

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«02» грудня 2024 р.

«02» грудня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична  
біотехнологія»  
на тему: «Біотехнологія ліпідів для одержання біопалива»

Виконав: здобувач II курсу, групи 1

СЕНІН Євгеній Артурович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Юрій ПЕНЧУК

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувач(-ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач

(підпис)

Київ – 2024 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична  
біотехнологія»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“08” жовтня 2024 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СЕНІНА Євгенія Артуровича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологія ліпідів для одержання біопалива»

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, к.т.н., доц.,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024р. № 875-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи: штам *Yarrowia lipolytica* NS432 для виділення ліпідів з подальшим одержанням біодизеля.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): РЕФЕРАТ, ВСТУП, РОЗДІЛ 1. Актуальність досліджень виробництва біопалива, РОЗДІЛ 2. Виробництво ліпідів дріжджовими біологічними агентами, РОЗДІЛ 3. Виробництво ліпідів мікроводоростями, РОЗДІЛ 4. Виробництво ліпідів змішаними культурами мікроводоростей та дріжджів, РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу, РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення ліпідів, РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва біодизеля, РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки.

5. Перелік графічного матеріалу: Технологічна схема «Біотехнологія ліпідів для одержання біопалива» – 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема «Біотехнологія ліпідів для одержання біопалива» – 1 аркуш формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	Завдання прийняв

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_ 08 жовтня 2024 року \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Актуальність досліджень виробництва біопалива	01.10.2024 р. – 04.10.2024 р.	
2	РОЗДІЛ 2. Виробництво ліпідів дріжджовими біологічними агентами	05.10.2024 р. – 07.10.2024 р.	
3	РОЗДІЛ 3. Виробництво ліпідів мікроводоростями	08.10.2024 р. – 11.10.2024 р.	
4	РОЗДІЛ 4. Виробництво ліпідів змішаними культурами мікроводоростей та дріжджів	12.10.2024 р. – 15.10.2024 р.	
5	РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування	16.10.2024 р. – 20.10.2024 р.	
6	РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	21.10.2024 р. – 27.10.2024 р.	
7	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення ліпідів	28.10.2024 р. – 02.11.2024 р.	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва біодизеля	03.11.2024 р. – 06.11.2024 р.	
9	РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки	07.11.2024 р. – 09.11.2024 р.	
10	Оформлення апаратурної та технологічної схем	10.11.2024 р. – 20.11.2024 р.	
11	Оформлення вступу та реферату	21.11.2024 р. – 22.11.2024 р.	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Євгеній СЕНІН**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Юрій КАРЛАШ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## ABSTRACT

In the qualification work, a technological and hardware scheme of the biodiesel production process from lipids obtained during the cultivation of *Yarrowia lipolytica* NS432 was developed.

The work considers the need for biofuel production and reviews current methods of microbial lipid production, calculates the annual lipid requirement for biodiesel production, which is approximately 395.5 tons, which will produce 320 tons of biodiesel.

The methods of lipid extraction and further biodiesel production are considered, and it is determined that the optimal option, taking into account the least losses of the final product, is the method that involves the following stages: isolation of yeast cells by centrifugation, further extraction of lipids with a hexane/isopropanol solution, separation of extracted lipids, concentration of the solution with extracted lipids, esterification of lipids in acidified methanol, separation of crude biodiesel, dehydration with anhydrous sodium sulfate, removal of excess hexane and packaging of the finished product.

The downstream process of lipid extraction consists of auxiliary (storage of culture liquid and preparation of auxiliary solutions for the process) and main operations (yeast cell isolation, lipid extraction, biodiesel production and biodiesel purification).

The work is presented on 125 pages of printed text and contains 9 tables. It consists of nine chapters, a list of references (116 sources) and a graphic part (2 sheets of A1 and A2 format).

Key words: *Yarrowia lipolytica* NS432, lipids, biodiesel.

## РЕФЕРАТ

В кваліфікаційній роботі розроблено технологічну та апаратурну схему процесу виробництва біодизелю з ліпідів отриманих при культивуванні *Yarrowia lipolytica* NS432.

В роботі розглянуто необхідність виробництва біопалива та оглянуто актуальні методи виробництва мікробних ліпідів, проведено розрахунок річної потреби ліпідів для виробництва біодизелю, яка становить приблизно 395,5 т, що дозволить виробити 320 т біодизелю.

Розглянуто способи виділення ліпідів та подальшого виробництва біодизелю, та визначено що оптимальним варіантом з врахуванням найменших втрат кінцевого продукту, є метод який передбачає виконання наступні стадії: виділення дріжджовії клітин центрифугуванням подальша екстракція ліпідів розчином гексан/ізопропанол, виділення екстрагованих ліпідів, концентрування розчину з екстрагованими ліпідами, етерифікація ліпідів в підкисленому метанолі, виділення неочищеного біодизелю, дегідратація за допомогою безводного сульфату натрію, видалення надлишкового гексану та пакування готового продукту.

Післяферментаційний технологічний процес виділення ліпідів складається з допоміжних (зберігання культуральної рідини та приготування допоміжних розчинів на технологічний процес) та основних робіт (виділення дріжджових клітин, екстракція ліпідів, виробництво біодизелю та очищення біодизелю).

Робота викладена на 125 сторінках друкованого тексту та містить 9 таблиць. Складається з дев'яти розділів, списку використаної літератури (116 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1 та А2).

Ключові слова: *Yarrowia lipolytica* NS432, ліпіди, біодизель.

## ЗМІСТ

ABSTRACT .....	3
РЕФЕРАТ .....	4
ВСТУП .....	7
РОЗДІЛ 1. Актуальність досліджень виробництва біопалива.....	8
РОЗДІЛ 2. Виробництво ліпідів дріжджовими біологічними агентами .....	11
РОЗДІЛ 3. Виробництво ліпідів мікроводоростями.....	26
3.1. Виробництво ліпідів фотоавтотрофними культурами .....	26
3.2. Виробництво ліпідів фотогетеротрофними культурами.....	31
РОЗДІЛ 4. Виробництво ліпідів змішаними культурами мікроводоростей та дріжджів .....	36
РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування .....	47
5.1. Характеристика ліпідів.....	47
5.2. Огляд ринку біопалива .....	48
5.3. Розрахунок річної потужності виробництва ліпідів.....	50
РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу.....	52
6.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів виділення ліпідів .....	52
6.1.1. Виділення дріжджових клітин .....	53
6.1.2. Екстракція ліпідів .....	54
6.2. Обґрунтування вибору процесів виробництва біодизелю .....	57
6.2.1. Виробництво біодизелю .....	58
6.2.2. Очищення біодизелю .....	59
6.2.3. Пакування та зберігання біодизелю.....	60
6.3. Підбір технологічного обладнання з урахуванням матеріальних потоків по стадіях .....	62
6.4. Специфікація виробничого обладнання .....	67
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення ліпідів .....	69
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва біодизеля.....	74
8.1. Масова частка ефірів .....	75
8.2. Густина.....	77
8.3. В'язкість кінематична.....	77

8.4. Температура спалаху в закритому тиглі.....	78
8.5. Масова частка сірки.....	79
8.6. Коксованість 10 % залишку перегонки .....	80
8.7. Цетанове число.....	81
8.8. Зольність .....	82
8.9. Масова частка води.....	83
8.10. Вміст механічних домішок .....	84
8.11. Випробовування на мідній пластинці.....	84
8.12. Окисна стабільність за температури 110°C.....	87
8.13. Кислотне число.....	88
8.14. Йодне число .....	89
8.15. Масова частка метилового ефіру ліноленової кислоти .....	89
8.16. Масова частка метанолу.....	90
8.17. Масова частка моно-; ди-; тригліцеридів. Масова частка вільного гліцерину та загального гліцерину.....	91
8.18. Масова частка лужних металів .....	94
8.18.1. (Na + K) .....	94
8.18.2. (Ca + Mg).....	96
8.19. Масова частка фосфору.....	97
РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки.....	99
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	111

## ВСТУП

Глобальна енергетична криза та зростаюче занепокоєння щодо зміни клімату підкреслили нагальну потребу у сталих джерелах енергії. Викопне паливо, яке вже понад століття є рушієм індустріалізації, не лише має обмежені запаси, але й є основним джерелом викидів парникових газів, що призводить до глобального потепління та погіршення стану довкілля [1]. У відповідь на ці виклики біопаливо стало багатообіцяючою альтернативою, пропонуючи відновлюване і більш чисте джерело енергії, яке може значно скоротити викиди вуглецю при ефективному виробництві та використанні [2].

Одним з найпоширеніших видів біопалива є біодизель, який зазвичай виробляється з рослинних олій. В Європі основною сировиною є ріпакова та канолова олії, тоді як у Бразилії та Північній Америці домінує соєва олія. Однак зростання попиту на біодизель призвело до значного збільшення кількості земель, призначених для виробництва біопалива [3]. Такий зсув у землекористуванні створив конкуренцію з існуючими продовольчими плантаціями, що призвело до зростання цін на продукти харчування [4], як наслідок, існує нагальна потреба у вивченні альтернативних джерел сировини, які не конкурують з виробництвом продуктів харчування.

Останніми роками дослідження все більше зосереджуються на нехарчовій сировині, такій як водорості, відпрацьовані олії та мікробні ліпіди, щоб подолати обмеження традиційних джерел біопалива. Серед них бактеріальні ліпіди привертають значну увагу завдяки їхньому потенціалу вироблятися у великих кількостях без потреби в сільськогосподарських угіддях [5]. Мікроорганізми можуть синтезувати ліпіди, використовуючи відходи або неорні землі, що робить їх дослідження актуальними для розробки сталого біопалива, яке не конкурує з виробництвом продуктів харчування.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін С.А.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					7	1
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

## РОЗДІЛ 1. Актуальність досліджень виробництва біопалива

Біопаливо почали розробляти і використовувати внаслідок занепокоєння щодо енергопостачання та можливого дефіциту енергії, а також через екологічні проблеми, пов'язані з викопними видами палива [6]. Глобальний попит на енергію постійно зростає через швидке зростання економіки високорозвинених країн, однак, на жаль, останні події показали, що в нинішній перспективі, дефіцит енергопостачання може стати серйозною проблемою через непередбачувані пандемічні ситуації або геополітичні конфлікти [7]. Більше того, експоненціальне зростання популярності криптовалют за останні роки призвело до ще одного безпрецедентно великого зростання споживання енергії для майнінгу біткойнів, яке в 2023 році досягло 141,2 ТВт-год енергії за рік, і це не кажучи про інші види криптовалют [7], для прикладу, споживання електроенергії всієї України за 2021 рік склало 153,8 ТВт-год [8]. Така ситуація призводить до безпрецедентного зростання цін на енергоносії, і тому пошук інших, нетрадиційних або відновлюваних джерел енергії став як ніколи актуальним.

Оскільки запаси викопних енергоресурсів на Землі обмежені, зростає потреба у відновлюваних ресурсах, таких як біопаливо. Саме тому соціальний, економічний та екологічний вплив біопалива став важливою темою досліджень в останнє десятиліття. Виснаження запасів сирої нафти та значний рівень забруднення навколишнього середовища спонукають дослідників та фахівців шукати та знаходити рішення [9]. Біодизель є альтернативним паливом, яке виробляється з відновлюваних джерел, таких як рослинні олії або тваринні жири. Його виробництво та використання мають значну актуальність з кількох причин: зниження викидів шкідливих речовин, таких як вуглекислий газ, тверді частки, оксиди азоту та сажа, зменшення залежності від викопного

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін С.А.			РОЗДІЛ 1. Актуальність досліджень виробництва біопалива	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					8	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

палива, покращення суцільного екологічного фону та стабілізація цін на паливо [10].

Біодизельне паливо, отримане з ліпідів, останнім часом викликає значний інтерес як стійке альтернативне паливо завдяки своїй високій енергетичній ємності, характеристиці чистого згорання, екологічності та здатності до біологічного розкладання [11]. На додачу до вищезазначених причин, чисельність населення у світі стрімко зростає, що призводить до постійного зростання попиту на паливо, який частково може бути покритий за рахунок біопалива [12]. Наразі ліпідні олії, що виробляються в промислових масштабах, отримують переважно з рослинної та тваринної сировини. Однак в останнє десятиліття спостерігається експоненціальне зростання досліджень, що зосереджуються на мікроорганізмах, здатних накопичувати ліпіди. Ці мікробні ліпіди за своїм складом подібні до тваринних або рослинних. Однією з їхніх природних переваг є те, що їх виробництво не залежить від клімату чи сезонності, а додатковою головною перевагою є зменшення потреби в земельних ділянках [13].

Внаслідок зростаючого попиту на ліпіди та обмеження їх виробництва з традиційних джерел, біотехнологічні методи з використанням маслянокислих мікроорганізмів останнім часом розглядаються як приваблива альтернатива для виробництва мікробних ліпідів. Широкий спектр мікроорганізмів, від бактерій до дріжджів, грибів і мікроводоростей, використовується як клітинні фабрики для отримання різноманітних біопродуктів, серед яких ліпіди є одними з найпривабливіших [14]. Серед вищезгаданих маслянокислих мікроорганізмів дріжджі та мікроводорості наразі розглядаються як найбільш потенційні, які мають свої переваги та недоліки. Найголовнішою перевагою дріжджів є їхній відносно швидкий ріст і здатність накопичувати велику кількість ліпідів [15]. Термін "маслянокислі" походить від здатності цих мікроорганізмів накопичувати ліпіди в концентраціях, що перевищують 40% (мас.) від їхньої сухої біомаси. Крім того, маслянокислі дріжджі можуть генерувати додаткові "рідкісні" ліпіди, такі як какао-масло (насичені ліпіди) та

інші форми насичених екзотичних жирів, які можуть бути використані для заміни високоцінних і дорогих ліпідів, що зустрічаються тільки в рослинах і тваринах [16]. Мікроводорості – це одноклітинні фотосинтезуючі організми, які потребують води, сонячного світла та вуглекислого газу для виробництва біомаси. Крім того, вони мають унікальну здатність адаптуватися до різних середовищ – від прісної до морської води і навіть стічних вод. За несприятливих умов, таких як обмеження поживних речовин, висока або низька температура, високі концентрації важких металів, рН та інтенсивність світла, мікроводорості можуть накопичувати до 40-60% ліпідів (сухої біомаси), що робить їх привабливою сировиною для виробництва біодизеля. Ці накопичені ліпіди містять жирні кислоти в діапазоні від C12 до C24, що ідентичні рослинним оліям [17].

