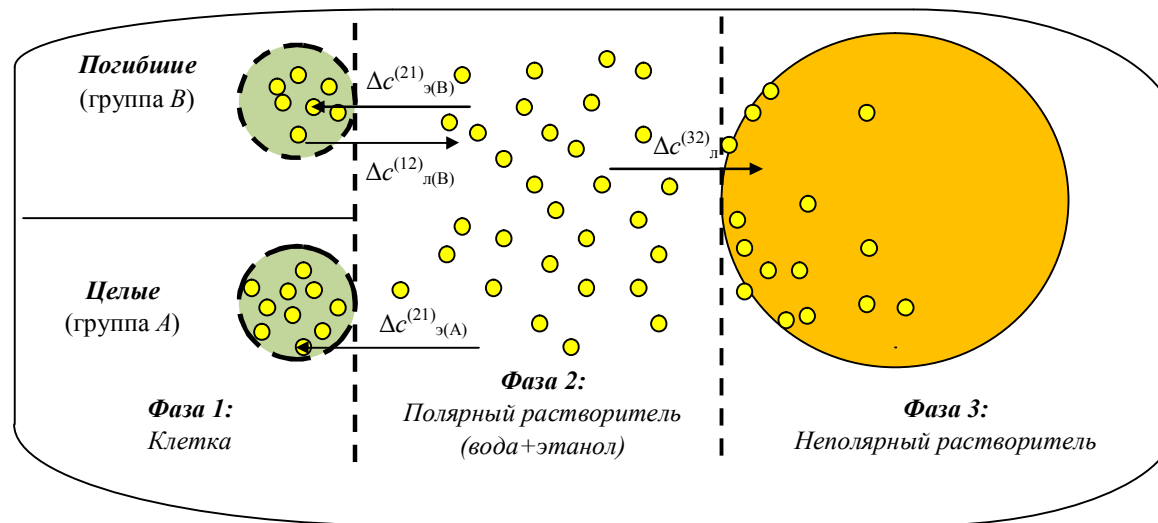


$\Delta c_{э(B)}^{(21)}$ – количество этанола, перешедшее из фазы 2 в клетки группы *B*; $\Delta c_{э(A)}^{(21)}$ - количество этанола, перешедшее из фазы 2 в клетки группы *A*; $\Delta c_{л}^{(23)}$ - количество липидов, перешедшее из фазы 2 в фазу 3

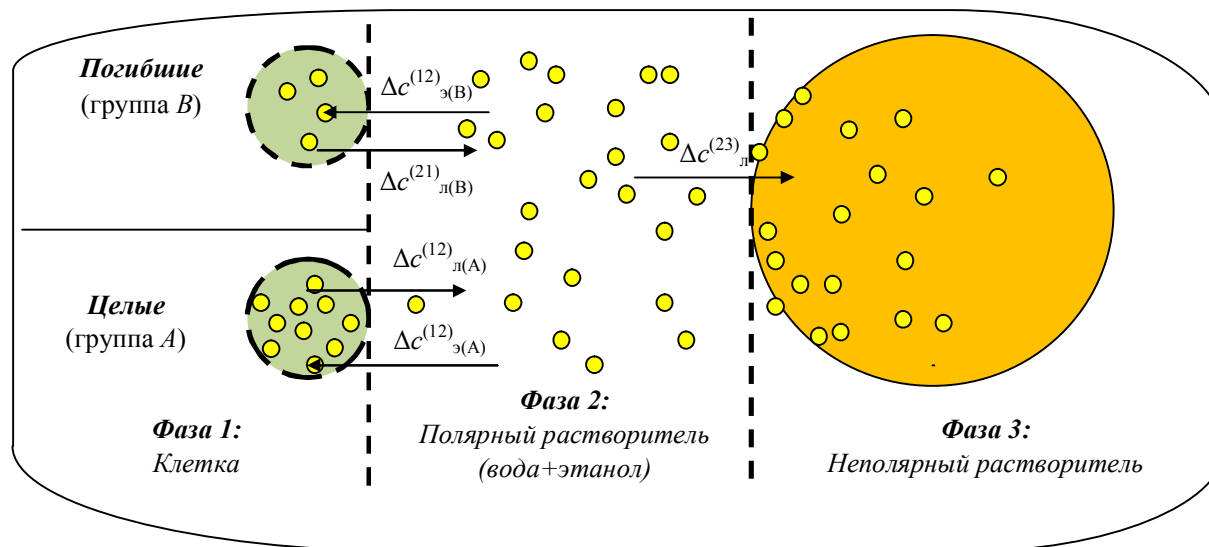
$\tau=20$ мин	<p>Этанол из фазы 2 диффундирует к поверхности клеток группы А (фазы 1) и внутрь клетки через увеличенные поры, образовавшиеся в результате денатурации белка. Этанол из фазы 2 через отверстия диффундирует внутрь клеток группы В:</p> $c_{\text{э}(A)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)}, \quad c_{\text{э}(B)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)},$ $c_{\text{л}}^{(1)} = c_{\text{л}(A)}^{(1)} + c_{\text{л}(B)}^{(1)}$	<p>Количество липидов в фазе 2 уменьшается, так как часть липидов переходит в фазу 3.</p> $c_{\text{э}}^{(2)} = c_{\text{нач}(\text{э})} - \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)} - \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)},$ $c_{\text{л}}^{(2)} = c_{\text{л}(C)} - \Delta c_{\text{л}}^{(23)}$	<p>Липиды, находящиеся в фазе 2, в результате дисперсионного взаимодействия образуют гидрофобные взаимодействия с каплями петролейного эфира (фаза 3), проникая внутрь капли петролейного эфира, чтобы уменьшить величину поверхностного натяжения капли (принцип минимума энергии). $c_{\text{л}}^{(3)} = \Delta c_{\text{л}}^{(23)}$</p>
---------------	---	--	---



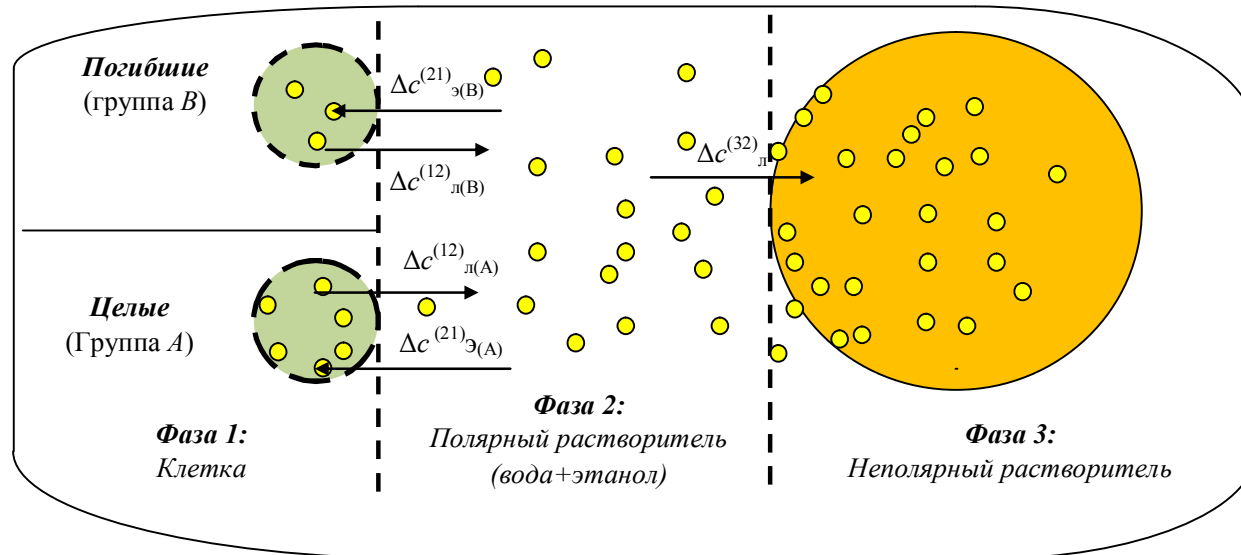
$\tau \in (20; 50)$	<p>Этанол из фазы 2 диффундирует к поверхности клеток группы <i>A</i> (фазы 1) и внутрь клетки через увеличенные поры, образовавшиеся в результате денатурации белка. Клетки, оставшиеся живыми, после комплексного воздействия смеси ферментов и СВЧ-излучения погибают.</p> <p>$c_{\text{э}(A)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)}$, $c_{\text{э}(B)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)}$, $c_{\text{л}}^{(1)} = c_{\text{л}(A)}^{(1)} + c_{\text{л}(B)}^{(1)} - \Delta c_{\text{л}(B)}^{(12)}$, где $\Delta c_{\text{л}(B)}^{(12)}$ - количество липидов, перешедшее из фазы 1 (клетки группы <i>B</i>) в фазу 2</p>	<p>Липиды клеток группы <i>B</i> диффундируют из фазы 1 в фазу 2.</p> <p>$c_{\text{э}}^{(2)} = c_{\text{нач}(\text{э})} - \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)} - \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)}$ $c_{\text{л}}^{(2)} = c_{\text{л}(C)} + \Delta c_{\text{л}(B)}^{(12)} - \Delta c_{\text{л}}^{(23)}$</p>	<p>Липиды, находящиеся в фазе 2 проникают внутрь капли петролейного эфира, чтобы уменьшить величину поверхностного натяжения капли (принцип минимума энергии).</p> <p>$c_{\text{л}(3)}^{(3)} = \Delta c_{\text{лп}}^{(23)}$</p>
---------------------	--	---	--



<p>$\tau=50$ мин</p>	<p>В фазе 1 (клетки, оставшиеся живыми, после комплексного воздействия смеси ферментов и СВЧ-излучения) и фазе 2 устанавливается равновесная концентрация этанола, липиды из фазы 1 (клетки, оставшиеся живыми, после комплексного воздействия смеси ферментов и СВЧ-излучения) по расширенным порам в результате молекулярной диффузии начинают проникать в фазу 2.</p> $c_{\text{э}(A)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)}, \quad c_{\text{э}(B)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)},$ $c_{\text{л}}^{(1)} = c_{\text{л}(A)}^{(1)} + c_{\text{л}(B)}^{(1)} - \Delta c_{\text{л}(B)}^{(12)}$	<p>В фазе 2 происходит увеличение концентрации липидов за счет их диффузии из клеток, которые погибли в результате воздействия этанола.</p> $c_{\text{э}}^{(2)} = c_{\text{нач}(\text{э})} - \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)} - \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)}$ $c_{\text{л}}^{(2)} = c_{\text{л}(C)} + \Delta c_{\text{л}(B)}^{(12)} - \Delta c_{\text{л}}^{(23)}$	<p>Липиды, находящиеся в фазе 2 проникают внутрь капли петролейного эфира, чтобы уменьшить величину поверхностного натяжения капли (принцип минимума энергии).</p> $c_{\text{л}(3)}^{(3)} = \Delta c_{\text{ллт}}^{(23)}$
---------------------------------	---	---	---



<p>$\tau > 50$ мин</p>	<p>Липиды из клеток, которые погибли в результате воздействия этанола (фаза 1), через увеличенные поры диффундируют в фазу 2.</p> $c_{\text{э}(A)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)}$ $c_{\text{э}(B)}^{(1)} = \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)}$ $c_{\text{л}}^{(1)} = c_{\text{л}(A)}^{(1)} + c_{\text{л}(B)}^{(1)} - \Delta c_{\text{л}(B)}^{(12)} - \Delta c_{\text{лип}(A)}^{(12)}$ <p>где $\Delta c_{\text{лип}(A)}^{(12)}$ - количество липидов, перешедшее из клеток группы А (фаза 1) в фазу 2</p>	<p>Концентрация липидов в фазе 2 уменьшается, так как часть липидов растворяется в фазе 3 (петролейный эфир).</p> $c_{\text{э}}^{(2)} = c_{\text{нач(э)}} - \Delta c_{\text{э}(A)}^{(21)} - \Delta c_{\text{э}(B)}^{(21)}$ $c_{\text{л}}^{(2)} = c_{\text{л}(C)} + \Delta c_{\text{л}(B)}^{12} + \Delta c_{\text{л}(A)}^{12} - \Delta c_{\text{л}}^{23}$	<p>Липиды, находящиеся в фазе 2 проникают внутрь капли петролейного эфира, чтобы уменьшить величину поверхностного натяжения капли (принцип минимума энергии).</p> $c_{\text{л}}^{(3)} = c_{\text{л}}^*$ <p>где $c_{\text{л}}^*$ - равновесная концентрация липидов в фазе 3</p>
--------------------------------------	--	--	---



В результате проведенного анализа механизма извлечения липидов из клеток микроводорослей были сформулированы следующие допущения к математическому описанию процесса экстракции :

1) все внутриклеточные липиды оказываются в межклеточной воде (фаза 2) при разрушении клеток;

2) из разрушенных клеток может быть извлечено 100 % внутриклеточных липидов;

3) размер капель неполярного экстрагента (фаза 3) составляет 300 мкм;

4) в экстракторе обеспечивается режим идеального перемешивания;

5) все клетки биомассы содержат примерно одинаковое количество внутриклеточных липидов ≈ 31 % от сухого вещества клетки;

6) поверхность капли петролейного эфира (фаза 3) постоянно «обновляется», т.е. липидные капли и молекулы липидов, которые соединились с петролейным эфиром проникают вглубь капли, а на поверхности находятся новые молекулы петролейного эфира, которые вступают в дисперсионные взаимодействия с молекулами липидов;

7) ≈ 70 % площади поверхности каждой капли петролейного эфира взаимодействует с липидными каплями или белково-липидными комплексами;

8) в каждой клетке группы *B* образуются отверстия;

9) в результате дезинтеграции в клетках возникают отверстия площадь сечения которых составляют ≈ 25 % от общей площади поверхности клеточной стенки и через которые смесь растворителей проникает внутрь клетки, а липиды покидают клетку, площадь отверстий всех погибших, но сохранивших форму клеток равна S_2 ;

10) из клеток микроводорослей группы *B* можно извлечь $J = 41$ % от общего количества липидов внутри клеток;

11) все клетки биомассы имеют одинаковый радиус $r = 6$ мкм, площадь поверхности S ;

12) все аквапорины клетки, через которые внутрь клетки попадает

полярный экстрагент, имеют одинаковый размер (0.28 нм) и одинаковую пропускную способность (один аквапорин пропускает 10^9 молекул воды за 1 с [177]);

13) каждая клетка группы A имеет одинаковое количество аквапоринов, растворитель проникает в клетку, а продукт покидает клетку только через аквапорины в стенках клетки, которые после ее гибели увеличиваются в размерах и липиды через них диффундируют в фазу 2;

14) из клеток микроводорослей группы A можно извлечь $I = 17\%$ от общего количества липидов внутри клеток;

15) все клетки биомассы имеют одинаковую толщину стенки $\delta=45$ нм, площадь поверхности S и одинаковое количество внутриклеточных липидов.

Структурная схема процесса экстракции внутриклеточных липидов из биомассы разрушенных клеток микроводорослей, представлена на рис. 3.9. Она отображает зависимость вектора выходных переменных от входных переменных и конструктивных параметров технологического аппарата – экстрактора. Вектор входных переменных включает: x – концентрацию клеток микроводоросли в суспензии, c_C – количество разрушенных клеток, $T_{\text{ЭКС}}$ – температуру процесса экстракции, Z – количество экстрагента, приходящегося на одну часть сухого вещества биомассы; $l_{\text{ЭКС}}$ – тип экстрагента; $E_{\text{ЭКС}}$ – соотношение количеств экстрагентов. Выходной переменной является s – концентрация липидов в петролейном эфире; Вектор конструктивных параметров включает: V_a – объем экстрактора.

Вывод уравнений математической модели

Выделим в потоке данной фазы элементарный параллелепипед с ребрами dx , dy и dz , ориентированными относительно осей координат (рис. 3.8) [79].

Рассмотрим материальный баланс по распределяемому веществу для параллелепипеда в общем случае неустановившегося массообмена [169, 170].

Рассределяемое вещество проходит сквозь грани параллелепипеда как путем конвективного переноса (M_K), так и молекулярной диффузии (M_M).

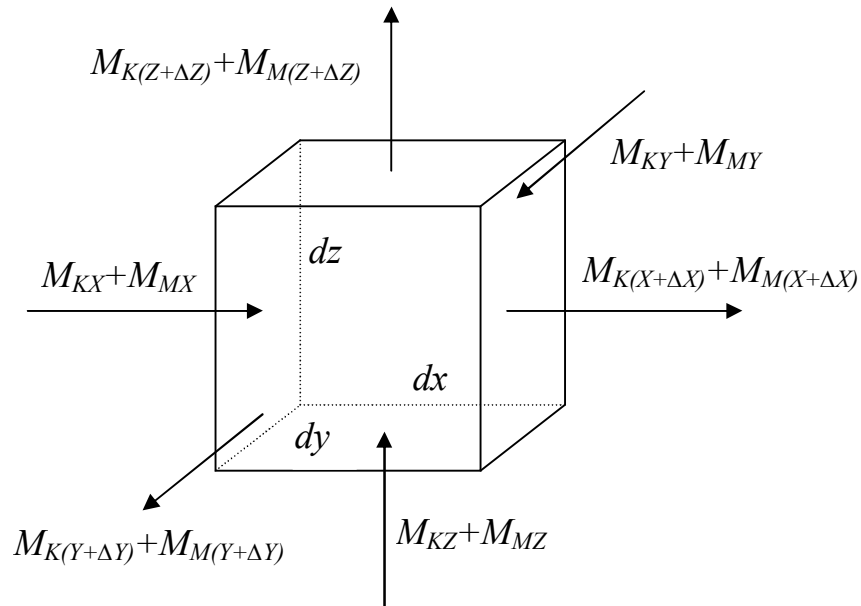


Рисунок 3.8 – К выводу уравнения молекулярной и конвективной диффузии

Конвективный перенос. Обозначим концентрацию распределяемого вещества в плоскости левой грани (на входе) параллелепипеда площадью $dy \cdot dz$ через c и проекции скорости потока на оси координат для данного элемента (точки) потока – через w_x , w_y и w_z , соответственно.

Тогда масса вещества, поступающего только за счет конвекции через площадь $dydz$, т.е. в направлении оси x , за время $d\tau$ составит:

$$M_{Kx} = w_x dy \cdot dz \cdot c \cdot d\tau$$

На противоположной грани (на выходе) параллелепипеда скорость и концентрация распределяемого вещества по оси x будут равны:

$$w_x + \frac{\partial w_x}{\partial x} \cdot dx, c + \frac{\partial c}{\partial x} \cdot dx.$$

Следовательно, за время $d\tau$ через противоположную грань параллелепипеда выходит путем конвективной диффузии:

$$M_{K(x+dx)} = w_x c \cdot dy \cdot d\tau + \frac{\partial(w_x \cdot c)}{\partial x} dx \cdot dy \cdot dz \cdot d\tau.$$

Разность между массами вещества, прошедшего через противоположные грани параллелепипеда за время $d\tau$ в направлении оси x равна:

$$dM_{Kx} = M_{Kx} - M_{K(x+dx)} = -\frac{\partial(w \cdot c)}{\partial x} dx \cdot dy \cdot dz \cdot d\tau = -\frac{\partial(w \cdot c)}{\partial x} dV \cdot d\tau,$$

где $dV = dx \cdot dy \cdot dz$ – объем элементарного параллелепипеда.

Аналогично в направлении осей y и z :

$$dM_{Ky} = -\frac{\partial(w \cdot c)}{\partial y} dV \cdot d\tau, \quad dM_{Kz} = -\frac{\partial(w \cdot c)}{\partial z} dV \cdot d\tau.$$

Таким образом, содержание распределяемого вещества в объеме параллелепипеда изменится за время $d\tau$ вследствие перемещения вещества путем конвективной диффузии на величину

$$dM_K = dM_{Kx} + dM_{Ky} + dM_{Kz} = -\left[\frac{\partial(w \cdot c)}{\partial x} + \frac{\partial(w \cdot c)}{\partial y} + \frac{\partial(w \cdot c)}{\partial z} \right] dV d\tau$$

или в развернутом виде, используя правило умножения производных:

$$dM_K = dM_{Kx} + dM_{Ky} + dM_{Kz} = -\left[\frac{\partial(w \cdot c)}{\partial x} + \frac{\partial(w \cdot c)}{\partial y} + \frac{\partial(w \cdot c)}{\partial z} \right] dV d\tau.$$

Согласно уравнению неразрывности потока для установившегося движения фазы: $\frac{\partial w_x}{\partial x} + \frac{\partial w_y}{\partial y} + \frac{\partial w_z}{\partial z} = 0$.

Следовательно, dM_K принимает следующий окончательный вид:

$$dM_K = -\left[w_x \frac{\partial c}{\partial x} + w_y \frac{\partial c}{\partial y} + w_z \frac{\partial c}{\partial z} \right] dV d\tau.$$

Молекулярная диффузия. Масса распределяемого вещества, поступающего в параллелепипед путем молекулярной диффузии через площадь $dy \cdot dz$ за время $d\tau$, в соответствии с первым законом Фика составит:

$$M_{Mx} = -D \frac{\partial c}{\partial x} dy \cdot dz \cdot d\tau.$$

Масса вещества, выходящего за время $d\tau$ через противоположную грань параллелепипеда путем молекулярной диффузии:

$$M_{M(x+dx)} = -D \frac{\partial}{\partial x} \left(c + \frac{\partial c}{\partial x} dx \right) dy \cdot dz \cdot d\tau.$$

Разность между массами продиффундировавшего через противоположные грани параллелепипеда вещества в направлении оси x за время $d\tau$ равна:

$$dM_{Mx} = M_{Mx} - M_{M(x+dx)} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} dx \cdot dy \cdot dz \cdot d\tau = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} dV d\tau.$$

Аналогично в направлении осей y и z :

$$dM_{My} = D \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} dV d\tau, \quad dM_{Mz} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} dV d\tau.$$

Таким образом, масса распределяемого вещества в объеме параллелепипеда изменится за время $d\tau$ вследствие перемещения вещества путем молекулярной диффузии на величину

$$dM_M = dM_{Mx} + dM_{My} + dM_{Mz} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) dV d\tau.$$

В результате изменения массы распределяемого вещества во времени в объеме параллелепипеда: $dM_\tau = \frac{\partial c}{\partial \tau} dV d\tau$.

Изменение массы распределяемого вещества за счет конвективной и молекулярной диффузии в объеме параллелепипеда по закону сохранения массы равняется изменению массы этого вещества во времени, т.е.:

$$dM_K + dM_M = dM_\tau$$

$$\text{или } - \left(w_x \frac{\partial c}{\partial x} + w_y \frac{\partial c}{\partial y} + w_z \frac{\partial c}{\partial z} \right) dV d\tau + D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) dV d\tau = \frac{\partial c}{\partial \tau} dV d\tau$$

$$\text{или } \frac{\partial c}{\partial \tau} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) - \left(w_x \frac{\partial c}{\partial x} + w_y \frac{\partial c}{\partial y} + w_z \frac{\partial c}{\partial z} \right). \quad (3.1)$$

$$\text{С начальными условиями (3.2): } c(x,0) = c_{x_0}; \quad c(y,0) = c_{y_0}; \quad c(z,0) = c_{z_0} \quad (3.2)$$

и граничными условиями третьего рода (3.3):

$$\begin{aligned}\alpha_1 \cdot c + \beta_1 \cdot \frac{\partial c}{\partial x} &= g_1(x, t), \\ \alpha_2 \cdot c + \beta_2 \cdot \frac{\partial c}{\partial y} &= g_2(y, t), \\ \alpha_3 \cdot c + \beta_3 \cdot \frac{\partial c}{\partial z} &= g_3(z, t).\end{aligned}\tag{3.3}$$

Уравнение (3.1) описывает кинетику изменения концентрации распределенного вещества в экстракторе для некоторого вещества. Схема кинетики экстракции липидов из клеток микроводорослей в экстракторе представлена на рисунке 3.9.

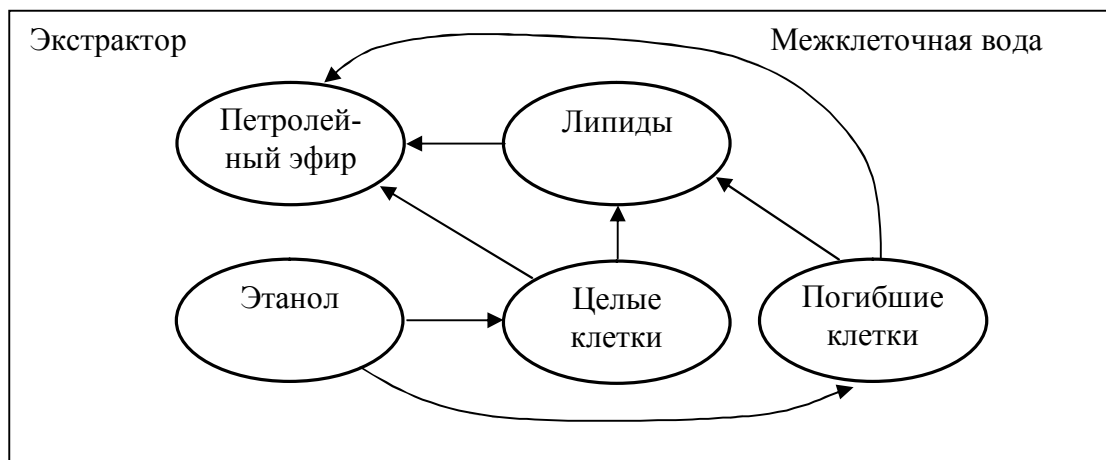


Рисунок 3.9 – Схема кинетики экстракции липидов из клеток микроводорослей в экстракторе

Исходя из рисунка 3.11, для расчета экстракции липидов из клеток микроводорослей в экстракторе получаем систему из 5 уравнений, которые описывают изменение концентрации этанола, липидов, петролейного эфира, погибших и целых клеток в межклеточной воде. При этом изменение концентрации этанола в фазе 2 осуществляется за счет молекулярной и конвективной составляющих, а липидов, петролейного эфира и клеток в основном за счет конвекции. Поскольку их молекулярное взаимодействие с межклеточной водой ничтожно мало. Таким образом, получаем систему уравнений (3.4):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial c}{\partial \tau} = D_{\text{э,мв}} \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) - \left(w_{1,x} \frac{\partial c}{\partial x} + w_{1,y} \frac{\partial c}{\partial y} + w_{1,z} \frac{\partial c}{\partial z} \right), \\ \frac{\partial c}{\partial \tau} = - \left(w_{2,x} \frac{\partial c}{\partial x} + w_{2,y} \frac{\partial c}{\partial y} + w_{2,z} \frac{\partial c}{\partial z} \right), \\ \frac{\partial c}{\partial \tau} = - \left(w_{3,x} \frac{\partial c}{\partial x} + w_{3,y} \frac{\partial c}{\partial y} + w_{3,z} \frac{\partial c}{\partial z} \right), \\ \frac{\partial c}{\partial \tau} = - \left(w_{4,x} \frac{\partial c}{\partial x} + w_{4,y} \frac{\partial c}{\partial y} + w_{4,z} \frac{\partial c}{\partial z} \right), \\ \frac{\partial c}{\partial \tau} = - \left(w_{5,x} \frac{\partial c}{\partial x} + w_{5,y} \frac{\partial c}{\partial y} + w_{5,z} \frac{\partial c}{\partial z} \right), \end{array} \right. \quad (3.4)$$

где $D_{\text{э,мв}}$ – диффузия этанола в межклеточную воду, w – скорость потока компонентов, c_A – концентрация клеток группы А, c_B – концентрация клеток группы В

Считаем, что в экстрактор сначала добавляется этанол в момент времени τ_0 , а затем в некоторый заданный момент времени τ_1 в экстрактор добавляется петролейный эфир, т.е. $\tau_1 > \tau_0$. Тогда начальные условия для системы (3.4) будут иметь следующий вид (3.5):

$$\begin{aligned} c_{\text{э}}(x,0) = 0; \quad c_{\text{э}}(y,0) = 0; \quad c_{\text{э}}(z,0) = 0; \\ c_{\text{л}}(x,0) = c_{\text{л}}^0(x); \quad c_{\text{л}}(y,0) = c_{\text{л}}^0(y); \quad c_{\text{л}}(z,0) = c_{\text{л}}^0(z); \\ c_{\text{нэ}}(x, \tau_1) = c_{\text{нэ}}^0(x); \quad c_{\text{нэ}}(y, \tau_1) = c_{\text{нэ}}^0(y); \quad c_{\text{нэ}}(z, \tau_1) = c_{\text{нэ}}^0(z); \\ c_{\text{А}}(x,0) = c_{\text{А}}^0(x); \quad c_{\text{А}}(y,0) = c_{\text{А}}^0(y); \quad c_{\text{А}}(z,0) = c_{\text{А}}^0(z); \\ c_{\text{В}}(x,0) = c_{\text{В}}^0(x); \quad c_{\text{В}}(y,0) = c_{\text{В}}^0(y); \quad c_{\text{В}}(z,0) = c_{\text{В}}^0(z); \end{aligned} \quad (3.5)$$

Граничные условия на отрезках $0 < x < H_x$, $0 < y < H_y$, $0 < z < H_z$ для системы (3.4) определяются через описание процесса диффузии компонентов согласно первому закону Фика:

1) **по этанолу**, определяются через описание процесса диффузии этанола внутрь целых и погибших клеток (рис. 3.10 и 3.11). Будем считать, что этанол в клетке распределяется равномерно.

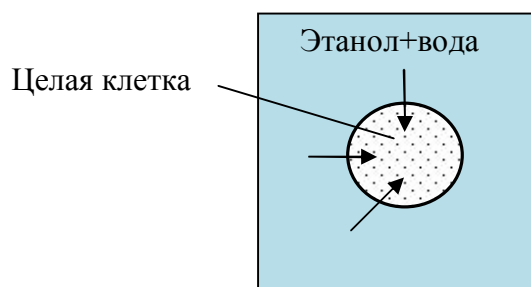


Рисунок 3.10 – Диффузия этанола внутрь целых клеток

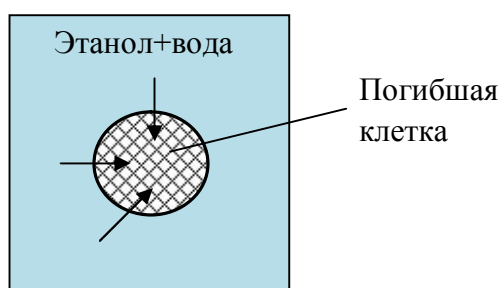


Рисунок 3.11 – Диффузия этанола внутрь погибших клеток

На левой границе $x=0, y=0, z=0$ имеем заданную концентрацию этанола:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{э}}(0, \tau) &= c_{\text{э}}^{\text{ex}}(x), \\
 c_{\text{э}}(0, \tau) &= c_{\text{э}}^{\text{ex}}(y), \\
 c_{\text{э}}(0, \tau) &= c_{\text{э}}^{\text{ex}}(z).
 \end{aligned}
 \tag{3.6}$$

Для правой границы разобьем описание процесса диффузии этанола на две составляющие:

а) Э+В (этанол+вода) → клетки группы А: диффузия этанола внутрь целых клеток (рис. 3.12);

б) Э+В (этанол+вода) → клетки группы В: диффузия этанола внутрь погибших клеток (рис. 3.13).

а) Э+В (этанол+вода) → клетки группы А. Для $x=H_x, y=H_y, z=H_z$ описание процесса на границе задается потоком (3.7):

$$\begin{aligned}
-n_A \cdot D_{\varepsilon, A}^x \cdot \frac{\partial c}{\partial x}(H_x, \tau) &= \frac{M_{\varepsilon, A}^x(\tau)}{F_A^x \cdot \tau}, \\
-n_A \cdot D_{\varepsilon, A}^y \cdot \frac{\partial c}{\partial y}(H_y, \tau) &= \frac{M_{\varepsilon, A}^y(\tau)}{F_A^y \cdot \tau}, \\
-n_A \cdot D_{\varepsilon, A}^z \cdot \frac{\partial c}{\partial z}(H_z, \tau) &= \frac{M_{\varepsilon, A}^z(\tau)}{F_A^z \cdot \tau},
\end{aligned} \tag{3.7}$$

где $D_{\varepsilon, A}$ – коэффициент диффузии этанола внутрь целых клеток (группа А);

n_A – массовая доля целых клеток в межклеточной воде; $M_{\varepsilon, A}$ – количество

продиффундировавшего этанола внутрь целой клетки, F_A – площадь поверхности целой клетки, m^2 .