Однак, незважаючи на всі екологічні переваги, біодизель не може широко використовуватися як паливо, що повністю замінює традиційне дизельне паливо. Основною причиною, про яку неодноразово згадували багато дослідників, є вища собівартість виробництва. Зниження собівартості виробництва біодизеля (собівартості одиниці продукції) можна досягти за рахунок підвищення продуктивності технологій, спрямованих на збільшення врожайності, зменшення капітальних інвестицій та зниження вартості сировини. Це вимагає ретельного економічного аналізу серед наявних можливих технологічних альтернатив, каталізаторів та альтернатив сировини, щоб вибрати найкращий варіант з економічної точки зору [18]. Тому, можна зробити висновок, що актуальність досліджень у галузі виробництва біодизеля полягає у необхідності покращення технологій, зниженні виробничих витрат та розширенні сировинної бази для забезпечення стійкого розвитку енергетичної галузі.

## РОЗДІЛ 2. Виробництво ліпідів дріжджовими біологічними агентами

Zhang, та його колеги [19] досліджували продукування ліпідів маслянокислими дріжджами *Trichosporon oleaginosus*, які культивувалися на муніципальному мулі та сирому гліцерині в якості основного джерела вуглецю. Це дослідження мало на меті виявити оптимальні умови для максимізації виробництва ліпідів, які можуть бути використані для подальшого виробництва біодизеля. Вчені встановили, що додавання сирого гліцерину значно підвищує концентрацію біомаси, що підтверджує ефективність використання цього відходу для культивування дріжджів. Крім того, дослідники зазначили, що концентрація гліцерину суттєво не впливала на накопичення ліпідів у клітинах. Дослідження також підкреслює важливість забезпечення належного співвідношення вуглецю до азоту (C/N) у середовищі, оскільки це суттєво впливає на індукцію ліпідного синтезу.

Найкращий результат у плані продукції ліпідів був досягнутий при додаванні до середовища 40 г/л сирого гліцерину та 3,7 г/л пептону [19]. За цих умов максимальний вміст ліпідів склав 40,3% від біомаси, а концентрація ліпідів досягла 16,4 г/л. Ферментація проводилася при температурі 28 °С, постійному перемішуванні 300-400 об/хв, рН середовища підтримувався на рівні 6,5, а аерація здійснювалася з витратою повітря 0,5 об'ємних одиниць на хвилину (vvm). Енергетичний баланс процесу виробництва біодизеля на основі мулу та сирого гліцерину виявився позитивним, а сам процес – енергоефективним. Собівартість виробництва біодизеля становила близько 0,75 доларів США за літр при використанні безкоштовного сирого гліцерину та 1,25 доларів США за літр в разі покупки гліцерину, що все ще є конкурентоспроможною ціною на ринку. Отримані результати свідчать про значний потенціал використання муніципальних відходів, таких як мул та

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін Є.А.			РОЗДІЛ 2. Виробництво ліпідів дріжджовими біологічними агентами	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					11	15
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

сирий гліцерин, для економічно ефективного виробництва біодизеля, що може бути привабливим варіантом для комерційного застосування.

Souza, та його колеги [20] провели дослідження продукції ліпідів у дріжджів, вирощених на сирому гліцерині, побічному продукті біодизельної промисловості. Вони дослідили здатність чотирьох штамів дріжджів (*Yarrowia lipolytica* ССМА 0357, *Y. lipolytica* ССМА 0242, *Wickerhamomyces anomalus* ССМА 0358 та *Cryptococcus humicola* ССМА 0346) використовувати сирий гліцерин як основне джерело вуглецю для росту та продукування ліпідів. Основна мета полягала в оцінці здатності цих штамів накопичувати ліпіди за різних концентрацій гліцерину та глюкози.

У ході дослідження було встановлено, що штам *Y. lipolytica* ССМА 0357 продемонстрував найвищий рівень продукції ліпідів, досягаючи близько 70% від маси сухої біомаси (wt/wt), при цьому основними жирними кислотами були пальмітинова (45,73%) та стеаринова (16,43%) [20]. Інші штами також виявили здатність до накопичення ліпідів, проте їхня продуктивність в середньому виявилися нижчою та сильно варіювалася залежно від концентрації джерела вуглецю та умов культивування. Наприклад, штам *W. anomalus* ССМА 0358, який раніше не розглядався як маслянокислий, продемонстрував виробництво ліпідів рівні 30% від сухої маси біомаси, що свідчить про можливий потенціал цього штаму для подальших досліджень. Дослідження авторів підтверджує важливість підбору оптимальних умов культивування та джерела вуглецю для максимального накопичення ліпідів у дріжджах, а також підкреслює потенціал сирого гліцерину як дешевого та ефективного субстрату для біотехнологічних процесів.

Brandenburg та співавт. [21] досліджували продукцію ліпідів дріжджами *Lipomyces starkeyi* CBS1807 при культивуванні на гідролізаті геміцелюлози, отриманому з березової деревини. У дослідженні використовувалося термохімічне попереднє оброблення деревини, що призвело до утворення гідролізату з високим вмістом ксилози, оцтової кислоти та фурфуролу. Основною метою було вивчення здатності *L. starkeyi* до використання цих

вуглецевих джерел для росту і накопичення ліпідів в умовах ферментації з контролем рН. Дослідники встановили, що *L. starkeyi* може ефективно виробляти ліпіди навіть у присутності інгібіторів, таких як оцтова кислота та фурфурол, що містяться в гідролізаті. У дослідах з регульованим рН 6,0 у ферментаторах було досягнуто високого рівня продукції ліпідів, до 60,5% від маси сухої біомаси. Важливо, що *L. starkeyi* змогла співспоживати ксилозу та оцтову кислоту, що призвело до поступового збільшення рН середовища, що, у свою чергу, дозволяло підтримувати оптимальні умови для росту і ліпідного накопичення без необхідності попередньої детоксикації субстрату. Найбільш поширеними жирними кислотами ліпідного складу були олеїнова (C18:1) і пальмітинова кислоти (C16:0). Отримані результати свідчать про перспективність використання *L. starkeyi* для виробництва ліпідів із геміцелюлозного гідролізату, особливо в умовах ферментації з контролем рН. Ця система показала здатність до високого рівня накопичення ліпідів навіть за відсутності детоксикації субстрату, що робить її привабливою для біотехнологічних застосувань та подальших досліджень у сфері біопалива.

Штам *L. kononenkoae* BF1S57, отриманий у дослідженні Chen та ін. [22], є потенційним кандидатом для виробництва біодизеля завдяки високій здатності накопичувати ліпіди. Дослідники виявили, що цей штам дріжджів здатен накопичувати до 60,06% ліпідів від сухої маси клітин (11,3 г/л ліпідів) протягом 96 годин культивування в 10-літровому ферментері з 90 г/л глюкози. Автори також досліджували вплив різних джерел вуглецю, таких як інулін, розчинний крохмаль, лактоза, мальтоза, ксилоза, сахароза та глюкоза, на продукцію ліпідів і ріст клітин. Вони встановили, що глюкоза була найкращим джерелом для виробництва ліпідів, але інші джерела, такі як сахароза, інулін і мальтоза, також мали хороший потенціал для використання. Лактоза, однак, виявилася найменш ефективною серед протестованих джерел вуглецю.

Важливою особливістю штаму *L. kononenkoae* BF1S57 є наявність двох копій генів, що кодують субодиниці ферменту синтази жирних кислот, що може пояснювати високу продуктивність ліпідів [22]. В умовах культивування

з 90 г/л глюкози, цей штам показав високу продуктивність ліпідів, досягаючи 0,16 г ліпідів на 1 г глюкози, що свідчить про ефективність процесу. Біодизель, отриманий з ліпідів цього штаму, повністю відповідав стандартам США (ASTM D6751) та ЄС (EN 14214), що підтверджує його придатність для комерційного використання. Основними жирними кислотами, що становили 94,6% від загального складу ліпідів, були пальмітинова (C16:0), пальмітолеїнова (C16:1), стеаринова (C18:0), олеїнова (C18:1) та лінолева (C18:2) кислоти. Ці кислоти мають подібний склад до рослинних олій, що робить їх придатними для виробництва біодизеля.

Chmielarz та його колеги [23] провели дослідження, спрямоване на вивчення здатності маслянокислих дріжджів використовувати сирий гліцерин та гідролізат геміцелюлози як джерела вуглецю для синтезу ліпідів. Ці два субстрати є побічними продуктами біодизельної промисловості та виробництва целюлози, що робить їх доступними та економічно привабливими для виробництва мікробних ліпідів. Дослідники протестували 27 штамів дріжджів і виявили, що лише 11 з них змогли рости на середовищах, що містять сирий гліцерин як єдине джерело вуглецю, з яких найкращий результат синтезу ліпідів показав штам *Rhodotorula toruloides* CBS 14. Аналіз складу жирних кислот показав, що основними компонентами ліпідів у *R. toruloides* були олеїнова кислота (46%), пальмітинова кислота (28%), лінолева кислота (16,3%) та стеаринова кислота (12,6%). Цей склад жирних кислот подібний до рослинних олій, що робить такі ліпіди придатними для виробництва біодизеля.

У ході дослідження було виявлено, що змішування сирого гліцерину з гідролізатом геміцелюлози мало стимулюючий ефект на конверсію гліцерину та накопичення ліпідів у цих штамів дріжджів [23]. У випадку *R. toruloides* CBS 14, у середовищі, що містило 10% гідролізату геміцелюлози та 55 г/л сирого гліцерину, було досягнуто найвищої концентрації біомаси (21,2 г/л) та ліпідів (12,5 г/л) після 96 годин культивування. Важливо, що в цьому середовищі гліцерин був спожитий значно швидше, ніж у контрольному

середовищі з чистим сирим гліцерином: 75% гліцерину було спожито вже за 72 години, а через 96 годин гліцерин повністю зник із середовища. Для порівняння, контрольній культурі з 55 г/л чистого сирого гліцерину було необхідно 144 години для повного споживання гліцерину, і максимальна концентрація ліпідів досягла лише 8,8 г/л. Дослідження підтвердило, що змішування гідролізату геміцелюлози з сирим гліцерином може сприяти покращенню швидкості накопичення ліпідів у дріжджах, скорочуючи час культивування та підвищуючи ефективність виробництва мікробних ліпідів. Це відкриває нові перспективи для використання цих низьковартісних побічних продуктів у біотехнологічних процесах для отримання високовартісних продуктів, таких як біодизель.

Sánchez i Nogué та співавт. [24] провели комплексне дослідження, яке демонструє інтегрований підхід до виробництва дизельного палива з лігноцелюлозних цукрів за допомогою маслянокислих дріжджів. Дослідники розпочали з широкомасштабного скринінгу 31 штаму дріжджів на гідролізаті кукурудзяного стебла, обробленого методом деацетилювання та розведеної кислотної обробки з подальшим ферментативним гідролізом (DDAP-EH). Найкращі результати показали штами *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, *Rhodospiridium toruloides* DSM-4444 та *Trichosporon guehoae* UCDFST 60-59, які було відібрано для подальших досліджень у біореакторах, де їх продуктивність оцінювалася за показниками виробництва ліпідів, включаючи вміст триацилгліцеридів та інших класів ліпідів.

В умовах культивування в біореакторах на гідролізаті кукурудзяного стебла найвищу продуктивність ліпідів показав штам *C. curvatus*, досягаючи вмісту ліпідів у біомасі 21,4 г/л (63,1%), з продуктивністю 0,22 г/л/год. Штам *R. toruloides* продемонстрував найвищий кінцевий вихід ліпідів – 23,3 г/л, що дорівнює 60,8% від сухої маси клітин, але мав нижчу загальну продуктивність – 0,17 г/л/год. Крім того, дослідники оцінили здатність дріжджів до детоксикації інгібуючих сполук, присутніх у лігноцелюлозних гідролізатах [24]. *R. toruloides* DSM-4444 продемонстрував найвищу здатність до

перетворення ароматичних сполук, таких як ванілін та фурфурол, і виявився єдиним штамом, здатним рости на чотирьох ароматичних сполуках (глюкоза, ксилоза, арабіноза, галактоза) як єдиному джерелі вуглецю. Це робить цей штам перспективним кандидатом для одночасної конверсії цукрів і лігніну у процесі виробництва біопалива. Ліпіди, виділені з *R. toruloides*, були піддані гідрогенізації та ізомеризації, що дало паливну суміш, придатну для використання як дизельне паливо, з показниками, що відповідають міжнародним стандартам дизельного палива.

Дослідження «Використання метанолу в сирому гліцерині для підвищення продуктивності ліпідів у нестерильних ферментаціях за участі *Trichosporon oleaginosus*» [25] досліджує потенціал метанолу як антимікробного агента, здатного замінити стерилізацію середовища в процесі виробництва ліпідів. Основною метою роботи було вивчити, як додавання метанолу, який міститься в сирому гліцерині, може контролювати контамінацію середовища бактеріями та одночасно підтримувати ріст дріжджів для накопичення ліпідів. Автори обрали сирий гліцерин із вмістом метанолу близько 31% як основне вуглецеве джерело для культивування *T. oleaginosus* і експериментально визначили, що оптимальна концентрація метанолу в середовищі становить 1,4% мас., за якої вихід біомаси досягав 43,39 г/л, а ліпідів – 20,42 г/л. Цей рівень продуктивності близький до результатів стерильного ферментування, де вихід біомаси та ліпідів становив 43,82 г/л і 21,87 г/л відповідно, але досягається без витрат на стерилізацію. Для порівняння, у нестерильних умовах без метанолу рівень продукції був значно нижчим: лише 6,9 г/л біомаси та 3,05 г/л ліпідів. Це підтверджує ефективність метанолу в контролі забруднень, дозволяючи досягати стабільних показників продуктивності в умовах, які не вимагають стерильності. Окрім того, інші домішки сирого гліцерину, такі як мила та каталізатори, не вплинули негативно на ріст дріжджів, що додатково спрощує процес і робить його економічно привабливішим.

Таким чином, результати дослідження [25] свідчать про значний потенціал метанолу як селективного агента для підтримання стабільного виходу ліпідів у промислових нестерильних ферментаціях. Цей підхід відкриває можливості для розвитку екологічно та економічно ефективних методів виробництва біодизеля з використанням відходів, що сприяє вдосконаленню існуючих технологій із замкнутим циклом. Водночас деякі аспекти потребують подальшого вивчення, особливо щодо довготривалої стабільності процесу за умов промислового масштабу, оскільки вплив інших забруднювачів та токсичних побічних продуктів метанолу, які можуть накопичуватись протягом тривалих періодів ферментації, лишається недостатньо вивченим.