б) Э+В (этанол+вода) → клетки группы В. Аналогичным образом описание процесса на границе $x=H_x$, $y=H_y$, $z=H_z$ задается потоком (3.8):

$$\begin{aligned}
-n_B \cdot D_{\varepsilon, B}^x \cdot \frac{\partial c}{\partial x}(H_x, \tau) &= \frac{M_{\varepsilon, B}^x(\tau)}{F_B^x \cdot \tau}, \\
-n_B \cdot D_{\varepsilon, B}^y \cdot \frac{\partial c}{\partial y}(H_y, \tau) &= \frac{M_{\varepsilon, B}^y(\tau)}{F_B^y \cdot \tau}, \\
-n_B \cdot D_{\varepsilon, B}^z \cdot \frac{\partial c}{\partial z}(H_z, \tau) &= \frac{M_{\varepsilon, B}^z(\tau)}{F_B^z \cdot \tau},
\end{aligned} \tag{3.8}$$

где $D_{\varepsilon, B}$ – коэффициент диффузии этанола внутрь погибших клеток

(группа В); n_B – массовая доля погибших клеток в межклеточной воде; $M_{\varepsilon, B}$

– количество продиффундировавшего этанола внутрь погибшей клетки, F_B – площадь поверхности погибшей клетки, m^2 .

Объединив две составляющие процесса диффузии этанола, которые описываются уравнениями (3.7) и (3.8), получим граничное условие на правой границе (3.9) для $x=H_x, y=H_y, z=H_z$:

$$\begin{aligned}
 -\left(n_A \cdot D_{\varepsilon,A}^x + n_B \cdot D_{\varepsilon,B}^x\right) \cdot \frac{\partial c_{\varepsilon}}{\partial x}\left(H_x, \tau\right) &= \frac{M_{\varepsilon,A}^x(\tau)}{F_A^x \cdot \tau} + \frac{M_{\varepsilon,B}^x(\tau)}{F_B^x \cdot \tau}, \\
 -\left(n_A \cdot D_{\varepsilon,A}^y + n_B \cdot D_{\varepsilon,B}^y\right) \cdot \frac{\partial c_{\varepsilon}}{\partial y}\left(H_y, \tau\right) &= \frac{M_{\varepsilon,A}^y(\tau)}{F_A^y \cdot \tau} + \frac{M_{\varepsilon,B}^y(\tau)}{F_B^y \cdot \tau}, \\
 -\left(n_A \cdot D_{\varepsilon,A}^z + n_B \cdot D_{\varepsilon,B}^z\right) \cdot \frac{\partial c_{\varepsilon}}{\partial z}\left(H_z, \tau\right) &= \frac{M_{\varepsilon,A}^z(\tau)}{F_A^z \cdot \tau} + \frac{M_{\varepsilon,B}^z(\tau)}{F_B^z \cdot \tau};
 \end{aligned} \tag{3.9}$$

2) **по липидам**, для $x=0, y=0, z=0$ определяются через описание процесса выливания липидов из клеток в воду и для $x=H_x, y=H_y, z=H_z$ через описание процесса диффузии липидов с петролейным эфиром (рис. 3.12 и 3.13).

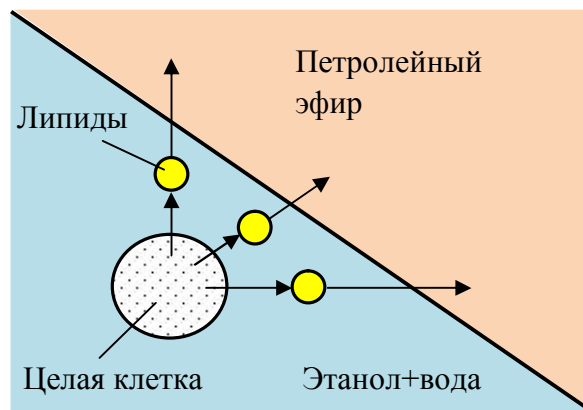


Рисунок 3.12 – Диффузия липидов из целых клеток в петролейный эфир в межклеточной воде

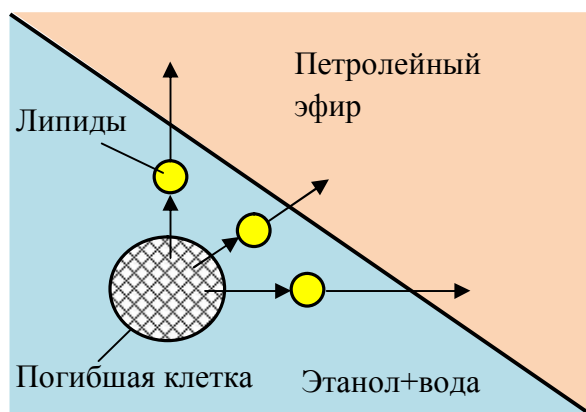


Рисунок 3.13 – Диффузия липидов из погибших клеток в петролейный эфир в межклеточной воде

Для левой границы описание процесса диффузии липидов из клеток разбивается на две составляющие по аналогии с диффузией этанола в клетки:

а) клетки группы А → липиды: диффузия липидов из целых клеток (рис. 3.14);

б) клетки группы В → липиды: диффузия липидов из погибших клеток (рис. 3.15);

а) клетки группы А → липиды. Для $x=0, y=0, z=0$ имеем заданный поток липидов их целых клеток (3.10):

$$\begin{aligned}
 -n_A \cdot D_{л,А}^x \cdot \frac{\partial c_{л,А}}{\partial x}(0, \tau) &= \frac{M_{л,А}^x(\tau)}{F_A^x \cdot \tau}, \\
 -n_A \cdot D_{л,А}^y \cdot \frac{\partial c_{л,А}}{\partial y}(0, \tau) &= \frac{M_{л,А}^y(\tau)}{F_A^y \cdot \tau}, \\
 -n_A \cdot D_{л,А}^z \cdot \frac{\partial c_{л,А}}{\partial z}(0, \tau) &= \frac{M_{л,А}^z(\tau)}{F_A^z \cdot \tau},
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

где $D_{л,А}$ – коэффициент диффузии липидов из целых клеток; n_A – массовая доля целых клеток в межклеточной воде; $M_{л,А}$ – количество продиффундировавших липидов из целых клеток, F_A – площадь поверхности целой клетки, m^2 ;

б) клетки группы В \rightarrow липиды. Для $x=0, y=0, z=0$ имеем заданный поток липидов из погибших клеток (3.11):

$$\begin{aligned} -n_B \cdot D_{л,В}^x \cdot \frac{\partial c_{л}}{\partial x}(0, \tau) &= \frac{M_{л,В}^x(\tau)}{F_B^x \cdot \tau}, \\ -n_B \cdot D_{л,В}^y \cdot \frac{\partial c_{л}}{\partial y}(0, \tau) &= \frac{M_{л,В}^y(\tau)}{F_B^y \cdot \tau}, \\ -n_B \cdot D_{л,В}^z \cdot \frac{\partial c_{л}}{\partial z}(0, \tau) &= \frac{M_{л,В}^z(\tau)}{F_B^z \cdot \tau}, \end{aligned} \quad (3.11)$$

где $D_{л,В}$ – коэффициент диффузии липидов из погибших клеток; n_B – массовая доля погибших клеток в межклеточной воде; $M_{э,В}$ – количество продиффундировавших липидов из погибших клеток, F_B – площадь поверхности погибшей клетки, m^2 .

Объединив две составляющие процесса диффузии липидов, которые описываются уравнениями (3.10) и (3.11), получим граничное условие (3.12) для $x=0, y=0, z=0$:

$$\begin{aligned} -\left(n_A \cdot D_{л,А}^x + n_B \cdot D_{л,В}^x\right) \cdot \frac{\partial c_{л}}{\partial x}(0, \tau) &= \frac{M_{л,А}^x(\tau)}{F_A^x \cdot \tau} + \frac{M_{л,В}^x(\tau)}{F_B^x \cdot \tau}, \\ -\left(n_A \cdot D_{л,А}^y + n_B \cdot D_{л,В}^y\right) \cdot \frac{\partial c_{л}}{\partial y}(0, \tau) &= \frac{M_{л,А}^y(\tau)}{F_A^y \cdot \tau} + \frac{M_{л,В}^y(\tau)}{F_B^y \cdot \tau}, \\ -\left(n_A \cdot D_{л,А}^z + n_B \cdot D_{л,В}^z\right) \cdot \frac{\partial c_{л}}{\partial z}(0, \tau) &= \frac{M_{л,А}^z(\tau)}{F_A^z \cdot \tau} + \frac{M_{л,В}^z(\tau)}{F_B^z \cdot \tau}; \end{aligned} \quad (3.12)$$

Для $x=H_x, y=H_y, z=H_z$ имеем заданный поток липидов (3.13):

$$\begin{aligned}
-D_{л,нэ}^x \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \left(H_x, \tau \right) &= \frac{M_{л,нэ}^x(\tau)}{F_{нэ}^x \cdot \tau}, \\
-D_{л,нэ}^y \cdot \frac{\partial c}{\partial y} \left(H_y, \tau \right) &= \frac{M_{л,нэ}^y(\tau)}{F_{нэ}^y \cdot \tau}, \\
-D_{л,нэ}^z \cdot \frac{\partial c}{\partial z} \left(H_z, \tau \right) &= \frac{M_{л,нэ}^z(\tau)}{F_{нэ}^z \cdot \tau},
\end{aligned} \tag{3.13}$$

где $D_{л,нэ}$ – коэффициент диффузии липидов в петролейный эфир; $M_{л,нэ}$ – количество продиффундировавших липидов в петролейный эфир, $F_{нэ}$ – площадь поверхности капли петролейного эфира, m^2 ;

3) по петролейному эфиру соответствуют его входной концентрации в экстракторе (3.14)–(3.15):

Для $x=0, y=0, z=0$:

$$c_{нэ}(0, \tau) = c_{нэ}^{вх(x)}; c_{нэ}(0, \tau) = c_{нэ}^{вх(y)}; c_{нэ}(0, \tau) = c_{нэ}^{вх(z)}. \tag{3.14}$$

Для $x=H_x, y=H_y, z=H_z$:

$$c_{нэ}(H_x, \tau) = c_{нэ}^{вх(x)}; c_{нэ}(H_y, \tau) = c_{нэ}^{вх(y)}; c_{нэ}(H_z, \tau) = c_{нэ}^{вх(z)}; \tag{3.15}$$

4) по целым клеткам (клетки группы А), граничные условия определяются диффузией клеток в петролейный эфир.

Для $x=0, y=0, z=0$ соответствуют входной концентрации клеток в экстракторе (3.16):

$$c_A(0, \tau) = c_A^{вх(x)}; c_A(0, \tau) = c_A^{вх(y)}; c_A(0, \tau) = c_A^{вх(z)}. \tag{3.16}$$

Для $x=H_x, y=H_y, z=H_z$ соответствуют заданному потоку (3.17):

$$\begin{aligned}
-D_{A,нэ}^x \cdot \frac{\partial c}{\partial x} (H_x, \tau) &= \frac{M_{A,нэ}^x(\tau)}{F_{нэ}^x \cdot \tau}, \\
-D_{A,нэ}^y \cdot \frac{\partial c}{\partial y} (H_y, \tau) &= \frac{M_{A,нэ}^y(\tau)}{F_{нэ}^y \cdot \tau}, \\
-D_{A,нэ}^z \cdot \frac{\partial c}{\partial z} (H_z, \tau) &= \frac{M_{A,нэ}^z(\tau)}{F_{нэ}^z \cdot \tau},
\end{aligned} \tag{3.17}$$

где $D_{A,нэ}$ – коэффициент диффузии целых клеток в петролейный эфир;

$M_{A,нэ}$ – количество продиффундировавших целых клеток в петролейный

эфир, $F_{нэ}$ – площадь поверхности петролейного эфира, м²;

5) по погибшим клеткам (клетки группы В), граничные условия определяются диффузией клеток в петролейный эфир аналогично с целыми клетками.

Для $x=0$, $y=0$, $z=0$ соответствуют входной концентрации погибших клеток в экстракторе (3.18):

$$c_a(0, \tau) = c_a^{ex(x)}; c_b(0, \tau) = c_b^{ex(y)}; c_c(0, \tau) = c_c^{ex(z)}. \tag{3.18}$$

Для $x=H_x$, $y=H_y$, $z=H_z$ соответствуют заданному потоку погибших клеток (3.19):

$$\begin{aligned}
-D_{B,нэ}^x \cdot \frac{\partial c}{\partial x} (H_x, \tau) &= \frac{M_{B,нэ}^x(\tau)}{F_{нэ}^x \cdot \tau}, \\
-D_{B,нэ}^y \cdot \frac{\partial c}{\partial y} (H_y, \tau) &= \frac{M_{B,нэ}^y(\tau)}{F_{нэ}^y \cdot \tau}, \\
-D_{B,нэ}^z \cdot \frac{\partial c}{\partial z} (H_z, \tau) &= \frac{M_{B,нэ}^z(\tau)}{F_{нэ}^z \cdot \tau},
\end{aligned} \tag{3.19}$$

где $D_{B,нэ}$ – коэффициент диффузии погибших клеток в петролейный эфир;
 $M_{B,нэ}$ – количество протифундировавших погибших клеток в петролейный эфир, F_B – площадь поверхности петролейного эфира, m^2 .

Введенное допущение о возможности осуществления в экстракторе идеального перемешивания, предполагает, что

$$D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) - \left(w_x \frac{\partial c}{\partial x} + w_y \frac{\partial c}{\partial y} + w_z \frac{\partial c}{\partial z} \right) = 0$$

Введем дополнительные допущения:

- 1) скорость изменения концентраций одинакова во всех направлениях;
- 2) перенос распределяемого вещества через поверхность фаз рассматривается как классический процесс массопередачи, согласно которому скорость массопередачи определяется количеством распределяемого вещества M (кг), переходящего из одной фазы в другую через единицу поверхности соприкосновения фаз F (m^2) в единицу времени τ , т.е. $\frac{M}{F \cdot \tau}$. При этом скорость процесса массопередачи пропорциональна его движущей силе, которая равна разности концентраций: $c - c^*$, где c – концентрация распределяемого вещества в первой фазе, откуда вещество уходит; c^* – концентрация распределяемого вещества у поверхности раздела фаз (со стороны первой фазы), при которой бы существовало равновесие с концентрацией второй фазы. Тогда скорость массопередачи равна $\frac{M}{F \cdot \tau} = \frac{c - c^*}{R}$ (основной закон массопередачи), где R – диффузионное сопротивление переносу вещества, $\frac{1}{R} = K$ – коэффициент массопередачи, м/с.

Ввиду вышесказанного, уравнение изменения количества распределяемого вещества через поверхность фаз за время $d\tau$ примет вид (3.20):

$$\frac{dM}{d\tau} = K \cdot F \cdot (c - c^*), \quad (3.20)$$

Рассмотрим изменение количества веществ в процессе экстракции липидов из пасты микроводорослей посредством петролейного эфира и составим уравнения материального баланса. В рассматриваемом процессе будем иметь 3 фазы: 1 фаза – погибшие и целые клетки; 2 фаза – этанол+вода; 3 фаза – петролейный эфир. Для однократного взаимодействия фаз уравнение материального баланса имеет следующий вид:

$$M1_H + M2_H = M1_K + M2_K,$$

где $M1_H$ и $M1_K$ – начальное и конечное количество фазы 1; $M2_H$ и $M2_K$ – начальное и конечное количество фазы 2.

В процессе экстракции липидов из пасты микроводорослей осуществляется следующие взаимодействия фаз:

1) фаза 2 → фаза 1: снижение количества этанола+воды за счет его поступления внутрь целых и погибших клеток (клеток группы *A* и *B*);

2) фаза 1 → фаза 3: повышение количества липидов за счет их диффузии из целых и погибших клеток;

3) фаза 2 → фаза 3: снижение количества липидов за счет их проникновения в петролейный эфир.

Таким образом, получим систему балансовых уравнений для изменения концентрации этанола и липидов в фазе 2 (3.21):

$$\begin{cases} M_{\text{э}(2)}^0 + M_{\text{э},A}^0 + M_{\text{э},B}^0 = M_{\text{э}(2)}^k + M_{\text{э},A}^k + M_{\text{э},B}^k, \\ M_{\text{л}(2)}^0 + M_{\text{л},A}^0 + M_{\text{л},B}^0 + M_{\text{л}(3)}^0 = M_{\text{л}(2)}^k + M_{\text{л},A}^k + M_{\text{л},B}^k + M_{\text{л}(3)}^k, \end{cases} \quad (3.21)$$

где $M_{\text{э}(2)}^0$, $M_{\text{э}(2)}^k$ – количество этанола фазе 2 в начальный и конечный

момент времени; $M_{\text{э},A}^0$, $M_{\text{э},A}^k$ – количество этанола в целых клетках в

начальный и конечный момент времени; $M_{\varepsilon, B}^0$, $M_{\varepsilon, B}^t$ – количество этанола в погибших клетках в начальный и конечный момент времени; $M_{л(2)}^0$, $M_{л(2)}^t$ – количество липидов в фазе 2 в начальный и конечный момент времени; $M_{л,(A)}^0$, $M_{л,(A)}^t$ – количество липидов в клетках группы A в начальный и конечный момент времени; $M_{л,(B)}^0$, $M_{л,(B)}^t$ – количество липидов в клетках группы B в начальный и конечный момент времени; $M_{л,пэ}^0$, $M_{л,пэ}^t$ – количество петролейного эфира в начальный и конечный момент времени.

Разделим правую и левую часть уравнений системы (3.21) на разность начального и конечного момента времени:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{M_{\varepsilon(2)}^t - M_{\varepsilon(2)}^0}{t_{\kappa} - t_0} + \frac{M_{\varepsilon, A}^t - M_{\varepsilon, A}^0}{t_{\kappa} - t_0} + \frac{M_{\varepsilon, B}^t - M_{\varepsilon, B}^0}{t_{\kappa} - t_0} = 0, \\ \frac{M_{л(2)}^t - M_{л(2)}^0}{t_{\kappa} - t_0} + \frac{M_{л, A}^t - M_{л, A}^0}{t_{\kappa} - t_0} + \frac{M_{л, B}^t - M_{л, B}^0}{t_{\kappa} - t_0} + \frac{M_{л(3)}^t - M_{л(3)}^0}{t_{\kappa} - t_0} = 0. \end{array} \right.$$

При условии непрерывности функций M на интервале $d\tau = \tau_{\kappa} - \tau_0$ и $d\tau \rightarrow 0$ запишем систему (3.21) в дифференциальной форме (3.22):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dM_{\varepsilon(2)}}{d\tau} + \frac{dM_{\varepsilon, (A)}}{d\tau} + \frac{dM_{л(2), (B)}}{d\tau} = 0, \\ \frac{dM_{л(2)}}{d\tau} + \frac{dM_{л, (A)}}{d\tau} + \frac{dM_{л, (B)}}{d\tau} + \frac{dM_{л(3)}}{d\tau} = 0. \end{array} \right. \quad (3.22)$$

Преобразуем систему (3.22) путем замены количеств этанола и липидов на концентрации этих веществ:

$$\begin{cases} \frac{dc_{\text{э}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{-V_a} \left(\frac{dM_{\text{э},A}}{d\tau} + \frac{dM_{\text{э},B}}{d\tau} \right), \\ \frac{dc_{\text{л}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{-V_a} \left(\frac{dM_{\text{л},A}}{d\tau} + \frac{dM_{\text{л},B}}{d\tau} + \frac{dM_{\text{л}(3)}}{d\tau} \right), \end{cases} \quad (3.23)$$

с начальными условиями: $c_{\text{э}}(0) = c_{\text{э}}^{\text{вх}}$, $c_{\text{л}(2)}(0) = c_{\text{л}(2)}^{\text{вх}}$,

где V_a – объем пасты микроводоросли, м³

Процесс экстракции липидов из биомассы микроводорослей согласно схеме экстракции, представленной выше можно разделить на три временных отрезка:

- 1) от 0 до 20 минут;
- 2) от 20 до 50 минут;
- 3) от 50 и далее.

Для первого этапа экстракции (от 0 до 20 минут) математическая модель будет иметь следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dc_{\text{э}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{-V_a} \left(\frac{dM_{\text{э},A}}{d\tau} + \frac{dM_{\text{э},B}}{d\tau} \right), \\ \frac{dc_{\text{л}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{-V_a} \left(\frac{dM_{\text{л}(3)}}{d\tau} \right), \end{cases}$$

С начальными условиями: $c_{\text{э}}(0) = c_{\text{э}}^{\text{вх}}$; $c_{\text{л}(2)}(0) = c_{\text{л}(2)}^{\text{вх}}$.

Для второго этапа экстракции (от 20 до 50 минут) математическая модель будет иметь следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dc_{\text{э}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{-V_a} \left(\frac{dM_{\text{э},A}}{d\tau} \right), \\ \frac{dc_{\text{л}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{-V_a} \left(-\frac{dM_{\text{л},B}}{d\tau} + \frac{dM_{\text{л}(3)}}{d\tau} \right), \end{cases}$$

С начальными условиями:

$$c_{\text{э}}(20) = c_{\text{э}}^{\text{вых}(1)}; c_{\text{л}(2)}(20) = c_{\text{л}(2)}^{\text{вых}(1)}.$$

Для третьего этапа экстракции (от 50 до 110 минут) математическая модель будет иметь следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dc_{\text{э}}(2)}{d\tau} = 0, \\ \frac{dc_{\text{л}(2)}}{d\tau} = \frac{1}{V_a} \left(\frac{dM_{\text{л},A}}{d\tau} + \frac{dM_{\text{л},B}}{d\tau} - \frac{dM_{\text{л}(3)}}{d\tau} \right) \end{cases}$$

С начальными условиями:

$$c_{\text{э}}(50) = c_{\text{э}}^{\text{вых}(2)}; c_{\text{л}(2)}(50) = c_{\text{л}(2)}^{\text{вых}(1)}.$$

Учитывая, что в экстракторе создается развитый турбулентный режим ($Re > 10000$), то коэффициент массопередачи будет главным образом зависит от коэффициента молекулярной диффузии и будет определяться по формуле:

$$K = D_m.$$

Количество этанола перешедшее из фазы 2 внутрь погибших, но сохранивших форму клеток $\frac{\Delta M_{\text{э},(B)}^{(21)}}{d\tau}$ в течение от 0 до 20 минут будет описываться первым законом Фика [162]:

$$\frac{\Delta M_{\text{э},(B)}^{(21)}}{d\tau} = -D_{\text{эф}} F_l \cdot \frac{dc_{\text{э}(B)}^{(21)}}{dx},$$

где $\frac{\Delta M_{\text{э},(B)}^{(21)}}{d\tau}$ - масса этанола, перешедшей из фазы 2 внутрь погибших, но сохранивших форму клеток за единицу времени; F_l - площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 1 (внутриклеточного пространства) – примем равной площади всех отверстий всех погибших, но сохранивших форму клеток, присутствующих в пасте микроводорослей; $\frac{dc_{\text{э}(B)}^{(21)}}{dx}$ - градиент концентрации этанола через отверстия в клетке микроводорослей группы B;

$D_{\text{вн}}$ - коэффициент молекулярной диффузии, осложненной тем, что диффузия идет через отверстия в клеточной стенке.

Согласно экспериментальным данным [180] и принятому допущению 10 площадь поверхности контакта фаз F_1 составит 25 % от общей поверхности всех клеток микроводорослей, таким образом F_1 может быть вычислена по формуле:

$$F_1 = c_{\text{кл}(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2, \quad (3.24)$$

где $c_{\text{кл}(B)}$ – концентрация всех погибших, но сохранивших форму клеток в пасте микроводорослей млн кл/мл; V_a – объем пасты микроводорослей, мл; r – радиус клетки микроводорослей, м.

Коэффициент диффузии этанола через отверстия внутрь клеток может быть рассчитан по уравнению Эйнштейна-Смолуховского для свободной диффузии с поправочным коэффициентом B_s , учитывающим площадь отверстий в клеточной стенке [161]:

$$D_{\text{вн}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_s} \cdot B_s,$$

где N_a - число Авогадро; $T_{\text{экс}}$ – температура экстракции; μ - динамическая вязкость, R - универсальная газовая постоянная; r_s - радиус молекулы этанола, B_s - поправочный коэффициент, учитывающим площадь отверстий клеточной стенки [161]:

$$B_s = F_1 / F_0, \quad (3.25)$$

где F_1 – общая площадь отверстий клеточной стенке, через которые этанол диффундирует внутрь клетки, F_0 – общая поверхность клеточных стенок погибших, но сохранивших форму клеток микроводорослей, которая определяется по формуле:

$$F_0 = 4 \cdot c_{\text{кл}(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2$$

где $\frac{dc_{э(B)}^{(21)}}{dx}$ - градиент концентрации этанола через отверстия клеточной стенки в клетку микроводорослей группы B приблизительно равен $\frac{c_{э(B)}^{(2)} - c_{э(B)}^{*(1)}}{l_{cm}}$, где l_{cm} - толщина клеточной стенки, м (рис. 3.14) [177].

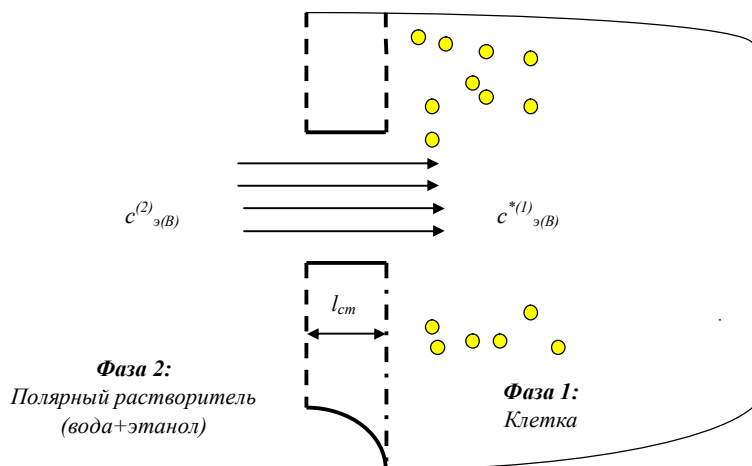


Рисунок 3.14 - Молекулярная диффузия через отверстие мембраны. Количество этанола перешедшее из фазы 2 внутрь целых клеток $\frac{\Delta M_{э,(B)}^{(21)}}{d\tau}$ в течение от 0 до 20 минут будет описываться также первым законом Фика:

$$\frac{\Delta M_{э,(B)}^{(21)}}{d\tau} = -D_{вн1} \cdot F_2 \cdot \frac{dc_{э(A)}^{(21)}}{dx},$$

где $\frac{\Delta M_{э,(B)}^{(21)}}{d\tau}$ - масса этанола, перешедшей из фазы 2 внутрь целых клеток микроводорослей за единицу времени; F_2 - площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 1 (внутриклеточного пространства) – примем равной площади всех аквапорин всех целых клеток, присутствующих в пасте микроводорослей; $\frac{dc_{э(B)}^{(21)}}{dx}$ - градиент концентрации этанола через аквапорины в клетке микроводорослей; $D_{вн1}$ - коэффициент молекулярной диффузии, осложненной тем, что диффузия идет только через поры в клеточной стенке.

Определим площадь поверхности все пор целых клеток микроводорослей из следующих соображений: коэффициент диффузии воды внутрь клетки *Chlorella vulgaris* равен $D_{эф}=1.2 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ [62]. Отсюда, находим

количество моль воды, которое проходит через аквапорины внутрь клетки за 1 с – $0.07 \cdot 10^{-6}$ моль. При этом, 1 моль содержит $6.022 \cdot 10^{23}$ молекул, таким образом за 1 с через все аквапорины проходит молекул:

$$6.022 \cdot 10^{23} \cdot 0.07 \cdot 10^{-6} = 0.42 \cdot 10^{17} \text{ шт.},$$

Также известно, что через одну пору аквапорина за 1 с проходит более 10^9 молекул воды [176], для расчета примем, что через одну пору проходит ровно 10^9 молекул воды. Тогда, общее количество аквапорин в клеточной стенке *Chlorella vulgaris* будет равно: $0.42 \cdot 10^{17} / 10^9 = 0.42 \cdot 10^8 \text{ шт}$

Примем площадь 1 аквапорина (диаметр одного аквапорина 0.20 нм [178]): $F_{\text{ак}} = \pi \cdot r_{\text{п}}^2 = 3.14 \cdot (1.4 \cdot 10^{-10})^2 = 6.15 \cdot 10^{-20} \text{ м}^2$.

Тогда общая площадь аквапоринов одной клетки:

$$F_{\text{Об}} = 6.15 \cdot 10^{-20} \cdot 0.42 \cdot 10^8 = 2.6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2.$$

Отсюда найдем, что общая площадь всех аквапорин всех целых клеток пасты микроводорослей равна:

$$F_2 = c_{\text{кл}(A)} \cdot V_a \cdot \frac{D_{\text{эф}} \cdot N_a}{100} \pi \cdot r_{\text{п}}^2, \quad (3.26)$$

где $c_{\text{кл}(A)}$ – концентрация всех целых клеток в пасте микроводорослей млн кл/мл; V_a – объем пасты микроводорослей, мл.

Коэффициент диффузии этанола через аквапорины внутрь клеток может быть рассчитан по уравнению Эйнштейна-Смолуховского для свободной диффузии с поправочным коэффициентом B_{S1} , учитывающим площадь отверстий в клеточной стенке [161]:

$$D_{\text{вн}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_s} \cdot B_{S1},$$

где N_a - число Авогадро; $T_{\text{экс}}$ – температура экстракции; μ - динамическая вязкость, R - универсальная газовая постоянная; r_s - радиус молекулы этанола, B_{S1} - поправочный коэффициент, учитывающим площадь пор (аквапорин) клеточной стенки [161]:

$$B_{s1} = F_2 / F_{01},$$

где F_2 – общая площадь пор клеточной стенки всех целых клеток пасты микроводорослей, через которые этанол диффундирует внутрь клеток, F_{01} – общая поверхность клеточных стенок целых клеток микроводорослей, которая определяется по формуле:

$$F_{01} = 4 \cdot c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2$$

где $\frac{dc_{э(A)}^{(21)}}{dx}$ – градиент концентрации этанола через поры клеточной стенки в

клетку микроводорослей приблизительно равен $\frac{c_{э(A)}^{(2)} - c_{э(A)}^{*(1)}}{l_{cm}}$, l_{cm} – толщина клеточной стенки, м (рис. 3.15).