Відповідно до роботи Maза та співавт. [26], *R. glutinis* R4 була досліджена як потенційне джерело ліпідів для виробництва біодизеля, завдяки її здатності акумулювати нейтральні жири, зокрема тригліцериди. Дослідження порівнювало здатність цієї психротолерантної дріжджової культури, виділеної з Антарктиди, до накопичення біомаси та синтезу ліпідів із вісьмома іншими штамми, що належать до родів *Rhodotorula* і *Yarrowia*, в умовах нестачі азоту та надлишку вуглецю. За оптимальних умов *R. glutinis* R4 показала найвищу продуктивність, досягаючи 14 г/л біомаси та 6,8-7,3 г/л ліпідів, з показником накопичення ліпідів на рівні 47% маси, що є еквівалентом результатів для олійних культур. Ліпіди, синтезовані *R. glutinis* R4, виявилися схожими за складом на рослинні олії і містили приблизно 61% олеїнової кислоти, що робить їх придатними для синтезу біодизеля. Було також доведено, що біодизель, виготовлений на основі ліпідів цього штаму, відповідає міжнародним стандартам якості пального (ASTM D6751 і EN 14214), зокрема за такими показниками, як цетанове число, йодне число, окисна стабільність та показником холодної фільтрації. За показником окисної стабільності біодизель з *R. glutinis* R4 досягав 9-10 годин, що перевищує стабільність біодизелів з рослинних олій (2-4 години), вказуючи на його високий потенціал як стійкого палива з тривалим терміном зберігання.

Попри значні переваги *R. glutinis* R4, зокрема її високу продуктивність ліпідів та відповідність стандартам якості біодизеля, дослідження [26] має певні обмеження. Залишається відкритим питання щодо стабільності цього процесу у промислових масштабах, особливо з урахуванням можливої різниці в характеристиках субстратів і умов культивування. Крім того, потрібно більше досліджень для визначення оптимальних умов культивування в різних температурних і поживних середовищах, аби підтвердити ефективність цього штаму як джерела ліпідів на постійній основі.

Sara та співавт. [27] дослідили потенціал дріжджів *Y. lipolytica* для синтезу ліпідів з використанням відходів біодизельного виробництва – сирого гліцерину. Основна мета роботи полягала в оптимізації концентрації гліцерину та азоту для підвищення виходу ліпідів у культурі за обмежених азотних умов. Дослідження виявило, що за оптимальних параметрів у середовищі з концентрацією гліцерину 89 г/л та аміаку 0,54 г/л *Y. lipolytica* виробляє до 25 г/л біомаси з ліпідним вмістом 52,7% мас. сухої біомаси. Це свідчить про підвищення показників на 64% для біомаси та на 20% для ліпідів у порівнянні з контролем за неоптимізованих умов. Аналіз жирних кислот, отриманих з ліпідів, показав, що вони складаються переважно з олеїнової, пальмітинової, лінолевої та стеаринової кислот, що робить цей продукт відповідним для виробництва біодизеля. Високий вміст олеїнової кислоти також сприяє покращенню стабільності палива.

Попри успішну оптимізацію процесу, деякі аспекти дослідження [27] потребують подальшого вивчення. Наприклад, хоча підвищена концентрація гліцерину позитивно вплинула на продуктивність, високі концентрації можуть призводити до підвищення осмотичного тиску, що знижує ефективність росту клітин. Окрім того, не було достатньо досліджено довготривалу стабільність процесу за промислових масштабів, особливо щодо контролю середовища з високими концентраціями гліцерину.

У дослідженні Woonyarit та співавт. [28] розглядається можливість підвищення продуктивності ліпідів за рахунок застосування низьковартісних

субстратів у процесі двостадійної ферментації з використанням олеагінових дріжджів *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-SP314. На першій стадії культивування використовували гідролізат верхівок цукрової тростини (STH) як джерело вуглецю для накопичення клітинної маси. За оптимізованих умов, що включали 43,18 г/л редукуючих цукрів та додавання соєвого борошна і  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , вдалося досягти концентрації біомаси на рівні 10,61 г/л з низьким вмістом ліпідів — лише 5,66% сухої маси клітин. На другій стадії дріжджі переносили на середовище із сирим гліцерином (CG), який виступав єдиним джерелом вуглецю для подальшого синтезу ліпідів, у середовищі з обмеженим вмістом азоту. Після завершення другої стадії культивування вміст ліпідів у біомасі досягнув 73,04% сухої маси, з концентрацією ліпідів у культурі 15,85 г/л та концентрацією клітинної маси на рівні 21,07 г/л.

Дослідження [28] показало, що двостадійний підхід із використанням гідролізату агровідходів і сирого гліцерину є ефективною стратегією для накопичення значної кількості ліпідів у дріжджах. У ліпідному профілі переважає олеїнова кислота, що робить кінцевий продукт придатним для виробництва стабільного біодизеля. На першій стадії метою було досягнення високої концентрації біомаси при мінімальній кількості ліпідів, і автори змогли досягти лише 5,66% ліпідів від сухої маси клітин. Це свідчить про те, що *R. fluvialis* не схильні накопичувати ліпіди у великій кількості за умов наявності поживних речовин, особливо азоту, у середовищі. Ліпідогенез активно активується саме на другій стадії, коли клітини піддаються впливу сирого гліцерину з обмеженим вмістом азоту, що сприяє перенаправленню метаболізму на синтез ліпідів, замість синтезу білків або іншої клітинної маси. Хоча результати є багатообіцяючими у лабораторних умовах, для промислового застосування знадобляться додаткові дослідження, особливо стосовно впливу домішок у сирому гліцерині, які можуть діяти як інгібітори росту або ліпідного синтезу у великих масштабах виробництва.

Ayadi та співавт. у своїй роботі [29] досліджували потенціал нової олеагінової дріжджової культури *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1, яка здатна

ефективно використовувати лігноцелюлозні гідролізати з агровідходів для синтезу ліпідів. Дріжджі культивували на середовищі з кислотним гідролізатом пшеничних висівок (WBH), що початково містило 56,6 г/л редукуючих цукрів, із застосуванням процесу ферментації без детоксикації середовища, що сприяло значному зниженню собівартості отримання ліпідів. Після 168 годин ферментації у режимі напівперіодичного живлення (періодичне підживлення гідролізатом пшеничних висівок з вмістом цукрів 11,2 г/л) загальна концентрація біомаси досягла 13,3 г/л, а вміст ліпідів у клітинах становив 38,7% сухої маси, що відповідає концентрації ліпідів 5,15 г/л.

Аналіз ліпідного профілю показав наявність підвищених рівнів мононенасичених (66,8%) і насичених (23,4%) жирних кислот у ліпідах Y-MG1, вирощених на пшеничних висівках, що забезпечує прийнятні характеристики до біодизеля відповідно до міжнародних стандартів якості палива, зокрема ASTM D6751 [29]. Проте результати також вказують на певні обмеження, зокрема вплив токсичних побічних продуктів гідролізу, таких як 5-гідроксиметилфурфурол (HMF) та фурфурол, на продуктивність процесу. Хоча детоксикація не проводилась, і дріжджі показали стійкість до цих інгібіторів, для промислового масштабування цього процесу може знадобитися ретельніше вивчення можливих варіацій у складі гідролізатів і їхнього впливу на процес культивування.

Робота Міао та співавт. [30] демонструє ефективність використання гідролізату кукурудзяних кочанів як сировини для синтезу ліпідів мікроорганізмами. Основною метою роботи було оцінити здатність дріжджів *R. taiwanensis* AM2352 конвертувати гідролізат у ліпіди, які можна перетворити на біодизель. Гідролізат отримали шляхом кислотного гідролізу, після чого він був детоксифікований для видалення таких інгібіторів, як 5-гідроксиметилфурфурол, фурфурол та оцтова кислота. Під час культивування у 5-літровому ферментері на середовищі, що містило 4% цукрів (основна частина – ксилоза), дріжджі досягли концентрації біомаси 18,7 г/л і вмісту

ліпідів у біомасі 60,3% за 108 годин ферментації. Загальний вихід ліпідів становив 55,8 г на кілограм кукурудзяних кочанів, що є високим показником порівняно з іншими дослідженнями. Ліпіди мали переважно довголанцюгові жирні кислоти (C16-C18), з яких понад 81,5% успішно перетворили на біодизель, який відповідає основним міжнародним стандартам (ASTM D6751, EN 14214).

Проте, незважаючи на високу ефективність процесу [30], автори відзначають кілька обмежень. По-перше, детоксифікація гідролізату спричиняє втрату 12,8% цукрів, що знижує економічну привабливість методу. По-друге, підвищений вміст пальмітинової кислоти (24,4%) і стеаринової кислоти (2,9%) погіршує низькотемпературні властивості отриманого біодизеля, що може обмежувати його використання в холодних умовах.

Стаття Friedlander та співавт. [31] демонструє поетапний підхід до вдосконалення метаболічних шляхів у дріжджів *Y. lipolytica*, спрямований на максимізацію накопичення ліпідів для виробництва біодизеля. Вибір базового штаму *Y. lipolytica* NS18 ґрунтувався на його мінімальному виділенні побічних метаболітів, таких як цитрати, та високій зручності для генетичних маніпуляцій. Основним напрямком роботи була надекспресія гена DGA1, що кодує діацилгліцерол-ацилтрансферазу типу 2, який є ключовим ферментом у синтезі тригліцеридів (TAG). Його інтеграція в геном штаму під сильним конститутивним промотором GPD1 забезпечила дворазове підвищення рівня ліпідів порівняно з диким типом.

Для досягнення подальшого підвищення ефективності синтезу було протестовано дев'ять гетерологічних генів DGA1 від різних олеагінових організмів. Найкращі результати отримані при експресії генів із *Rhodospiridium toruloides* і *Lipomyces starkeyi*, що дозволило збільшити вміст ліпідів утричі. Додатковим етапом була делеція гена TGL3, відповідального за деградацію TAG. Його видалення сприяло збереженню накопичених ліпідів у клітинах на пізніх етапах ферментації.

Результати [31] показали, що отриманий штам NS432 здатний накопичувати до 77% ліпідів у сухій масі клітин за умов періодичного культивування, досягаючи продуктивності 0,27 г/л/год і виходу 0,21 г ліпідів на грам спожитої глюкози. У підживлюваній ферментації титр ліпідів досяг 85 г/л, із продуктивністю 0,73 г/л/год, хоча вміст ліпідів у біомасі трохи знизився до 73%. Робота демонструє значний потенціал використання генетично модифікованих штамів *Y. lipolytica* для ефективної конверсії низьковартісних субстратів, таких як ксилоза, лінгоцелюлоза чи крохмаль. Проте, попри високу ефективність у лабораторних умовах, масштабування процесу до промислових обсягів вимагатиме додаткових досліджень, зокрема оптимізації ферментаційних умов для стабільної продуктивності та зниження витрат.

Робота Yu та співавт. [32] демонструє ефективний підхід до утилізації відходів олієпереробної промисловості шляхом перетворення органічних речовин на мікробні ліпіди. Дослідження було спрямоване на використання рафінованих стічних вод соєвої олії (RSOW) як субстрату без стерилізації, розведення чи додаткового збагачення поживними речовинами. У процесі культивування дріжджів *T. fermentans* в умовах, оптимізованих за допомогою методів Плакетта-Бермана та Бокса-Бенкена (температура 28,3°C, кількість посівного матеріалу 5,9% (об'ємних) та початковий рН 6,1), досягнуто високої ефективності очищення стічних вод: зниження хімічного споживання кисню на 94,7% і видалення вмісту олії на 89,9% через 40 годин ферментації в біореакторі. За цих умов біомаса дріжджів становила 7,9 г/л, концентрація ліпідів – 3,4 г/л, а вміст ліпідів у клітинах – 43%. Отримані мікробні ліпіди були багаті ненасиченими жирними кислотами (більше 70%), зокрема олеїноюю і лінолевою, що відповідає характеристикам рослинних олій, використовуваних для синтезу біодизеля.

Автори також підкреслюють, що фосфоліпіди, присутні у рафінованих стічних водах соєвої олії, сприяють зростанню біомаси та накопиченню ліпідів у дріжджах, оскільки вони можуть виступати попередниками внутрішньоклітинного синтезу ліпідів. Це дозволило забезпечити подвійний

ефект: очищення стічних вод і виробництво корисного продукту для біодизеля. Однак масштабування цього процесу до промислового рівня може зіткнутися з певними проблемами. Зокрема, змінний склад рафінованих стічних вод соєвої олії залежно від умов виробництва олії може впливати на стабільність результатів. Крім того, оптимізація умов культивування дріжджів потребує подальших досліджень для врахування впливу змінних параметрів, таких як аерація, швидкість перемішування та концентрація фосфоліпідів у середовищі.

## Синтез ліпідів дріжджами для виробництва біодизеля

Продуцент	Джерело вуглецю:	Концентрація субстрату, г/л	Концентрація ліпідів, г/л	Вміст ліпідів, % біомаси	Час культивування, год	Літ.
<i>Trichosporon oleaginosus</i> ATCC 20905	вторинний мул; Додаткове джерело вуглецю: Сирий гліцерин	30 (початкова) 40	16,4	40,3	84	[19]
<i>Yarrowia lipolytica</i> CCMA 0357	Сирий гліцерин	100	6,83	70	48	[20]
<i>Lipomyces starkeyi</i> CBS1807	Гідролізат березової тирси	70 г/л ксилози	8,04	60,5	144	[21]
<i>Lipomyces kononenkoae</i> BF1S57	Глюкоза	90	11,3	60,06	96	[22]
<i>Rhodotorula toruloides</i> CBS 14	Сирий гліцерин гідролізат геміцелюлози	55 10%	12,5	58	96	[23]
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM-4444	Глюкоза Ксилоза Арабіноза Галактоза	58,17 34,63 5,11 2,09	23,3	60,8	120	[24]
<i>Trichosporon oleaginosus</i> ATCC 20905	Сирий гліцерин + 1,4% метанолу	62,7	20,42	47	60	[25]
<i>Rhodotorula glutinis</i> R4	Глюкоза	40	6,8-7,3	47	120	[26]
<i>Yarrowia lipolytica</i> SM7	Сирий гліцерин	89	13,175	52,7	66	[27]

Закінчення табл. 2.1

Продуцент	Джерело вуглецю:	Концентрація субстрату, г/л	Концентрація ліпідів, г/л	Вміст ліпідів, % біомаси	Час культивування, год	Літ.
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-SP314	Гідролізат жому цукрової тростини  Сирий гліцерин	43,18 г/л загальних редукуючих цукрів  81,54	15,85	73,04	244	[28]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Y-MG1	Гідролізат пшеничних висівок	93,7 г/л загальних редукуючих цукрів	5,15	38,7	168	[29]
<i>Rhodotorula taiwanensis</i> AM2352	Гідролізат кукурудзяних рилець: - ксилоза - глюкоза - 5-гідроксиметилфурфурол Дріжджовий екстракт	36,79 7,22 0,02 5	11,22	60,3	108	[30]
<i>Yarrowia lipolytica</i> NS432	Сирий гліцерин Глюкоза	80 75	84,5 ± 1,7	73 ± 2 %	115	[31]
<i>Trichosporon fermentans</i> (CICC 1368)	Стічні води заводу з переробки соєвої олії (стічні води були сумішшю 6,25 г/л натрієвого мила, 1,25 г/л соєвих фосфоліпідів, 2 г/л соєвої олії та 0,3 г/л (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	-	3,4	43	60	[32]

### РОЗДІЛ 3. Виробництво ліпідів мікрободоростями

Постійне занепокоєння щодо зменшення запасів викопного палива прискорило потребу в сталих технологіях, які прокладають шлях до технологій альтернативного палива, такого як біодизель. У напрямку виробництва біодизелю перші дослідження базувалися на відомих рослинних джерелах олії, таких як соя, пальма, соняшник, ріпак, відходах харчової промисловості та тваринних жирах, однак наявність рослинної біомаси вимагає великих площ оброблюваних земель, що зумовлює необхідність пошуку альтернативних варіантів [33]. Таким чином, мікроорганізми, такі як мікрободорості та дріжджі, були визначені як можливі джерела ліпідів завдяки їхній більшій пристосованості до великомасштабного вирощування та більшому потенціалу виробництва ліпідів. Будучи гетеротрофними, дріжджі потребують певного фіксованого джерела вуглецю для синтезу нових клітин та енергії, тоді як мікрободорості, будучи фототрофними мікроорганізмами, мають потенціал для перетворення світла та CO<sub>2</sub> в біомасу разом з накопиченням ліпідів.

#### 3.1. Виробництво ліпідів фотоавтотрофними культурами

Метою дослідження авторів було знайти нові потенційні ліпідопродукуючі штами мікрободоростей для виробництва біопалива [33]. Зразки водоростей були зібрані з п'яти водойм у Раджастані, Індія. У результаті аналізу 18 ізолятів було відібрано три найперспективніших: BV3 (*Nostoc* sp.), BV4 (*Nostoc* sp.) і BV14 (*Cyanobacteria*). Ліпідний вміст у цих ізолятах становив 12,3% (BV3), 17,3% (BV4) і 26,6% (BV14) сухої маси клітин, тоді як ліпідна продуктивність склала 0,159, 0,106 та 0,046 г/л/день відповідно. BV14 демонстрував найбільшу продуктивність, хоча цей ізолят мав найнижчий рівень росту (2,61 г/л біомаси). Подальший аналіз ліпідів показав,

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін Є.А.			РОЗДІЛ 3. Виробництво ліпідів мікрободоростями	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					26	10
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

що всі три ізоляти продукують нейтральні ліпіди, які містять насичені коротколанцюгові алкани, що є бажаним для трансестерифікації в біодизель. Проте, варто зазначити, що загальні показники ліпідного синтезу в ізолятив є відносно низькими у порівнянні з іншими джерелами, такими як *Chlorella* чи *Nannochloropsis*, що може обмежувати їх застосування у промислових масштабах. Крім того, присутність коротколанцюгових алканів вимагає подальшого дослідження їхньої ролі у властивостях отриманого біодизеля, особливо щодо низькотемпературної стабільності та інших фізико-хімічних характеристик.

Робота Narayanan та співавт. [34] досліджує використання термофільних мікродоростей для біоконверсії в біодизель за екстремальних умов навколишнього середовища. В рамках дослідження було проведено ізоляцію та молекулярну ідентифікацію штаму *Coelastrella* sp. FI69 з використанням аналізу гена 18S рРНК. Штам виявився стійким до підвищених температур (до 50°C) і високої інтенсивності світла, що робить його перспективним для культивування в умовах відкритого середовища. У бульбашкових колонних біореакторах штам вирощували за умов аерації з різним вмістом CO<sub>2</sub>: 0,04%, 1,5% і 5%. Максимальна концентрація біомаси (3,54 г/л) і ліпідна продуктивність (40,7 мг/л/день) були досягнуті при концентрації CO<sub>2</sub> 1,5%, що на 1,5 раза перевищувало показники для аерації повітрям (0,04% CO<sub>2</sub>). Вміст ліпідів у біомасі варіювався від 17,02% до 18,3% від сухої маси залежно від умов, а жирнокислотний профіль містив значну частку C16:0 (пальмітинова кислота) і C18:1 (олеїнова кислота), які є бажаними компонентами для синтезу біодизеля.

Попри перспективність *Coelastrella* sp. FI69, автори [34] відзначають, що низький вміст ліпідів у біомасі (менше 20%) обмежує його безпосереднє використання для синтезу біопалива. Для підвищення ефективності виробництва ліпідів запропоновано оптимізацію умов культивування за допомогою індукції стресу, зокрема шляхом обмеження азоту чи фосфору. Такі умови зазвичай сприяють перенаправленню метаболічних процесів від

синтезу білків і нуклеїнових кислот до накопичення резервних сполук, зокрема тригліцеридів. Необхідні подальші дослідження для визначення найефективнішого поєднання стресових факторів, яке б забезпечувало максимальну ліпідну продуктивність при мінімальних витратах на культивування. Це особливо важливо для забезпечення економічної доцільності процесу в промислових умовах.

Sangarillai та Marimuthu досліджували вплив різних поживних середовищ на ріст і накопичення ліпідів у мікрowodоростях *Asterarcys quadricellulare*, ізольованих із прісноводних водойм Індії [35]. Головною метою роботи було визначити оптимальне середовище для збільшення продуктивності біомаси і ліпідів, що мають застосування у виробництві біодизеля. Для експерименту використовували чотири середовища: модифіковане середовище Болда (BBM), модифіковане середовище CFTRI, середовище BG11 і середовище CHU. Найкращі результати були досягнуті на модифікованому середовищі BBM, де концентрація сухої біомаси досягла 1,44 г/л на 25-й день культивування, що перевищувало показники для інших середовищ на 51,7% (BG11), 42,7% (CHU) і 46,2% (CFTRI). Вміст ліпідів у біомасі становив 25,2% сухої ваги, а концентрація ліпідів — 375 мг/л, що на 31,2% більше, ніж у BG11, та на 18,7% більше, ніж у CFTRI. Крім того, аналіз жирнокислотного профілю виявив високу частку насичених (пальмітинова та стеаринова кислоти) і мононенасичених (олеїнова кислота) жирних кислот, що є бажаним для виробництва біодизеля завдяки хорошій стабільності до окислення і в'язкості.

Однак, попри очевидні переваги, дослідження має певні обмеження [35]. Зокрема, досить низький вміст ліпідів у біомасі порівняно з іншими штамми мікрowodоростей може обмежити економічну доцільність використання *Asterarcys quadricellulare* без попередньої оптимізації. Наприклад, індукція азотного або фосфорного стресу могла б сприяти підвищенню вмісту ліпідів у клітинах, хоча це потребує додаткових досліджень. Окрім того, масштабування процесу до промислових умов вимагатиме оцінки

довготривалої стабільності росту в умовах відкритих водойм і змінних кліматичних факторів.

Paramasivam та співавт. [36] досліджували вплив світла, солоності та рН на ріст і синтез ліпідів морських мікроводоростей *Nannochloropsis* sp.. Основна мета роботи полягала в оптимізації умов культивування для досягнення максимального накопичення біомаси та ліпідів, придатних для виробництва біодизеля. Оптимальні умови культивування, такі як концентрація солоності 30 ppt, рН 8 і фототрофний режим ( $35 \mu\text{mol m}^2/\text{c}$ ), забезпечили максимальну продуктивність біомаси  $1,37 \pm 0,08$  г/л/добу та місту ліпідів 64,3% сухої біомаси. Ліпідний профіль водоростей містив 72,6% олеїнової кислоти, 13,35% пальмітинової кислоти та 8,86% лінолевої кислоти. Високий вміст ненасичених жирних кислот (74,08%) вказує на придатність цього джерела для виробництва біодизеля, особливо завдяки покращеним властивостям палива при низьких температурах.

Дослідження [36] підтвердило, що стресові фактори, такі як підвищена солоність і лужне середовище, можуть сприяти накопиченню ліпідів через регуляцію метаболізму жирних кислот у клітинах. Проте при солоності 40 ppt спостерігалось зниження росту мікроводоростей через осмотичний стрес, що вплинуло на продуктивність. Такі результати демонструють необхідність дотримання чітких меж оптимізації для забезпечення стабільності процесу. Однак, хоча результати свідчать про високу ефективність *Nannochloropsis* sp., для промислового масштабування необхідні подальші дослідження. Зокрема, важливо оцінити стабільність культури за тривалого культивування та вплив коливань параметрів середовища на ліпідний склад і продуктивність.

Робота Fawzy та Alharthi [37] присвячена дослідженню впливу стресових умов культивування, включаючи дефіцит азоту, фосфору та сольовий стрес, на продуктивність біомаси та ліпідів. У дослідженні використовували методологію поверхневого відгуку (Response Surface Methodology, RSM) для оптимізації параметрів середовища. За оптимізованих умов культивування (0,63 г/л азоту, 0,02 г/л фосфору та 1,61 М NaCl) *Dunaliella parva*

демонструвала максимальну продуктивність біомаси 48,59 мг/л/день, вміст ліпідів 39,08% та продуктивність ліпідів 19,91 мг/л/день. Ці показники були в 1,2, 1,5 та 1,4 рази вищими, відповідно, ніж за стандартних умов середовища. Однак стресові умови також впливали на зниження вмісту поліненасичених жирних кислот (PUFAs) з 54,5% до 40,3% та збільшення насичених жирних кислот (SFAs) з 42,8% до 59,7%. Це покращило властивості біодизеля, включаючи цетанове число (48,7 порівняно з 40,2 за стандартних умов) та стабільність до окислення (4,67 години проти 3,48 години).

Попри успішну оптимізацію, автори відзначають кілька обмежень [37]. Дефіцит азоту та фосфору сприяв підвищенню вмісту ліпідів, однак це відбувалося за рахунок зниження продуктивності біомаси, що може обмежувати загальну продуктивність ліпідів у масштабних процесах. Крім того, хоча збільшення частки SFAs сприяє покращенню стабільності біодизеля, воно також підвищує температуру замерзання палива (cloud point та pour point), що може обмежити використання в холодних умовах. Додаткові дослідження необхідні для визначення способів мінімізації втрат біомаси під час стресових умов та подальшої оптимізації складу жирних кислот для забезпечення кращих низькотемпературних характеристик біодизеля.

Різні типи стічних вод, що скидаються з великих населених пунктів, в більшості своїй очищаються традиційними методами, такими як метод активного мулу, однак критичним недоліком традиційних методів є те, що вони занадто енергозатратні. Крім того, для дотримання більш суворих стандартів скидання відходів на звичайних очисних спорудах потрібні додаткові витрати на хімічні реагенти для видалення фосфору. У зв'язку з цими проблемами було докладено багато зусиль для зменшення експлуатаційних витрат та споживання енергії, щоб змінити парадигму в бік енергоефективних очисних споруд, тому використання мікробіодоростей привертає дедалі більше уваги як новий метод енергоефективної технології очищення стічних вод завдяки їх здатності поглинати азот і фосфати (в умовах

автотрофного культивування) та органічний вуглець (в умовах міксотрофного гетеротрофного культивування) [38].

Таким чином, метою дослідження авторів було виділити нові види мікроводоростей з різних водних середовищ (річкової води та стічних вод очисних споруд) та дослідити їхні біохімічні характеристики щодо вилучення поживних речовин та продукування ліпідів [38]. Ізоляти мікроводоростей, отримані з річкової води та очисних споруд, були досліджені з метою відбору відповідних видів мікроводоростей, здатних одночасно вилучати поживні речовини та виробляти біопаливо. Серед десяти ізолятів найвищі показники вилучення поживних речовин – 8,1 мг-Т-N/л/д та 1,6 мг-Т-P/л/д – були досягнуті *Chlorella sorokiniana* UTEX 1810 в умовах фотоавтотрофного культивування. Також *C. sorokiniana* UTEX 1810 показала майже найбільші показники продуктивності біомаси та вмісту ліпідів – 0,53 г/л та 46,52% відповідно, в той час як найкращі показники становили 0,65 г/л та 46,87% для *C. miniata* UTEX 490. Аналіз складу метилових ефірів жирних кислот (МЕЖК) показав переважний вміст пальмітинової кислоти (C16:0), стеаринової кислоти (C18:0), лінолевої кислоти (C18:2) та генейкозанової кислоти (C21:0). Ці результати свідчать про те, що *C. sorokiniana* UTEX 1810 є перспективним кандидатом для одночасного видалення поживних речовин та виробництва біопалива зі стічних вод.

### **3.2. Виробництво ліпідів фотогетеротрофними культурами**

Polat та Altınbaş [39] досліджували вплив концентрації ацетату та початкового рН середовища на ріст біомаси і накопичення ліпідів у фотогетеротрофній культурі *Auxenochlorella protothecoides* (CCAP 211/54). Метою дослідження було досягнення максимальної продуктивності біомаси та ліпідів, придатних для синтезу біодизеля. Оптимальні умови культивування — 24,4 мМ ацетату при рН 5,96 — забезпечили максимальну продуктивність біомаси (1537 мг/л) та ліпідного вмісту (47,8% сухої ваги). За цих умов основні жирні кислоти включали пальмітинову (16,9%), олеїнову (21,9%) та ліноленову (24,4%), що свідчить про придатність отриманих ліпідів для

виробництва високоякісного біодизеля. Варто зазначити, що з підвищенням концентрації ацетату понад 35 мМ спостерігалось значне зниження продуктивності біомаси та вмісту ліпідів через осмотичний стрес, що також супроводжувалося зменшенням вмісту хлорофілу.

Дослідження [39] продемонструвало, що додавання органічного джерела вуглецю (ацетату) сприяє збільшенню метаболічної активності клітин, однак потребує ретельного контролю для уникнення інгібіторного ефекту надмірної концентрації. У порівнянні з іншими видами мікродоростей, отримані показники *A. protothecoides* виявилися конкурентоспроможними, однак вимагають подальшого вдосконалення для масштабування. Наприклад, інтеграція додаткових джерел азоту, таких як екстракти дріжджів, могла б підвищити продуктивність біомаси, як це спостерігалось у дослідженнях з іншими штамми. Також залишається відкритим питання економічної доцільності використання ацетату як джерела вуглецю у великих обсягах виробництва.

Метою роботи авторів було дослідити вплив обмеження вмісту нітрату натрію ( $\text{NaNO}_3$ ) на ріст ціанобактерії *Synechocystis* PCC 6803 з метою підвищення вмісту ліпідів [40]. Порівняно з контрольним середовищем, обмеження  $\text{NaNO}_3$  має як позитивний, так і негативний вплив на ріст біомаси, її вміст зростає зі зменшенням концентрації  $\text{NaNO}_3$  з 1,25 до 0,75 г/л і далі ріст біомаси знижується зі зменшенням концентрації  $\text{NaNO}_3$  з 0,5 до 0,25 г/л (з 4-го по 9-й тиждень). Найвищі показники росту біомаси (0,043 г/л/добу) були отримані при культивуванні *Synechocystis* PCC 6803 на 9-му тижні в модифікованому середовищі BG11 з 0,75 г/л  $\text{NaNO}_3$ , в той час, як найнижчі (0,003 г/л/добу) – при культивуванні в модифікованому середовищі BG11 з 0,25 г/л  $\text{NaNO}_3$ . Максимальні концентрації хлорофілу *a* і *b* для *Synechocystis* PCC 6803, культивованого на 9-му тижні, становили 6,42 мкг/мл (0,75 г/л  $\text{NaNO}_3$ ) і 0,63 мкг/мл (1,25 г/л  $\text{NaNO}_3$ ), відповідно. Крім того, культура демонструвала зменшення вмісту білка та збільшення вмісту ліпідів зі зменшенням концентрації  $\text{NaNO}_3$ . Отримані результати свідчать про те, що

концентрація 0,75 г/л NaNO<sub>3</sub>у поживному середовищі *Synechocystis* PCC 680 призводить до найвищого вмісту ліпідів (21,3%), що робить його потенційною сировиною для виробництва біодизеля.