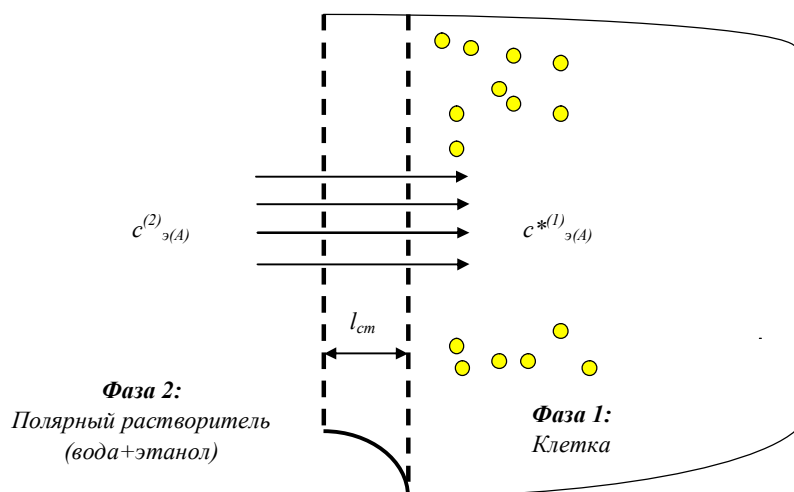


Рисунок 3.15 - Молекулярная диффузия через отверстие мембраны

Введем в систему уравнение, описывающее диффузию липидов из фазы 2 (межклеточная вода+этанол) в фазу 3 (капли петролейного эфира), для проверки адекватности модели (экспериментально определялась концентрация общих липидов в фазе 2 и фазе 3). Диффузия липидов, которые вытекли в фазу 2 из разрушенных клеток, с 0 по 20 мин будет описываться первым законом Фика:

$$\frac{\Delta M_{л(3)}}{d\tau} = -D_m \cdot F_3 \cdot \frac{dc_{л(3)}}{dx} ,$$

где $\frac{\Delta M_{л(3)}}{d\tau}$ – масса липидов, перешедшая из фазы 2 в фазу 3 за единицу

времени; F_3 – площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 3 (капли

петролейного эфира) – примем равной площади поверхности всех капель петролейного эфира; $\frac{dc_{л(3)}}{dx}$ - градиент концентрации липидов из фазы 2 в фазу 3; D_m - коэффициент молекулярной диффузии липидов из фазы 2 в фазу 3.

Площадь поверхности контакта фаз 2 и 3 – F_3 может быть определена, как сумма поверхностей всех капель петролейного эфира, которые при разрушении клетки взаимодействуют с плавающими в фазе 2 липидными каплями и белково-липидными комплексами. Таким образом, общую площадь поверхности контакта фаз в данном случае можно будет вычислить по следующим формулам:

$$F_{\Pi} = 4 \cdot \pi \cdot r_{н.э.}^2,$$

где F_{Π} – площадь поверхности капли петролейного эфира; $r_{н.э.}$ – радиус капли петролейного эфира.

$$V_{\text{кап}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_{н.э.}^3,$$

где $V_{\text{кап}}$ – объем капли петролейного эфира.

$$n = \frac{V_{п.э.}}{V_{\text{кап}}},$$

где n – количество капель петролейного эфира; $V_{п.э.}$ – объем петролейного эфира, взятого для экстракции; $V_{\text{кап}}$ – объем капли петролейного эфира.

Общая площадь поверхности контакта фаз в таком случае равна:

$$F_3 = F_{\Pi} \cdot n.$$

Проникновение липидов внутрь капли петролейного эфира будет осуществляться за счет молекулярной диффузии, расчет которой будет осуществляться по формуле Эйнштена-Смолуховского:

$$D_{\text{вн}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l}$$

где N_a - число Авогадро; $T_{\text{экс}}$ – температура экстракции; μ - динамическая вязкость, R - универсальная газовая постоянная; r_l – радиус липидной капли.

где $\frac{dc_{л(3)}}{dx}$ - градиент концентрации липидов из фазы 2 в фазу 3, который будет

определяться по формуле: $\frac{c_{л}^{(2)} - c_{л}^{*(3)}}{r_{п.э.}}$ (рис. 3.16).

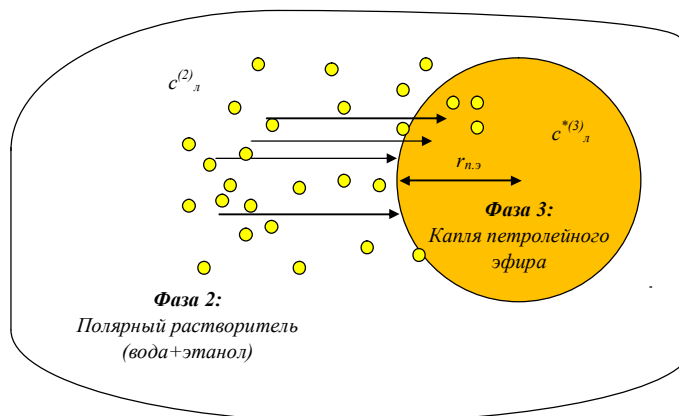


Рисунок 3.16 - Молекулярная диффузия через отверстие мембраны

Таким образом, для времени экстракции от 0 до 20 минут математическая модель кинетики экстракции липидов из клеток микроводорослей после стадии дезинтеграции с использованием в качестве экстрагентов этанола и петролейного эфира (1:2 (об.)) (диффузия этанола внутрь целых и погибших клеток; диффузия липидов из фазы 2 (этанол+вода) в фазу 3 (петролейный эфир)): будет иметь вид:

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dc_{э(2)}}{d\tau} &= \left(-\frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_э} \cdot \frac{(c_{кл(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2)^2}{4 \cdot c_{кл(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \left(\frac{c_{э(B)}^{(2)} - c_{э(B)}^{*(1)}}{l_{cm}} \right) - \right. \\ &\left. - \frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_э} \cdot \frac{(c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \frac{D_{эф}}{100} \cdot N_a \cdot \pi \cdot r_{n1}^2)^2}{4 \cdot c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \frac{c_{э(A)}^{(2)} - c_{э(A)}^{*(1)}}{l_{cm}} \cdot F_2 \right) \cdot \frac{1}{V_a}, \\ \frac{dc_{л(2)}}{d\tau} &= \frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_л} \cdot \frac{3 \cdot V_{п.э.}}{r_{п.э.}} \cdot \left(\frac{c_{л}^{(2)} - c_{л}^{*(3)}}{r_{п.э.}} \right) \cdot \frac{1}{V_a}, \\ \frac{dc_{л(3)}}{d\tau} &= -\frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_л} \cdot \frac{3 \cdot V_{п.э.}}{r_{п.э.}} \cdot \frac{c_{л}^{(2)} - c_{л}^{*(3)}}{r_{п.э.}} \cdot \frac{1}{V_a}. \end{aligned} \right.$$

Начальные условия:

$$c_{э(2)}(x, 0) = \frac{x_{св} \cdot \frac{20}{3} \cdot \rho_{эт}}{46 \cdot (x_{св} \cdot 20 + m_{влаж. био} \cdot W_{вл})},$$

$$c_{л(2)}(x,0) = c_{л(раз)}^{*2} = \frac{x_{св} c_{лип} c_c}{892 \cdot (x_{св} \cdot 20 + m_{влаж. био} \cdot W_{вл})},$$

$$c_{л(3)}(x,0) = 0.$$

где $x_{св}$ – количество сухого вещества микроводорослей; $\rho_{эт}$ – плотность этанола; $m_{влаж. био}$ – масса пасты микроводорослей; $W_{вл}$ – количество воды в паста микроводорослей; $c_{лип}$ – количество липидов в пасте микроводорослей относительно сухого вещества клетки; c_c – количество полностью разрушенных клеток микроводорослей в пасте микроводорослей.

На промежутке времени от 20 до 50 минут достигается равновесие в процессе диффузии этанола внутрь погибших, но сохранивших форму клеток; из погибших клеток (фаза 1) в межклеточную воду + этанол (фаза 2) начинают диффундировать липиды; продолжается диффузия этанола из фазы 2 в целые клетки (фаза 1); диффузия липидов из фазы 2 (этанол+вода) в фазу 3 (петролейный эфир)). Математическая модель на этом промежутке времени описывается системой уравнений (3.27), начальными условиями для которой являются $c_{э(2)}$, $c_{л(2)}$, $c_{л(3)}$ в момент времени $\tau=20$ мин, и определяются по результатам решения математической модели на промежутке времени от 0 до 20 минут.

Процесс диффузии липидов из фазы 1 (внутриклеточного пространства погибших, но сохранивших форму клеток) в фазу 2 (межклеточная вода+этанол), который начинается в момент времени $\tau=20$ мин описывается первым законом Фика:

$$\frac{\Delta M_{л(B)}^{(12)}}{d\tau} = -D_{вн} F_1 \frac{dc_{л(B)}^{(12)}}{dx},$$

где $\frac{\Delta M_{л(B)}^{(12)}}{d\tau}$ – масса липидов, перешедших из фазы 1 (внутриклеточного пространства погибших, но сохранивших форму клеток) в фазу 2 (межклеточную воду+этанол) за единицу времени; F_1 – площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 1 (внутриклеточного пространства) – примем равной площади всех отверстий всех погибших, но сохранивших

форму клеток, присутствующих в пасте микроводорослей; $\frac{dc_{л(B)}^{(12)}}{dx}$ - градиент концентрации липидов через отверстия в клетке микроводорослей; $D_{вн}$ – коэффициент молекулярной диффузии, осложненной тем, что диффузия идет через отверстия в клеточной стенке. Согласно экспериментальным данным [180] и принятому допущению 10 площадь поверхности контакта фаз F_I может быть вычислена по формуле (3.24).

Коэффициент диффузии этанола через отверстия внутрь клеток может быть рассчитан по уравнению Эйнштейна-Смолуховского для свободной диффузии с поправочным коэффициентом B_S , учитывающим площадь отверстий в клеточной стенке и рассчитывается по формуле:

$$D_{вн} = \frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l} \cdot B_S,$$

где N_a - число Авогадро; $T_{экс}$ – температура экстракции; μ - динамическая вязкость, R – универсальная газовая постоянная; r_l – радиус молекулы липида, B_S – поправочный коэффициент, учитывающим площадь отверстий клеточной стенки, который рассчитывается по формуле (3.25). $\frac{dc_{л(B)}^{(12)}}{dx}$ -

градиент концентрации липидов через отверстия клеточной стенки в фазу 2 приблизительно равен $\frac{c_{л(B)}^{*(1)} - c_{л(B)}^{(2)}}{l_{ст}}$, $l_{ст}$ - толщина клеточной стенки, м (рис. 3.17).

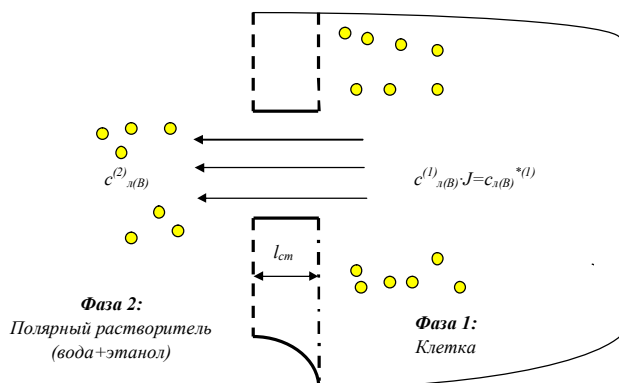


Рисунок 3.17 – Молекулярная диффузия липидов через отверстие мембраны

Учитывая эти изменения (равновесие в процессе диффузии этанола внутрь погибших, но сохранивших форму клеток; диффузия липидов из погибших, но сохранивших форму клеток в межклеточное пространство (фаза 2)), математическая модель экстракции липидов из клеток микроводорослей будет иметь вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc_{э(2)}}{d\tau} = \frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_э} \cdot \frac{(c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \frac{D_{эф} \cdot N_a}{100} \cdot \pi \cdot r_{n1}^2)^2}{4 \cdot c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \left(\frac{c_{э(2)} - c_{э(A)}^{*(1)}}{l_{см}} \right) \cdot \frac{1}{V_a} \\ \frac{dc_{л(2)}}{d\tau} = \left(-\frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_л} \cdot \frac{(c_{кл(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2)^2}{4 \cdot c_{кл(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \frac{c_{л(B)}^{*(1)} - c_{л(B)}^{(2)}}{l_{см}} + \right. \\ \left. + \frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_л} \cdot \frac{3 \cdot V_{п.э.}}{r_{п.э.}} \cdot \frac{c_{л(2)}^{(2)} - c_{л(2)}^{*(3)}}{r_{п.э.}} \right) \cdot \frac{1}{V_a} \\ \frac{dc_{л(3)}}{d\tau} = -\frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_л} \cdot \frac{3 \cdot V_{п.э.}}{r_{п.э.}} \cdot \frac{c_{л(2)}^{(2)} - c_{л(3)}^{*(3)}}{r_{п.э.}} \cdot \frac{1}{V_a} \end{array} \right. , \quad (3.27)$$

Начальные условия:

$$c_{э(2)}(20) = c_{э(2)}^{6yx}(0,20) ,$$

$$c_{л(2)}(20) = c_{л(2)}^{6yx}(0,20) ,$$

$$c_{л(3)}(20) = c_{л(3)}^{6yx}(0,20) .$$

После 50 минуты экстракции наблюдаются следующие процессы:

1) равновесие в процессе диффузии этанола внутрь погибших, но сохранивших форму клеток;

2) наступает равновесие в процессе диффузии этанола из фазы 2 в целые клетки (фаза 1);

3) из погибших клеток (фаза 1) в межклеточную воду + этанол (фаза 2) продолжают диффундировать липиды; начинается диффузия липидов из целых клеток, которые в результате действия этанола (денатурация белков) погибают;

4) продолжается диффузия липидов из фазы 2 (этанол+вода) в фазу 3 (петролейный эфир).

В результате денатурации белков клеточной стенки целых клеток микроводорослей из-за воздействия этанола, которая наблюдается к

50 минуте процесса экстракции у большинства клеток, поры клеточной стенки увеличиваются в размерах до 1 нм или же белок денатурирует и в клеточной мембране появляются трещины аналогичного размера. Наблюдается равновесие в процессе диффузии этанола внутрь клеток, вязкость цитоплазмы и фазы 2 выравнивается и липиды, находящиеся внутри целых клеток через увеличенные поры и образовавшиеся трещины начинают диффундировать в фазу 2 (межклеточная вода+этанол). Процесс диффузии липидов из фазы 1 (внутриклеточного пространства целых клеток) в фазу 2 (межклеточная вода+этанол), который начинается в момент времени $\tau=50$ мин описывается первым законом Фика:

$$\frac{\Delta M_{л(A)}^{(12)}}{d\tau} = -D_{м2} \cdot F_4 \cdot \frac{dc_{л(A)}^{(12)}}{dx},$$

где $\frac{\Delta M_{л(A)}^{(12)}}{d\tau}$ - масса липидов, перешедших из фазы 1 (внутриклеточного пространства погибших, но сохранивших форму клеток) в фазу 2 (межклеточную воду+этанол) за единицу времени; F_4 – площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 1 (внутриклеточного пространства) – примем равной площади всех увеличившихся пор и трещин в стенках клеток присутствующих в пасте микроводорослей; $\frac{dc_{л(A)}^{(12)}}{dx}$ - градиент концентрации липидов через увеличившиеся поры стенок клеток микроводорослей; $D_{м2}$ - коэффициент диффузии липидных капель и белково-липидных комплексов через увеличившиеся поры стенок клеток микроводорослей [179]. Общую площадь всех аквапорин всех целых клеток пасты микроводорослей будет определяться по формуле (3.26), с учетом того, что радиус пор аквапорин увеличился и стал равен 1 нм. Коэффициент диффузии липидов через аквапорины из целых клеток в фазу 2 (межклеточную воду+этанол) можно рассчитать по формуле:

$$D_{м2} = \frac{R \cdot T_{экс}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l} \cdot B_{S2},$$

где N_a - число Авогадро; $T_{экс}$ – температура экстракции; μ - динамическая вязкость, R – универсальная газовая постоянная; r_l – радиус липидов, B_{s2} – поправочный коэффициент, учитывающим площадь увеличившихся пор (аквапорин) клеточной стенки. $\frac{dc_{л(A)}^{(12)}}{dx}$ - градиент концентрации липидов через увеличившиеся поры клеточной стенки в фазу (2) приблизительно равен $\frac{c_{л(A)}^{*(1)} - c_{л(A)}^{(2)}}{l_{cm}}$, l_{cm} - толщина клеточной стенки, м (рис. 3.18).

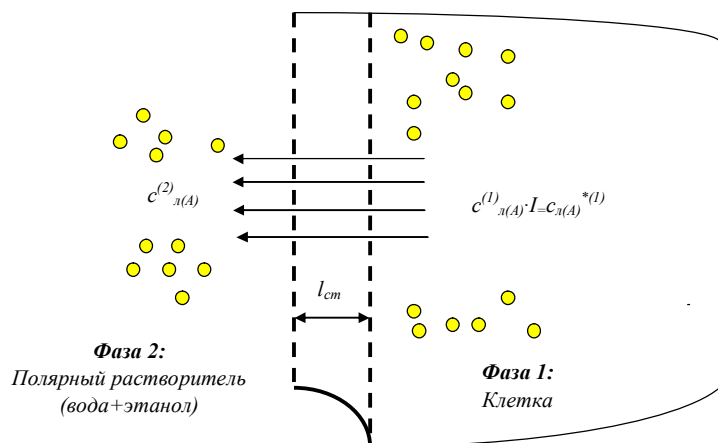


Рисунок 3.18 – Молекулярная диффузия через отверстие мембраны

Учитывая эти изменения (равновесие в процессе диффузии этанола внутрь погибших, но сохранивших форму и целых клеток; диффузия липидов из погибших, но сохранивших форму клеток и целых клеток в межклеточное пространство (фаза 2)), математическая модель на этом промежутке времени (после 50 минут) описывается системой уравнений (3.28), начальными условиями для которой являются $c_{э(2)}^{вых}$, $c_{л(2)}^{вых}$, $c_{л(2)}^{вых}$, и определяются по результатам решения математической модели на промежутке времени от 20 до 50 минут. Для проверки адекватности математической модели был проведен эксперимент по экстракции липидов из 50 мл пасты микроводорослей влажностью 98 % предварительно обработанной СВЧ-излучением (в процессе обработки температура пасты не превышала 50 °С), в качестве использовали этанол-петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.), при $Z= 1:280$. Температуре 30 °С. Отбор проб проводился каждые 30 минут. Общая продолжительность экстракции составляла 300 минут. Анализ проб на содержание общих липидов проводился по методу Цоллнера-Кирша.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc_{\varepsilon(2)}}{d\tau} = 0, \\ \frac{dc_{л(2)}}{d\tau} = \left(-\frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l} \cdot \frac{(c_{кл(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2)^2}{4 \cdot c_{кл(B)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \left(\frac{c_{л(B)}^{*(1)} - c_{л(B)}^{(2)}}{l_{cm}} \right) - \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l} \cdot \right. \\ \left. \frac{(c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \frac{D_{\text{эф}} \cdot N_a}{100} \cdot \pi \cdot r_{n2}^2)}{4 \cdot c_{кл(A)} \cdot V_a \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \left(\frac{c_{л(A)}^{*(1)} - c_{л(A)}^{(2)}}{l_{cm}} \right) + \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l} \cdot \frac{3 \cdot V_{п.э.}}{r_{п.э.}} \cdot \left(\frac{c_{л}^{(2)} - c_{л}^{*(3)}}{r_{п.э.}} \right) \cdot \frac{1}{V_a} \right), \\ \frac{dc_{л(3)}}{d\tau} = -\frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r_l} \cdot \frac{3 \cdot V_{п.э.}}{r_{п.э.}} \cdot \left(\frac{c_{л}^{(2)} - c_{л}^{*(3)}}{r_{п.э.}} \right) \cdot \frac{1}{V_a}. \end{array} \right. \quad (3.28)$$

Начальные условия:

$$c_{\varepsilon(2)}(50) = c_{\varepsilon(2)}^{\text{был}}(20, 50),$$

$$c_{л(2)}(50) = c_{л(2)}^{\text{был}}(20, 50).$$

$$c_{л(3)} = c_{л(3)}^{\text{был}}(20, 50).$$

Для расчетов кинетики экстракции липидов с использованием математической модели использовались значения переменных, представленные в табл. 3.13. Согласно экспериментальным данным основная часть липидов 93 % от общего количества была извлечена за 100–120 минут экстракции (рис. 3.30).

Математическая модель кинетики процесса экстракции липидов на промежутке времени от 0 до 20 минут имеет вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc_{\varepsilon(2)}}{d\tau} = -\left(\frac{\Delta M_{\varepsilon(B)}^{(21)}}{d\tau} + \frac{\Delta M_{\varepsilon(A)}^{(21)}}{d\tau} \right) \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dc_{л(2)}}{d\tau} = -\frac{\Delta M_{л(3)}}{d\tau} \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dc_{л(3)}}{d\tau} = -0.5 \cdot 10^{-9} \cdot 1,86 \cdot \frac{c_{л}^{(3)} - 0,79}{150 \cdot 10^{-6}} \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dM_{\varepsilon(B)}^{(21)}}{d\tau} = -0.7 \cdot 10^{-11} \cdot 0,031 \cdot \frac{c_{\varepsilon(B)}^{(1)} - 1,7 \cdot 10^6}{45 \cdot 10^{-9}}, \\ \frac{dM_{\varepsilon(A)}^{(21)}}{d\tau} = -0,136 \cdot 10^{-11} \cdot 0,0028 \cdot \frac{c_{\varepsilon(A)}^{(1)} - 1,7 \cdot 10^6}{45 \cdot 10^{-9}}. \end{array} \right.$$

Таблица 3.13 – Исходные данные для расчета кинетики процесса экстракции липидов

Обозначение переменной	Значение
v , м/с	0.4 ($Re > 10000$)
$c_{кл}$, МЛН КЛ/М ³ ($\Phi 2 + \Phi 3$)	≈ 0.7 г (или $2,75 \cdot 10^9$ клеток)
$c_{лип}$, Г	0.22
l , м	$45 \cdot 10^{-9}$
Z	1 г сухой биомассы – 280 мл смеси экстрагентов
N , %	40
R , %	28
$1 - (N + R)$	32
$c^{(1)}_{л.н.(A)}$, МОЛЬ	$3.2 \cdot 10^{-4}$
I , %	17
$c^{(1)}_{л.н.(B)}$, МОЛЬ	$2.6 \cdot 10^{-4}$
J , %	41
$c^{(2)}_{лип(C)}$, МОЛЬ/М ³ (вода+этанол)	1.4
$V_э$, М ³	$93 \cdot 10^{-6}$
$V_{п.э}$, М ³	$186 \cdot 10^{-6}$
$r_{п.э}$, М	$300 \cdot 10^{-6}$
$V_а$, М ³	$330 \cdot 10^{-6}$
$r_{кл}$, М	$6 \cdot 10^{-6}$
F_1 , М ²	0.031
$F_{0(A)}$, М ²	0.124
$F_{0(B)}$, М ²	0.1
$B_{s0(B)}$	0.25
$B_{s1(A)}$	0,023
$B_{s2(A)}$	0.29
$c^{(2)}_э$, МОЛЬ/М ³ (вода+этанол)	$0.17 \cdot 10^7$
$T_{экс}$, К	320
$\mu_{(1)}$, Па·с	$\approx 20 \cdot 10^{-3}$
$\mu_{(2)}$, Па·с	$0.54 \cdot 10^{-3}$
$\mu_{(3)}$, Па·с	$0.32 \cdot 10^{-3}$
$r_{п1}$, М	$0.14 \cdot 10^{-9}$
F_2 , М ²	0.0028
$r_{п2}$, М	$0.5 \cdot 10^{-9}$
F_3 , М ²	0.036
F_4 , М ²	1.86
$M_{лип}$, Г/МОЛЬ	388
$d_{мол.лип}$, М	$1.6 \cdot 10^{-9}$
$d_{мол.эт}$, М	$0.4 \cdot 10^{-9}$
$d_{мол.вод}$, М	$0.275 \cdot 10^{-9}$

Начальные условия:

$$c_{э(2)}^{нач} = 1.7 \cdot 10^6 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{э(B)}^{нач} = 0 \text{ моль} / \text{м}^3$$

$$c_{э(A)}^{нач} = 0 \text{ моль} / \text{м}^3$$

$$c_{л(2)}^{нач} = 1.4 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

Результаты математического моделирования кинетики экстракции липидов на промежутке времени от 0 до 20 минут представлены на рис. 3.19-3.21.

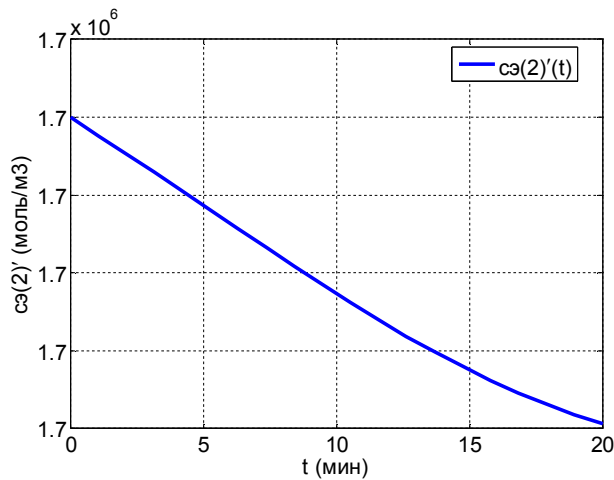


Рисунок 3.19 – Изменение концентрации этанола в фазе 2

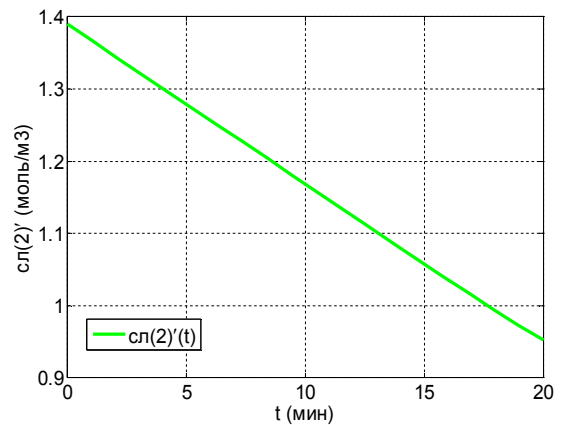


Рисунок 3.20 – Изменение концентрации липидов в фазе 2

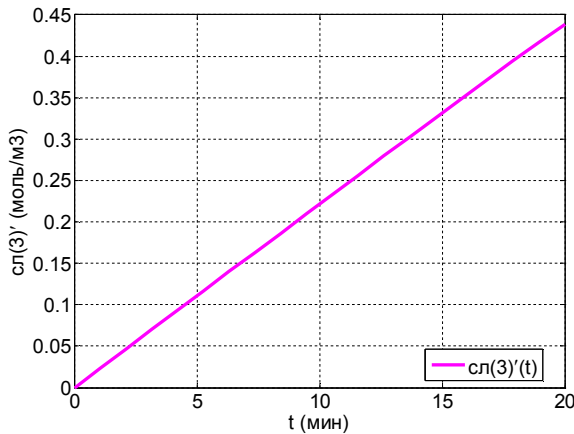


Рисунок 3.21 – Изменение концентрации липидов в фазе 3

Коэффициенты диффузии этанола внутрь целых клеток был равен:

$$D_{\text{вн1}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r} \cdot B_{S1} = \frac{8.314 \cdot 323}{6.022 \cdot 10^{23}} \cdot \frac{1}{6\pi \cdot 20 \cdot 10^{-3} \cdot 0.2 \cdot 10^{-9}} \cdot 0.023 = 0.14 \cdot 10^{-11} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Коэффициенты диффузии этанола внутрь погибших, но сохранивших форму клеток был равен:

$$D_{\text{вн}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r} \cdot B_S = \frac{8.314 \cdot 323}{6.022 \cdot 10^{23}} \cdot \frac{1}{6\pi \cdot 20 \cdot 10^{-3} \cdot 0.2 \cdot 10^{-9}} \cdot 0.25 = 0.7 \cdot 10^{-11} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Коэффициенты молекулярной диффузии липидов из фазы 2 в фазу 3 был равен:

$$D_m = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r} = \frac{8.314 \cdot 323}{6.022 \cdot 10^{23}} \cdot \frac{1}{6\pi \cdot 0.32 \cdot 10^{-3} \cdot 1.6 \cdot 10^{-9}} = 0.5 \cdot 10^{-9} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Математическая модель, проведенного эксперимента на промежутке времени от 20 до 50 минут будет иметь вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc_{\text{э}(2)}}{d\tau} = -\frac{\Delta M_{\text{э}(A)}^{(21)}}{d\tau} \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dc_{\text{л}(2)}}{d\tau} = \left(\frac{\Delta M_{\text{л}(B)}^{(12)}}{d\tau} - \frac{\Delta M_{\text{л}(3)}}{d\tau} \right) \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dc_{\text{л}(3)}}{d\tau} = -0.5 \cdot 10^{-9} \cdot 1.86 \cdot \frac{c_{\text{л}}^{(3)} - 0.7}{150 \cdot 10^{-6}} \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dM_{\text{э}(A)}^{(21)}}{d\tau} = -0.136 \cdot 10^{-11} \cdot 0.0028 \cdot \frac{c_{\text{э}(A)}^{(1)} - 1.7 \cdot 10^6}{45 \cdot 10^{-9}}, \\ \frac{dM_{\text{л}(B)}^{(12)}}{d\tau} = -0.137 \cdot 10^{-9} \cdot 0.031 \cdot \frac{0.46 - c_{\text{л}(B)}^{(2)}}{45 \cdot 10^{-9}}. \end{array} \right.$$

Начальные условия:

$$c_{\text{э}(2)}^{\text{нач}} = 1.7 \cdot 10^6 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{\text{л}(2)}^{\text{нач}} = 0.95 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{\text{л}}^{\text{нач}(3)} = 0.45 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{\text{э}(A)}^{\text{нач}} = c_{\text{э}(A)}^{(0,20)} \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{\text{л}(B)}^{\text{нач}} = 0.79 \text{ моль} / \text{м}^3.$$

Результаты математического моделирования кинетики экстракции липидов на промежутке времени от 20 до 50 минут представлены на рис. 3.22-3.24.

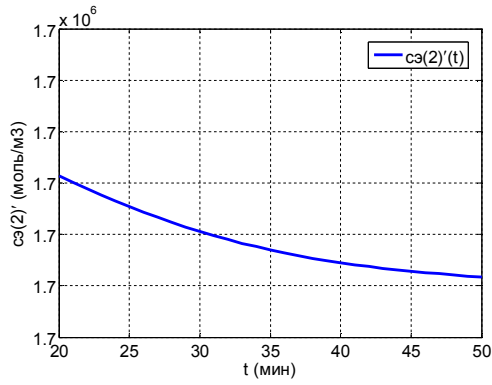


Рисунок 3.22 – Изменение концентрации этанола в фазе 2

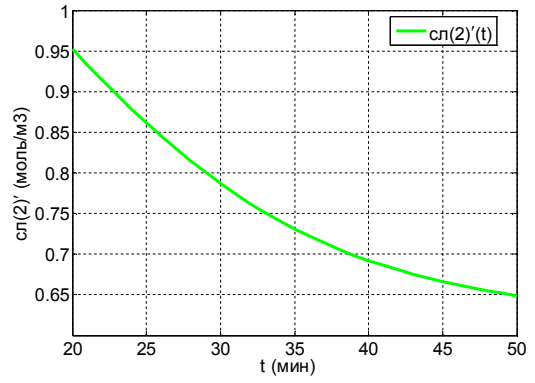


Рисунок 3.23 – Изменение концентрации липидов в фазе 2

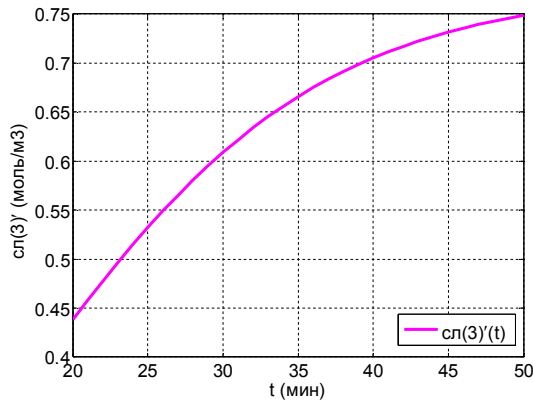


Рисунок 3.24 – Изменение концентрации липидов в фазе 3

Коэффициенты диффузии липидов из погибших, но сохранивших форму клеток (фаза 1) в межклеточную воду (фаза 2) был равен:

$$D_{\text{вн}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r} \cdot B_S = \frac{8.314 \cdot 323}{6.022 \cdot 10^{23}} \cdot \frac{1}{6\pi \cdot 0.54 \cdot 10^{-3} \cdot 0.8 \cdot 10^{-9}} \cdot 0.25 = 13.7 \cdot 10^{-11} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Математическая модель, проведенного эксперимента на промежутке времени от 50 до 110 минут будет иметь вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc_{\text{э}(2)}}{d\tau} = 0, \\ \frac{dc_{\text{л}(2)}}{d\tau} = \left(\frac{\Delta M_{\text{л}(B)}^{(12)}}{d\tau} + \frac{\Delta M_{\text{л}(A)}^{(12)}}{d\tau} - \frac{\Delta M_{\text{л}(3)}}{d\tau} \right) \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dc_{\text{л}(3)}}{d\tau} = -0.5 \cdot 10^{-9} \cdot 1.86 \cdot \frac{c_{\text{л}}^{(3)} - 0.7}{150 \cdot 10^{-6}} \cdot \frac{1}{330 \cdot 10^{-6}}, \\ \frac{dM_{\text{л}(B)}^{(12)}}{d\tau} = -0.137 \cdot 10^{-9} \cdot 0.031 \cdot \frac{0.46 - c_{\text{л}(ног)}^{(1)}}{45 \cdot 10^{-9}}, \\ \frac{dM_{\text{л}(A)}^{(12)}}{d\tau} = -14.3 \cdot 10^{-11} \cdot 0.036 \cdot \frac{0.8 - c_{\text{л}(цел)}^{(1)}}{45 \cdot 10^{-9}}. \end{array} \right.$$

Начальные условия:

$$c_{э(2)}^{нач} = 1.7 \cdot 10^6 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{л(2)}^{нач} = 0.65 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{л(3)}^{нач} = 0.75 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{л(A)}^{нач} = 0.97 \text{ моль} / \text{м}^3,$$

$$c_{л(B)}^{нач} = c_{л(B)}^{(20,50)} \text{ моль} / \text{м}^3.$$

Результаты математического моделирования кинетики экстракции липидов на промежутке времени от 50 до 110 минут представлены на рис. 3.25-3.27.

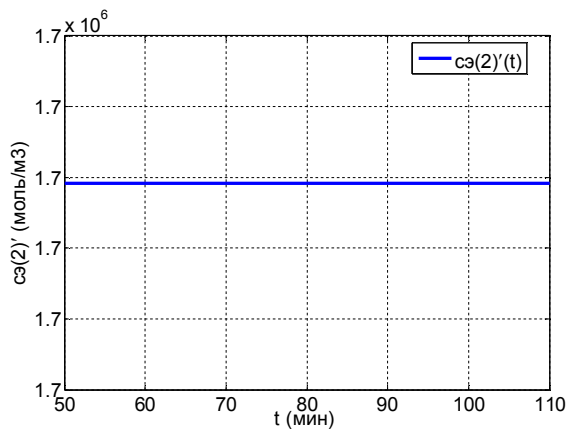


Рисунок 3.25 – Изменение концентрации этанола в фазе 2

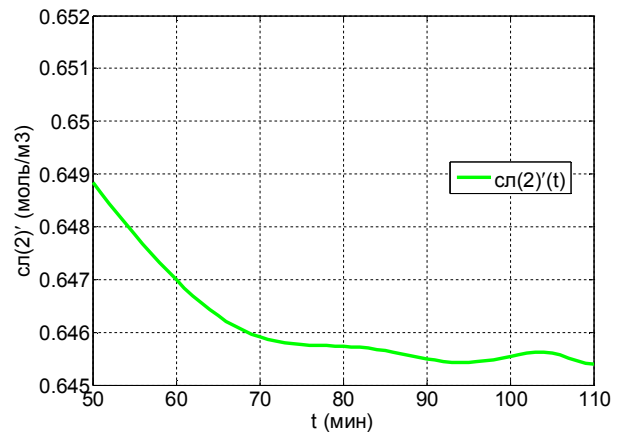


Рисунок 3.26 – Изменение концентрации липидов в фазе 2

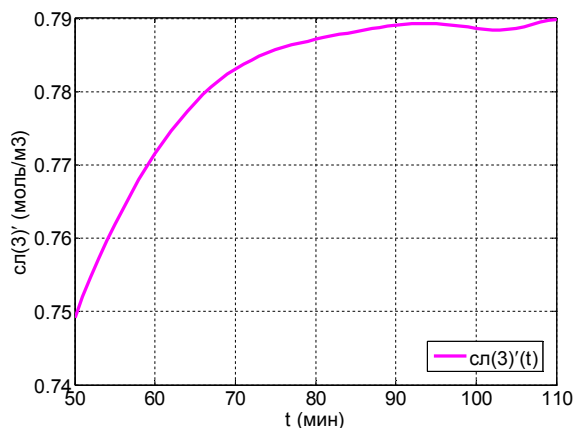


Рисунок 3.27 – Изменение концентрации липидов в фазе 3

Коэффициенты диффузии липидов из целых клеток у которых увеличились поры до диаметра равного 1 нм (фаза 1) в межклеточную воду (фаза 2) был рассчитан согласно уравнению:

$$D_{\text{вн1}} = \frac{R \cdot T_{\text{экс}}}{N_a} \cdot \frac{1}{6\pi\mu r} \cdot B_s = \frac{8.314 \cdot 323}{6.022 \cdot 10^{23}} \cdot \frac{1}{6\pi \cdot 20 \cdot 10^{-3} \cdot 0.2 \cdot 10^{-9}} \cdot 0.29 = 14 \cdot 10^{-11} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Сложение результатов для трех промежутков времени (от 0 до 20 мин; от 20 до 50 мин; от 50 мин до 110 мин) вместе позволяет получить модельную кривую кинетики экстракции липидов из микроводорослей, обработанных СВЧ-излучением. Адекватность математической модели проверялась путем сравнения расчетных и экспериментальных значений. (рис. 3.28-3.30).

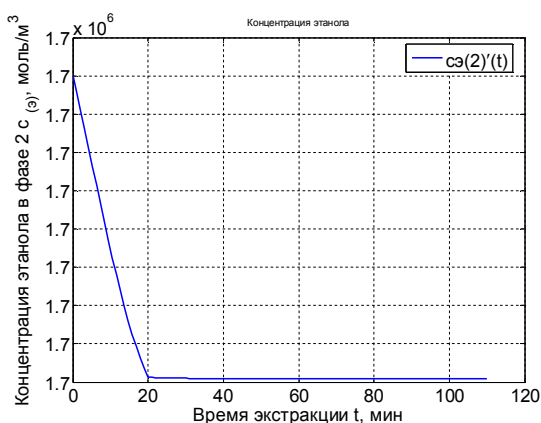


Рисунок 3.28 – Изменение концентрации этанола в фазе 2

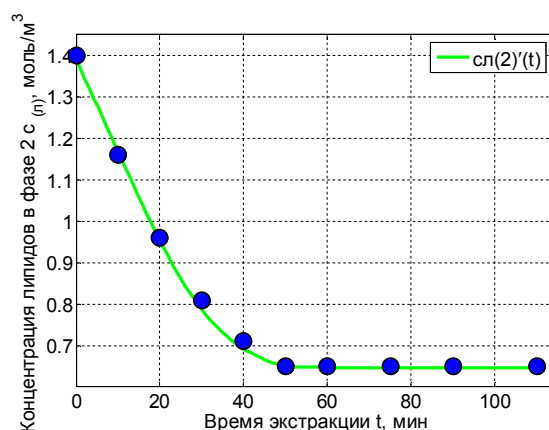


Рисунок 3.29 – Изменение концентрации липидов в фазе 2

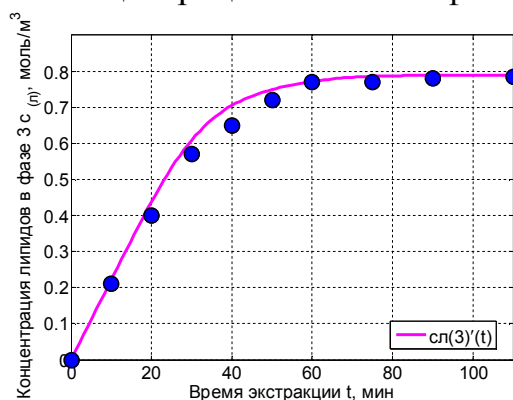


Рисунок 3.30 – Динамика экстракции липидов из биомассы микроводорослей, обработанной СВЧ-излучением: о - эксперимент; сплошная - результаты расчета по модели

Максимальное рассогласование данных составило 15%. Из экспериментов следует, следует, что осуществление экстракции дольше 110 минут нецелесообразно, поскольку основная часть липидов уже извлечена.

3.3 Процесс этерификации липидов для производства эфиров жирных кислот

При исследовании процесса этерификации липидов решались следующие задачи:

1) проведение жирнокислотного анализа липидов микроводорослей для определения их перспективности по сравнению с другими видами липидов (рапсовое, пальмовое, соевое и касторовое масла);

2) определение типа и количества вносимого катализатора, температуры процесса и соотношения количеств липидов и этанола для получения максимального выхода ЭЖК.

Жирнокислотный анализ липидов, извлеченных из микроводорослей, производился с помощью газового хроматографа «Кристаллюкс-4000М». Хроматографический анализ липидов микроводорослей позволил сделать вывод о том, что качественный состав фракции нейтральных липидов микроводорослей сходен с пальмовым маслом (табл. 3.14).

Таблица 3.14 – Жирнокислотный состав липидов (масел)

ЖК	Масло микроводорослей	Пальмовое масло (Индонезия)	Соевое масло (США)	Касторовое масло (Бразилия)	Рапсовое масло [153] (ЕС)
Насыщенные, %	52	52	15	3	5
Ненасыщенные, %	48	48	85	97	95

Таким образом, липиды микроводорослей содержат в 1.8 раза меньше ненасыщенных жирных кислот, чем соевое масло (сырье для биотоплива в США) и в 2 раза меньше, чем в рапсовом масле (сырье для биотоплива в странах ЕС). Более низкое содержание ненасыщенных жирных кислот позволит увеличить сроки хранения биотоплива из-за уменьшения окисления молекул ЭЖК. Для определения технологических условий (режимов) проведения реакции этерификации липидов микроводорослей с целью получения ЭЖК были использованы липиды, извлеченные из микроводорослей с использованием смеси экстрагентов этанол и петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.).

Эксперимент по определению оптимальной температуры проведения реакции проводился при фиксированном количестве гомогенного щелочного катализатора NaOH - 4 % (от вносимой массы липидов), соотношении количеств липидов и этанола - 1:8 (мол.) и времени реакции 1 час.

В ходе эксперимента отмерялось необходимое количество этанола и липидов. Затем в этанол добавляли гидроксид натрия и перемешивали полученную смесь до полного растворения гидроксида натрия. Липиды нагревали в термостате до заданной температуры. Далее приливали смесь этилового спирта и растворенного в нем катализатора к нагретой массе липидов, смесь перемешивали в течение 1 мин и помещали в термостат на 1 ч; через каждые 15 минут осуществлялось перемешивание суспензии в течение 1 мин, величина pH среды поддерживалась на уровне $pH=10$. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.15.

Таблица 3.15 - Влияние температуры синтеза на характеристики ЭЖК

Температура, °C	Выход, %
20	3
45	28
50	35
55	38
60	42
65	39

Из анализа экспериментальных данных следует, что наибольший выход ЭЖК достигается при температуре реакции $T=60$ °C. При этом необходимо осуществлять промывку ЭЖК для того, чтобы снизить величину pH и сократить количество щелочного катализатора или использовать другие виды катализатора.

Эксперимент по определению оптимального соотношения липидов микроводорослей и этанола проводился при фиксированном количестве вносимого гомогенного катализатора гидроксида натрия ≈ 4 % (от массы вносимых липидов), температуре реакции 60 °C и времени реакции 1 ч. Эксперимент проводился по методике, описанной выше. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.16.

Таблица 3.16 - Влияние концентрации этанола на выход ЭЖК

Соотношение липидов и этанола (мол.)	Выход ЭЖК от общего объема смеси, %
1:1.5	24
1:3	35
1:4	38
1:5	41
1:6	45
1:7	43
1:8	42

Из анализа экспериментальных данных следует, что максимальный выход липидов 45 % (об.) наблюдается при соотношении 1:6 (мол.) липидов и этанола.

Эксперимент по подбору вида катализатора, необходимого для проведения реакции этерификации, проводился с гетерогенным катализатором (мезофазным мезопористым материалом (МММ)) и щелочным гомогенным катализатором $NaOH$, которые вносились в количестве 4 % от массы вносимых липидов. Молярное соотношение липидов и этанола составляло 1:6 (мол.), температура реакции $T=60\text{ }^{\circ}C$. Для проведения эксперимента отмерялось необходимое количество этанола и липидов. Затем в этанол добавлялся гидроксид натрия, полученную смесь перемешивали до полного растворения гидроксида натрия. Липиды нагревали в термостате до заданной температуры. Смесь этилового спирта и растворенного в нем катализатора приливали к нагретой массе липидов. Полученную смесь перемешивали в течение 1 мин, затем ставили смесь в термостат на 1 ч, перемешивая через каждые 15 мин суспензию в течение 1 мин. Вначале гетерогенный катализатор добавлялся в этанол, а затем к смеси добавляли липиды при температуре $T=60\text{ }^{\circ}C$. Смесь перемешивали в течение 1 мин стеклянной палочкой, затем помещали в термостат на 1 ч при температуре $T=60\text{ }^{\circ}C$, перемешивая через каждые 15 мин суспензию в течение 1 мин. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.17. Из анализа экспериментальных данных следует, что с гетерогенным катализатором выход ЭЖК составляет 0, с гомогенным щелочным катализатором - 42-43 % от общего объема смеси.

Таблица 3.17 – Влияние вида вносимого катализатора на выход ЭЖК

Вид катализатора	<i>pH</i>	Выход ЭЖК от общего объема смеси, %
гетерогенный	≈ 7.5	0
гомогенный	≈ 10	42-43

В следующем эксперименте определяли количество вносимого щелочного гомогенного катализатора для обеспечения максимального выхода ЭЖК от общего объема смеси. Количество вносимого щелочного катализатора *NaOH* варьировалось от 0 до 6 % от массы вносимых липидов. В ходе эксперимента отмерялось необходимое количество этанола и липидов. Затем в этанол добавлялся гидроксид натрия, полученную смесь перемешивали до полного растворения гидроксида натрия. Липиды микроводорослей нагревали в термостате до заданной температуры. Далее приливали смесь этилового спирта и растворенного в нем катализатора к нагретой массе липидов, смесь перемешивали в течение 1 мин и помещали в термостат на 1 ч, осуществляя через каждые 15 мин перемешивание суспензии в течение 1 мин. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.18.

Таблица 3.18 – Зависимость выхода ЭЖК от количества вносимого щелочного гомогенного катализатора

Количество вносимого <i>NaOH</i> , % от массы липидов	<i>pH</i>	Выход ЭЖК, %
0.0	$\approx 7-7.5$	-
0.5	≈ 8	17
1.0	≈ 8	26
1.5	≈ 8	33
3.0	$\approx 8-10$	45
4.0	≈ 10	42
5.0	$\approx 10-12$	39
6.0	$\approx 10-12$	37

Из анализа экспериментальных данных следует, что наибольший выход липидов ≈ 45 % от общего объема смеси наблюдается при добавлении гомогенного щелочного катализатора в количестве 3 % от массы вносимых липидов.

Выводы по главе 3:

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований механизмов, кинетики, свойств и режимов процессов экстракции и этерификации липидов можно сделать следующие выводы:

1. Процесс экстракции внутриклеточных липидов целесообразно осуществлять при температуре $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, смесью экстрагентов этанола и петролейного эфира в соотношении 1:2 (об.) и соотношении $Z=1:20$ (количества сухих клеток (г) к количеству смеси экстрагента (мл));

2. Реакцию этерификации необходимо проводить при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ и соотношении этанол-липиды 6:1 (мол.) в присутствии 3 % (от массы липидов) щелочного катализатора - гидроксида натрия, что позволит получить наибольший выход ЭЖК 45 % (об.). Низкий выход ЭЖК можно объяснить наличием примесей в составе липидного концентрата, в частности, наличием каротиноидов (β -каротина), хлорофилла, стерина и др., которые не преобразовались в ЭЖК;

3. Разработана математическая модель процесса экстракции внутриклеточных липидов из клеток микроводорослей, учитывающая особенности экстракции липидов из клеток группы *A* (целые), группы *B* (погибшие, но сохранившие форму) и клеток группы *C* (разрушенные);

4. Исследована кинетика процесса экстракции липидов из микроводорослей влажностью 98 % смесью этанол и петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.), при температуре $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Определены кинетические коэффициенты модели процесса экстракции липидов из микроводорослей при температуре $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Глава 4. Аппаратурно-технологическое оформление производства эфиров жирных кислот из микроводорослей *Chlorella vulgaris*

4.1 Аппаратурно-технологическое оформление технологического процесса стадий подготовки и предварительной обработки сырья

На основании результатов экспериментальных исследований математического моделирования культивирования микроводорослей была предложена конструкция фотобиореактора (рис. 4.1), состоящего из непрозрачного корпуса 1, в нижней части которого смонтирована газораспределительная магистраль 2, совмещенная с магистралью подачи питательной среды 3. На крышке корпуса 1 смонтированы осветительные блоки 5 со светодиодными элементами. Конструкция фотобиореактора состоит из элементарных модулей, каждый из которых включает в себя четыре осветительных модуля с интенсивностью света ≈ 250 мкмоль фотонов/(м²·с).

Газораспределительная магистраль используется для барботажной суспензии микроводорослей газовой смеси, совмещенная с магистралью подачи питательной среды. Расположение газораспределительной магистрали совместно с магистралью подачи питательной среды позволяет увеличить площадь поверхности контакта, обеспечивает равномерное распределение питательной среды в объеме фотобиореактора и исключает образование застойных зон.

Осветительные блоки выполнены из прозрачного несмачиваемого полимерного материала и располагаются друг от друга и корпуса реактора на расстоянии ≈ 400 мм, что обеспечивает равномерное освещение всего объема суспензии на требуемом уровне. Размещение осветительных блоков, оснащенных светодиодными элементами по всему внутреннему объему фотобиореактора позволяет интенсифицировать процесс фотосинтеза по сравнению с фотобиореакторами, в которых размещение источников света осуществляется снаружи. Выполнение осветительных блоков из прозрачного

несмачиваемого полимерного материала позволяет реже осуществлять их мойку с извлечением из крышки корпуса, что облегчает обслуживание реактора.

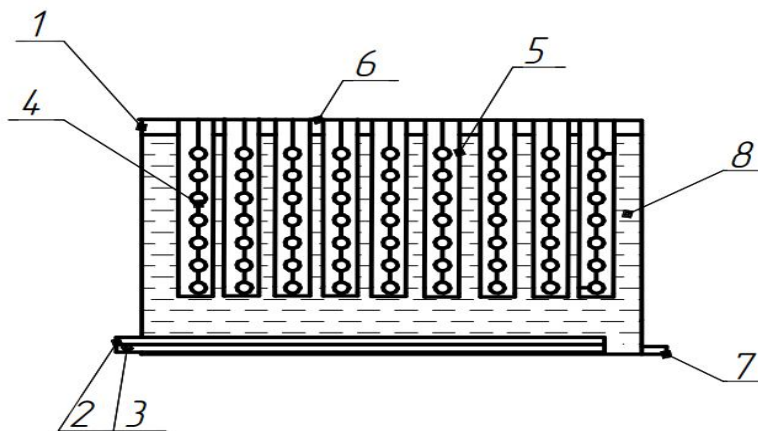


Рисунок 4.1 – Схема реактора: 1 - непрозрачный корпус; 2 - газораспределительная магистраль; 3 - магистраль подачи питательной среды; 4 - светодиодные элементы; 5 осветительные блоки; 6 - отверстия в крышке реактора; 6, 7 -штуцеры для слива суспензии; 8 - суспензия микроводорослей

Средняя концентрация суспензии микроводорослей (с содержанием липидов 31 % от сухого вещества клеток) в фотобиореакторе будет составлять 0.9 г/л каждые 13 суток культивирования.

С Целью оценки эффективности преобразования энергии света E в энергию химических связей (биомассы и масла) микроводорослей составим уравнение энергетического баланса:

$$q \cdot M = K_{ин} \cdot E, \quad (4.1)$$

где q – удельное энергосодержание биомассы, равное для фотосинтезирующих микроводорослей 21–22 МДж/кг, M – масса биомассы, E – показатель энергии света, а $K_{ин}$ – интегральный коэффициент эффективности преобразования световой энергии в органическое вещество.

Показатель энергии света E найдем из следующих соображений: пусть каждый элементарный модуль фотобиореактора содержит 4 осветительных блока, каждый из которых создает поток излучения возбуждающего

фотосинтез ≈ 250 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$), таким образом, за 24 часа площадь поверхности 1 м^2 получит следующее количество фотонов:

$$E = 250 \cdot 86400 \cdot 4 = 86.4 \text{ моль фотонов /}(\text{м}^2 \cdot \text{сут}).$$

Энергия одного фотона с длиной волны $\lambda=500$ нм составляет приблизительно $4 \cdot 10^{-19}$ Дж. Следовательно, 1 моль фотонов имеет энергию 240.9 кДж/моль. В этом случае показатель энергии света составит:

$$E = 240.9 \cdot 86.4 = 20.8 \text{ МДж /}(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$$

Тогда из уравнения энергетического баланса можно определить коэффициент $K_{ин}$:

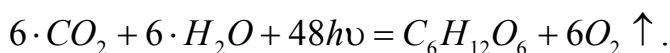
$$K_{ин} = \frac{q \cdot M}{E} = \frac{21.5 \cdot 0.029}{20.8} = 0.03 = 3 \%$$

Интегральный коэффициент эффективности преобразования световой энергии в органическое вещество является произведением двух коэффициентов

$$K_{ин} = K_{ФАР} \cdot K_{ФС},$$

где $K_{ФАР}$ - коэффициент фотосинтетически активной радиации; $K_{ФС}$ - отношение энергосодержания получившегося органического вещества к суммарной энергии всех вступивших в реакцию фотосинтеза фотонов.

На восстановление одной молекулы углекислого газа необходимо 8-10 фотонов из диапазона фотосинтетически активной радиации.



Энергия одного моля фотонов, как было определено ранее, составляет 240.9 кДж/моль. Если в качестве устойчивого продукта фотосинтеза взять глюкозу, имеющую теплоту сгорания в расчете на 1 моль восстанавливаемого CO_2 равную 470 кДж, то превращение энергии света в энергию органического вещества осуществляется с теоретически оцениваемой эффективностью $K_{ФС} = 470/1920 \approx 0.24$ (24%). Следует отметить, что в реальности $K_{ФС}$ существенно уменьшается из-за факторов, ограничивающих эффективность поглощения света, и диссипационных

потерь на дыхание и фотодыхание. На практике это уменьшение составляет 50–65 % [2] от исходного значения, т.е. $K_{\phi C}$ не превышает 0.11–0.12.

Тогда коэффициент $K_{\phi AP}$ составит:

$$K_{\phi AP} = \frac{K_{ин}}{K_{\phi C}} = \frac{0.03}{0.11} = 0.27$$

Расход углекислого газа, который необходим для максимальной эффективности преобразования энергии излучения в энергию химических связей, найдем из следующих соображений. За сутки энергия излучения в одном элементарном модуле фотобиореактора составляет 86.4 моль фотонов/(м²·сут). С учетом стехиометрических коэффициентов суммарного уравнения фотосинтеза получим, что через элементарный модуль фотобиореактора через газораспределительную магистраль за сутки должно прокачиваться 10.8 моль углекислого газа или 241.9 л.

С учетом того, что в воздухе среднее содержание углекислого газа равно 0.0393 %, получим:

$$V_{возд} = 241.9 \cdot \frac{100}{0.0393} = 615.6 \text{ л/сут} = 25.6 \text{ л/ч}$$

Для осуществления стадии разрушения клеточных стенок разработан аппарат-дезинтегратор (рис. 4.2). Дезинтегратор состоит из корпуса, к крышке которого примыкают модули с магнетронами, смонтированные на отражательной трубе. В отражательной трубе установлена мешалка с четырьмя пропеллерами, засасывающая суспензию микроводорослей со дна аппарата и нагнетающая ее к поверхности. Отражательная труба представляет собой цилиндр, выполненный из нержавеющей стали с полированной внутренней поверхностью, обеспечивающей необходимый коэффициент отражения электромагнитных волн, создаваемых магнетроном, и свободу их прохождения внутрь резонатора через отверстия в местах установки. Частота излучения магнетрона составляет 2450 МГц.

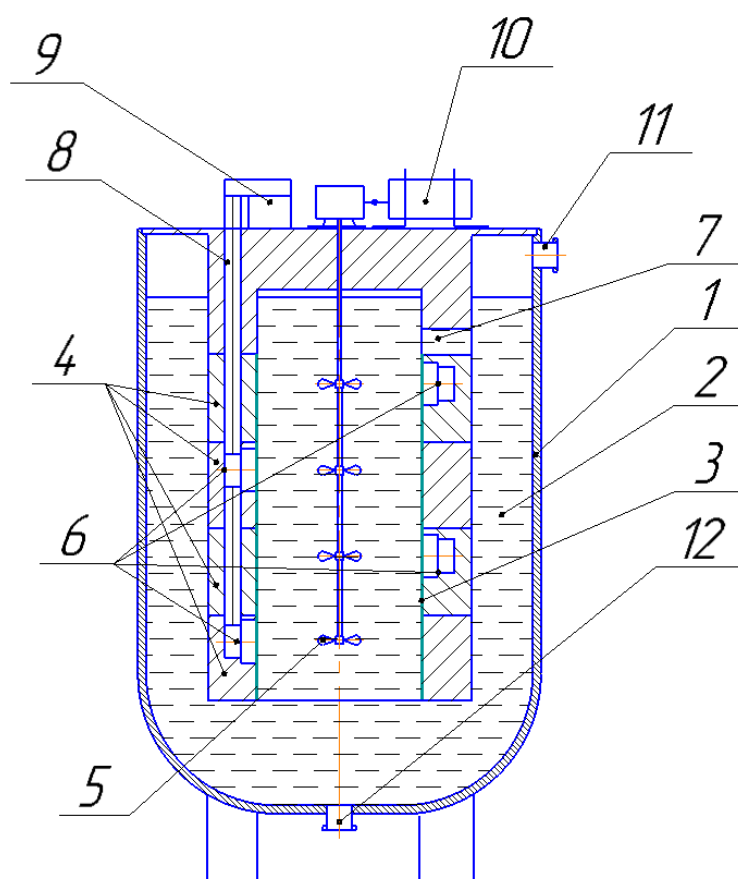


Рисунок 4.2 – Общий вид дезинтегратора клеток микроводорослей:
 1 – корпус; 2 – паста микроводорослей; 3 – отражательная труба; 4 – съемные модули; 5 – пропеллерная мешалка; 6 – магнетроны; 7 – канал для переливания пасты; 8 – канал с проводами; 9 – блок питания и управления; 10 – редуктор, электродвигатель; 11 – входной штуцер; 12 – выходной штуцер

Диаметр дезинтегратора выбирается из следующих соображений. Глубина проникновения СВЧ-излучения в пасту микроводорослей влажностью 98-99 % определяется по формуле [172]:

$$\delta = \frac{\lambda}{\sqrt{2 \cdot \varepsilon \cdot (\sqrt{1 + \operatorname{tg}^2 \delta} - 1)}}, \quad (4.2)$$

где λ – длина волны, м; ε – относительная диэлектрическая проницаемость; $\operatorname{tg} \delta$ – тангенс угла диэлектрических потерь.

Под глубиной проникновения в материал понимают расстояние δ , на котором плотность мощности энергии уменьшается до 37 % от ее значения на поверхности. Рассчитаем величину δ :

$$\lambda = c/f = 300000/2450 \cdot 10^6 = 0.125 \text{ м}$$

$$\delta = \frac{\lambda}{\sqrt{2 \cdot \varepsilon \cdot (\sqrt{1 + \text{tg}^2 \delta} - 1)}} = \frac{0.125}{\sqrt{2 \cdot 80 \cdot (\sqrt{1 + (0.1)^2} - 1)}} = 0.127 \text{ м}$$

Результаты расчета подтверждаются проведенным экспериментом по определению температуры пасты микроводорослей в зависимости от расстояния до волновода. Результаты эксперимента представлены в табл. 4.1

Таблица 4.1 – Зависимость мощности излучения от глубины проникновения в пасту микроводорослей

Глубина проникновения $l_{пр}$, м	Мощность излучения $P_{изл}$, %
0.025	100
0.050	60
0.075	45
0.100	40
0.125	37
0.150	33
0.175	29
0.200	26
0.225	25
0.250	23

Математическая модель, описывающая падение мощности излучения в зависимости от глубины проникновения в пасту микроводорослей влажностью 98-99 % имеет следующий вид: $P_{изл} = 0.0987 \cdot l_{пр}^{-0.615}$ (коэффициент корреляции $R=0.9925$). С учетом рекомендаций [172] выбираем форму обрабатываемого изделия такой, чтобы его линейные размеры хотя бы в одном измерении не превышали удвоенного значения глубины проникновения δ . Потому принимаем диаметр отражательной трубы D равным 0.25 м. Высоту отражательной трубы $h=1$ м из тех соображений, что в трубе установлены четыре магнетрона, каждый из которых будет облучать участок высотой 0.25 м (щель волновода имеет высоту 0.25 м, и закрывается слюдой, являющейся нейтральной средой для СВЧ-излучения). Магнетроны будут располагаться на следующих высотных отметках - 0.125; 0.375; 0.625; 0.875 м (рис. 4.3). Отражательная труба, в которой происходит

обработка пасты микроводорослей СВЧ-излучением, делится на две зоны: в первой зоне (от 0 до 0.5 м) происходит нагрев суспензии от 20 °С до 35 °С, и при этом паста перемещается из точки А в точку В (рис. 4.3). Один магнетрон при этом должен сообщить пасте микроводорослей следующее количество энергии:

$$Q = c \cdot m \cdot (t_{\text{кон}} - t_{\text{нач}}) / 2,$$

где масса пасты m будет равна

$$m = \rho \cdot V,$$

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h = 3.14 \cdot (0.125)^2 \cdot 0.5 = 0.025 \text{ м}^3$$

$$m = 1020 \cdot 0,025 \approx 25 \text{ кг}.$$

$$Q = c \cdot m \cdot (t_{\text{кон}} - t_{\text{нач}}) / 2 = 4.2 \cdot 25 \cdot (35 - 20) / 2 = 788 \text{ кДж}.$$

В этом случае 1 см³ пасты будет получать количество q энергии, равное

$$q = 788 \text{ кДж} / 25000 \text{ см}^3 = 0.0315 \text{ кДж} / \text{см}^3.$$

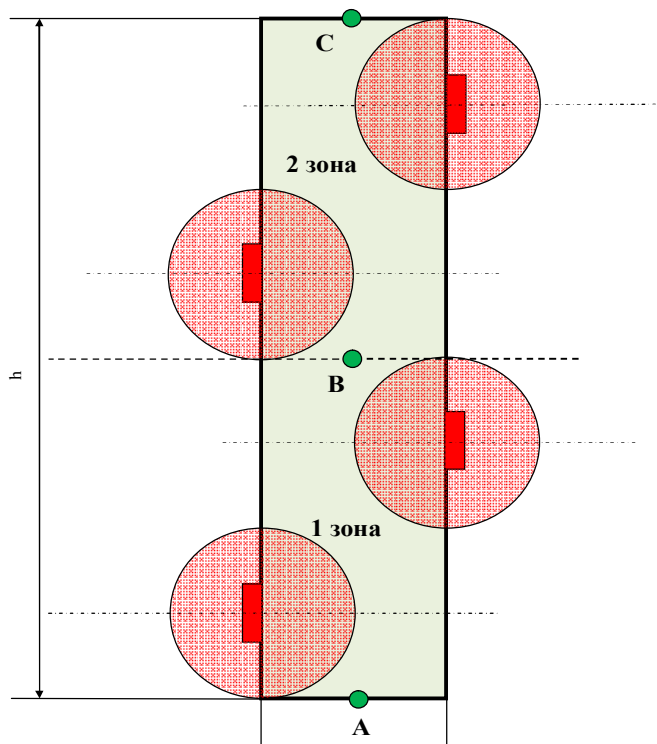


Рисунок 4.3 – Расположение зон нагрева пасты микроводорослей в отражательной трубе

Проводились эксперименты по определению усредненного количества энергии, получаемой 1 см³ пасты. Было отобрано 19 образцов по 600 см³

пасты, которые обрабатывались СВЧ-излучением мощности 280-700 Вт в течение 10-40 с. Количество энергии, максимально поглощаемое пастой микроводорослей (на расстоянии 0.025 м от волновода), определялось по формуле $Q = c \cdot m \cdot (t_{кон} - t_{нач})$.