Антибіотики часто використовуються для профілактики та лікування бактеріальних інфекцій. Однак приблизно 75% спожитих антибіотиків прямо чи опосередковано потрапляють у навколишнє середовище. Надмірне використання антибіотиків у всьому світі сприяє поширенню антибіотикорезистентності в мікробних спільнотах і становить велику загрозу для здоров'я людей [41]. Технологія на основі мікроводоростей є екологічно чистим та економічно ефективним методом виробництва біопалива та видалення забруднювачів. У своєму дослідженні автори культивували *Scenedesmus obliquus* з різними концентраціями офлоксацину у середовищі BG11 [41]. У системі водорості-антибіотики *S. obliquus* могла ефективно видаляти офлоксацин у концентрації 10 мг/л; однак ефективність виведення обмежувалася при вищих дозах (20-320 мг/л). При цьому вміст ліпідів суттєво збільшувався на 21,10-49,63%, що було спричинено переходом вуглецю з вуглеводнів антибіотику у ліпіді. Найбільша ліпідна продуктивність (7,53 мг/л/добу) спостерігалася за концентрації офлоксацину 10 мг/л, що приблизно в 1,5 рази перевищувало контроль. Більше того, *S. obliquus*, культивована з офлоксацином, змогла покращити якість біодизельного палива завдяки збільшенню вмісту насичених жирних кислот та зменшенню ненасичених жирних кислот. Це дослідження демонструє, що система водорості-антибіотики є перспективним рішенням для одночасного видалення антибіотиків та виробництва біопалива.

Метою дослідження авторів було виділити та ідентифікувати штам мікроводорості, здатний до накопичення високого вмісту ліпідів, та оцінити його ліпідоутворювальну здатність [42]. Автори виділили та ідентифікували новий штам мікроводорості *Parachlorella kessleri* R-3, який може використовувати різноманітні органічні та неорганічні джерела вуглецю та азоту, також було виявлено, що штам R-3 може накопичувати велику кількість

біомаси та ліпідів у широкому діапазоні рН від 3 до 11, а також може поступово змінювати рН середовища до майже нейтрального під час культивування. При оптимальній концентрації глюкози 10 г/л, концентрації нітрату натрію 0,8 г/л і початковому рН 7 було досягнуто найвищої біомаси водоростей 6,90 г/л, вмісту ліпідів 45,12% і ліпідної продуктивності 340,94 мг/л/д. Крім того, переважаючими жирними кислотами у складі виділених ліпідів були пальмітинова (C16:0) та пальмітолеїнова (C16:1), які складають 88,04% від загального вмісту. Це свідчить про високий потенціал нового штаму мікроводоростей для застосування у виробництві біодизеля.

Стаття «Концепція сталого біопереробного заводу для виробництва біопалива шляхом комплексної утилізації харчових відходів» [43] пропонує двостадійний процес, що дозволяє максимально використовувати харчові відходи для отримання біодизеля. У першій стадії дослідники провели ферментативний гідроліз харчових відходів з отриманням глюкози (407 г/кг харчових відходів) і фруктози (123,3 г/кг), які використовували для вирощування мікроводоростей *Auxenochlorella protothecoides*. Це забезпечило вихід біомаси на рівні 0,346 г/г цукрів і вихід ліпідів 0,216 г/г цукрів, з кінцевою концентрацією ліпідів 5,42 г/л (64,52% від сухої маси). На другій стадії з тієї ж маси харчових відходів виділили 14,15% олійної фракції, з якої за допомогою двоетапної трансестерифікації отримали 135,8 г метилових ефірів жирних кислот на кілограм харчових відходів, що перевищує стандартні показники для біодизеля. Крім того, в процесі трансестерифікації утворювався сирий гліцерин, який згодом використали для додаткового культивування мікроводоростей. Загалом комплексний підхід дозволив отримати 248,21 г біодизеля з кожного кілограма харчових відходів.

Незважаючи на ефективність цього процесу, важливими аспектами для подальшого вивчення є вплив складу відходів, оскільки харчові залишки можуть мати змінний вміст білків, жирів та забруднюючих речовин, що потребує коригування умов ферментації і трансестерифікації для підтримання стабільності процесу у промислових масштабах.

## Синтез ліпідів мікрободоростями для виробництва біодизеля

Продуцент	Режим вирощування	Концентрація біомаси, г/л	Виробництво ліпідів	Вміст ліпідів, % біомаси	Час вирощування	Літ.
Вісімнадцять ізолятів, що належать до ціанофітових та хлорофітових	Фотоавтотрофний	2,607-19,426	0,046-0,159 г/л/доба	12,306-26,567	15 дн	[33]
<i>Coelastrella</i> sp. FI69	Фотоавтотрофний, аерація 1,5% вуглекислого газу	3,54	40,7 мг/л/доба	18	16 дн	[34]
<i>Asterarcys quadricellulare</i> (KNUA020)	Фотоавтотрофний	1,44 ± 0,015	0,015 г/л/доба	25,2	25 дн	[35]
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> (CCAP 211/54)	Фотогетеротрофний; 24,4 мМ ацетату; рН 5,96	1,537 мг/л	0,722 г/л	47,8	120 год	[36]
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Фотогетеротрофний; середовище BG-11; 0,75 г/л NaNO <sub>3</sub>	0,043 г/л/доба	0,009 г/л/доба	21,3	9 тижнів	[37]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Фотоавтотрофний	1,37 г/л/добу	0,88 г/л/добу	64,3	9 дн	[38]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Фотогетеротрофний; середовище BG-11; офлоксацин 10 мг/л	0,92 г/л	7,53 мг/л/добу	21,35	20 дн	[39]
<i>Dunaliella parva</i>	Фотоавтотрофний; модифіковане середовище Джонсона	48,59 мг/л/день	19,91 мг/л/добу	39,08	10 дн	[40]
<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 1810	Фотоавтотрофний	0,53 г/л	0,25 г/л	46,52	12 дн	[41]
<i>Parachlorella kessleri</i> R-3	Фотогетеротрофний; глюкоза 10 г/л	6,9 г/л	340,94 мг/л/д	45,12	9 дн	[42]
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> SAG 211-7a	Фотогетеротрофний; Гідролізат харчових відходів:	8,41	5,42	64,52	96	[43]

## РОЗДІЛ 4. Виробництво ліпідів змішаними культурами мікроводоростей та дріжджів

Маслянисті мікроводорості та дріжджі є двома основними групами мікроорганізмів, які є сталими джерелами для виробництва біодизеля, оскільки вони можуть накопичувати велику кількість ліпідів у своїх клітинах. На сьогоднішній день різні види мікроводоростей і дріжджів використовуються для виробництва біодизеля окремо [44]. Однак, незважаючи на постійні зусилля, їх низька ліпідна продуктивність і висока вартість вирощування все ще залишаються основними перешкодами для їх широкомасштабного впровадження. Спільне культивування мікроводоростей і дріжджів базується на взаємодоповнюючих метаболічних потребах цих організмів і пропонує подолання ключових обмежень традиційного монокультурного культивування. Основна ідея ко-культивування полягає у створенні взаємовигідних умов, де продукти обміну однієї культури стають субстратом для іншої. Мікроводорості забезпечують кисень, необхідний для дихання дріжджів, тоді як дріжджі продукують вуглекислий газ та органічні кислоти, які є ключовими для фотосинтезу та метаболізму мікроводоростей. Важливим аспектом є те, що дріжджі можуть розкладати складні вуглеводи, наприклад, крохмаль чи целюлозу, до простих цукрів, які мікроводорості ефективно засвоюють.

Ця стратегія дозволяє ефективно використовувати низьковартісні або відходів субстрати, такі як гідролізати агровідходів чи стічні води харчової промисловості. Наприклад, ко-культивування *Chlorella vulgaris* з *Rhodotorula glutinis* продемонструвало значне збільшення ліпідного вмісту, досягнувши 62,2% сухої ваги клітин [45]. Крім того, загальна продуктивність ліпідів у таких системах може перевищувати 900 мг/л/день, що значно випереджає

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Сенін С.А.			РОЗДІЛ 4. Виробництво ліпідів змішаними культурами мікроводоростей та дріжджів		
Перевір.		Карлаш Ю.В.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						36	11
					Кафедра БТМ		

результати монокультур. Важливою перевагою ко-культивування є зниження ризиків накопичення інгібіторів у середовищі. Присутність дріжджів сприяє стабілізації рН завдяки їх метаболізму, тоді як виділення мікроводоростями кисню зменшує ймовірність анаеробного стресу для дріжджів. Це сприяє створенню стабільних умов для тривалого культивування.

Проте, для ефективної реалізації такого підходу важливий вибір сумісних штамів. Співвідношення мікроводоростей і дріжджів, їхні метаболічні потреби, температурний оптимум і швидкість росту мають бути збалансовані [44]. Наприклад, відхилення в пропорціях інокулюму можуть призвести до домінування одного організму і зниження ефективності системи. Крім того, параметри освітлення, концентрація поживних речовин та інші фізико-хімічні умови повинні бути оптимізовані для забезпечення максимальної продуктивності. Ко-культивування пропонує значний потенціал для розвитку технологій замкнутого циклу в біоекономіці. Проте для масштабування цього підходу потрібні додаткові дослідження щодо підтримки стабільності симбіозу в умовах промислового культивування та економічної оцінки впровадження таких систем.

Автори досліджували можливість використання змішаної культури мікроводоростей і дріжджів з рідкого дигестату стічних вод молочного виробництва (Дигестат) для виробництва біодизелю [46]. Вони дослідили ріст клітин, використання поживних речовин та оцінили продуктивність моно- та змішаної культури *Chlorella vulgaris* і *Yarrowia lipolytica* в Дигестаті з додаванням гліцерину в якості джерела вуглецю. Результати шестиденного культивування показали, що змішана культура може підвищити ефективність біологічної утилізації азоту і фосфору та отримати вищий вихід біомаси (1,62 г/л), ліпідів (0,31 г/л) і вищу теплоту згоряння (34,06 КДж/л), в той час як монокультури показали нижчий вихід ліпідів за той же час: *C. vulgaris* – 0,28 г/л, *Y. lipolytica* – 0,04 г/л. Порівняно з монокультурою *C. vulgaris*, у змішаній культурі спостерігали зниження рівня транскрипції генів нітратредуктази та глутамінсинтетази II у *C. vulgaris* за достатньої кількості аміаку. Отримані

результати дозволили авторам зробити позитивні висновки щодо ефективності використання змішаної культури для ефективної переробки дигестату стічних вод молочного виробництва для виробництва біодизелю.

Автори досліджували виробництво мікробної олії моно- та змішаною культурою мікроводоростей *Chlorella pyrenoidosa* та червоних дріжджів *Rhodotorula glutinis* з використанням гідролізату багаси маніоки в якості джерела вуглецю [47]. Результати показали, що обидва штами здатні переносити і навіть розкладати деякі побічні продукти, що містяться в гідролізаті, а підхід змішаної культури прискорює деградацію деяких побічних продуктів. За використання гідролізату багаси маніоки з концентрацією загального цукру 40 г/л, після 12 днів, змішана культура показала вихід біомаси та ліпідів –  $31,45 \pm 4,93$  г/л та  $18,47 \pm 3,25$  г/л, відповідно. Виділенні ліпіди в основному склалися з олеїнової та пальмітинової кислот, що вказує на потенційне застосування, наприклад, як сировина для виробництва біодизелю, косметики, харчових добавок та мастил. В результаті проведеного експерименту автори зробили висновок, що біоконверсія дешевої лігноцелюлозної біомаси за допомогою змішаних культур має високий потенціал для вирішення одночасно кількох потреб, включаючи захист навколишнього середовища, зменшення глобального антропогенного парникового ефекту, а також дешевого субстрату для виробництва ліпідів.

В останні роки гетеротрофне культивування розглядається як перспективний підхід для ефективного вирощування мікроводоростей з метою отримання великої їх біомаси. При гетеротрофному вирощуванні потреба у світлі зникає, таким чином, конструкція та експлуатаційні вимоги біореактора значно спрощуються. Крім того, за рахунок асиміляції екзогенного джерела вуглецю значно посилюється ріст клітин водоростей, досягається вища щільність біомаси та коротший період культивування, а також висока щільність клітин, отримана в гетеротрофній культурі, ефективно знижує витрати на збір біомаси. Зазвичай для гетеротрофного культивування мікроводоростей як джерело вуглецю використовують глюкозу, тоді як

сахарозу важко утилізувати гетеротрофно [48]. Автори розробили нову систему сумісного культивування за допомогою змішаної культури *Chlorella pyrenoidosa* з іммобілізованими *Saccharomyces cerevisiae* в темряві для ефективного отримання чистої водоростевої суспензії з використанням сахарози як єдиного джерела вуглецю [48]. У цій системі, після 4 днів вирощування, автори отримали чисту суспензію водоростей з концентрацією біомаси 2,08 г/л та вмістом ліпідів 29%, що було вище, ніж у системі, що містила глюкозу (1,62 г/л та 25,2% відповідно). Крім того, іммобілізовані дріжджові клітини тричі повторно використовували. Автори зазначають, що така стратегія може ефективно знизити вартість джерела вуглецю при гетеротрофному вирощуванні мікрводоростей.

Метою дослідження авторів було створення синтетичної системи шляхом поєднання фототрофного сахарозосекретуючого *S. elongatus* зі штамми дріжджів, здатними продукувати побічні продукти метаболізму, в тому числі прекурсори жирних кислот для виробництва біопалива [49]. Не менш важливим завданням було визначити, чи може присутність гетеротрофного дріжджового партнера бути корисним для фототрофного біологічного агента. Серед трьох видів досліджуваних дріжджів *R. glutinis* і *C. curvatus* ефективно росли і використовували сахарозу, вироблену *S. elongatus*, тоді як ріст *S. cerevisiae* сильно залежав від рівня сахарози. Загальний вихід ліпідів при сумісному культивуванні *S. elongatus* і *R. glutinis* був на 50% вищими порівняно з монокультурою *S. elongatus*, при культивуванні ко-культури протягом 4 днів, максимальне накопичення біомаси склало 0,8 г/л, а концентрація ліпідів 0,03 г/л. Автори також оцінили вплив спільного культивування з *R. glutinis* на ріст *S. elongates* та зменшення утворення пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), який утворюється під впливом світла та хімічних речовин, присутніх у поживному середовищі та виявили, що *R. glutinis* не тільки сприяла росту *S. elongates*, але й поступово виводила  $H_2O_2$  з поживного середовища. Жирнокислотний склад ліпідів ко-культури показав підвищений рівень пальмітолеїнової та лінолевої кислот.