Количество энергии в зависимости от глубины проникновения убывает по закону: $P_{изл} = 0.0987 \cdot l_{пр}^{-0.615}$. Расчетные значения усредненного количества теплоты, которое получает 1 см³ пасты микроводорослей, представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2 – Экспериментальные данные для расчета усредненного количества энергии, получаемого 1 см³ микроводорослей

№ образца	Мощность P , Вт	Время τ , с	Количество теплоты Q , кДж	Усредненное количество теплоты на 1 см ³ пасты
1	700	40	11.0	0.0765
2	700	30	9.0	0.0626
3	700	20	6.0	0.0417
4	700	10	3.0	0.0209
5	560	50	7.0	0.0487
6	560	40	6.0	0.0417
7	560	30	4.7	0.0327
8	560	20	3.5	0.0243
9	560	10	1.7	0.0118
10	420	50	5.5	0.0383
11	420	40	5.0	0.0348
12	420	30	4.3	0.0299
13	420	20	2.7	0.0188
14	420	10	1.1	0.0077
15	280	55	4.7	0.0327
16	280	40	3.6	0.0250
17	280	30	2.0	0.0139
18	280	20	2.0	0.0139
19	280	10	0.8	0.0056

На основании полученных экспериментальных данных проводились расчеты зависимости количества поглощенной энергии 1 см³ пасты микроводорослей от времени τ и мощности СВЧ-излучения P .

При проведении расчетов принимали допущение о том, что в реакторе обеспечивается режим идеального смешения и каждый кубический сантиметр пасты микроводорослей получает равное количество энергии. С помощью пакета прикладных программ Matlab была построена и обучена по экспериментальным данным нейронная сеть, описывающая зависимость $E=f(P, \tau)$ количества сообщенной 1 см³ пасты микроводорослей влажностью 98 % энергии (E) от мощности СВЧ-излучения (P) и времени обработки (τ) (рис. 4.4).

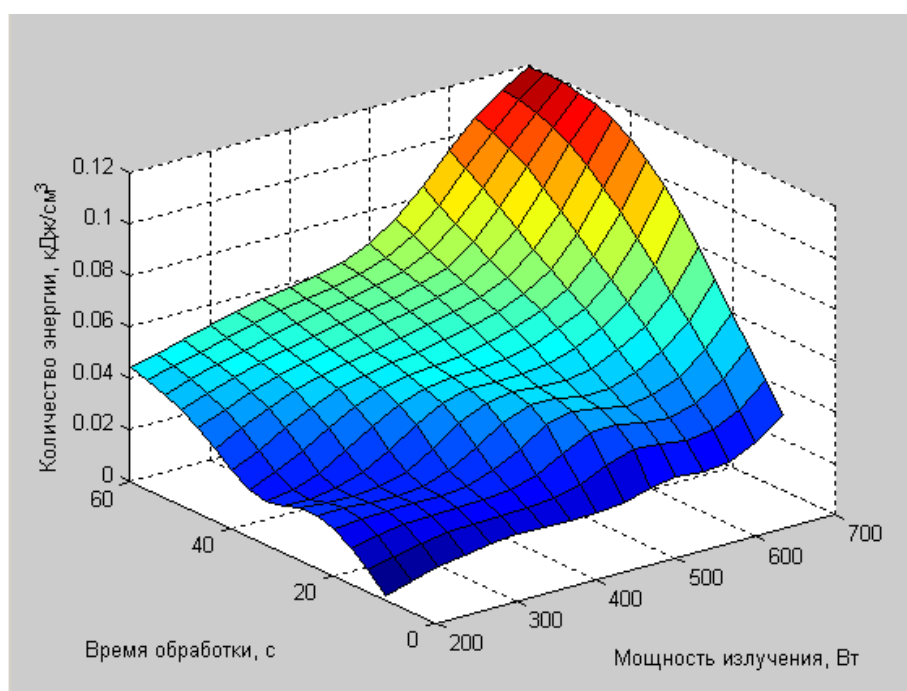


Рисунок 4.4 – Зависимость количества сообщенной энергии (E) 1 см³ пасты микроводорослей от мощности СВЧ-излучения (P) и времени обработки (τ)

С использованием нейронной сети решалась задача определения оптимальных значений мощности магнетрона и времени воздействия СВЧ-излучения по критерию экономических затрат (\mathcal{E}) и с учетом ограничения на количество энергии, которое должен получить 1 см³ пасты микроводорослей:

$$\begin{aligned} \mathcal{E}(P, \tau) &\rightarrow \min; \\ E - 0.032 &\leq 0. \end{aligned} \quad (4.3)$$

Заметим, что при использовании для обработки пасты микроводорослей СВЧ-излучения высокой мощности общие затраты на

работу магнетрона будут меньше, чем при использовании СВЧ-излучения малой мощности. Это обстоятельство объясняется тем, что количество энергии, излучаемое магнетроном, пропорционально времени его работы, таким образом, для обеспечения малой мощности излучения требуется большее количество циклов включения/выключения магнетрона. Максимальную мощность используемых магнетронов возьмем равной 700 Вт.

Затраты на дезинтеграцию клеток (Z_{atr2}) можно подсчитать по формуле:

$$Z_{atr1} = \left(P \cdot \left(\tau \cdot \frac{P}{700} \right) \right) \cdot 2.77 \cdot 10^7 \cdot 3.5 ,$$

$$Z_{atr2} = Z_{atr1} + 0.2 \cdot Z_{atr1} ,$$

где P -мощность магнетрона, Вт; τ -время работы магнетрона, с; $2.77 \cdot 10^7$ -переводной коэффициент; 3,5-стоимость 1кВт энергии, руб; 0.2 – коэффициент запаса.

Тогда общие затраты на обеспечение производства единицы продукции можно рассчитать по формуле:

$$\text{ЭЗ} = Z_{atr2} + 0.2 \cdot Z_{atr2};$$

где 0.2 – коэффициент запаса.

Из решения задачи (4.3) следует, что минимум затрат наблюдается при использовании магнетрона мощностью 400 Вт и времени его работы ≈ 34 -35 секунд. При этом, скорость движения пасты в дезинтеграторе должна составлять:

$$v = \frac{1}{\tau_{\text{пребыван}}} = \frac{1}{35 \cdot 4} = 0.007 \text{ м/с} .$$

Следует отметить, что при работе дезинтегратора за время 140 с до температуры 50 °С нагревается 0.0123 м³, затем через каждые 35 с до температуры 50 °С будет нагреваться 0.0123 м³ пасты микроводорослей. Таким образом, оптимальное время обработки 1.25 м³ концентрированной суспензии составит ≈ 1.03 ч.

4.2 Аппаратурно-технологическое оформление технологического процесса экстракции липидов

Для проведения процесса экстракции внутриклеточных липидов из биомассы микроводорослей был предложен экстрактор (рис. 4.5). Расчет аппарата проводился для условий протекания процесса, описанных в п. 3.1: $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Re=10000$; смесь экстрагентов этанол и петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.); соотношение количества сухих клеток (г) к количеству смеси экстрагента (мл) $Z=1:20$. Прототипом конструкции экстрактора является одноходовой кожухотрубчатый теплообменник, который состоит из цилиндрических оголовников 4, в которых организуется развитый турбулентный режим, трубных решеток 3 и труб 1, находящихся в кожухе 2. Поверхность аппарата и подходящих труб защищена слоем теплоизоляции. В межтрубном пространстве циркулирует теплоноситель (вода), который поддерживает необходимую температуру экстракции. С помощью насоса 5 по трубопроводу экстрагенты и паста микроводорослей, поднимаются вверх и перемешиваются в цилиндрическом пространстве 4 (оголовник 1). В трубах 1, куда затем попадает экстракционная смесь организуется развитый турбулентный режим ($Re>10000$), после чего, смесь оказывается в оголовнике 2, откуда вновь перекачивается насосом в оголовник 1 и цикл повторяется.

Расчет установки проведем для следующих условий: объем экстрактора (два оголовника + трубное пространство) равен 5 м^3 ; высота оголовников $h_{ог}$ варьируется в диапазоне $[0.4;0.5]$ м; длина труб экстрактора будет варьироваться в диапазоне $[1;9]$ м; толщина труб экстрактора равна 2 мм, а внешний диаметр труб $d_{вн}$ будет находится в диапазоне $[0.02; 0.04]$ м [181, 182].

Расчет экстрактора осуществлялся по схеме:

1) минимальная скорость смеси в нагнетательной линии будет наблюдаться в трубном пространстве, при этом там должен быть организован

развитый турбулентный режим ($Re=10000$). Скорость смеси в трубном пространстве была рассчитана по формуле:

$$\omega = \frac{10000 \cdot \mu}{d_{\text{вн}} \cdot \rho} \quad (4.4)$$

2) трубы располагаются в трубной решетке по концентрическим окружностям, тогда общее количество труб $n_{\text{тр}}$ можно рассчитать по формуле $n_{\text{тр}} = \sum_1^i 2\pi i$, где i – количество концентрических окружностей в трубной решетке [182].

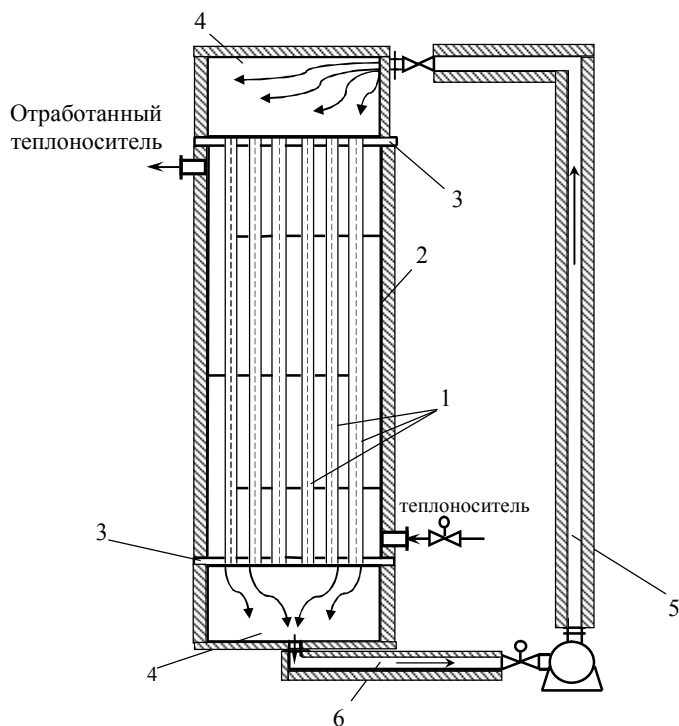


Рисунок 4.5 – Экстрактор циклического типа: 1 – трубы, 2 – кожух, 3 – трубная решётка, 4 – цилиндрические крышки, 5-рециркуляционный насос, 6 – штуцер для слива мисцеллы в промежуточную емкость, 7 –промежуточная емкость

3) площадь трубной решетки определяли по формуле:
 $S_{\text{тр}} = 0.866 \cdot S^2 \cdot n_{\text{тр}}$, где S – расстояние между трубами, равное $S = 1.3 \cdot d_{\text{вн}}$ [182].

4) диаметр кожуха и диаметр оголовников 1 и 2: $d_{\text{кож}} = d_{\text{оз}} = 1.1 \sqrt{S_{\text{мп}}}$.

5) общий объем экстрактора $V_{\text{экс}}$:

$$V_{\text{экс}} = V_{\text{мп}} + V_{\text{оз}} \cdot 2 = \left(\frac{\pi \cdot d_{\text{вн}}^2}{4} \cdot n_{\text{мп}} \cdot L_{\text{мп}} \right) + \left(\frac{\pi \cdot d_{\text{оз}}^2}{4} \cdot h_{\text{оз}} \right) \cdot 2.$$

6) мощность N насоса, который необходим для прокачивания экстракционной смеси через трубопровод и экстрактор, определялась по формуле: $N = \frac{G \cdot \Delta p}{1000 \cdot \eta}$, где G – расход экстракционной смеси, м³/с; Δp – полное гидравлическое сопротивление, Па; η – коэффициент полезного действия (к.п.д = 0.65) [183].

7) полное сопротивление – это сумма сопротивлений, возникающих в трубопроводе нагнетательной ветки $\Delta p1$, оголовнике 1 и 2 – $2 \cdot \Delta p2$, трубах экстрактора $\Delta p3$ и горизонтальной части трубопровода $\Delta p4$ равно [183]:

$$\Delta p = \Delta p1 + 2 \cdot \Delta p2 + \Delta p3 + \Delta p4,$$

$$\Delta p1 = \frac{\rho \omega_3^2}{2} \cdot \left(1 + \frac{\lambda L_2}{d_2} + \sum \xi \right) + \rho \cdot g \cdot h,$$

где ρ – плотность экстракционной смеси; ω_3 – скорость движения экстракционной смеси в трубопроводе; L_2 – длина трубопровода; d_2 – диаметр трубопровода; λ – коэффициент трения; ξ – коэффициент местного сопротивления; g – ускорение свободного падения; h – высота подъема экстракционной смеси.

$$\Delta p2 = \Delta p_{\text{расш}} + \Delta p_{\text{суж}},$$

где $\Delta p_{\text{расш}}$ – гидравлическое сопротивление внезапного расширения; $\Delta p_{\text{суж}}$ – гидравлическое сопротивление внезапного сужения.

$$\Delta p_{\text{расш}} = \left(\frac{\rho \omega_0^2}{2} \right) \cdot \xi, \text{ где } \omega_0 \text{ - скорость потока в меньшем сечении.}$$

$$\Delta p_{\text{суж}} = \left(\frac{\rho \omega_0^2}{2} \right) \cdot \xi.$$

Гидравлическое сопротивление в трубах экстрактора $\Delta p3$:

$$\Delta p3 = \frac{\rho \omega_2^2}{2} \cdot \left(1 + \frac{\lambda L}{d_{\text{вн}}} + \sum \xi \right),$$

где L – длина труб экстрактора; ω_2 - скорость движения экстракционной смеси в трубах экстрактора.

Гидравлическое сопротивление Δp_4 : $\Delta p_4 = \frac{\rho \omega_4^2}{2} \cdot (1 + \frac{\lambda L_3}{d_2} + \sum \xi)$, где ω_4 - скорость движения экстракционной смеси в трубопроводе; L_3 – длина горизонтальной части трубопровода.

8) расход экстракционной смеси в одной трубе экстрактора равен:

$$G_2 = \omega_2 \cdot \frac{\pi \cdot d_{mp}^2}{4}.$$

9) время пребывания смеси в трубе экстрактора: $t_2 = L / \omega_2$.

10) расход экстракционной смеси в оголовнике: $G_1 = n_{mp} \cdot G_2$.

11) скорость экстракционной смеси в оголовнике: $\omega_1 = \frac{4 \cdot G_1}{\pi \cdot d_{oc}^2}$, а время

пребывания смеси в оголовнике: $t_1 = h_{oc} / \omega_1$.

12) расход экстракционной смеси в нагнетательной части трубопровода G_3 примем равным расходу экстракционной смеси в оголовнике $G_3 = G_1$.

13) скорость движения экстракционной смеси в трубопроводе находили по формуле: $\omega_3 = \frac{4 \cdot G_3}{\pi \cdot d_2^2}$, а время пребывания в нагнетательной части трубопровода: $t_3 = L_2 / \omega_3$.

14) расход экстракционной смеси в горизонтальной части трубопровода G_4 примем равным расходу экстракционной смеси в оголовнике $G_4 = G_1$, тогда скорость движения экстракционной смеси в трубопроводе равна: $\omega_4 = \frac{4 \cdot G_4}{\pi \cdot d_2^2}$, а время пребывания в нагнетательной части трубопровода равно $t_4 = L_3 / \omega_4$.

15) общее время одного цикла циркуляции экстракционной смеси t :

$$t = 2 \cdot t_1 + t_2 + t_3 + t_4.$$

Для определения минимальных энергетических затрат проведения процесса экстракции липидов из пасты микроводорослей (минимальная мощность насоса) была поставлена и решена задача оптимизации (4.5) с ограничениями (4.6), (4.7).

$$N = \min_{x \in X} y, \quad (4.5)$$

$$y = f(x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6, x_7, x_8, x_9, x_{10}), \quad (4.6)$$

$$\begin{cases} 0.025 - x_1 \leq 0, x_1 - 0.036 \leq 0, \\ 0.021 - x_2 \leq 0, x_2 - 0.15 \leq 0, \\ 10000 - x_3 \leq 0, x_3 - 100000 \leq 0, \\ 0.4 - x_4 \leq 0, x_4 - 0.5 \leq 0, \\ 1 - x_5 \leq 0, x_5 - 9 \leq 0, \\ 1 - x_6 \leq 0, x_6 - 12 \leq 0, \\ 2 - x_7 \leq 0, x_7 - 2.01 \leq 0, \\ 1 - x_8 \leq 0, x_8 - 23 \leq 0, \\ 5 - x_9 = 0, \\ 2 - x_{10} = 0, \end{cases} \quad (4.7)$$

где N - оптимальная мощность насоса, y - полное гидравлическое сопротивление сети, x_1 - диаметр труб экстрактора, x_2 - диаметр нагнетательной части трубопровода, x_3 - критерий Рейнольдса (турбулентный режим в трубах экстрактора), x_4 - высота оголовника экстрактора, x_5 - длина труб экстрактора, x_6 - длина нагнетательной части трубопровода, x_7 - длина горизонтальной части трубопровода, x_8 - коэффициент, определяющий количество труб в экстракторе, x_9 - объем экстрактора, x_{10} - разница длины нагнетательной части трубопровода и длины экстрактора

Решение задачи условной оптимизации с линейными и нелинейными ограничениями в прикладной среде *Matlab* приведено в табл. 4.3.

Таблица 4.3 - Характеристики экстрактора циклического типа

Наименование параметра	Значение
Диаметр труб экстрактора, м	0.032
Длина труб экстрактора, м	6.5
Общее количество труб, шт.	755
Диаметр кожуха, м	1.2
Диаметр оголовников, м	1.2
Высота оголовников, м	0.5
Длина нагнетательной части трубопровода, м	8.5
Длина горизонтальной части трубопровода, м	2
Диаметр трубопровода, м	0.15
Гидравлическое сопротивление, атм.	3.05
Мощность насоса, кВт	49

Общее время одного цикла прокачки экстракционной смеси через экстрактор и трубопровод составит 44 с. Скорость движения, расход экстракционной смеси и время пребывания в экстракторе и трубопроводе представлены в табл. 4.4.

Таблица 4.4 - Характеристики экстрактора циклического типа

	ω , м/с	G , м ³ /с	t , с
Трубы экстрактора	0.17	0.00014	37.2
Оголовник 1	0.1	0.105	5
Оголовник 2	0.1	0.105	5
Нагнетательная часть трубопровода	6	0.105	1.4
Горизонтальная часть трубопровода	6	0.105	0.3

Для обеспечения данной производительности и мощности подходит насос Grundfos NB 125-200/196-188, который имеет максимальную производительность 509 м³/ч, максимальный напор 45 м при мощности 55 кВт.

Для обеспечения минимальных тепловых потерь и поддержания необходимой температуры экстракции $T_{экс}$ необходимо подобрать тип и толщину изоляционного материал экстракционной системы, включающей экстрактор, трубопровод и насос. Расчет толщины теплоизоляционного материала проводится по формуле:

$$\delta_{из} = \frac{\lambda_{из}}{\alpha_n} \cdot \frac{(t_{см} - t_{из})}{(t_{из} - t_{окр})},$$

где α_n - коэффициент теплоотдачи в окружающую среду (воздух), Вт/(м²·К); $\delta_{из}$, $\lambda_{из}$ - соответственно толщина (в м) и коэффициент теплопроводности материала изоляции, Вт/(м·К); $t_{см}$, $t_{из}$, $t_{окр}$ - соответственно температуры наружной стенки аппарата, окружающей среды, наружной поверхности теплоизоляционного слоя, °С.

Коэффициент теплоотдачи, который определяет суммарную скорость переноса теплоты конвекцией и тепловым излучением для аппаратов,

находящихся в закрытых помещениях, при температуре поверхности до 150 °С можно рассчитать по приближенному уравнению:

$$\alpha_n = 9.74 + 0.07 \cdot (t_{из} - t_{окр})$$

Для расчета толщины тепловой изоляции допускается принять, что температура стенки равна температуре теплоносителя в межтрубном пространстве $t_{ст} = t_{мен}$. Среднегодовая температура окружающего воздуха в закрытом помещении составляет 20 °С (принимается условно).

Для изоляции был выбран материал - пенополиуретан, которая имеет коэффициент теплопроводности 0.035 Вт/(м·К). Температура наружной поверхности теплоизоляционного слоя примем равной 22 °С. Тогда коэффициент теплоотдачи будет равен 9.88 Вт/(м²·К).

Примем температуру стенки равной средней температуре теплоносителя (воды) в межтрубном пространстве равной 52 °С, тогда толщина слоя изоляции $\delta_{из}$ будет равен 55 мм.

Количество тепла, которое переносится конвекцией и тепловым излучением, с единицы поверхности изоляционного слоя в окружающую среду за один цикл (44 с) составит 459 Дж/(м²·К). Перепад температуры составляет $T_{из} - T_{окр} = 22 - 20 = 2$ °С. Тогда количество тепла, которое перенесется с единицы изоляционного слоя составит 4594 Дж/м². Общая площадь поверхности изоляционного слоя (экстрактор, трубопровод, насос) составит 22.3 м². Тогда, общее количество тепла, которое перенесется с поверхности изоляционного слоя составит 102.4 кДж. Тогда за один цикл обработки экстракционная смесь потеряет 102.4 кДж, а температура экстракционной смеси будет равна 49.9 °С.

Площадь поверхности теплообмена $F_{то}$ при $n_{мп} = 755$ шт., $L_{мп} = 6.5$ м, $d_{вн} = 0.032$ м равна 463 м². Таким образом, необходимо рассчитать расход и скорость течения теплоносителя в межтрубном пространстве, который обеспечит поддержание температуры экстракции 50 °С. В экстракторе организовано противоточное течение экстракционной смеси и теплоносителя

(рис. 4.5). В качестве теплоносителя была выбрана – вода так, как это наиболее дешевый теплоноситель, соответствующий необходимым требованиям. Расчет проводился по схеме, представленной в приложении Г.

Результаты расчета для $t_{1нач} = 60 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_{1кон} = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ $t_{2нач} = 49.9 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_{2кон} = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{то} = 463 \text{ м}^2$ представлены в табл. 4.5

Таблица 4.5- Результаты расчета теплового баланса экстрактора

Наименование параметра	Значение
$K, \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$	43.8
$\alpha, \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$	1295
$G, \text{ кг}/\text{с}$	0.94
$\omega, \text{ м}/\text{с}$	$2.3 \cdot 10^{-7} 0$

4.3 Практические рекомендации по проектированию производства эфиров жирных кислот из микроводорослей

На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований подготовки и предварительной обработки сырья (микроводорослей), экстракции и этерификации можно сформировать следующий перечень рекомендаций для организации производства ЭЖК из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111.

Культивирование микроводорослей следует осуществлять на питательной среде Тамия ОРТИМУМ, штамм вносится в концентрации 2-4 млн кл/мл (5-10 % от объема питательной среды); температура культивирования - 30 °С; уровень освещенности - 14 клк; толщина слоя суспензии 0.04 м. Необходимо обеспечивать перемешивание суспензии для того, чтобы все клетки микроводоросли попадали в зону с достаточным освещением.

При данном способе культивирования можно рекомендовать пневматическое перемешивание газовой-воздушной смесью для предотвращения осаждения клеток биомассы и обеспечения всех клеток микроводорослей в достаточном количестве светом и необходимыми питательными веществами.

На четвертые сутки культивирования в суспензию вносится азотсодержащая соль – нитрат калия в количестве 3.2 г/л суспензии (рис. 4.6 (а)). На восьмые сутки культивирования клетки выходят на стационарную фазу роста и достигают концентрации $x=50-60$ млн кл/мл (рис. 4.6 (а)). После этого необходимо создать стрессовые условия культивирования дефицитом азотсодержащих соединений, концентрация которых на восьмой день культивирования становится ниже 100 мг нитрат-анионов/л суспензии (рис. 4.6 (б)). Культивирование клеток микроводоросли в стрессовых условиях стимулирует синтез внутриклеточных липидов - триацилглицеридов. Концентрация внутриклеточных липидов достигает максимальной концентрации 31 % от сухого вещества клетки на 6-7 сутки культивирования в стрессовых условиях.

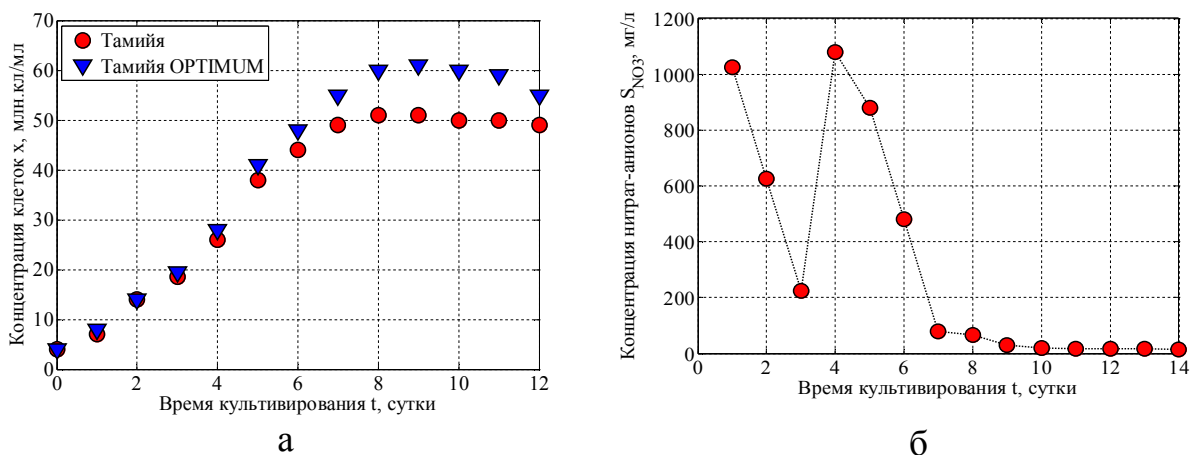


Рисунок 4.6 - Кинетика роста клеток *Chlorella vulgaris* на средах *Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM* (а); кинетика убыли азотсодержащего субстрата (б)

Концентрирование клеток биомассы необходимо производить под действием центробежных сил при $F_r=1000$ в течение 5 мин. в результате получается паста влажностью 96-99 %.

Для разрушения клеточных стенок паста микроводоросли подвергается воздействию смеси ферментов «Целлолюкс А» – «Протосубтилин г3х», взятых в соотношении 0.012 мг/мл – 0.004 мг/мл, 10 мин при температуре 50–55 °С и воздействии СВЧ-излучения (частотой 2450 МГц, мощностью 280-420 Вт).

Экстракция липидов из пасты микроводорослей после предварительной обработки проводится смесью экстрагентов петролейный эфир и этанол, взятых в соотношении 2:1 (об.), при соотношении микроводоросли-экстрагент - 1 (г): 20 мл. Температура экстракции должна составлять 50..55 °С. Отгонка растворителей производится при 80-85 °С.

С целью повышения выхода ЭЖК необходимо отделить полярные липиды и максимальное количество примесей (каротиноиды, хлорофилл). Для отделения полярных липидов от нейтральных рекомендуется использовать метод осаждения холодным ацетоном. Фосфолипиды плохо растворяются в ацетоне, в то время как нейтральные липиды – хорошо растворяются даже при отрицательных температурах [130].

Реакцию этерификации необходимо проводить при следующих условиях: молярное соотношение количеств липидов и этанола должно составлять 1:6 (об.), температура реакции – 60 °С, количество вносимого гомогенного щелочного катализатора (*NaOH*) - 3 % от массы липидов. Отделение глицерина необходимо производить под действием центробежных сил. Для снижения величины рН до нейтрального значения необходимо проводить реакцию нейтрализации, например 1 %-ным раствором лимонной кислоты, который добавляется в смесь в соотношении от 4 до 6 мл водного раствора кислоты на 100 мл ЭЖК. Смесь ЭЖК подвергается очистке водной промывкой (пузырьковой (пенной), аэрозольной и объемной).

Технологическая схема производства ЭЖК из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 представлена на рис. 4.7.

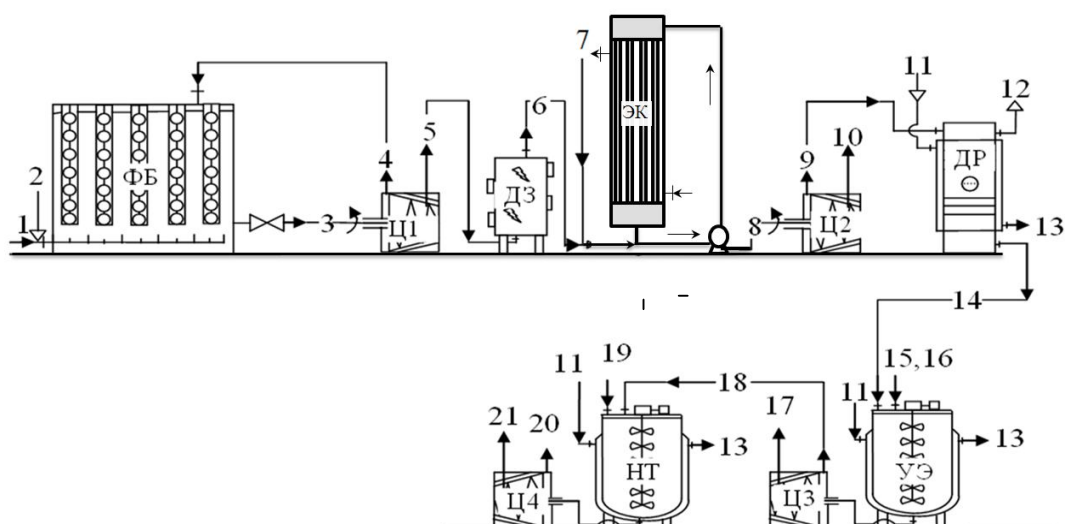


Рисунок 4.7 - Технологическая схема производства ЭЖК из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*

При пуске производства в фотобиореактор (ФБ) загружают питательную среду *Тамия OPTIMUM* при температуре $T=30$ °С и небольшое количество посевного материала 1, а также подают газовоздушную смесь 2, содержащую 0.0393 % CO_2 . В рабочем объеме фотобиореактора создается интенсивное излучение светодиодными лампами осветительных блоков. (один осветительный блок дает интенсивность излучения ≈ 250 мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$)). При этих условиях в фотобиореакторе

осуществляется рост биомассы. На четвертые сутки культивирования в питательную среду подают азотсодержащую соль. Побочным продуктом реакции фотосинтеза является кислород, который удаляется из фотобиореактора. Стадия роста биомассы продолжается до тех пор, пока концентрация биомассы не станет равной 55 млн кл/мл (\approx 7-8 сутки культивирования). После этого в суспензию добавляют питательную среду *Тамийя OPTIMUM* без азотсодержащей соли. Процесс культивирования в условиях стресса осуществляют в фотобиореакторе 6-7 суток, пока количество внутриклеточных липидов в клетках не достигнет 31 % от сухого вещества клетки. После этого половина содержимого ФБ постепенно отбирается и подается в центрифугу (Ц1), где происходит разделение влажной биомассы и воды. Далее отделенная вода 4 вновь подается в фотобиореактор. Паста микроводорослей 5 влажностью 98 % поступает в дезинтегратор (ДЗ), где с помощью комплексного воздействия СВЧ-излучения и смеси ферментов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин г3х» осуществляется разрушение клеток микроводорослей. Паста микроводорослей с разрушенными клетками 6 подают в экстрактор (ЭК), куда добавляется смесь экстрагентов 7 петролейный эфир и этанол (2:1 (об.)) в соотношении 1 г биомассы к 20 мл смеси экстрагентов. Экстракцию проводят при температуре 50 °С. Микроводоросли и мисцелла 8 подают в центрифугу (Ц2), где отделяется шрот и спиртовая мисцелла 10. Мисцеллу с неполярными липидами 9 (липиды, растворенные в петролейном эфире) подают в дистиллятор (ДР), где отгоняется экстрагент 12. Липиды микроводорослей 14 подают в устройство для проведения реакции этерификации (УЭ), куда добавляется этиловый спирт 15 в соотношении с липидами 6:1 (мол.) – 16. Процесс этерификации проводят при температуре 60 °С, использованием щелочного катализатора – гидроксида натрия 3 % (от массы липидов). Затем образовавшуюся смесь эфиров жирных кислот и глицерина подают в центрифугу (Ц3), где происходит отделение глицерина 17. Эфиры жирных кислот 18 поступают в устройство для проведения реакции нейтрализации остатков щелочного катализатора водным раствором

лимонной кислоты 19. Далее смесь поступает в центрифугу (Ц4), где происходит разделение ЭЖК 21 и примесей 20, которые отделяются в виде солей.

Разработанные рекомендации по культивированию микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 и технологическая схема на основе использования современных машин и аппаратов приняты к внедрению в ФГБНУ ВНИИТиН и в ОАО "Биохим" при разработке и проектировании технологических линий по производству компонентов смесевого биотоплива.

Выводы по главе 4:

1. Предложена оригинальная конструкция фотобиореактора для осуществления процесса культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 производительностью 0.9 г/л за один период культивирования, обеспечивающая высокий коэффициент преобразования энергии света (250 мкмоль фотонов/(м²·с) от 1 одного светодиодного элемента) в энергию связей органических веществ 3 %. (патент РФ № 151576)

2. Разработана конструкция дезинтегратора, обеспечивающая обработку производительностью 1.2 м³/ч пасты микроводорослей влажностью 98 % СВЧ-излучением, генерируемым четырьмя магнетронами мощностью 400 Вт, при температуре не выше 50 °С.

3. Рассчитан экстрактор циклического типа объемом 5 м³, обеспечивающая проведения процесса экстракции липидов из клеток микроводорослей при температуре $T=50$ °С, развитом турбулентном режиме ($Re=10000$), смесью экстрагентов этанол и петролейный эфир в соотношении 1:2 (об.) и соотношении $Z=1:20$ (количество сухих клеток (г) к количеству смеси экстрагента (мл)).

4. Разработана технологическая схема и практические рекомендации по проектированию производства ЭЖК из микроводорослей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе современных методов математического и физического моделирования получены новые научные результаты для теории проектирования процессов и аппаратов культивирования микроводорослей, разрушения клеток, экстракции липидов в производстве эфиров жирных кислот из растительного сырья.

1. На основе проведенных теоретических и экспериментальных исследований механизмов и кинетики процессов подготовки, экстракции и этерификации липидов определены условия их эффективного осуществления:

1) Культивирование микроводорослей штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-III необходимо проводить при начальной концентрации штамма 2-4 млн. кл/мл; с использованием питательной среды Тамийя OPTIMUM; при температуре 30 °С; уровне освещенности 14 клк; толщине слоя суспензии микроводорослей не более 0.4 м; время культивирования до создания стрессовых условий 7-8 суток (до концентрации 50-60 млн. кл/мл); создание стрессовых условий в течение 6-7 суток путем создания дефицита нитрата калия (менее 100 мг нитрат-анионов/л суспензии);

2) концентрирование суспензии целесообразно осуществлять центрифугированием суспензии ($F_r = 1000$) для получения пасты микроводорослей влажностью 95.0–99.5 %; комплексное разрушение клеточных стенок смесью ферментов «Целлолюкс А»– «Протосубтилин ГЗх» и СВЧ-излучением позволяет повысить выход липидов в 5.8 раз по сравнению с контрольным образцом;

3) процесс экстракции внутриклеточных липидов целесообразно осуществлять при температуре 50 °С, соотношении экстрагентов - смесь этанола-петролейного эфира 1:2 (об.) и соотношении сухих клеток (г) к количеству смеси экстрагента (мл) (1:20);

4) реакцию этерификации необходимо проводить при температуре 60 °С и соотношении этанол-липиды 6:1 (мол.) в присутствии 3 % (от массы липидов) щелочного катализатора - гидроксида натрия.

2. На основе проведенных экспериментальных исследований закономерностей воздействия СВЧ-излучения на клетки микроводорослей установлено: 1) процесс дезинтеграции клеток необходимо осуществлять с помощью СВЧ-излучения мощностью 280–420 Вт; 2) каждый кубический сантиметр пасты микроводорослей влажностью 98 % должен получить 0.187 кДж/см³ за один период обработки.

3. Предложены способ получения ЭЖК из микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 и конструкции новых аппаратов для стадий подготовки сырья, позволяющие повысить уровень энерго- и ресурсосбережения производства ЭЖК.

4. Разработаны математические модели процессов культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 и экстракции липидов из микроводорослей, позволяющие рассчитывать изменение массы микроводорослей и концентрации липидов в жидкой фазе и создающие предпосылки для эффективного управления процессами получения липидов.

5. Разработаны практические рекомендации по проектированию процессов и аппаратов подготовки сырья, экстракции липидов в производстве ЭЖК.

ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Z - соотношение высушенной биомассы (г) микроводорослей и органического растворителя (мл); δ - суммарный показатель растворимости Гильдебранда, МПа^{1/2}; δ_D - параметр дисперсионного взаимодействия молекул, МПа^{1/2}; δ_P - параметр индукционного взаимодействия, МПа^{1/2}; δ_H - параметр ориентационного взаимодействия, МПа^{1/2}; δ_D - параметр взаимодействия, возникающего между неполярными молекулами, МПа^{1/2}; R_0 - радиус растворимости; R_a - расчетная величина, которая оценивает расстояние до растворителя из центра сферы растворимости; δ_{DS} , δ_{PS} , δ_{HS} - параметры дисперсионного, индукционного, ориентационного взаимодействий соответственно (для растворителя); δ_{DP} , δ_{PP} , δ_{HP} параметры дисперсионного, индукционного, ориентационного взаимодействий соответственно (для растворенного вещества); RED - относительная разность энергий; ЭЖК - эфиры жирных кислот; T_k - температура культивирования, °C; S - количество азотсодержащего субстрата, г/л; I - уровень освещенности, клк; K_s - константа полунасыщения по субстрату, г/л; K_{ing} - константа ингибирования по субстрату, г/л; K_I - константа полунасыщения по освещенности; μ - удельная скорость роста, сутки⁻¹; E_n - емкость популяции, млн кл/мл; x - концентрация клеток микроводоросли в суспензии, млн кл/мл; $c_{лин}$ - количество внутриклеточных липидов в биомассе клеток, %; $K_{лин}$ - выход липидов, %; d - диаметр клетки, м; F_r - фактор разделения; S - степень осаждения клеток, %; АВС - аппарат с вихревым слоем ферромагнитных частиц; l/d_c - соотношение длины и диаметра ферромагнитных частиц; ν - коэффициент заполнения аппарата; A - группа целых клеток; B - группа клеток, утративших жизнеспособность, но сохранивших форму; C - группа разрушенных клеток; J - коэффициент, учитывающий степень извлечения липидов из клеток группы B ; I - коэффициент, учитывающий неполное извлечение липидов из целых клеток; $c^{(1)}_{э(A)}$ - концентрация этанола в клетках группы A , моль/м³; $c^{(1)}_{э(B)}$ - концентрация этанола в клетках группы B , моль/м³; $c^{(1)}_л$ - общая концентрация липидов в фазе 1, моль/м³; $c^{(1)}_{л(A)}$ - концентрация липидов в клетках группы A , моль/м³; $c^{(1)}_{л(B)}$ - концентрация липидов в клетках группы B , моль/м³; $c^{(2)}_л$ - концентрация липидов в фазе 2, моль/м³; $c_{л(C)}$ - концентрация липидов в разрушенных клетках (группа C), моль/м³; $c^{(2)}_э$ - концентрация этанола в фазе 2, моль/м³; $c_{нач(э)}$ - начальная концентрация этанола, моль/м³; $c^{(3)}_л$ - концентрация липидов в фазе 3, моль/м³; $l_{ЭКС}$ - тип экстрагента; $E_{ЭКС}$ - соотношение количеств экстрагентов; F_1 - общая площадь отверстий клеточной стенке, через которые этанол диффундирует внутрь клетки, м²; F_0 - общая поверхность клеточных стенок погибших, но сохранивших форму клеток микроводорослей, м²; F_2 - общая площадь пор клеточной стенки всех целых клеток пасты микроводорослей, через которые этанол диффундирует внутрь клеток, м²; F_{01} - общая поверхность клеточных стенок целых клеток микроводорослей, м²; F_3 - площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 3 (капли петролейного эфира), м²; $D_{вн}$ - коэффициент молекулярной диффузии, осложненной тем, что диффузия идет через отверстия в клеточной стенке, м²/с; $D_{вн1}$ - коэффициент молекулярной диффузии, осложненной тем, что диффузия идет только через поры в клеточной стенке, м²/с; $D_{эф}$ - коэффициент диффузии воды внутрь клетки *Chlorella vulgaris*, м²/с; N_a - число Авогадро; $T_{экс}$ - температура экстракции, °C; μ - динамическая вязкость, м²/с; R - универсальная газовая постоянная; r_s - радиус молекулы этанола, м; B_s - поправочный коэффициент, учитывающим площадь отверстий клеточной стенки; $c_{кл(B)}$ - концентрация всех погибших, но сохранивших форму клеток в пасте микроводорослей, млн кл/мл; V_a - объем пасты микроводорослей, мл; r - радиус клетки микроводорослей, м; B_{s1} - поправочный коэффициент, учитывающим площадь пор (аквапорин) клеточной стенки; D_m - коэффициент молекулярной диффузии липидов из фазы 2 в фазу 3, м²/с; F_{II} - площадь поверхности капли петролейного эфира, м²; $r_{n,э}$ - радиус капли петролейного эфира, м; $V_{кан}$ - объем капли петролейного эфира, м³; n - количество капель петролейного эфира; $V_{кан}$ - объем капли петролейного эфира, м³; $x_{св}$ - количество сухого вещества микроводорослей; $\rho_{эт}$ - плотность этанола, кг/м³; $m_{влаж. био}$ - масса пасты микроводорослей; $W_{вл}$ - количество воды в паста микроводорослей; $c_{лин}$ - количество липидов в пасте микроводорослей относительно сухого вещества клетки; c_c - количество полностью разрушенных клеток микроводорослей в пасте микроводорослей; F_4 - площадь контакта фазы 2 (межклеточной воды) и фазы 1 (внутриклеточного пространства), м²; D_{m2} - коэффициент диффузии липидных капель и белково-липидных комплексов через увеличившиеся поры стенок клеток микроводорослей, м²/с; B_{s2} - поправочный коэффициент, учитывающим площадь увеличившихся пор (аквапорин) клеточной стенки; l_{cm} - толщина клеточной стенки, м; q - удельное энергосодержание биомассы, равное для фотосинтезирующих микроводорослей, МДж/кг; M - масса биомассы, кг; E - показатель энергии света; $K_{ин}$ - интегральный коэффициент эффективности преобразования световой энергии в органическое вещество; $K_{ФАР}$ - коэффициент фотосинтетически активной радиации; $K_{ФС}$ - отношение энергосодержания полученного органического вещества к суммарной энергии всех вступивших в реакцию фотосинтеза фотонов; λ - длина волны, м.

Список литературы

1. Форрестер, Д. Мировая динамика: Пер. с англ./Д. Форрестер. – М.: ООО «Издательство АСТ; Спб.: Terra Fantastica, 2003. -379 с.
2. Чернова, Н. И. Эффективность производства биодизеля из микроводорослей / Н. И. Чернова, С. В. Киселева, О. С. Попель // Энергосбережение, новые и возобновляемые источники энергии. – 2014. – №6.- С. 14 – 21.
3. Campbell, C. J. The coming oil crisis / C. J. Campbell // Multi-science Publishing Company and Petroconsultants. – S. A Essex, 1997. – 456 с.
4. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // Biotechnol Adv 25. – 2007. – P. 294 – 306.
5. Huntley, M. E. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal / M. E. Huntley, D. G. Redalje // Mitig Adapt Strat Glob Change. – 2007. – N 12. – P. 573. – 608.
6. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production / P. M. Schenk, R. Skye, Thomas-Hall [et al.] // Bioenergy Res 1. – 2008. – P. 20 – 43.
7. Li, Y. Biofuels from microalgae / Y. Li, M. Horsman, CQ. Lan, N. Dubois-Calero // Biotechnol Prog 24. – 2008. – P. 815 – 820.
8. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor / L. Rodolfi, GC. Zitelli, N. Bassi [et al.] // Biotech Bioeng 102. – 2009. – P. 100 – 112.
9. Prospects of biodiesel production from microalgae in India / S. A. Khan, M. Z. Rashmi Hussain, S. Prasad, UC. Banerjee // Renew Sust Energ Rev 13. – 2009. – P. 2361 – 2372.
10. Algal Biofuels [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.nrel.gov/bioenergy/algal-biofuels.html> (дата обращения: 22.06.16).
11. UOP Renewable Jet Fuel Process [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.uop.com/processing-solutions/renewables/green-jet-fuel/uop-renewable-jet-fuel-process/> (дата обращения: 22.06.16).

12. Green Star Products, Inc. (GSPI) [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.gspi.com/a.htm/> (дата обращения: 22.06.16).
13. Kim, S. Handbook of Marine Microalgae. Biotechnology Advances/ S.Kim/ - Pukyong National University, Busan, South Korea: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015/ - 604 p.
14. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella* / Y. S. Cheng, Y. Zheng, J. M. Labavitch [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2011. – N 46. – P. 1927 – 1933.
15. Flocculation of microalgae using cationic starch / D. Vandamme, I. Foubet, B. Meesschaert, K. Muylaert // *J Appl Phycol*. – 2010. – N 22. – P. 525 – 530.
16. Poelman, E. Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae / E. Poelman, N. De Pauw, B. Jeurissen // *Resources, Conservation and Recycling*. – 1997/ – N 19. – P. 1 – 10.
17. Lee, A. K. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // *J Appl Phycol*. – 2009. – N 21. – P. 559 – 567.
18. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, A. F. A. Hoadley // *Chemical Engineering Journal*. – 2010. – N 162. – P. 935 – 940.
19. Halim, R. Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass / R. Halim, W. T. Thusitha, L. Dedreia, A. Paul // *Bioresource technology*. Elsevier, USA. – 2013. – N 140. – P. 53 – 63.
20. Algae Biofuels Research in Universities [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://oilgae.com/oilgae/Algae-Biofuels-Research-in-Universities.pdf> (дата обращения: 22.06.16).
21. Gouveia, L. Microalgae as a Feedstock for Biofuels / L. Gouveia. – Springer, 2011. – 69 p.
22. Tamiya, H. Mass culture of algae / H. Tamiya // *Ann Rev Plant Physiol*. – 1957. – N 8. – С. 309 – 334.

23. Упитис, В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига : Зинатне, 1983. – 240 с.
24. Музафаров, А. М. Культивирование и применение микроводорослей / А. М. Музафаров, Т. Т. Таубаев – Ташкент : Изд-во «Фан» Узбекской ССР, 1984. – 136 с.
25. Vonshak, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae In: A. Richmond (ed.) / A. Vonshak // Handbook of microalgal mass culture. – CRC Press, Boca Raton FL, 1986. – P. 117 – 145.
26. Ramkumar, K. Mandalam. Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in High-Density *Chlorella vulgaris* Cultures / K. Mandalam Ramkumar, Bernhard Ø. Palsson // John Wiley & Sons, Inc. – 1998. – P. 605 – 611.
27. Wijanarko, A. Effect of the Presence Of Substituted Urea and Also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivied Medium on *Chlorella* Lipid Content, Progress in Biomass and Bioenergy Production [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.intechopen.com/books/progress-in-biomass-and-bioenergy-production/effect-of-the-presence-of-substituted-urea-and-also-ammonia-as-nitrogen-source-in-cultivied-medium-o> (дата обращения 02.12.14).
28. Held, P. Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red – Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in *Chlorella Vulgaris* [Электронный ресурс] – Режим доступа : <http://www.biotek.com/resources/articles/nile-red-dye-algal.html> (дата обращения 25.05.15).
29. Held, P. Monitoring of Algal Growth Using Their Intrinsic Properties [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.biotek.com/resources/articles/monitoring-of-algal-growth-using-intrinsic-properties.html>. (дата обращения 25.05.15).
30. Ауджанова, В. К. Морфологические и систематические характеристики хлореллы. Ее производство и применение / В. К. Ауджанова // Научный вестник. – 2014. – № 1 (1). – С. 113 – 126.

31. Araujo, S. G. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains [Электронный ресурс] / S. G. Araujo. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353534> (дата обращения: 1.12.15).

32. Клячко-Гурвич, Г. Л. Физиолого-биохимические аспекты направленного получения ценных метаболитов в условиях интенсивной культуры водорослей / Г. Л. Клячко-Гурвич, В. Е. Семененко // Биология автотрофных микроорганизмов. Труды МОИП. – 1966. – Т. XXIV. – С. 154 – 159.

33. Соловченко, А. Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими / А. Е. Соловченко // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 192 – 202.

34. Влияние имидазола на обмен жирных кислот при восстановлении клеток хлореллы после азотного голодания / Г. Л. Клячко-Гурвич, Т. С. Рудова, Е. С. Кованова, В. Е. Семененко // Физиология растений. – 1973. – № 20(3). – С. 326 – 331.

35. Семененко, В. Е. К вопросу о выращивании Культуры *Chlorella rupeoidosa* в условиях освещения импульсным светом / В. Е. Семененко, М. Г. Владимирова, М. А. Попова // Физиология растений. – 1960. – Т. 7, Вып. 4. — С. 459 – 465.

36. Barghbani, R. Investigating the Effects of Several Parameters on the Growth of *Chlorella vulgaris* Using Taguchi's Experimental Approach / R. Barghbani, K. Rezaei, A. Javanshir // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. – №1. -2012. – P. 128-133.

37. Blair, M. F., Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production / M. F. Blair, B. Kokabian, V. G. Gude // Journal of Environmental Chemical Engineering. - № 2 (1). – 2014. – P. 665-674.

38. Emerson, R. The photochemical reaction in photosynthesis / R. Emerson, W. J. Arnold // Gen.Physiol. – N 16. – 1932. – P. 191 – 205.

39. Khoeyi, Z. A. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris* / Z. A. Khoeyi, J. Seyfabadi, Z. Ramezani // *Aquaculture International*. - № 20 (1). – 2012. – P. 41-49.
40. Seyfabadi, J. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes / J. Seyfabadi, Z. Ramezani, Z. A. Khoeyi // *Journal of Applied Phycology*. - № 23 (4). – 2011. P. 721- 726.
41. Gong, Q. Effects of Light and pH on Cell Density of *Chlorella Vulgaris* / Q. Gong, Y. Feng, L. Kang. et. al // *International Conference on Applied Energy*. - № 61. – 2014. – P. 2012-2015.
42. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana* / M. R. Brown, G. A. Dunstan, S. J. Norwood, K. A. Miller // *J Phycol*. – 1996. – N 32. – P. 64 – 73.
43. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture / M. R. Brown, S. M. Barrett, J. K. Volkman [et al.] // *Aquaculture* 143. – 1996. – P. 341 – 360.
44. Khotimchenko, S. V. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance / S. V. Khotimchenko, I. M. Yakovleva // *Phytochemistry* 66. – 2005. – P. 73 – 79.
45. Lynch, D. V. Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina* / D. V. Lynch, G. A. Thompson // *Plant Physiol* 69. – 1982. – P. 1369 – 1375.
46. Converti, A. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production/ A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz et. al // *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. - № 48 (6). – 2009. – P. 1146-1151.
47. Latała, A. Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae [Электронный ресурс]. – Режим доступа :

http://www.iopan.gda.pl/oceanologia/OC_31/OC_31_119-138.pdf. (дата обращения 02.12.14).

48. Chinnasamy, S. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature/ S. Chinnasamy, B. Ramakrishnan, A. Bhatnagar et. al // International Journal of Molecular Sciences/ -№ 10. – 2009. – P. 518-532.

49. Mayo, A. W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria/ A. W.Mayo// Water Environment Research. - № 69 (1). – 1997. – P. 64-72.

50. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella* / Y. S. Cheng, Y. Zheng, J. M. Labavitch [et al.] // Process Biochemistry. – 2011. – N 46. – P. 1927 – 1933.

51. Flocculation of microalgae using cationic starch / D. Vandamme, I. Foubet, B. Meesschaert, K. Muylaert // J Appl Phycol. – 2010. – N 22. – P. 525 – 530.

52. Poelman, E. Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae / E. Poelman, N. De Pauw, B. Jeurissen // Resources, Conservation and Recycling. – 1997/ – N 19. – P. 1 – 10.

53. Lee, A. K. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // J Appl Phycol. – 2009. – N 21. – P. 559 – 567.

54. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, A. F. A. Hoadley // Chemical Engineering Journal. – 2010. – N 162. – P. 935 – 940.

55. A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation / L. Xu, C. Guo, F. Wang [et al.] // Bioresource Technology. – 2011. – N 102. – P. 10047 – 10051.

56. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds / R. M. Knuckey, M. R. Brown, R. Robert, D. M. F. Frampton // Aquacultural Engineering. – 2006. – N 35. – P. 300 – 313.

57. Papazi, A. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants / A. Papazi, P. Makridis, P. Divanach // *J Appl Phycol.* – 2010. – N 22. – P. 349 – 355.
58. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii* / L. Borges, J. A. Moron-Villarreyes, M. G. Montes D'Oca, P. C. Abreu // *Biomass and Bioenergy.* – 2011. – N 35. – P. 4449 – 4454.
59. Harvesting of microalgae by bio-flocculation / S. Salim, R. Bosma, M. H. Vermue, R. H. Wijffels // *J Appl Phycol.* – 2011. – N 23. – P. 849 – 855.
60. Pittman, J. K. The potential of sustainable algal biofuel production using waste water resources / J. K. Pittman, A. P. Dean, O. Osundeko // *Bioresource Technology.* – 2011. – N 102. – P. 17 – 25.
61. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review / C. Y. Chen, K. L. Yeh, R. Aisyah [et al.] // *Bioresource Technology.* – 2011. – N 102. – P. 71 – 81.
62. Surendhiran, D. Study on Flocculation Efficiency for Harvesting *Nannochloropsis oculata* for Biodiesel Production / D. Surendhiran, M. Vijay // *International Journal of ChemTech Research.* – 2013. – Vol. 5, N. 4. – P. 1761 – 1769.
63. Electrocoagulation of marine microalgae / Nyomi Uduman, Hsueh Lee, Michael K. Danquah, Andrew F. A. Hoadley // Department of Chemical Engineering, Monash University, Wellington Road, Clayton, Victoria 3800. – Australia. – 2011. – 11 p.
64. Nakamura, H. Report on the present situation of Microalgae Research institute of Japan / H. Nakamura // *Reports from the microalgae Research institute of Japan.* – 1961. – Vol. 2, N 1. – P. 1 – 12.
65. Арутюнян, Н. П. Культивирование одноклеточных водорослей / Н. П. Арутюнян. – Ереван : Изд-во АН Арм. ССР, 1966. – С. 3 – 86.
66. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолосС, 2004. – 296 с.

67. Цыренов, В.Ж. Основы биотехнологии: Иммунная биотехнология: Учебно-методическое пособие/В.Ж. Цыренов. -Улан-Уде: Изд-во ВСГТУ, 2002. – 74 с.

68. Шапхаев, Э.Г. Основы биотехнологии 5.Дезинтеграция клеток: Учебное пособие / Э.Г. Шапхаев, В.Ж. Цыренов, Е.И. Чебунина .- Улан-Уде: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 96 с.

69. Алехин, Е. К. Как действуют антибиотики / Е. К. Алехин // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 19 – 23.

70. Иванов, Г.Ю. Установка для культивирования хлореллы : пат. Рос. Федерация № 2477040 / Г.Ю. Иванов, А.В. Мирзоян ; – 2011.

71. Богданов, Н.И. Установка для выращивания микроводорослей : патент Рос. Федерация № 2268923 / Н.И. Богданов, М.В. Куницын; – 2006.

72. Даре, Л.А. Реактор: патент Рос. Федерация 2508396/ Л.А. Даре,- 2014.

73. Щеголькова Н.М. , Мойжес О.В. , Шашкина П.С. Реактор для очистки сточной воды от биогенных элементов и обеззараживания /[Электронный ресурс] – Режим доступа : // <http://watchemec.ru/article/> (дата обращения 02.06.16).

74. Цыганков, А.А.Реактор: патент Рос.Федерация 2451446/ А.А Цыганков, Е.Е. Елизаров; - 2012.

75. Current state of research and development in the area of cultivation of microalgal biomass [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.algaereactor.ru/en/the-current-state-of-research-and-development/> (дата обращения: 22.06.16).

76. Richardson, J. W. A financial assessment of two alternative cultivation systems and their contributions to algae biofuel economic viability/ J. W. Richardsona, M. D. Johnsona, X.i Zhangb et. Al // Algal Research. - № 4.- 2014.- P.96-104.

77. Тихонов И.В. Биотехнология: Учебник /И.В.Тихонов, Е.А.Рубан, Т.Н.Грязнева и др.; Под ред. акад. РАСХН Е.С.Воронина. – СПб: ГИОРД, 2008. – 704 с.

78. Виэстур, У.Э. «Биотехнология. Биологические агенты, технология, аппаратура»/ У.Э. Виэстур, И.А. Шмите, А.В. Жилевич. - Рига: Зинатне, 1987. — 263 с.

79. Касаткин, А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии /А.Г. Касаткин.- 9-е изд., исправленное.- М.: Химия, 1973. – 752 с.

80. Соколов, В.Н. Аппаратура микробиологической промышленности/ В.Н.Соколов, М.А. Яблокова. - Л.: Машиностроение, 1987.- 278 с.

81. Флотаторы с выделением газа из раствора [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/10_protsessy_i_apparaty_khimicheskikh_tekhnologiy_chast_II/7045 (дата обращения: 22.06.16).

82. Матов, Б.М. Электрофлотация/ Б.М. Матов.- Кишинев: Картя Молдовеняскэ, 1971. -184 с.

83. Мамаков, А.А. Современное состояние и перспективы применения электролитической флотации веществ/ А.А. Мамаков. - Кишинев: Штиница, 1975. Ч. 2. -184 с.

84. Algae: A Triple Solution To Aquaculture Industry Challenges [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.originclear.com/pdf/Algae-Triple-Solution-to-Aquaculture-Industry-Challenges> (дата обращения: 22.06.16).

85. Homogenizer Handbook Processing of Emulsions and Dispersions [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.apvhemisan.com/uploads/images/Process_E_D_By_Homog_3005_01_06_2008_US.pdf (дата обращения: 22.06.16).

86. Ушаков, В.М. Баллистический дезинтегратор микроорганизмов: патент Рос. Федерация 2021348/ В.М. Ушаков, А.И.Скиба , - 1994.

87. Андриянов, Ю. В. Способ дезинтеграции биологических клеток : патент Рос. Федерация 2117040/ Ю.В. Андриянов, В.П.Смирнов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/211/2117040.html> (дата обращения: 22.06.16).

88. Lee, S. Biofuels and Bioenergy: Processes and Technologies/ Sunggyu Lee, Y.T. - CRC Press, 2012. – 341 p.

89. Algae Harvesting, Dewatering and Extraction [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.originclear.com/pdf/OOIL_World_Biofuels_Markets_100316.pdf (дата обращения: 22.06.16).

90. Yang F. A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum* sp at Room Temperature / F. Yang, W. Xiang, X. Sun // *Marine Drugs*. – 2014. – N 12. – P. 1258 – 1270.

91. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review/ Halim Ronald [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2012. – Vol. 30. – P. 710 – 731.

92. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae / Lee Jae-Yon [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101. – P. 575 – 577.

93. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae / E. Ryckebosch [et al.] // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2012. – Vol. 89. – P. 189 – 198.

94. Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae / D. T. Céline [et al.] // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17. – P. 8196 – 8205.

95. Mamidipally, P. K. First approach on rice bran oil extraction using limonene / P. K. Mamidipally, S. X. Liu // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2004. – N 106. – P. 122 – 125.

96. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method / S. Araujo Glacio, J. B. L. Leonardo Matos, Jader O. Fernandes [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2013. – Vol. 20 (1). – P. 95 – 98.

97. Concas, A. Microalgal Cell Disruption Through Fenton Reaction: Experiments, Modeling and Remarks on its Effect on the Extracted Lipids Composition / A. Concas, M. Pisu, G. Cao // Chemical Engineering Journal. – 2015. – Vol. 263. – P. 392 – 401.

98. Enhanced Lipid Extraction from Unbroken Microalgal Cells Using Enzymes / A. Zuorro, R. Lavecchia, G. Maffei [et al.] // Chemical engineering transactions. – 2015. – Vol. 43. – P. 211 – 216.

99. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris* / Hyeon-Soo Cho, You-Kwan Oh, Soon-Chul Park [et al.] // Renewable Energy. – 2013. – Vol. 54. – P. 156 – 160.

100. Клячко-Гурвич, Г. Л. О количественной экстракции нативных липидов из клеток хлореллы / Г. Л. Клячко-Гурвич, В. Е. Семенов // Физиология растений. – 1978. – № 25[2]. – С. 412 – 417.

101. Prommuak, C. Microalgal Lipid Extraction and Evaluation of Single-Step Biodiesel Production / C. Prommuak [et al.] // Engineering Journal. – 2012. – Vol. 16. – P. 157 – 166.

102. Пат. № 8598378 US 12/404,176. Methods and compositions for extraction and transesterification of biomass components / Cooney Michael J., Young Gregory ; заявитель и патентообладатель University Of Hawaii. – № 61/036,913 ; заявл. 13.03.09 ; опубл. 17.09.09. – 9 с. : ил.

103. Пат. № 8524929 US, 13/653,595. Extraction with fractionation of lipids and proteins from oleaginous material / Aniket Kale, Qiang Hu, Sommerfeld Milton ; заявитель и патентообладатель Arizona Board Of Regents For And On Behalf Of Arizona State University. – № 13/493,586 ; заявл. 17.10.12 ; опубл. 03.09.13. – 3 с. : ил.

104. Пат. № 8450111 US 12/970,484. Lipid extraction from microalgae using a single ionic liquid / Di Salvo Roberto, Reich Alton J., Waite Dykes H. H., Jr., Teixeira Rodrigo; заявитель и патентообладатель Streamline Automation. – № 61/309,439 ; заявл. 16.12.10 ; опубл. 28.05.13. – 5 с. : ил.

105. Пат. № 8388846 US 13/083,895. Method and apparatus for lysing and processing algae / Chew Geoffrey, Reich Alton J., Waite Dykes H. H., JR., Di Salvo Roberto ; заявитель и патентообладатель Streamline Automation, Llc. – № 13/493,586 ; заявл. 04.12.11 ; опубл. 05.03.13. – 5 с. : ил.