Сумісне культивування має багато переваг, однією з яких є можливість виробництва декількох цільових продуктів одночасно [50]. Астаксантин, який має широкий спектр потенційних застосувань (наприклад, функціональні харчові добавки, косметика та фармацевтика), привертає велику увагу через свої протипухлинні та антиоксидантні властивості, водночас ліпіди можуть бути використані як сировина для виробництва біодизелю, косметики, дієтичних добавок та мастил. Метою дослідження авторів було дати нове розуміння виробництва цінних мікробних метаболітів змішаною культурою *Chromochloris zoofingiensis* та *Xanthophyllomyces dendrorhous*, які є типовими мікроорганізмами, здатними одночасно накопичувати цінний астаксантин та ліпіди [50]. Порівняно з чистою культурою *C. zoofingiensis*, у змішаній культурі було отримано посилене продукування ліпідів та астаксантину. Максимальний вихід астаксантину та ліпідів, досягнутий після 12 днів культивування у змішаній культурі у співвідношенні 3:1 (водорості до дріжджів), становив 5,50 мг/л та 2,37 г/л відповідно, що в 1,10 та 2,72 рази більше, ніж у монокультурі *C. zoofingiensis*. Крім того, ліпіди, отриманий зі змішаної культури, мали жирнокислотний склад, подібний до рослинної олії, що є прийнятним для виробництва біодизелю.

Високі енерговитрати, необхідні для збирання біомаси після культивування, ставлять під сумнів економічну доцільність комерціалізації мікробних ліпідів. Біомасу від води можна виділити за допомогою центрифугування та мікрофільтрація. Однак ці методи споживають надзвичайно велику кількість енергії. Технологія іммобілізації є цікавою технікою для спрощення відділення біомаси від води, їх можна зібрати простим методом просіювання без великих енерговитрат. Найпоширенішим способом іммобілізації є метод гелевого захоплення, в якому використовують переважно природні полісахариди, такі як агар, карагинани та альгінати. Іммобілізація в альгінатних гелевих кульках є недорогою і легкою у виконанні, а також забезпечує сприятливі умови для росту, тому є актуальною для

промислового застосування. Біомасу можна легко відокремити від альгінату, розчинивши їх в карбонаті натрію перед центрифугуванням [51].

У своєму дослідженні автори зробили спробу підвищити біомасу та ліпідну продуктивність маслянокислих дріжджів *Trichosporonoides spathulata* шляхом сумісного культивування з мікроводоростями *Chlorella* spp., оптимізації умов культивування та інкапсуляції їх в альгінатні гелеві кульки [51]. Поживне середовище для культивування містило 10 % сирого гліцерину та 0,5 % сульфату амонію. Інкапсуляція відбувалася наступним чином: культуральний бульйон, що містив дріжджі та мікроводорості, змішували зі стерильним поживним середовищем та 4% розчином альгінату натрію у об'ємному співвідношенні 3:1, після чого суміш екструдували по краплях через голку з плоским кінцем в стерильний 2% розчин хлориду кальцію і перемішували. Коінкапсульовані мікроорганізми вносили в культуральне середовище в концентрації 5% (об/об). Загальна біомаса та ліпіди в ко-культурі з контролем рН 6,0 після 72 год культивування в оптимізованих умовах складала 12,2 та 5,74 г/л, відповідно. Система моніторингу розчиненого кисню в біореакторі показала, що мікроводорості ефективно виконували роль постачальника кисню для дріжджів. Дослідження авторів також показало, що спільно інкапсульовані дріжджі та мікроводорості можуть рости і виробляти ліпіди так само, як і їхні вільні клітини, таким чином, метод інкапсуляції можна застосовувати для виробництва ліпідів і спрощення подальшого процесу збору врожаю. Ця система сумісних культур продукувала ліпіди з високим вмістом насичених жирних кислот, що вказує на її потенціал для використання в якості сировини для виробництва біодизеля.

Автори досліджували виробництво біомаси та ліпідів ко-культури мікроводоростей та дріжджів використовуючи стічні води виноробного заводу в якості субстрату, а також порівнювали з біомасою та ліпідоутворенням чистих культур, зокрема, їхнє дослідження було проведено для порівняння ліпідного та жирнокислотного складу *Chlorella vulgaris* та *Rhodotorula glutinis*, культивованих у фотоавтотрофних та гетеротрофних умовах [52]. Завдяки

спільному культивуванню дріжджів та мікроводоростей протягом 10 днів, культура дала найбільшу кількість клітин ( $27,73 \times 10^5$  клітин/мл) та біомасу (0,808 г/л). Продукція ліпідів у ко-культурі (117,73 мг/л) була в чотири рази вищою, ніж у фотоавтотрофній чистій культурі *C. vulgaris* (23,1 мг/л). Вміст пальмітинової кислоти у ко-культурі (C16:0) становив 24,65%, тоді як вміст олеїнової кислоти (C18:1) – 56,34%, що було вище, ніж в чистих культурах. Результати дослідження авторів вказують на те, що сумісні культури можуть бути використані для підтримки росту мікроорганізмів і як підхід до ефективного збільшення виробництва біодизельного палива.

Метою дослідження авторів було вивчення потенціалу підвищення ліпідної продуктивності маслянокислих дріжджів *Rhodospiridium toruloides* у змішаній культурі з мікроводоростями *Chlorella pyrenoidosa* використовуючи змішані в пропорції 1:1 муніципальні стічні води та води, отримані з лікеро-горілчаного заводу, а також дослідження пов'язаної з цим ефективності видалення органічних речовин та поживних речовин (азоту і фосфору), присутніх у стічних водах [53]. Початкове хімічне споживання розчинного кисню (ХСК) під час культивування було близько 25000 мг/л, початкова клітинна щільність 2107 клітин/мл (дріжджі) та 5106 клітин/мл (мікроводорості), при температурі 30°C. Вміст ліпідів та вихід ліпідів ко-культури становили  $63,45 \pm 2,58\%$  та  $4,60 \pm 0,36$  г/л, в той час як чиста культура дріжджів дала вихід ліпідів тільки 3,0 г/л, а чиста культура мікроводорості – 1,9 г/л. Відповідна ефективність видалення ХСК, загального азоту та загального фосфору ко-культури становила  $95,34 \pm 0,07\%$ ,  $51,18 \pm 2,17\%$  та  $89,29 \pm 4,91\%$ , відповідно, після 5 днів культивування без корекції рН. Оскільки ріст дріжджів *R. toruloides* підвищив рН змішаних стічних вод до рівня, придатного для мікроводорості *C. pyrenoidosa*, інокуляція мікроводорості через 40 годин після початкового культивування дріжджів дозволила заощадити хімічні речовини для коригування рН порівняно з чистою культурою мікроводорості. Автори зробили висновок, що підхід з

використанням сумісної культури є доцільним для покращення виробництва ліпідів зі змішаних стічних вод.

Дослідження, представлене авторами, спрямоване на вивчення впливу спільного культивування маслянокислих дріжджів *Rhodotorula glutinis* та мікродорості *Scenedesmus obliquus* на виробництво біомаси та загальних ліпідів у фотобіореакторі об'ємом 5 літрів [54]. *Rhodotorula glutinis* – це маслянокислі дріжджі, які можуть використовувати широкий спектр органічних матеріалів, накопичуючи велику кількість ліпідів, *Scenedesmus obliquus* – мікродорість, яка може бути одним з найперспективніших продуцентів мікробних олій завдяки своїй здатності до швидкого росту та здатності виробляти ліпідів в природних умовах. Біомаса та виробництво ліпідів у змішаній культурі були порівняні з такими у чистих культурах. У цій сумісній культурі мікродорості потенційно діють як генератор кисню для росту аеробних дріжджів, в той час як дріжджі взаємно постачають вуглекислий газ мікродоростям. Результати спільного культивування протягом 4 днів показали, що біомаса становила 10 г/л (збільшилася на 40-50% порівняно з чистими культурами), а загальний вміст ліпідів – 24% (зріс на 60-70%). Окрім синергетичного ефекту від утилізації газу, забезпечення мікроелементами один одного після лізису природних клітин було визнано ще однією перевагою для зростання всієї системи спільного культивування.

Дослідження, представлені статті авторів, були проведені з метою вдосконалення виробництва біодизельної сировини у вигляді суміші маслянокислих дріжджів та мікродоростей, вирощених на стічних водах заводу з переробки морепродуктів, як підходу до інтеграції потоків відходів [45]. Змішана культура представлена маслянокислими дріжджами *Rhodotorula glutinis* та мікродоростями *Chlorella vulgaris* показала кращий ріст біомаси та виробництво ліпідів, ніж у чистих культурах. Автори аргументували це тим, що мікродорості діяли як генератор кисню для дріжджів, в той час як дріжджі забезпечували мікродорості вуглекислим газом, і обидві культури одночасно продукували ліпідів. Оптимальними умовами для виробництва

ліпідів сумісною культурою визнано наступні: співвідношення дріжджів і мікроводоростей 1:1; початковий рН 5,0; концентрація меляси 1%; інтенсивність світла 5,0 люкс при 16:8-годинному світловому і темновому циклах. За цих умов найбільша біомаса  $4,63 \pm 0,15$  г/л і концентрація ліпідів  $2,88 \pm 0,16$  г/л були отримані після п'яти днів культивування. Крім того, подібний до рослинної олії жирнокислотний склад ліпідів (пальмітинова кислота – 41,4%; олеїнова кислота – 27,8%) свідчить про їх високий потенціал для використання в якості сировини для біодизельного палива.

Підвищення конкурентоспроможності виробництва біодизельного палива з культур мікроводоростей вимагає застосування декількох стратегій для отримання високого вмісту ліпідів, швидкого зростання біомаси та здатності адаптуватися до різних видів навколишнього середовища з метою використання невідновлюваних джерел поживних речовин. Тому використання окремого аборигенного штаму мікроводоростей або консорціуму з природних або антропогенних об'єктів зараз розглядається як альтернатива для виробництва біопалива. У дослідженні Suastes-Rivas та співавт. вивчали часову поведінку вторинних метаболітів, що продукуються консорціумом місцевих мікроводоростей і дріжджів, виділених зі стічних вод [55]. Переважаючим видом у консорціумі був *Scenedesmus obliquus*, що становив 68% організмів. Крім того, консорціум містив ряд видів дріжджів, включаючи *Candida pimensis* (43%), *Arthroderma vanbreuseghemii* (23%), *Diaporthe aspalathi/Diaporthe meridionalis* (25%) і *Hericium americanum* (3%). Ця ко-культура мікроводоростей і дріжджів показала продуктивність біомаси  $0,06 \text{ г л}^{-1} \text{ день}^{-1}$ , з вмістом 30% (мас.) вуглеводів, 4% (мас.) білків і 55% (мас.) ліпідів. Переетерифікація ліпідів дала метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК), які включали метилпентадеканоат (1,90%), метиловий ефір цис-10-пентадеканової кислоти (1,36%), метиловий пальмітат (2,64%), метиловий пальмітолеат (21,36%), метиловий олеат (64,95%), метиловий ліноленат (3,83%) і метиловий лінолелаїдат (3,95%), що є актуальним для виробництва біодизеля

## Синтез ліпідів змішаними культурами мікрободоростей та дріжджів для виробництва біодизеля

Мікрободорості	Дріжджі	Поживне середовище	Концентрація біомаси, г/л	Концентрація ліпідів, г/л	Вміст ліпідів, % біомаси	Час культивування	Літ.
<i>Chlorella vulgaris</i> NIES-227;	<i>Yarrowia lipolytica</i> GIM 2.197	Рідкий дигестат/вода (1:1) + гліцерин	1,62	0,31	18,98	6 дн	[46]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 15-2070	<i>Rhodotorula glutinis</i> (GIM2.27)	Гідролізат багаси маніюки (40 г/л)	31,42	18,47	58,6	12 дн	[47]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> FACHB-9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Середовище BG-11 + сахароза (1%)	2,08	0,59	29	4 дн	[48]
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	<i>Rhodotorula glutinis</i> (ATCC 204091)	Середовище BG-11 + дріжджовий екстракт	0,79	0,03	4,76	4 дн	[49]
<i>Chromochloris zofingiensis</i> (ATCC 30412)	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (AS2.1557)	Модифіковане середовище Болда + глюкоза + сечовина	7,59	2,37	31,2	12 дн	[50]
<i>Chlorella vulgaris</i> TISTR 8261	<i>Trichosporonoides spathulata</i> JU4-57	Сирий гліцерин	12,2	5,74	47	5 дн	[51]
<i>Chlorella vulgaris</i> FACHB-31	<i>Rhodotorula glutinis</i> 2.704	Стічні води виноробного виробництва	0,808	0,12	15	10 дн	[52]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> FACHB-9	<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS 2.1389	Стічні води спиртового заводу + Муніципальні стічні води (1:1)	7,25	4,6	63,45	5 дн	[53]

Мікродорості	Дріжджі	Поживне середовище	Концентрація біомаси, г/л	Концентрація ліпідів, г/л	Вміст ліпідів, % біомаси	Час культивування	Літ.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Глюкоза (30 г/л)	10	2,4	24	4 дн	[54]
<i>Chlorella vulgaris</i> TISTR 8261	<i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159	Стічні води з переробки морепродуктів + м'яса	4,63	2,88	62,2	5 дн	[45]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Candida pimensis</i> ; <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> ; <i>Diaporthe aspalathi</i> / <i>Diaporthe meridionalis</i> ; <i>Hericium americanum</i>	Середовище ВВМ	0,06 г/л/день	~0,033 г/л/день	55	12 дн	[55]

## РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування

### 5.1. Характеристика ліпідів

Ліпіди – це різноманітна група органічних сполук, вони складаються переважно з жирних кислот, стеринів і складних ліпідів, таких як фосфоліпіди, гліколіпіди та сфінголіпіди. Профілі жирних кислот зазвичай включають насичені та ненасичені жирні кислоти, найпоширенішими прикладами яких є пальмітинова, стеаринова, олеїнова та лінолева кислоти. Ненасичені жирні кислоти мають вирішальне значення для підтримки плинності та гнучкості мембран, тоді як насичені жирні кислоти сприяють стабільності та цілісності клітинних мембран [56].

Ліпіди мають кілька важливих фізичних властивостей, які впливають на їхню функціональність. До них відносяться температури плавлення і кипіння та розчинність. Температура плавлення жирних кислот варіюється залежно від ступеня насиченості, насичені жирні кислоти мають вищу температуру плавлення порівняно з ненасиченими. Наприклад, пальмітинова кислота має температуру плавлення близько 63-64°C, тоді як олеїнова кислота, ненасичена жирна кислота, плавиться при температурі 13-14°C [57]. Вони, як правило, нерозчинні у воді, але розчиняються в органічних розчинниках, таких як хлороформ, метанол та етанол [58].