106. Пат. № 8476060 US 12/758,480. Process for separating lipids from a biomass / Chianelli Russell, Hildebrand Calvin, Rodriguez Joaquin ; заявитель и патентообладатель Board Of Regents, The University Of Texas System. – № 61/168,804 ; заявл. 12.04.10 ; опубл. 02.07.13. – 3 с.: ил.

107. Fajardo, A. R. Lipid extraction from the microalga *Phaedactylum tricorutum* / A. R. Fajardo, L. E. Cerdan, A. R. Medina [et al.] // European Journal of Lipid Science Technology. – 2007. – N 109. – P. 120 – 125.

108. McConnell, B. Kinetics Study of the Solvent Extraction of Lipids from *Chlorella vulgaris* / B. McConnell, I. H. Farag // International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR). – 2013. – N 1(10). – P. 28 – 38.

109. Короткова, Ю. С. Фармацевтическая технология «ПРЕПАРАТЫ ЗАВОДСКОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ» методические указания к практическим занятиям для студентов/ Ю. С.Короткова. – Иваново., 2011. -85 с.

110. Технология микробного жира [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mybiblioteka.su/2-584.html> (дата обращения: 22.06.16).

111. Veljkovic, V.B Kinetics of sunflower oil methanolysis catalyzed by calcium oxide. / V.B. Veljkovic, O.S. Stamenkovic, Z.B. Todorovic, et. al// Fuel. - 2009. - № 88 (9). - P. 1554-1562.

112. Stamenkovic, O.S. Modeling the kinetics of calcium hydroxide catalyzed methanolysis of sunflower oil. / O.S. Stamenkovic, , V.B.Veljkovic, Z.B. Todorovic, , M.L. Lazic et. al// Bioresource Technology. - In Press, Corrected Proof.

113. Dossin, T.F. Kinetics of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification. / T.F.Dossin, M.F. Reyniers, G.B. Marin// Applied Catalysis B: Environmental. - 2006.- №62 (1-2). P. 35-45.

114. Srivastava, A. Triglycerides-based diesel fuels. / A. Srivastava, Prasad, R // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2000.- № 4. - P. 111-133.
115. Meher, L.C. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. / L.C. Meher, D.V.Sagar, S.N. Naik// Renewable and Sustainable Energy Reviews. - 2006. -№ 10. P. 248–268.
116. Hak-Joo, K. Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst. / K. Hak-Joo, K. Bo-Seung, Min-Ju et. al // Catalysis Today. - 2004.- №93-95. P. 315-320.
117. Liu, X. Transesterification of soybean oil to biodiesel using SrO as a solid base catalyst. / X. Liu, H. He, Y. Wang, S. Zhu // Catalysis Communications. - 2007.-№8. - P. 1107-1111.
118. Arzamendi, G Synthesis of biodiesel with heterogeneous NaOH/alumina catalysts: Comparison with homogeneous NaOH. / G. Arzamendi, I. Campo, E. Arguinarena et. al// Chemical Engineering Journal.- 2007. - №134. (1-3).- P. 123-130.
119. Lotero, E. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. / E. Lotero, Y. Liu, D.E. Lopez et. Al// Industrial & Engineering Chemistry Research.- 2005. - №44. (14).- P. 5353-5363.
120. Рабо, Дж. Химия цеолитов и катализ на цеолитах. В двух томах. Т.1. / Дж. Рабо – М.: Мир, 1980. – 506 с.
121. Rothenberg, G. Solid Acid Catalysts for Biodiesel Production - Towards Sustainable Energy. / G. Rothenberg, A.A., KissDimian// Advanced Synthesis & Catalysis. - 2005. - №348.- P. 75-81.
122. Савельев, Г.С. Производство и использование биодизельного топлива из рапса/ Г.С. Савельев. - Москва : Издательство ВИМ, 2007. - 95 с.
123. Василев, Р.Г. Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 1: биодизель/ Р.Г. Василев// Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007. – т.3 №1. – С. 47-54.

124. Demirbas, A. Biodiesel. A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines/ A. Demirbas.-Springer, 2008. – 140 p.

125. Богданов, Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных [Электронный ресурс] / Н. И. Богданов – Режим доступа : http://www.хлорелла.рф/up/files/Suspension_of_Chlorella_in_the_diet.pdf (дата обращения 25.05.15).

126. Богданов, Н.И. Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР N С-III продуцент биомассы ; патент Рос. Федерация 1751981 / Н.И. Богданов, 1997.

127. Владимирова, М. Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей / М. Г. Владимирова, В. Е. Семенов. – М. : Изд-во Акад. наук СССР, 1962. – 61 с.

128. ГОСТ 23268.9–78. Воды минеральные питьевые лечебные, лечебно-столовые и природные столовые. Методы определения нитрат-ионов. – Введ. 1980-01-01. – М. : Изд-во стандартов, 1978. – 12 с.

129. Биохимия липидов/сост. Н.М. Орел.- Минск: Издательский центр БелГУ,2007.- 34 с.

130. Kates, M. Lipid extraction procedures. Techniques of lipidology isolation, analysis, and identification of lipids / M. Kates // Elsevier Science Publisher, Amsterdam, the Netherlands. – 1986. – 342 p.

131. Денситометр Сорбфил. Версия 2.0: Руководство пользователя . - г. Краснодар: ООО Имид, 2013. - 19 с.

132. Handel, E. V. Rapid determination of total lipids in mosquitoes / E. V. Handel // J. Aru. Mosq. CoNrnol Assoc. – 1985. – Vol. 1, No. 3. – P. 302 – 304.

133. Gerken, H. G. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production/ H. G. Gerken, B.S. Donohoe, E.P. Knoshaug// Planta. - 2012, P. 239-253.

134. Gude, V.G. Microwave Energy Potential for Biodiesel Production/ V.G. Gude, P.D. Patil, E. Martinez-Guerra et. al// USA, 2013. - 31 p

135. Ковалев, И.В. Лекции по биофизике. Учебно-методическое пособие / И.В. Ковалев, И.В. Петрова, Л.В. Капилевич и др. - Под редакцией проф. Баскакова М.Б. – Томск, 2007. –175 с.

136. Рогачева, С. М. Биомолекулы: строение, свойства, функции [Электронный ресурс]: учебное пособие: электронное издание сетевого и локального распространения / С. М. Рогачева. - М-во образования и науки Российской Федерации, Саратовский гос. технический ун-т. - Саратов : СГТУ, 2014.

137. Мукатова, М. Д. Способ получения хлорофилла из высших водных растений: патент Рос. Федерация 2496813/ М.Д. Мукатова, М. И. Кабанин, А. Р. Салиева, - 2013.

138. Хлорелла - уникальное растение [Электронный ресурс] Режим доступа: http://algotec.ru/about_chlor/dwelling/ (Дата доступа: 22.06.16).

139. Диэлектрические потери [Электронный ресурс] Режим доступа: http://studopedia.ru/3_47031_dielektricheskie-poteri.html (Дата доступа: 22.06.16).

140. Семихина, Л. П. Диэлектрические и магнитные свойства воды в водных растворах и биообъектах в слабых электромагнитных полях/ Л. П. Семихина. – Тюмень, 2005. – 173 с.

141. Корчагин Ю.В. Способ стерилизации материалов при помощи свч-излучения с высокой напряженностью поля и устройство для реализации способа: патент Рос. Федерация 2161505/ Ю.В. Корчагин. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/216/2161505.html/> (Дата доступа: 22.06.16).

142. Ленинджер, А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ./ А.Ленинджер. -М.: Мир, 1985.- 367 с.

143. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь. Русско-английский/ В.З Тарантул. –М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с.

144. Кольман, Я. Наглядная биохимия: Пер. с нем/ Я. Кольман, К.-Г Рем.— М.: Мир, 2000. - 469 с.

145. Hansen Solubility Parameters in Practice [Электронный ресурс] Режим доступа: https://books.google.ru/books?id=efMbTvlfc8wC&printsec=frontcover&dq=hansen+solubility+parameters+in+practice&hl=ru&sa=X&ved=0ahUKEwixg4n_yMXNAhVCJ5oKHZMBAjwQ6AEIHDAА#v=onepage&q=hansen%20solubility%20parameters%20in%20practice&f=false (Дата доступа: 22.06.16).

146. Межмолекулярное взаимодействие [Электронный ресурс] Режим доступа: https://books.google.ru/books?id=efMbTvlfc8wC&printsec=frontcover&dq=hansen+solubility+parameters+in+practice&hl=ru&sa=X&ved=0ahUKEwixg4n_yMXNAhVCJ5oKHZMBAjwQ6AEIHDAА#v=onepage&q=hansen%20solubility%20parameters%20in%20practice&f=false (Дата доступа: 22.06.16).

147. Hansen C.M. Hansen solubility parameters a user's handbook. Second Edition/ C. M. Hansen. – London, New York : CRC Press, 2007. – 520 p.

148. Зеин [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://dic.academic.ru/dic.nsf/bse/88501/%D0%97%D0%B5%D0%B8%D0%BD> (Дата доступа: 22.06.16).

149. Hansen Solubility Parameters [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.hansen-solubility.com/downloads.php> (Дата доступа: 22.06.16).

150. Спирт этиловый [Электронный ресурс] Режим доступа: http://tiu.ru/Spirt-etilovyj.html?no_redirect=1 (Дата доступа: 22.06.16).

151. Петролейный эфир Режим доступа: http://tiu.ru/search?search_scope=product&search_in_region=&search=%D0%9D%D0%B0%D0%B9%D1%82%D0%B8&search_term=%D0%BF%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B9%D0%BD%D1%8B%D0%B9+%D1%8D%D1%84%D0%B8%D1%80 (Дата доступа: 22.06.16).

152. Тарифы на электроэнергию в тамбовской области 2016 [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.energo-consultant.ru/sprav/tarifi_na_elektroenergiyu_v_2016/tarifi_na_elektroenergiyu_v_Tambovskoy_obl_2016 (Дата доступа: 22.06.16).

153. Масло рапсовое нерафинированное [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.agroserver.ru/b/maslo-rapsovoe-nerafinirovannoe-579955.htm> (Дата доступа: 22.06.16).
154. Полищук, А.В. Исследование эффективности нейтрализации биодизеля/ А.В. Полищук, Н.И. Казак, В.Н. Полищук [Электронный ресурс] . Режим доступа: <http://sworld.education/konfer32/270.pdf> (Дата доступа: 22.06.16).
155. Voegele, E. Report outlines global biodiesel production / E. Voegele //Biodiesel Magazine. - 2011. - № 31. - P. 4.
156. Пузырьковая промывка биодизеля / Recscling – повторное использование или возвращение в оборот отходов производства или мусора [Электронный ресурс] / 2013. Режим доступа: <http://recyclingforum.ru/showthread.php/250-Пузырьковая-промывка-биодизеля?s=4077b58b0ba1b77a0d26ea9b5a19bb42>. (Дата доступа: 22.06.16).
157. Alover, M. Collaborative biodiesel tutorial. "Applesid" processor / M. Alover // Biodiesel Magazine. - 2005. - 6 p.
158. Kingsland, Sh. E. Modeling nature: episodes in the history of population ecology / Sh. E. Kingsland. – Chicago : University of Chicago Press, 1995. – 315 p.
159. Йоргенсен, С. Э. Управление озерными системами / С. Э. Йоргенсен ; пер. с англ. – М. : Агропромиздат, 1985. – 160 с.
160. Дьяконов, В. В. Математические пакеты расширения Матлаб : специальный справочник / В. В. Дьяконов, В. А. Круглов. – СПб. : Изд-во Питер, 2001. – 480 с.
161. Акулинин, Е.И. Автономная система обеспечения фермерских хозяйств биодизельным топливом [Текст] /Е.И. Акулинин, М.С. Темнов, Е.В. Пешкова и др. // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания. – Воронеж, 2015. – №2. – С. 15-21.

162. Растворение и экстрагирование в системе твердое тело – жидкость [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/10_protsessy_i_apparaty_khimicheskikh_tekhnologiy_chast_II/7125 (дата обращения: 22.06.16).

163. Романков, П.Г. Массообменные процессы химической технологии/ П.Г. Романков, В.Ф. Фролов. - Л.: Химия, 1990. -385 с.

164. Плановский, А.Н. Процессы и аппараты химической и нефтехимической технологии: Учебник для вузов. / А.Н. Плановский, П.И. Николаев. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Химия, 1987. - 496 с.

165. Кузнецова, Е.А. Биохимия. Курс лекций [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://oreluniver.ru/file/chair/chemistry/study/biochemistry_lecture.pdf (дата обращения: 22.06.16).

166. Неорганические соли [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.component-reaktiv.ru/index.php/neorganicheskie-reaktivy/soli> (дата обращения: 22.06.16).

167. Купить химические реактивы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://himsnab-spb.ru/production/chemicals/> (дата обращения: 22.06.16).

168. ЭДТА (Трилон-Б) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vitazone.ru/product/edta-trilon-b-/> (дата обращения: 22.06.16).

169. Кафаров, В.В. Основы массопередачи. учеб/ В.В.Кафаров.-3-е изд., перераб. И доп.-М.: Высшая школа,1979. -439 с.

170. Кафаров В.В., Глебов М.Б. Математическое моделирование основных процессов химических производств: Учебное пособие для вузов. - М. М. Высшая школа, 1991. -400с.

171. Технологическая инструкция по использованию ферментных препаратов. ООО ПО «СИББИОФАРМ»/ Москва, 2005. – 17 стр.

172. Злобина, И.В. СВЧ термическая обработка неоднородных по структуре и электрофизическим характеристикам композиций из

органических материалов: дис. ...канд. тех. наук: 05.09.10/ Ирина Владимировна Злобина; ФГБОУ ВПО «саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.». – Саратов., 2015. – 173 с.

173. Production and Testing of Ethyl and Methyl Esters [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://journeytoforever.org/biofuel_library/EthylMethylEsters.html (дата обращения: 22.06.16).

174. Myers, J. Laboratory cultures/ Myers, J/ - . In: R. A. Lewin (ed.), Physiology and biochemistry of algae., New York/: Academic Press, 1962. - pp. 603–615

175. Евдокимов, Е.В. Динамика популяций в задачах и решениях. Учебное пособие./Е.В. Евдокимов. – Томск.: Томский государственный университет, 2001. - 72 с.

176. Gerald, K. Cell and molecular biology: Concepts and Experiments / K. Gerald. - John Wiley & Sons, 2009. – 832 p.

177. Антонов, В.Ф. Биофизика: учебник для вузов. / В. Ф. Антонов, А.М. Черныш, В.И. Пасечник и др. - 1-е изд.. - М.: Владос, 1999. - 288 с.

178. Holm, A. Aquaporins in infection and inflammation [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:924453/FULLTEXT01.pdf> (дата обращения: 22.06.17).

179. Рудобашта, С.П. Массоперенос в системах с твердой фазой. / С.П. Рудобашта. – М.: Химия, 1980. – 248 с.

180. Dejoye, C. Combined Extraction Processes of Lipid from *Chlorella vulgaris* Microalgae: Microwave Prior to Supercritical Carbon Dioxide Extraction/ Céline Dejoye , Maryline Abert Vian, Guy Lumia et. al // Int. J. Mol. Sci.. - 2011.- №12,. P. 9332-9341.

181. Тимонин, А.С. Основы конструирования и расчета химико-технологического и природоохранного оборудования: Справочник. Т.2. / А.С. Тимонин. – Калуга: Издательство Н. Бочкаревой, 2002. – 1028 с.

182. Байгалиев, Б.Е. «Теплообменные аппараты»: учебное пособие/ Б.Е. Байгалиев, А.В. Щелчков, А.Б. Яковлев, П.Ю. Гортышов. – Казань: Изд-во Казан.гос. техн. ун-та, 2012. –180 с.

183. Павлов, К.Ф. «Примеры и задачи по курсу процессов и аппаратов химической технологии». Учебное пособие для вузов/ К.Ф. Павлов, П.Г. Романков, А.А. Носков. – Л.: Химия, 1987. – 576 с.

Приложение А. Результаты обзора исследований по подбору технологических условий экстракции внутриклеточных липидов из микроводорослей

Таблица А1 – Обзор исследований по подбору условий экстракции внутриклеточных липидов из микроводорослей

Исследование	Штамм и вид микроводорослей	Способ разрушения	Экстрагент	Температура экстракции, °С	Соотношение г микроводорослей / мл экстрагента	Выход липидов, %
1	2	3	4	5	6	7
Ли и др. [92]	<i>Chlorella vulgaris</i> Сухая, растворенная в дистиллированной воде	автоклавирование, гомогенизирование в шариковой мельнице, обработка СВЧ-излучением, обработка ультразвуком, «осмотический шок»	хлороформ-метанол 1:1 (об.)	Нет данных	1:1	10 % (масс.) СВЧ-излучение (2450 МГц в течение 5 мин) + хлороформ-метанол 1:1 (об.)
Ruckebosch E. и др. [93]	<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-11b влажная	1) трехкратное замораживание-размораживание в жидком азоте; 2) гомогенизация в среде метанола с помощью шариковой мельницы в течение 30 с при частоте 60 Гц; 3) обработка ультразвуком в течение 15 мин после в среде метанола, хлороформа и воды.	хлороформ-метанол 1 : 1 (об.); хлороформ-метанол 2 : 1 (об.); дихлорметан-этанол 1 : 1 (об.); гексан-изопропанол 3 : 2 (об.); метил-трет-бутиловый эфир-метанол 10 : 3 (об.). (использовались для всех трех случаев разрушения)	Нет данных	1:140 при использовании лиофилизированных водорослей	22 % (масс.) хлороформ-метанол с соотношением 1 : 1 (об.) после гомогенизации в среде метанола с помощью шариковой мельницы в течение 30 с при частоте 60 Гц

Продолжение таблицы А1

1	2	3	4	5	6	7
Celine Dejoye Tanzi и др.[94] Лю и др. [95]	Сухие микроводоросли	Нет данных	Терпены: б-пинен, D-лимонен, пара- кумол, гексан	97-98	1:30	0.91 % б-пинен, D-лимонен, пара-кумол
Glacio S. Araujo и других [96]	<i>Chlorella vulgaris</i> после флокуляции гидроксидом натрия и сушка при 60 °С	ультразвук (40 кГц)	Методы Блайя и Дайера, Чэна, Фолча, Хара и Радина, и Сокслета	110 (Сокслет) Для остальных методов данных нет	1:42.5/110 (Сокслет)	52.5 % масс ультразвук (40 кГц); хлороформ-метанол с соотношением 1 : 2 (об.)
Fangfang Yang и др. [90]	<i>Picochlorum Sp.</i> влажные микроводоросли		Этанол, затем после отделения от этанола биомассы к этанолу приливали гексан.	Комнатная температура 27 °С	R = 5 : 1	33 % от сухого вещества в течение 37 мин при слабом перемешивании
Alessandro Concas и другие [97]	<i>Chlorella vulgaris</i> Влажные микроводоросли	с помощью реакции Фентона: раствор, содержащий 0.5 моль/ л H ₂ O ₂ и 0.024 моль/л FeSO ₄ ; обработка в течение трех минут	этанол и гексан	Нет данных	Нет данных	17.4 %
Antonio Zuorro и другие [98]	<i>Nannochloropsis sp</i> Лиофилизированн ый порошок	ферментный комплекс (состоящий из галакатоманназы, 1.4 β- целлюбиозидазы и β- глюкозидазы). время обработки – 90 мин, масса вносимого ферментного комплекса – 1.3 мг·г ⁻¹ , pH = 5, T = 36 °С	хлороформ- Метанол-вода	Комнатная температура	Нет данных	Выход липидов 70 % от присутствующих в клетке

Окончание таблицы А1

1	2	3	4	5	6	7
Hyeon-Soo Cho и др. [99]	<i>Chlorella vulgaris</i> Влажные микроводоросли	Целлюлаза	гексан, метанол и хлороформ	50 °С	Нет данных	Установлено, что для достижения максимального выхода 85.3 % через 72 часа необходимо поддерживать pH = 4.8 и T = 50 °С
Клячко-Гурвич Г. Л. и др. [100]	<i>Chlorella vulgaris</i> Влажные микроводоросли	дезинтегратор со стеклянными бусами	изопропанол-хлороформ (1:1)	Нет данных	Нет данных	Выход липидов составил 99% от общего количества находившихся в клетке
С. Prommuak и др. [101]	<i>Chlorella vulgaris</i> Лиофилизированные микроводоросли	ультразвук и СВЧ-излучение	Хлороформ и метанол в соотношении 2 : 1 (об./об.); гексан	50 °С	1:180 (Сокслет); 1:100 (метод Фолча)	38.9% при разрушении клеток с помощью СВЧ-излучения (мощность аппарата 300 Вт)

Приложение Б. Определение вида и соотношения растворителей с помощью методики Ч. Хансена

Цель: с использованием методики Ч. Хансена подобрать оптимальный растворитель (или смесь растворителей) для извлечения усредненной молекулы липида, среднестатистического белково-липидного комплекса и триацилглицерида.

Ход эксперимента:

1) С помощью методики Ч. Хансена по формулам (1.6) и (1.7) определить наилучшие растворители (и смеси), подходящие для извлечения данного вида липидов (табл. Б1, Б2, Б3).

2) Объединить полученные результаты и выбрать смеси, подходящие во всех трех случаях (табл. Б4.).

Таблица Б1 - Подбор оптимального растворителя для среднестатистического липида *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111

№	Экстрагент	δ_D	δ_P	δ_H	R_a	RED	Растворимость*
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Хлороформ	17.8	3.1	5.7	3.6	0.76	1
2	Метанол	14.7	12.3	22.3	20.4	4.33	0
3	Этанол	15.8	8.8	19.4	16.1	3.43	0
4	Гексан	14.9	0	0	6.1	1.29	0
5	Бензин (гептан)	15.2	0	0	5.8	1.24	0
6	Нефрас (гексан)	15.1	0	0	5.9	1.26	0
7	Петролейный эфир	14.7	0	0	6.3	1.33	0
8	Изопропанол	15.8	6.1	16.4	12.5	2.67	0
9	Х:М (1:1)	16.25	7.7	14	10.68	2.27	0
10	Х:М (1:2)	15.63	9.54	17.32	14.5	3.09	0
11	Х:М (9:1)	17.49	4.02	7.36	4.15	0.88	1
12	Х:Э (1:1)	16.8	5.95	12.55	8.81	1.88	0
13	Х:Э (1:2)	16.4	7.09	15.29	11.69	2.49	0
14	Х:Э (9:1)	17.6	3.67	7.07	4.05	0.86	1
15	Гек:М (1:1)	14.8	6.15	11.15	7.97	1.7	0
16	Гек:М (1:2)	14.76	8.61	15.61	12.84	2.73	0
17	Гек:М (9:1)	14.88	1.23	2.23	4.03	0.86	1
18	Гек:М (4:1)	14.86	2.46	4.46	2.93	0.62	1
19	Гек:М (7:3)	14.84	3.69	6.69	3.73	0.79	1
20	Гек:Э (1:1)	15.35	4.4	9.7	5.87	1.25	0
21	Гек:Э (1:2)	15.53	6.16	13.58	9.87	2.10	0
22	Гек:Э (9:1)	14.99	0.88	1.94	4.25	0.91	1
23	Гек:Э (8:2)	15.08	1.76	3.88	2.91	0.62	1
24	Гек:Э (7:3)	15.17	2.64	5.82	2.83	0.60	1
25	Гек:Э (3:2)	15.26	3.52	7.76	4.08	0.87	1
26	Неф:М (1:1)	14.9	6.15	11.15	7.9	1.68	0
27	Неф:М (1:2)	14.82	8.61	15.61	12.82	2.73	0
28	Неф:М (9:1)	15.06	1.23	2.23	3.8	0.81	1

Окончание таблицы Б1

1	2	3	4	5	6	7	8
29	Неф:М (4:1)	15.02	2.46	4.46	2.64	0.56	1
30	Неф:М (7:3)	14.98	3.69	6.69	3.53	0.75	1
31	Неф:Э (1:1)	15.45	4.4	9.7	5.81	1.24	0
32	Неф:Э (1:2)	15.59	6.16	13.58	9.86	2.10	0
33	Неф:Э (9:1)	15.17	0.88	1.94	4.06	0.86	1
34	Неф:Э (4:1)	15.24	1.76	3.88	2.67	0.57	1
35	Неф:Э (7:3)	15.31	2.64	5.82	2.63	0.56	1
36	Неф:Э (3:2)	15.38	3.52	7.76	3.97	0.85	1
37	ПЭ:М (1:1)	14.7	6.15	11.15	8.04	1.71	0
38	ПЭ:М (9:1)	14.7	1.23	2.23	4.27	0.91	1
39	ПЭ:М (4:1)	14.7	2.46	4.46	3.23	0.69	1
40	ПЭ:М (7:3)	14.7	3.69	6.69	3.94	0.84	1
41	ПЭ:М (1:2)	14.7	8.61	15.61	12.87	2.74	0
42	ПЭ:Э (1:1)	15.25	4.4	9.7	5.93	1.26	0
43	ПЭ:Э (1:2)	15.47	6.16	13.58	9.89	2.10	0
44	ПЭ:Э (9:1)	14.81	0.88	1.94	4.47	0.95	1
45	ПЭ:Э (4:1)	14.92	1.76	3.88	3.16	0.67	1
46	ПЭ:Э (7:3)	15.03	2.64	5.82	3.04	0.65	1
47	ПЭ:Э (3:2)	15.14	3.52	7.76	4.2	0.89	1
48	d-Лимонен	17.2	1.8	4.3	2.7	0.57	1

* 1 – растворитель подходит; 0 – растворитель не подходит

Таблица Б2 - Подбор оптимального растворителя для среднестатистического белково-липидного комплекса

№	Экстрагент	δ_D	δ_P	δ_H	RED	Растворимость*
1	2	3	4	5	6	7
1	Хлороформ	17.8	3.1	5.7	0.19	1
2	Метанол	14.7	12.3	22.3	2.67	0
3	Этанол	15.8	8.8	19.4	2.02	0
4	Гексан	14.9	0	0	1.37	0
5	Бензин (гептан)	15.2	0	0	1.32	0
6	Нефрас (гексан)	15.1	0	0	1.33	0
7	Петролейный эфир	14.7	0	0	1.4	0
8	Изопропанол	15.8	6.1	16.4	1.52	0
9	Х:М (1:1)	16.25	7.7	14	1.25	0
10	Х:М (1:2)	15.63	9.54	17.32	1.82	0
11	Х:М (3:2)	16.56	6.78	12.34	0.96	1
12	Х:М (7:3)	16.87	5.86	10.68	0.68	1
13	Х:М (4:1)	17.18	4.94	9.02	0.39	1
14	Х:М (9:1)	17.49	4.02	7.36	0.11	1
15	Х:Э (9:1)	17.6	3.67	7.07	0.07	1
16	Х:Э (4:1)	17.4	4.24	8.44	0.27	1
17	Х:Э (7:3)	17.2	4.81	9.81	0.48	1
18	Х:Э (3:2)	17	5.38	11.18	0.7	1
19	Х:Э (1:1)	16.8	5.95	12.55	0.92	1
13	Х:Э (1:2)	16.4	7.09	15.29	1.36	0
14	Гек:М (1:1)	14.8	6.15	11.15	1.09	0
15	Гек:М (1:2)	14.76	8.61	15.61	1.67	0
16	Гек:М (9:1)	14.88	1.23	2.23	1.10	1
17	Гек:М (4:1)	14.86	2.46	4.46	0.90	1
18	Гек:М (7:3)	14.84	3.69	6.69	0.82	1
19	Гек:М (3:2)	14.82	4.92	8.92	0.89	1
20	Гек:Э (1:1)	15.35	4.4	9.7	0.80	0
21	Гек:Э (1:2)	15.53	6.16	13.58	1.21	0
22	Гек:Э (9:1)	14.99	0.88	1.94	1.12	0
23	Гек:Э (8:2)	15.08	1.76	3.88	0.90	1
24	Гек:Э (7:3)	15.17	2.64	5.82	0.76	1
25	Гек:Э (3:2)	15.26	3.52	7.76	0.72	1
26	Гек:Э (2:3)	15.44	5.28	11.64	0.98	1
27	Неф:М (1:1)	14.9	6.15	11.15	1.07	0
28	Неф:М (1:2)	14.82	8.61	15.61	1.66	0
29	Неф:М (9:1)	15.06	1.23	2.23	1.06	0
30	Неф:М (4:1)	15.02	2.46	4.46	0.86	1
31	Неф:М (7:3)	14.98	3.69	6.69	0.78	1

Окончание таблицы Б2

1	2	3	4	5	6	7
32	Неф:М (3:2)	14.94	4.92	8.92	0.86	1
33	Неф:Э (1:1)	15.45	4.4	9.7	0.78	0
34	Неф:Э (1:2)	15.59	6.16	13.58	1.20	0
35	Неф:Э (9:1)	15.17	0.88	1.94	1.08	0
36	Неф:Э (4:1)	15.24	1.76	3.88	0.87	1
37	Неф:Э (7:3)	15.31	2.64	5.82	0.72	1
38	Неф:Э (3:2)	15.38	3.52	7.76	0.68	1
39	Неф:Э (2:3)	15.52	5.28	11.64	0.96	1
40	ПЭ:М (1:2)	14.7	8.61	15.61	1.68	0
41	ПЭ:М (1:1)	14.7	6.15	11.15	1.11	0
42	ПЭ:М (9:1)	14.7	1.23	2.23	1.13	0
43	ПЭ:М (4:1)	14.7	2.46	4.46	0.94	1
44	ПЭ:М (7:3)	14.7	3.69	6.69	0.86	1
45	ПЭ:М (3:2)	14.7	4.92	8.92	0.93	1
46	ПЭ:Э (1:1)	15.25	4.4	9.7	0.82	1
47	ПЭ:Э (1:2)	15.47	6.16	13.58	1.21	0
48	ПЭ:Э (9:1)	14.81	0.88	1.94	1.15	0
49	ПЭ:Э (4:1)	14.92	1.76	3.88	0.94	1
50	ПЭ:Э (7:3)	15.03	2.64	5.82	0.79	1
51	ПЭ:Э (3:2)	15.14	3.52	7.76	0.75	1
52	ПЭ:Э (2:3)	15.36	5.28	11.64	0.99	1
48	d-Лимонен	17.2	1.8	4.3	0.48	1

* 1 – растворитель подходит; 0 – растворитель не подходит

Таблица Б3 - Подбор оптимального растворителя для триацилглицерида *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111

№	Экстрагент	δ_D	δ_P	δ_H	RED	Растворимость*
1	2	3	4	5	6	7
1	Хлороформ	17.8	3.1	5.7	0.69	1
2	Метанол	14.7	12.3	22.3	4.41	0
3	Этанол	15.8	8.8	19.4	3.5	0
4	Гексан	14.9	0	0	1.25	0
5	Бензин (гептан)	15.2	0	0	1.19	0
6	Нефрас (гексан)	15.1	0	0	1.21	0
7	Петролейный эфир	14.7	0	0	1.30	0
8	Изопропанол	15.8	6.1	16.4	2.72	0
9	Х:М (1:1)	16.25	7.7	14	2.34	0
10	Х:М (1:2)	15.63	9.54	17.32	3.16	0
11	Х:М (9:1)	17.49	4.02	7.36	0.87	1
12	Х:Э (1:1)	16.8	5.95	12.55	1.92	0
13	Х:Э (1:2)	16.4	7.09	15.29	2.54	0
14	Х:Э (9:1)	17.6	3.67	7.07	0.83	1
15	Гек:М (1:1)	14.8	6.15	11.15	1.79	0
16	Гек:М (1:2)	14.76	8.61	15.61	2.82	0
17	Гек:М (9:1)	14.88	1.23	2.23	0.85	1
18	Гек:М (4:1)	14.86	2.46	4.46	0.67	1
19	Гек:М (7:3)	14.84	3.69	6.69	0.88	1
20	Гек:Э (1:1)	15.35	4.4	9.7	1.32	0
21	Гек:Э (1:2)	15.53	6.16	13.58	2.17	0
22	Гек:Э (9:1)	14.99	0.88	1.94	0.88	1
23	Гек:Э (8:2)	15.08	1.76	3.88	0.62	1
24	Гек:Э (7:3)	15.17	2.64	5.82	0.65	1
25	Гек:Э (3:2)	15.26	3.52	7.76	0.93	1
26	Неф:М (1:1)	14.9	6.15	11.15	1.77	0
27	Неф:М (1:2)	14.82	8.61	15.61	2.81	0
28	Неф:М (9:1)	15.06	1.23	2.23	0.79	1
29	Неф:М (4:1)	15.02	2.46	4.46	0.61	1
30	Неф:М (7:3)	14.98	3.69	6.69	0.84	1

Окончание таблицы Б3

1	2	3	4	5	6	7
31	Неф:Э (1:1)	15.45	4.4	9.7	1.30	0
32	Неф:Э (1:2)	15.59	6.16	13.58	2.16	0
33	Неф:Э (9:1)	15.17	0.88	1.94	0.83	1
34	Неф:Э (4:1)	15.24	1.76	3.88	0.56	1
35	Неф:Э (7:3)	15.31	2.64	5.82	0.60	1
36	Неф:Э (3:2)	15.38	3.52	7.76	0.91	1
37	ПЭ:М (1:1)	14.7	6.15	11.15	1.80	0
38	ПЭ:М (9:1)	14.7	1.23	2.23	0.91	1
39	ПЭ:М (4:1)	14.7	2.46	4.46	0.74	1
40	ПЭ:М (7:3)	14.7	3.69	6.69	0.93	1
41	ПЭ:М (1:2)	14.7	8.61	15.61	2.83	0
42	ПЭ:Э (1:1)	15.25	4.4	9.7	1.33	0
43	ПЭ:Э (1:2)	15.47	6.16	13.58	2.17	0
44	ПЭ:Э (9:1)	14.81	0.88	1.94	0.93	1
45	ПЭ:Э (4:1)	14.92	1.76	3.88	0.69	1
46	ПЭ:Э (7:3)	15.03	2.64	5.82	0.70	1
47	ПЭ:Э (3:2)	15.14	3.52	7.76	0.96	1
48	d-Лимонен	17.2	1.8	4.3	0.43	1

* 1 – растворитель подходит; 0 – растворитель не подходит

Таблица Б4 – Экстрагенты подходящие для извлечения всех трех видов липидов

Экстрагент	Комментарий
Хлороформ	Токсичен
Х:М (9:1)	Хлороформ не подходит для пром.
Х:Э (9:1)	Хлороформ не подходит для пром.
ГЕКСАН:М (4:1)	Метанол - яд.
ГЕКСАН:М (7:3)	Метанол - яд.
ГЕКСАН:Э (4:1)	RED=0.71
ГЕКСАН:Э (7:3)	RED=0.67
ГЕКСАН:Э (3:2)	RED =0.84
НЕФРАС:М (4:1)	Метанол - яд.
НЕФРАС:М (7:3)	Метанол - яд.
НЕФРАС:Э (4:1)	RED =0.67
НЕФРАС:Э (7:3)	RED =0.63
НЕФРАС:Э (3:2)	RED =0.81
ПЭ:М (4:1)	Метанол - яд.
ПЭ:М (7:3)	Метанол - яд.
ПЭ:Э (4:1)	RED =0.77
ПЭ:Э (7:3)	RED =0.71
ПЭ:Э (3:2)	RED =0.87
d-Лимонен	Нестандартный растворитель

Расчеты по подбору различных видов экстрагентов приведены в таблице Б5

Таблица Б5 - Подбор экстрагентов для извлечения липидов с помощью теории растворимости Ч. Хансена

№	Экстрагент	RED для ТАГ	RED для усредненной молекулы липида	RED для белково-липидного комплекса
1	Этанол (Э)	3.50	3.43	2.02
2	Э/П. Э (4:1 об/об)	2.61	2.54	1.47
3	Э/П. Э (2:1 об/об)	2.17	2.10	1.21
4	Э/П. Э (3:2 об/об)	1.74	1.67	0.97
5	Э/П. Э (1:1 об/об)	1.33	1.26	0.82
6	Э/П. Э (2:3 об/об)	0.96	0.89	0.75
7	Э/П. Э (1:2 об/об)	0.70	0.65	0.70
8	Э/П. Э (1:4 об/об)	0.69	0.94	0.94
9	Петролейный эфир (П.Э)	1.30	1.33	1.40

■ - смесь растворителей не подходит; □ - смесь растворителей подходит

Теоретические расчеты были проверены с помощью серии экспериментов по экстракции липидов различными соотношениями этанола и петролейного эфира (табл. Б5) из пасты микроводорослей влажностью 98 % при температуре экстракции 50 °С, при соотношении Z количества смеси экстрагентов (мл) к количеству взятой биомассы (г) 20:1.