#### *Використання ліпідів*

Ліпіди, зокрема триацилгліцерини, дуже затребувані як сировина для виробництва біодизеля. Біодизель, це альтернатива викопним видам палива, який виробляється шляхом переетерифікації жирних кислот на метилові ефіри. Біодизель, отриманий з ліпідів, має перевагу завдяки наявності ненасичених жирних кислот, які мають нижчу температуру плавлення, що підвищує текучість палива, покращуючи його експлуатаційні характеристики

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін Є.А.			РОЗДІЛ 5. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					47	5
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

при більш низьких температурах [59].

У харчовій промисловості ліпіди відіграють важливу роль як емульгатори, стабілізатори та підсилювачі смаку. Фосфоліпіди та гліколіпіди використовуються для створення стабільних емульсій, які необхідні для таких продуктів, як майонез, салатні заправки та морозиво. Ці емульгатори допомагають підтримувати однорідну текстуру і запобігають розшаруванню масляної та водної фаз у цих продуктах [60].

У фармацевтичній промисловості ліпіди є невід'ємною частиною розробки ліпосомальних систем доставки ліків. Амфіпатична природа дріжджових фосфоліпідів робить їх ідеальними для формування стабільних ліпосом, які можуть підвищити біодоступність і терапевтичну ефективність ліків. Крім того, ліпіди використовуються в рецептурах місцевих кремів і мазей, де вони діють як зволожуючі агенти, покращуючи поглинання і утримання активних інгредієнтів в шкірі [61].

В косметичній промисловості вони використовуються у формулах засобів для догляду за шкірою та волоссям завдяки своїм пом'якшувальним і зволожуючим властивостям. Ліпіди, а саме кераміди та сфінголіпіди, допомагають відновити природний бар'єр шкіри, утримуючи вологу та захищаючи від шкідливого впливу навколишнього середовища. Вони також використовуються в продуктах проти старіння, де сприяють підтримці еластичності шкіри та зменшенню появи зморшок [62].

## **5.2. Огляд ринку біопалива**

Серед розглянутих в попередньому підрозділі сфер використання ліпідів, найбільш перспективним та затребуваним на сьогодні є застосування їх в паливній промисловості, а саме для виробництва біодизелю, оскільки виробництво цього палива є екологічно чистим, а використання ліпідів як сировини дозволяє зменшити залежність від викопних видів палива. Крім того, біодизель, виготовлений з ліпідів, виробляє менше викидів парникових газів порівняно з традиційним дизельним паливом на нафтовій основі, що сприяє зменшенню забруднення повітря та пом'якшенню наслідків зміни клімату.

Згідно останніх офіційних статистичних даних опублікованих Державною службою статистики України в 2023 році [63], впродовж 2021 року було використано 5,7 млн тон дизельного палива, зважаючи що дане значення є занадто великим, для визначення потреби яку можна задовольнити розрахунки будемо проводити по даним використаного дизельного палива в певній області. Для розрахунку оберемо Тернопільську область, в якій згідно даних Державної служби статистики України [64], за 2020 рік було використано 128 000 т дизельного палива.

Зважаючи на наявність великої кількості постачальників палива на території України, а також щорічний приріст імпорту палива [65], припустимо що серед заданого значення можливо буде задовольнити лише 10 % потреби, тоді необхідна кількість дизельного палива становить:

$$128\,000\text{ т} * 0,1 = 12\,800\text{ т}$$

Також слід врахувати наявну конкуренцію серед виробників біодизелю на території України. На сьогодні об'єми виробленого біодизелю не враховуються в статистичних даних, та складно визначити які і де в нашій країні функціонують заводи по виробництву біодизелю, однак згідно інформації розміщеної в інтернет ресурсах в Україні розміщено 14 біодизельних заводів загальною потужністю 300 000 т/рік та близько 50 невеликих підприємств які здатні виробляти приблизно 25 000 т/рік біодизельного палива [66]. Зважаючи на наявність конкуренції серед виробників біодизельного палива необхідно визначену потребу зменшити, а саме прийmemo що від розрахованої потреби можна реалізувати приблизно 2,5 %, тоді теоретично можлива потреба в біодизельному паливі становить:

$$12\,800\text{ т} * 0,015 = 320\text{ т}$$

У зв'язку з тим що виробництво біодизелю відбуватиметься з ліпідів дріжджових клітин *Yarrowia lipolytica*, необхідно врахувати що з отриманих ліпідів в ході виробничого культивування не можна отримати таку саму кількість біодизелю, через втрати в процесі переробки сировини в кінцевий продукт. На сьогодні вчені досліджують шляхи збільшення виходу кінцевого

продукту, що дозволить зменшити собівартість виробленого біодизелю, серед розглянутих наукових публікацій найбільший вихід біодизелю з ліпідів *Yarrowia lipolytica* отримано в статті [67]. В даній роботі зазначається що вихід біопалива становить 80,91 % від вмісту ліпідів в дріжджових клітинах, отже враховуючи дану інформацію розрахуємо необхідну кількість ліпідів для задоволення раніше визначеної потреби:

$$320 \text{ т} / 0,8091 = 395,5 \text{ т}$$

Для зручності подальших розрахунків переведемо дане значення в кілограми:

$$395,5 \text{ т} * 1000 = 395 \text{ 500 кг}$$

З огляду на вищенаведену інформацію, можна зробити висновок, що річна потреба у виробництва ліпідів з дріжджових клітин *Yarrowia lipolytica* становить 395 500 кг, що дозволить задовольнити невеликий сегмент ринку дизельного палива в Тернопільській області.

### 5.3. Розрахунок річної потужності виробництва ліпідів

Для визначення потужності виробництва потрібно прийняти наступні вихідні дані:

- річна потужність підприємства,  $G_{\text{гп}} = 395 \text{ 500 кг/рік}$
- кількість робочих днів у рік  $T_{\text{рд}} = 330$  днів
- концентрація ліпідів  $P_{\text{кр}} = 84,5 \text{ кг/м}^3$  (*Yarrowia lipolytica* NS432 накопичує 84,5 г/л ліпідів за 115 год культивування [68])
- сухих речовин (СР) в готовому продукті (0,9-0,95)  $СР_{\text{гп}} = 0,95$
- час виробничого циклу  $T_{\text{цк}} = 123$  год
- коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини від можливих нестерильних операцій), 1,1-1,5;  $K_1 = 1,1$
- коефіцієнт заповнення ферментера для аеробного культивування  $K_{\text{ф}} = 0,6$
- сумарні втрати при виділенні ліпідів  $E_{\text{св}} = 0,2$
- втрати культуральної рідини при біосинтезі (краплевинос), 0,05- 0,2)  $E_{\text{ф}} = 0,1$

#### Розрахунок

Кількість ферментацій на рік

$$N_{\text{цк}} = 24 \times K_1 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цк}} = 24 \cdot 1,1 \cdot 330 / 123 = 70,8$$

Округляємо до цілого в більшу сторону  $N_{\text{цк}} = 71$

Кількість ліпідів за цикл, кг/цикл

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 395\,500 / 71 = 5\,570$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію з врахуванням втрат при виділенні ліпідів  $E_{\text{св}}$ , м<sup>3</sup>

$$V_{\text{кр}} = G_{\text{цк}} \cdot C_{\text{Ргп}} / P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 5\,570 \cdot 0,95 / (84,5(1 - 0,2)) = 78,3$$

Робочий об'єм ферментера,  $V_{\text{ф}}$ , м<sup>3</sup>

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 78,3 / (1 - 0,1) = 87$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, м<sup>3</sup>

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{ф}} = 87 / 0,6 = 145 \text{ м}^3$$

## РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу

### 6.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів виділення ліпідів

Виділення та очищення цільового продукту будь-якого біотехнологічного виробництва є одним із ключових етапів, так як вибір даних етапів впливатимуть на кінцевий вихід продукту, чистоту та кінцеву вартість отриманого продукту. З врахуванням впливу стадій виділення та очищення цільового продукту на раніше перераховані показники слід проводити вибір оптимальних методів.

З огляду на те що ліпіди є сировиною для виробництва біодизелю, від кількості яких залежить кінцевий вихід отриманого продукту, під час виділення та очищення даних ліпідів слід обирати методи які забезпечують найменший показник втрат даних ліпідів, однак з урахуванням подальшої переробки ліпідів в біопаливо, яка передбачає використання додаткових стадій обробки отриманих ліпідів, показником чистоти отриманого продукту можна знехтувати, тобто ідеально чистий продукт в даному застосуванні непотрібен.

В основному виділення ліпідів з дріжджових клітин відбувається з використанням наступних етапів:

- Виділення біомаси з культуральної рідини
- Екстракція
- Концентрування екстракту

Розглянемо детальніше наведені етапи, які є необхідними для ефективного виділення ліпідів з дріжджів.

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін Є.А.			РОЗДІЛ 6. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					52	17
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

### 6.1.1. Виділення дріжджових клітин

Ліпіди знаходяться у специфічних клітинних відділах, відомих як ліпідні тільця або ліпідні краплі [69], тому першим необхідним етапом отримання ліпідів після виробничого культивування дріжджових клітин є виділення біомаси. Для видалення біомаси зазвичай використовують центрифугування або фільтрування. Розглянемо більш детально дані методи та визначимо який з даних методів є найкращим.

Центрифугування є високоефективним і швидким способом відокремлення дріжджової біомаси від культуральної рідини, але вимагає спеціалізованого обладнання і споживає велику кількість енергії.

Фільтрація є менш енергоємною і простішою у застосуванні, але може бути повільнішою і менш ефективною для культур з високою щільністю.

За один цикл ферментації зливається приблизно  $78,3 \text{ м}^3$ , зважаючи що даний об'єм є великим, а також враховуючи що вміст біомаси в культуральній рідині становить  $115,8 \text{ г/л}$ , доцільно проводити центрифугування для виділення дріжджових клітин, так як при використанні фільтруванні культуральної рідини з великим вмістом клітин постійно відбуватиметься забивання фільтрувальної мембрани, що негативно впливатиме на час проведення процесу.

Отже, процес виділення дріжджових клітин виглядатиме наступним чином, враховуючи що об'єм культуральної рідини завеликий з реактора де відбувається зберігання культуральної рідини, насосом подаватимуть порційно в центрифугу, яка буде виділяти клітини при  $2800 \text{ об/хв}$  впродовж  $15 \text{ хв}$ , отриманий супернатант направлятимуть на знешкодження, а біомасу в реактор на подальші стадії.

Отримавши осад дріжджових клітин також слід врахувати що з клітинами та буде залишкова рідина, яка містить непотрібні продукти життєдіяльності мікроорганізмів та залишки компонентів поживного середовища, що може негативно впливати на подальші етапи виділення ліпідів

тому перед подальшим етапами, необхідно провести промивання дріжджових клітин за допомогою дистильованої води, як описано в статті [70].

Процес промивання отриманого осаду після центрифугування виглядатиме наступним чином, в реактор з осадом вносять трохи більший об'єм дистильованої води перемішують та направляють в центрифугу для виділення клітин, процес центрифугування відбуватиметься як описано на попередньому етапі виділення дріжджових клітин з культуральної рідини, а саме порційно при 2800 об/хв.

### **6.1.2. Екстракція ліпідів**

В результаті попередніх етапів отримують промиті дріжджові клітини, для подальшого виділення ліпідів необхідно проводити їх екстракцію з клітин, однак ліпіди дуже міцно зв'язані в клітинній стінці тому перед процесом екстракції слід провести попередню обробку клітин, що дозволить полегшити процес екстракції та збільшити кінцевий вихід ліпідів.

Процес руйнування дріжджових клітин можна провести механічно, немеханічних, або комбінованим варіантом, розглянемо більш вживані методи [71].

До механічних способів руйнування клітин відносять, бісерний млин, гомогенізацію під високим тиском, та ультразвукову обробку, однак останню можна одразу виключити бо даний метод не підходить для дріжджових клітин, через їх міцну стінку. До немеханічних методів можна віднести ферментативний або хімічний гідроліз клітинної стінки, термічну обробку або створення осмотичного тиску. Комбіновані варіанти можуть поєднувати в собі декілька варіантів немеханічних та механічних методів.

Враховуючи що під час використання немеханічних методів, а саме ферментативного або хімічного гідролізу клітинної стінки, використовується реагент який неможливо відновити, а враховуючи великі об'єми та вартість даних реагентів даний метод є значно дорожчим в порівнянні з механічними методами так як при механічній обробці передбачається використання одного

методу з великою кількістю повторів. Отже, можна зробити висновок що оптимальним варіантом буде використання механічних методів.

Для визначення оптимального методу руйнування клітин механічними методами розглянемо наукові статті, так наприклад в статті проводиться порівняння найбільш вживаних методів попередньої обробки біомаси перед проведенням екстракції, а саме проводиться порівняння бісерного млину, ультразвукової та термічної обробки, а також ліофілізації [72]. В результаті експериментів було встановлено що найбільш оптимальним варіантом попередньої обробки біомаси є використання бісерного млину так як в даному випадку даний метод дозволяє отримати вихід ліпідів на рівні з ліофілізацією однак час та енерговитрати затрачені на даний процес є значно меншими.

В статті [73], розглядається послідовне використання бісерного млину та гомогенізації під високим тиском, що в подальшому покращує кінцевий вихід ліпідів, незважаючи на той факт що вихід ліпідів при використанні даного методу є кращим в порівнянні з використанням одного бісерного млина, використання його в нашому випадку не є доцільним через великі об'єми дріжджових клітин, та затрачувану велику кількість додаткового часу та енергії на додатковий етап руйнування клітин.

Отже, процес руйнування дріжджових клітин перед екстракцією виглядатиме наступним чином промиті дріжджові клітини направляють в бісерний млин який завантажений скляними кульками, враховуючи великий об'єм біомаси процес руйнування клітин відбуватиметься порційно по 10 хв при 480 об/хв. Отримані подрібнені клітини направляють на подальші стадії.

Процес екстракції ліпідів з клітин можна проводити з використання різноманітних органічних розчинників однак необхідно врахувати що процес потрібно проводити з використання органічних розчинників які дозволятимуть екстрагувати необхідні ліпіди. Для подальшого обрання оптимального методу виділення ліпідів з подальшим виробництво біодизелю розглянемо наявні статті в яких відбувається екстракція ліпідів для біодизелю.

В статті [74] екстракцію ліпідів для подальшого виробництва біодизелю проводять з використанням розчину гексан/ізопропанол у співвідношенні 5:3. Даний варіант дозволяє виділити майже всі ліпіди так як отриманий екстрагент складається з полярного та неполярного розчинника.