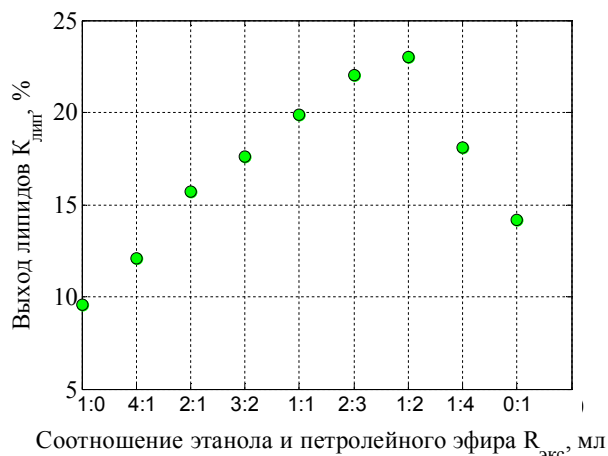


Рисунок 1 - Зависимость выхода липидов от типа экстрагента

Экспериментальные исследования подтвердили теоретические расчеты: максимальное количество липидов 23 % из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* было извлечено при соотношении полярного экстрагента – этанола и неполярного экстрагента – петролейного эфира 1:2 (об.) (рис.1).

Приложение В. Материальный баланс производства ЭЖК из микроводорослей *Chlorella vulgaris*

Потребность фермерского хозяйства г. Тамбова в биотопливе составляет 190 кг/сут [161]. Для этого объема необходимо 215 кг технических липидов.

На стадию хранения готовой продукции поступают липиды в количестве $G_{\text{гот.}} = 215$ кг.

1. Фасовка

На стадию фасовки поступает готовый продукт с учетом потерь:

$$G = G_{\text{гот.}} + (G_{\text{гот.}} \cdot 0.2/100) = 215 + 0.43 = 215.4 \text{ кг,}$$

где $G_{\text{гот.}}$ – масса липидов, кг.

2. Стадия охлаждения

Количество потерь на стадии упаковки:

$$\Delta G_{\text{уп.}} = G_{\text{уп.}} \cdot 0.5/100 = 215.43 \cdot 0.005 = 1.1 \text{ кг,}$$

где $\Delta G_{\text{уп.}}$ – потери продукта на стадии упаковки, кг.

Количество смеси, ушедшее со стадии охлаждения:

$$G_{\text{охл.}} = G_{\text{уп.}} + \Delta G_{\text{уп.}} = 215.4 + 1.1 = 216.5 \text{ кг.}$$

3. Стадия дистилляции

Количество смеси, поступившей на стадию дистилляции с учетом потерь:

$$G_{\text{дист.}} = G_{\text{охл.}} + (G_{\text{охл.}} \cdot 3/100) = 223.0 \text{ кг,}$$

где $G_{\text{дист.}}$ – масса смеси масел на дистилляции, кг.

4. Стадия центрифугирования 2

На стадию центрифугирования 2 с учетом потерь поступает смесь технических липидов в количестве:

$$G_{\text{т.ж.цен 2}} = G_{\text{дист.}} + (G_{\text{дист.}} \cdot 2/100) = 227.5 \text{ кг,}$$

где $G_{\text{т.ж.цен 2}}$ – масса технических липидов на стадии центрифугирования 2, кг.

Это количество составляет 31 % от массы СВ (сухих веществ) биомассы микроводоросли, тогда количество биомассы равно:

$$G_{\text{СВ.БМ.}} = G_{\text{СВ.БМ.}} \cdot 100/31 = 733.7 \text{ кг},$$

где $G_{\text{СВ.БМ.}}$ – масса СВ микроводоросли, кг.

Учтем, что влажность биомассы составляет 98 %, тогда общее количество биомассы:

$$G_{\text{общ. БМ.}} = (100/2 G_{\text{СВ.БМ.}}) = 36687.4 \text{ кг}.$$

где $\Delta G_{\text{общ. БМ.}}$ – масса биомассы микроводоросли с учетом влажности, кг.

Рассчитаем количество оставшихся компонентов биомассы:

$$G_{\text{компл.}} = G_{\text{СВ.БМ.}} - G_{\text{СВ.БМ.}} = 506.3 \text{ кг или с учетом влажности биомассы } 98\% - 25314.3 \text{ кг},$$

где $G_{\text{компл.}}$ – масса оставшихся компонентов, кг.

5. Стадия экстракции

Определим количество этанола и петролейного эфира, необходимых для проведения процесса экстракции. Согласно исследованиям на 1 г сухой биомассы микроводоросли необходимо 20 мл экстрагентов в соотношении 1:2 (6.7 мл этанола и 13.3 мл петролейного эфира).

Количество этанола:

$$G_{\text{эт.1}} = G_{\text{СВ.БМ.}} \cdot 5.4 = 733.8 \text{ кг} \cdot 5.4 \text{ кг} = 3928.9 \text{ кг}.$$

где $G_{\text{эт.1}}$ – масса этанола на стадии экстракции, кг.

Количество петролейного эфира:

$$G_{\text{П.Э.1}} = G_{\text{СВ.БМ.}} \cdot 8.8 = 733.8 \cdot 8.8 = 6457 \text{ кг}.$$

где $G_{\text{П.Э.1}}$ – масса петролейного эфира на стадии экстракции, кг.

Количество смеси экстрагентов, поступивших на стадию центрифугирования 2 с учетом потерь:

$$G_{\text{С.ЭК}} = (G_{\text{пэ2}} + G_{\text{эт2}}) - (G_{\text{пэ2}} + G_{\text{эт2}}) \cdot 0.2/100 = 8308.7 \text{ кг}.$$

В уравнении (10): $G_{\text{С.ЭК}}$ – общая масса системы экстрагентов, кг.

Количество смеси экстрагентов ушедшей со стадии центрифугирования 2 с биошротом:

а) по петролейному эфиру;

$$G_{C.ЭК1} = G_{пт2} \cdot 5/100 = 322.9 \text{ кг},$$

где $G_{C.ЭК1}$ – масса петролейного эфира, ушедшая с биошротом, кг.

б) по этанолу.

$$G_{C.ЭК2} = G_{эт2} \cdot 5/100 = 196.4 \text{ кг},$$

где $G_{C.ЭК2}$ – масса этанола, ушедшая с биошротом, кг.

Компоненты биошрота составляют с учетом экстрагирующей смеси:

$$G_{бш.} = G_{C.ЭК1} + G_{C.ЭК2} + G_{комп.} = 25845 \text{ кг}.$$

$G_{бш.}$ – масса биошрота и смеси экстрагентов, кг.

8. Стадия дезинтеграции

Количество биомассы, поступившее на стадию дезинтеграции с учетом потерь составит:

$$G_{БМ. дез.} = G_{общ.БМ} + (G_{общ.БМ} \cdot 3/100) = 37788.0 \text{ кг}.$$

где $G_{бш.}$ – масса биомассы микроводоросли на стадии дезинтеграции, кг.

Предварительно, рассчитаем количество целлюлозы, которое содержится в 755.8 кг сухой биомассы. Известно, что в 1 г сухой биомассе хлореллы содержится 25 % углеводов, из которых на целлюлозу приходится 5 %:

$$G_{цел} = (G_{БМ. дез.} \cdot 0.25) \cdot 0.05 = 9.4 \text{ кг}.$$

где $G_{цел.}$ – масса целлюлозы в биомассе микроводоросли, кг.

Согласно технологическим условиям на 0,02 г сухой биомассы нужно 0,0012 мг фермента:

$$G_{цел А} = (9447 \cdot 0.0000012) / 0.02 = 0.6 \text{ кг}.$$

где $G_{цел А}$ – масса ФП Целлолюкса - А, кг.

Действие смеси «Целлолюкс-А» и «Протосубтилин г3х» эффективно в соотношении 3:1 (масс.). Количество «Протосубтилина» г3х необходимое на дезинтеграцию клеточной стенки:

$$G_{прот} = G_{цел А} / 3 = 0.2 \text{ кг}.$$

где $G_{прот}$ – масса «Протосубтилин г3х», кг.

9. Стадия центрифугирования 1

Количество биомассы поступившей на стадию разделения с учетом потерь:

$$G_{\text{отд. БМ}} = G_{\text{дез}} + (G_{\text{дез}} \cdot 2/100) = 38543.8 \text{ кг.}$$

где $G_{\text{отд.БМ}}$ – масса влажной биомассы, г.

Количество биомассы влажностью 98 % в культуральной жидкости составляет до 10 %, следовательно, отделено будет с учётом потерь:

$$G_{\text{смеси}} = G_{\text{отд. БМ}} \cdot 100/10 = 385438.0 \text{ кг.}$$

$$G_{\text{КЖ}} = G_{\text{смеси}} - G_{\text{отд. БМ}} = 346894.2 \text{ кг.}$$

В уравнениях (19) и (20): $G_{\text{смеси}}$ – масса суспензии биомассы; $G_{\text{КЖ}}$ – масса культуральной жидкости, кг.

10. Стадия культивирования

Произведем расчет количества углекислого газа, необходимого для прироста биомассы на каждом этапе культивирования.

Рассчитаем усредненную формулу жирных кислот хлореллы: $C_{15}H_{30}O_2$, усредненная формула липидов хлореллы: $C_{24}H_{46}O_3$, тогда формула С-моля: $CH_{1,92}O_{0,13}$.

Для «усредненной» биомассы часто используется формула, предложенная Стоутхаммером для С-моля: $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$.

Рассчитаем С-моль биомассы хлореллы, зная что в ней содержится 31% липидов:

$$H: 0,31 \cdot 1,92 + 0,69 \cdot 1,8 = 1,85$$

$$O: 0,31 \cdot 0,13 + 0,69 \cdot 0,5 = 0,39$$

$$N: 0,31 \cdot 0,2 = 0,06$$

Пренебрегаем азотом из-за его незначительного содержания. С-моль биомассы хлореллы: $CH_{1,84}O_{0,39}$.

Рассчитаем по углероду количество углекислого газа, необходимого для получения 1 (г) биомассы. Массовая доля углерода в биомассе составит:

$$\omega(C)_1 = A(C) \cdot n / M_{\gamma \text{ ср}} = 12 \cdot 1 / (12 \cdot 1 + 1 \cdot 1,84 + 16 \cdot 0,39) = 0,6$$

В уравнении (21): A – атомная масса элемента, а.е.м.; n – индекс этого элемента в формул; $M_{\gamma \text{ ср}}$ – средняя молярная масса, г/моль.

Массовую долю углерода в углекислом газе:

$$\omega(C)_2 = A(C) \cdot n / M_{CO_2} = 12 \cdot 1 / (12 \cdot 1 + 16 \cdot 2) = 0,27.$$

В уравнении (22): M_{CO_2} – молярная масса углекислого газа, г/моль.

Тогда масса CO_2 , необходимого для получения 1 г биомассы, составит:

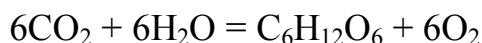
$$\omega(C)_1 / \omega(C)_2 = 0,6 / 0,27 = 2,20 \text{ г}$$

Масса углекислого газа, расходуемого за цикл на образование сухого вещества биомассы (734 кг):

$$G_{CO_2} = 734 \text{ кг} \cdot 2,2 \text{ кг} = 1,6 \text{ т.}$$

В уравнении (4.44): G_{CO_2} – масса углекислого газа, т.

Из простейшего уравнения фотосинтеза найдем количество выделяемого биомассой кислорода на стадии роста биомассы:



Молярная масса углекислого газа и кислорода:

$$M_r(CO_2) = 12 + 16 \cdot 2 = 44 \text{ г/моль};$$

$$M_r(O_2) = 16 \cdot 2 = 32 \text{ г/моль.}$$

Так как на один моль углекислого газа приходится 1 моль кислорода, масса кислорода, приходящаяся на 1 г углекислого газа, составит:

$$m(O_2) = 32:44 = 0,73 \text{ г.}$$

Масса выделяемого биомассой кислорода на стадии роста биомассы:

$$G_{O_2} = G_{CO_2} \cdot 0,73 = 1,17 \text{ т};$$

Необходимое количество воды на стадии культивирования $G_{\text{вод кул}}$ составляет 346 893,8 кг ($G_{\text{КЖ}}$) или $V_{\text{КЖ}} = 350 \text{ м}^3$.

В данном производстве используется питательная среда *Тамийя OPTIMUM* разбавленная в 3 раза, в состав которой входят следующие макро- и микрокомпоненты.

Среда *Тамийя OPTIMUM*:

$$G_{KNO_3} = 0,33 \cdot V_{\text{вкул}} \cdot 3,2 = 370 \text{ кг};$$

$$G_{MgSO_4 \cdot 7H_2O} = 0,33 \cdot V_{\text{вкул}} \cdot 0,125 = 14,5 \text{ кг};$$

$$G_{KH_2PO_4} = 0,33 \cdot V_{\text{вкул}} \cdot 0,2 = 253,2 \text{ кг};$$

$$G_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0.33 \cdot V_{\text{вкул}} \cdot 0.003 = 0.35 \text{ кг.}$$

где G_{KNO_3} – масса нитрата калия, кг; $G_{\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ – масса сульфата магния, кг; $G_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ – масса дигидрофосфата калия, кг; $G_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ – масса сульфата железа, кг.

Количество микроэлементов по Арнону ($V_{\text{мк}} = 350$ л раствора микроэлементов):

$$G_{\text{HBO}_3} = 0.28 \cdot V_{\text{мк}} = 0.98 \text{ кг;}$$

$$G_{\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}} = 0.8 \cdot V_{\text{мк}} = 0.28 \text{ кг;}$$

$$G_{\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0.1 \cdot V_{\text{мк}} = 0.35 \text{ кг;}$$

$$G_{\text{MoO}_3} = 0.018 \cdot V_{\text{мк}} = 0.6 \text{ кг;}$$

$$G_{\text{NH}_4\text{VO}_3} = 0.023 \cdot V_{\text{мк}} = 8.05 \text{ кг.}$$

где G_{HBO_3} – масса борной кислоты, кг; $G_{\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}}$ – масса хлорида марганца, кг; $G_{\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$ – масса сульфата цинка, кг; G_{MoO_3} – масса окиси марганца, кг; $G_{\text{NH}_4\text{VO}_3}$ – масса ванадата аммония, кг.

Общее количество смеси солей с учетом потерь на загрузку:

$$G_{\text{смеси}} = \sum G_{\text{макро}} + \sum G_{\text{микро}} + G_{\text{вкул}} + \sum \Delta G_{\text{пот}} = 660 \text{ кг}$$

где $\sum G_{\text{макро}}$ – масса смеси солей по макроэлементам, кг; $\sum G_{\text{микро}}$ – масса смеси солей по микроэлементам, кг; $\sum \Delta G_{\text{пот}}$ – масса потерь по микро- и макрокомпонентам питательной среды, кг.

Количество солей необходимое на цикл 1-ого культивирования. Режим подкормки является цикличным и составляет 1 норму концентрата питательного раствора на 3-е суток:

$$G_{\text{н}} = \sum G_{\text{макро}} + \sum G_{\text{микро}} + \sum \Delta G_{\text{пот}} = 660 \text{ кг.}$$

где $G_{\text{н}}$ – масса одной нормы концентрата, кг.

Цикл культивирования равняется 14-15 дням: 8 дней – накопления биомассы, 6-7 дня – стимуляции накопления липидов.

Количество подкормок: $N = 15/3 = 5$. Причем, на 9 сутки культивирования нужно вносить макро- и микроэлементы без добавления нитрата калия, для того, чтобы стимулировать накопление липидов внутри клеток.

Приложение Г. Расчет теплового баланса экстрактора

1) Поверхность теплообмена $F_{mo} = 463 \text{ м}^2$, учитывая необходимый запас 10 %, найдем поверхностную плотность теплового потока q : $q = 1.1 \cdot Q \cdot F_{mo}$, где Q – расход теплоты, который определяется по формуле:

$$Q = 1.05 \cdot G_2 \cdot c_2 \cdot (t_{2кон} - t_{2нач}),$$

где G_2 - расход экстракционной смеси; c_2 – теплоемкость экстракционной смеси при температуре t_{2cp} , $t_{2нач}$ – это температура экстракционной смеси на входе в экстрактор, $t_{2кон}$ – температура экстракционной смеси на выходе из экстрактора; t_{2cp} - средняя температура экстракционной смеси:

$$t_{2cp} = 0.5 \cdot (t_{2нач} + t_{2кон}),$$

где $t_{2нач}$ – это температура экстракционной смеси на входе в экстрактор, $t_{2кон}$ – температура экстракционной смеси на выходе из экстрактора.

2) Расход теплоносителя G_1 определялся по формуле:

$$G_1 = \frac{Q}{c_1 \cdot (t_{1нач} - t_{1кон})},$$

где $t_{1нач}$ – это температура теплоносителя на входе в экстрактор, $t_{1кон}$ – температура теплоносителя на выходе из экстрактора, c_1 - теплоемкость теплоносителя при температуре t_{1cp} .

Коэффициент теплопередачи определялся: $K = \frac{q}{\Delta t_{cp}}$, где $\Delta t_{cp} = \Delta t_{\delta} - \Delta t_{m}$,

$\Delta t_{\delta} = t_{1нач} - t_{2кон}$, $\Delta t_{m} = t_{1кон} - t_{2нач}$, где $t_{1нач}$ – это температура теплоносителя на входе в экстрактор, $t_{1кон}$ – температура теплоносителя на выходе из экстрактора.

3) Расчет коэффициента теплоотдачи от экстракционной смеси α_2 при $Re_2=10000$ определялся по формулам:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_{cm2}}{d_{внут}},$$

где Nu_2 - критерий Нуссельта; λ_{cm2} - коэффициент теплоемкости экстракционной смеси при температуре t_{cm2} ; $d_{внут}$ - внутренний диаметр труб.

$$Nu_2 = 0.021 \cdot \varepsilon_\ell \cdot Re_2^{0.8} \cdot Pr_2^{0.43} \cdot \left(\frac{Pr_2}{Pr_{cm2}} \right)^{0.25}$$

где $\varepsilon_\ell = 1$; Pr_2 - критерий Прандтля при температуре t_{2cp} ; Pr_{cm2} - критерий Прандтля при температуре стенки со стороны экстракционной смеси равной t_{cm2} .

Критерий Прандтля при температуре стенки со стороны экстракционной смеси равной t_{cm2} определяли по формуле:

$$Pr_{cm2} = \frac{c_{cm2} \cdot \mu_{cm2}}{\lambda_{cm2}},$$

где c_{cm2} - теплоемкость экстракционной смеси при температуре t_{cm2} ; μ_{cm2} - динамическая вязкость экстракционной смеси при температуре t_{cm2} .

4) Расчет коэффициента теплоотдачи от теплоносителя α_1 при шахматном расположении пучков труб и $Re_1 < 1000$ определялся по формулам:

$$\alpha_1 = \frac{1}{\frac{1}{K} - \Sigma r_{ст} - \frac{1}{\alpha_2}}$$

где $\Sigma r_{ст}$ - термическое сопротивление стенки и загрязнений.

5) Объемный расход теплоносителя V_1 и экстракционной смеси V_2 определялся по формуле:

$$V_1 = G_1 / \rho_1,$$

где ρ - плотность экстракционной смеси или теплоносителя.

6) Скорость движения теплоносителя в межтрубном пространстве ω_1

равна: $\omega_1 = \frac{V_1}{S_1}$,

где S_1 – площадь межтрубного пространства.

7) S_1 определялась по формулам:

$$S_1 = \frac{\pi \cdot \ell^2}{4},$$

где ℓ - расстояние между перегородками межтрубного пространства.

$$\ell = \frac{b}{1.415 \cdot \psi}, b = 0.25 \cdot d_{\text{кож}}, \psi = \frac{1 - (d_{\text{вн}} / t_{\text{ш}})}{1 - 0.9 \cdot (d_{\text{вн}} / t_{\text{ш}})^2}$$

где ψ - коэффициент, зависящий только от наружного диаметра $d_{\text{кож}}$ и шага труб $t_{\text{ш}}$. $t_{\text{ш}} = 1.3 \cdot d_{\text{вн}}$

Приложение Д. Акты о внедрении результатов работы



Открытое Акционерное Общество

“Орбита”

производство продуктов питания

Россия, г. Тамбов, ул. Кавалерийская, 13, тел: (0752) 72-11-60, факс (0752) 72-44-01

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ОАО «Орбита»

Н.М. Страшнов

» МАРТА 2017 г.



АКТ

об использовании результатов
кандидатской диссертационной работы
Темнова Михаила Сергеевича

Комиссия в составе:

председатель - технический директор Сатин А.В.,

члены комиссии - начальник лаборатории Шуняева О.Б., начальник управления фундаментальных и прикладных исследований ФГБОУ ВО "ТГТУ" Галыгин В.Е.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Темнова М.С. «Кинетика и аппаратурно-технологическое оформление процессов получения эфиров жирных кислот», представленной на соискание ученой степени кандидата наук, использованы в практической деятельности ОАО «Орбита»:

- 1) при экстракции жиров;
- 2) выполнении расчетов процессов производства жиров и повышения эффективности их извлечения из липидных смесей.

Председатель комиссии: Сатин А.В. Сатин

Члены комиссии: Шуняева О.Б. Шуняева

Галыгин В.Е. Галыгин

Российская Федерация



«Биохим»

Открытое акционерное общество
393250, Тамбовская обл., г. Рассказово,
ул. Аптекарская, 16
тел. (47531) 24-792, факс (47531) 24-818.
email: biohim68@yandex.ru
ИНН/КПП 6828000346/682801001,
ОКВЭД 11.01 ОКПО 00479468
р/с 40702810301100000080
ОГРН 1026801115274
АО Банк «ТКПБ»
к/с 30101810600000000755
БИК 046850755

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ОАО «БИОХИМ»



Л.Т. Гриднева

04

2017 г

АКТ

о внедрении (использовании) результатов
кандидатской диссертационной работы
Темнова Михаила Сергеевича

Комиссия в составе:

председатель - главный инженер Струкова С.И.,

члены комиссии - зам. генерального директора по качеству Ивинская Г.Н.,
начальник управления фундаментальных и прикладных исследований ФГБОУ ВО
"ТГТУ" Галыгин В.Е.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы
Темнова М.С. - «Кинетика и аппаратурно-технологическое оформление процессов
получения эфиров жирных кислот», представленной на соискание ученой степени
кандидата наук, использованы в деятельности ОАО «Биохим» при разработке
нового ресурсосберегающего технологического процесса получения эфиров
жирных кислот из растительного сырья (микроводорослей) для производства
биодизельного топлива:

- 1) экспериментальные данные по исследованию закономерностей воздействия СВЧ-излучения, ферментов, антибиотиков, вихревого слоя ферромагнитных частиц, осмотического шока на интенсификацию процесса экстракции липидов; кинетики процессов культивирования и разрушения клеток микроводорослей, экстракции и этерификации липидов, условий их эффективного осуществления;
- 2) математические модели и комплекс программ ЭВМ для расчета процессов и аппаратов производства эфиров жирных кислот, позволяющий выполнять:

а) расчет оптимального химического состава питательной среды для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111; б) кинетики процессов культивирования биомассы микроводорослей и экстракции липидов; в) расчет оптимальных (по критерию энерго- и ресурсосбережения) конструктивных и режимных переменных функционирования технологической схемы производства эфиров жирных кислот из возобновляемого растительного сырья (микроводорослей).

3) рекомендации по разработке технологической схемы производства эфиров жирных кислот из растительного сырья (микроводорослей) и проектированию промышленных аппаратов для осуществления стадий подготовки и предварительной обработки растительного сырья, экстракции и этерификации липидов на основе использования современных машин и аппаратов: новые конструкции фотобиореактора и дезинтегратора (патенты РФ № 2569149 - способ культивирования биомассы с повышенным содержанием липидов, № 151576 - фотобиореактор, программы расчета кинетики накопления липидов в биомассе микроводорослей №2015617096 и для моделирования кинетики экстракции липидов из биомассы микроводорослей №2016660175), оптимальные технологические режимы осуществления процессов культивирования биомассы микроводорослей с повышенным содержанием липидов, экстракции и этерификации липидов.

Результаты внедрялись при выполнении НИР и ОКР в рамках базовой части государственного задания (проекты № 1983 «Разработка технологии комплексной переработки биоразлагаемых отходов», № 14.5059.2017/БЧ «Кинетика процессов технологии очистки сточных вод с использованием микроводорослей») и программы «У.М.Н.И.К.» (договор № 6406 ГУ/2015 «Разработка технологии получения биомассы *Chlorella vulgaris* для комплексной переработки»).

Использование указанных результатов позволяет повысить качество проектирования производства эфиров жирных кислот из возобновляемого растительного сырья и сократить затраты на проведение проектных работ.

Председатель комиссии:  С.И. Струкова

Члены комиссии:  Г.Н. Ивинская

 В.Е. Галыгин



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
**«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНИКИ И
НЕФТЕПРОДУКТОВ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ»**
(ФГБНУ ВНИИТИН)

392022, г. Тамбов, пер. Ново-Рубежный, 28
Телефон: 8(4752)44-01-37, факс: (4752)44-64-14
e-mail: viitin-adm@mail.ru; http://vniitin.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВНИИТИН
к.т.н., профессор А.Н. Зазуля



2017 г.

АКТ

об использовании результатов
кандидатской диссертационной работы
Темнова Михаила Сергеевича

Комиссия в составе:

председатель - заведующий лабораторией "Организации нефтехозяйств и экономного расходования нефтепродуктов", к.т.н. Корнев А.Ю.,
члены комиссии - заведующий лабораторией "Использования машинно-тракторных агрегатов", к.т.н. Балашов А.В., начальник управления фундаментальных и прикладных исследований ФГБОУ ВО "ТГТУ", к.т.н. Галыгин В.Е.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Темнова М.С., использованы в деятельности ФГБНУ ВНИИТИН при расчетах процессов получения биодизельного топлива из растительного сырья - микроводорослей:

1) экспериментальные данные по исследованию закономерностей воздействия СВЧ-излучения, ферментов, антибиотиков, вихревого слоя ферромагнитных частиц, осмотического шока на интенсификацию процесса экстракции липидов; кинетики процессов культивирования и разрушения клеток микроводорослей, экстракции и этерификации липидов, условий их эффективного осуществления;

2) математические модели и комплекс программ ЭВМ для расчета процессов культивирования микроводорослей, экстракции внутриклеточных липидов: а) расчет оптимального химического состава питательной среды для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111; б) кинетики процессов культивирования биомассы микроводорослей и экстракции липидов; в) расчет оптимальных (по критерию энерго- и ресурсосбережения) конструктивных и режимных переменных функционирования технологической схемы производства эфиров жирных кислот из микроводорослей)

Результаты внедрялись при выполнении НИР и ОКР в рамках базовой части государственного задания (проекты № 1983 «Разработка технологии комплексной переработки биоразлагаемых отходов», № 14.5059.2017/БЧ «Кинетика процессов технологии очистки сточных вод с использованием микроводорослей») и программы «У.М.Н.И.К» (договор № 6406 ГУ/2015 «Разработка технологии получения биомассы *Chlorella vulgaris* для комплексной переработки»).

Использование указанных результатов позволяет повысить качество проектирования производства эфиров жирных кислот из возобновляемого растительного сырья и сократить затраты на проведение проектных работ.

Председатель комиссии:  А.Ю. Корнев

Члены комиссии:  А.В. Балашов

 В.Е. Галыгин