В статті [75] проводять порівняння методів екстракції ліпідів, а саме екстракцію Соклета, прискорену екстракцією розчинником та екстракція діоксидом вуглецю при надкритичному тиску з використанням етанолу як супутнього розчинника. В результаті порівняння зазначених методів було встановлено що оптимальним варіантом є використання екстракції діоксидом вуглецю при надкритичному тиску з використанням етанолу як супутнього розчинника, даний метод в порівнянні з іншими розглянутими дозволив отримати значно більшу кількість ліпідів. Одна враховуючи складність проведення даних процесів та необхідність використання великої кількості енергії як для нагрівання так і для створення надлишкового тиску, а також додаткового спеціального обладнання, даний варіант екстракції ліпідів є значно гіршим в порівнянні з попереднім методом.

В статті [70] для екстракції ліпідів, спочатку клітини витримували впродовж ночі в етанолі, потім підкислюють розчин та в подальшому проводять екстракцію гексаном, однак даний метод має декілька етапів та є занадто довгим що в порівнянні з іншими розглянутими варіантами є недоцільним у використанні.

Підсумовуючи, серед розглянутих варіантів оптимальним буде використання розчину гексан/ізопропанолу для екстракції ліпідів з дріжджових клітин так як він є найпростішим та найшвидшим.

Отже, процес екстракції виглядатиме наступним чином, в реактор з подрібненими клітинами вносять розчин гексан/ізопропанолу, вміст реактору нагрівають до 50 °C та інтенсивно перемішують впродовж 60 хв, в подальшому отриманий розчин направляють в екстрактори де відбувається відстоювання та розділення отриманого розчину на дві фази, в верхній фазі

знаходиться екстраговані ліпідів, в нижній фазі подрібнені клітини. Виділені екстраговані ліпіди направляють на подальші стадії.

Враховуючи що під час екстракції ліпідів використовувалась велика кількість органічного розчинника, для зручності проведення подальших етапів доцільно буде провести концентрування розчину, для зменшення його об'ємів. Враховуючи що більша частина розчину становить гексан/ізопропанол, процес концентрування доцільно проводити в вакуум- випарній установці, що дозволить випарити велику кількість екстрагенту, який в подальшому можна направити на відновлення та повторне використання, що позитивно впливатиме на собівартість отриманого продукту.

Отже, отриманий екстракт ліпідів направляють в вакуум-випарну установку, де відбувається випарювання надлишкової кількості екстрагента при 40 °C та 0,04 МПа. По завершенню процесу отриманий концентрат направляють в реактор де відбувається його зберігання до подальшого використання, а випарений екстрагент направляють на відновлення.

## **6.2. Обґрунтування вибору процесів виробництва біодизелю**

Отримані концентровані ліпіди можна фасувати та направляти на реалізацію з метою подальшого виробництва біодизелю, однак враховуючи що подальші етапи виробництва біодизелю не є важкими, а більша частина необхідного обладнання для проведення даного виробництва вже використовується під час процесів післяферментаційного виділення ліпідів, доцільно власноруч провести виробництво біодизелю з виділених ліпідів, що в подальшому дозволить отримати продукт з доданою вартістю та дозволить реалізувати товар з більшою окупністю для виробництва.

Виробництво біодизелю з ліпідів передбачає наявність наступних етапів: виробництво біодизелю з ліпідів, очищення біодизелю, пакування готового продукту.

### 6.2.1. Виробництво біодизелю

Першим етапом виробництва біодизелю з отриманих ліпідів є процес переетерифікації ліпідів. Даний процес полягає в утворенні метилових ефірів (біодизель) з ліпідів та метанолу і каталізатору.

В статті [76] переетерифікацію проводили за допомогою метанолу та додатково внесеної сульфатної кислоти в різній концентрації яка слугувала в якості каталізатору процесу. В ході досліджень було встановлено, що оптимальним варіантом є використання 2 % сульфатної кислоти від об'єму метанолу, в порівнянні з іншими концентраціями дана демонструє більший вихід біодизелю.

В статті [70] порівнювали використання різних каталізаторів під час процесу етерифікації метанолом, а саме сульфатну кислоту та натрію калію, в ході порівняння було визначено що найбільша кількість біодизелю утворюється при використанні сульфатної кислоти.

Отже, підсумовуючи наведену інформацію в розглянутих статтях процес переетерифікації ліпідів, відбуватиметься наступним чином, до концентрованих ліпідів вносять метанол та сульфатну кислоту в кількості 2 % від об'єму метанолу, після внесення компонентів вміст реактору нагрівають до 55 °C та витримують при заданій температурі при постійному перемішуванні впродовж 2 год. По завершенню процесу розчин залишають в реакторі та дають йому охолонути до кімнатної температури, та після охолодження направляють на подальші етапи виробництва.

В результаті етерифікації отримують розчин в якому знаходиться біодизель, гліцерин, метанол, каталізатор та домішки, в подальшому щоб отримати біодизель придатний до реалізації його необхідно виділити з даного розчину. В статтях [70, 74, 76], для виділення біодизелю використовують гексан, даний органічний розчинник є чудовим варіантом так як біодизель з легкістю розчиняється в гексані, в той час як гліцерин та інші компоненти нерозчинні в гексані. Отже, наступним етапом після етерифікації, є виділення біодизелю з розчину за допомогою гексану. Процес виділення біодизелю

виглядатиме наступним чином в розчин з біодизелем вносять 2 кратний об'єм гексану проводять інтенсивне перемішування, та направляють отриманий розчин на відстоювання, після 2 год відстоювання, розчин поділяється на дві фази, верхня фаза містить гексан з біодизелем, а нижня усі інші домішки, верхню фазу направляють в реактор де відбувається зберігання до подальшого використання.

В статті процес екстрагування біодизелю проводять двічі що дозволяє отримати максимальну кількість продукту, отже доцільно також провести повторну екстракції з нижньої фази в якій знаходяться побічні продукти етерифікації та залишкова кількість біодизелю.

Отже, після першого виділення біодизелю, нижню фазу направляють в реактор в який в подальшому повторно вносять гексан та інтенсивно перемішують і в подальшому направляють в екстрактори для відстоювання. Верхню фазу направляють в реактор до розчину отриманого з першого виділення, а отриману нижню фазу після 2 повторів виділення біодизелю направляють на відновлення, так як в даному розчині знаходиться гліцерин та метанол які в подальшому можна використати на потреби виробництва.

### **6.2.2. Очищення біодизелю**

В результаті етапів виробництва біодизелю ми отримуємо неочищений продукт, який має залишкову вологу та велику концентрацію гексану, для отримання готового до реалізації біодизелю необхідно видалити залишкову вологу та прибрати надлишковий гексан.

Для видалення надлишкової вологи, в статті [70] використовують безводний сульфат натрію, дана сіль чудово підходить в нашому випадку. Суть процесу дегідратації за допомогою безводного сульфату натрію полягає в внесенні даної солі яка поглинає молекули води. Враховуючи розчинність сульфату натрію в гексані, а дана сіль нерозчинна в гексані, концентрація якого на даному етапі є надлишковою даний варіант є оптимальним, так як в подальшому дана сіль не буде в ньому розчинятись та при поглинанні надлишкової вологи випадатиме в осад, який в подальшому можна легко

видалити. Також дана сіль доволі легко відновлюється до безводної форми, шляхом нагрівання, що дозволяє її використовувати багато разів, що позитивно впливатиме на собівартість продукту.

Отже, процес дегідратації виглядатиме наступним чином, до розчину отриманого на попередніх етапах вносять безводний сульфат натрію, вміст реактора ретельно перемішують для рівномірного розподілу компонентів та в подальшому направляють на етап виділення осаду сульфату натрію шляхом фільтрування в мембранному-фільтр пресі. Отриманий фільтрат (безводний біодизель) направляють на подальші стадії очищення, а отриманий осад сульфату натрію направляють на відновлення, з метою подальшого використання.

Враховуючи використання в попередніх етапах вакуум-випарну установку гексан можна видалити шляхом концентрування розчину в даній установці, що дозволить зменшити економічні витрати на придбання додаткового обладнання.

Отже, процес видалення гексану виглядатиме наступним чином, безводний біодизель направляють в вакуум-випарну установку де відбувається видалення гексану, при температурі 65 °С, та 0,034 МПа. Випарений гексан направляють на відновлення для подальшого повторного використання, а отриманий концентрат (біодизель) направляють на останню стадію пакування.

### **6.2.3. Пакування та зберігання біодизелю**

Заключним етапом процесу виробництва біодизелю з дріжджових ліпідів є пакування та маркування отриманого продукту, процес пакування відбувається з урахуванням властивостей продукту, а саме відношення до світла, навколишнього середовища та взаємодії з пакувальними матеріалами.

Упаковка біодизелю відіграє важливу роль у захисті продукту від зовнішніх впливів, таких як кисень, світло та волога, які можуть призвести до окислення або гідролізу метилових ефірів жирних кислот – основного компонента біодизелю. Для транспортування та зберігання біодизелю

зазвичай використовуються металеві або пластикові бочки, герметичні контейнери IBC (міжнародні контейнерні бочки) та стаціонарні резервуари. Останні часто обладнані системами для підтримання стабільної температури та вологості, що дозволяє зберігати біодизель у належному стані протягом тривалого часу.

Зберігання біодизелю також вимагає врахування умов температурного режиму (до 25°C), а також мінімізації доступу ультрафіолетового випромінювання. Контакт із вологою може спричинити утворення осаду або підвищення кислотного числа, що погіршує якість продукту. Включення антиоксидантів до складу пального є одним із сучасних методів подовження терміну зберігання та збереження його експлуатаційних характеристик.

З огляду на ці фактори, металеві бочки є найбільш оптимальний варіант тари. Металеві бочки мають високу міцність і стійкість до корозії, особливо якщо вони покриті захисним покриттям. Вони є відмінним бар'єром для світла та кисню, ефективно запобігаючи окислювальній деградації біодизеля під час зберігання і транспортування. Окрім того, металеві бочки є герметичними, що допомагає зберегти якість біодизеля, мінімізуючи контакт з вологою.

В результаті аналізу різних можливостей, було зроблено висновок, що оптимальним буде проводити пакування біодизеля у металеві бочки об'ємом 200 дм<sup>3</sup> з вузькою горловиною, що стандартним підходом, визначеним відповідно до вимог ISO EN 14214 та ДСТУ 6081. Така тара забезпечує оптимальні умови для транспортування та зберігання продукту, мінімізуючи вплив факторів, що можуть вплинути на якість пального. Металеві бочки забезпечують герметичність, захист від впливу ультрафіолетового випромінювання, проникнення вологи та кисню, що знижує ризик окислювальних процесів у біодизелі.

Згідно з даними зазначених нормативних документів, вузька горловина металевих бочок сприяє зручності переливання та запобігає значному контакту з повітрям під час експлуатації. Крім того, металева тара має високу міцність, що знижує ризик пошкодження під час транспортування навіть за

несприятливих умов, таких як тряска або механічний вплив. Важливим аспектом є і хімічна інертність матеріалів бочок: сталь, що використовується для виготовлення, покрита антикорозійними покриттями, що запобігає взаємодії з паливом і не впливає на його якість.

Отже, отриманий біодизель направляють в автоматичну лінію розливу рідини, яка призначена для бочок об'ємом 200 л, де відбувається автоматичний розлив біодизелю та подальше герметичне закривання бочки. В подальшому бочки з біодизелем маркуються з обов'язковим нанесенням маніпуляційного знака «Берегти від нагрівання» та, для можливості подальшого перевезення, відповідною класифікацією транспортної небезпеки вантажу згідно з ДСТУ 4500-3 «Вантажі небезпечні. Класифікація» (клас 3, підклас 3.3, класифікаційний шифр 3313). В подальшому запакований біодизель направляється на склад де відбувається зберігання до подальшого збуту.

### **6.3. Підбір технологічного обладнання з урахуванням матеріальних потоків по стадіях**

Підбір технологічного обладнання для стадій виділення ліпідів наведений в таблиці 6.1.

Вихідні дані:

Об'єм культуральної рідини за один цикл ферментації = 93,9 м<sup>3</sup>.

Концентрація ліпідів = 84,5 г/л

Концентрація біомаси в культуральній рідині = 115,8 г/л

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях виробництва біодизелю

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ДР 1. Зберігання культуральної рідини</b>						
1	ДР 1.1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	78,3 м <sup>3</sup>		78,3 м <sup>3</sup>	Реактор об'ємом 100 м <sup>3</sup>
<b>ДР 2. Приготування допоміжних розчинів на технологічний процес</b>						
2	ДР 2.1. Приготування екстрагенту	Гексан	102 000 л			2 реактори об'ємом 100 м <sup>3</sup>
		Ізопропанол	61 200 л			
		Екстрагент (Гексан/ізопропанол)			163 200 л (102 000 л + 61 200 л)	
3	ДР 2.2. Приготування підкисленого метанолу	Метанол	17 076 л			Реактор об'ємом 20 м <sup>3</sup>
		Сульфатна кислота	348 л			
		Підкислений метанол			17 424 л (17 076 л + 348 л)	
<b>ТП 3. Виділення дріжджових клітин</b>						
4	ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	78,3 м <sup>3</sup>			Центрифуга з продуктивністю 30 м <sup>3</sup> /год
		Супернатант	42 031 л (78 300 – 36 269)			
		Біомаса	36 269 л (78,3 м <sup>3</sup> * 115,8 / 0,25)	907 л (2,5 %)	35 362 л (36 269 л – 907 л)	
5	ТП 3.2. Промивання біомаси	Біомаса	35 362 л			Реактор об'ємом 100 м <sup>3</sup>
		Дистильована вода	40 000 л			
		Супернатант	42 500 л			Центрифуга з продуктивністю 30 м <sup>3</sup> /год
		Промита біомаса	32 862 л	822 л (2,5 %)	32 040 л (32 862 л – 822 л)	

<b>ТП 4. Екстракція ліпідів</b>						
6	ТП 4.1. Подрібнення клітин в бісерному млині	Промита біомаса	32 040 л			Бісерний млин з продуктивністю 3 м <sup>3</sup> /год
		Подрібнені клітини		640 л (2 %)	31 400 л (32 040 л – 640 л)	
7	ТП 4.2. Екстракція ліпідів органічним розчинником	Подрібнені клітини	31 400 л			2 реактори об'ємом 100 м <sup>3</sup>
		Екстрагент (Гексан/ізопропанол)	163 200 л			
		Об'єднаний розчин	194 600 л (31 400 + 163 200)			
		Екстраговані ліпіди (Верхня фаза)	161 000 (194 600 л – 33 600 л)	1 610 л (1 %)	159 390 л (161 000 л – 1 610 л)	3 екстрактори об'ємом 10 м <sup>3</sup>
		Клітини (Нижня фаза)	33 600 л			
9	ТП 4.4. Концентрування супернатанту	Супернатант	159 390 л			Вакуум-випарна установка з продуктивністю по випареній волозі 19,6 м <sup>3</sup> /год
		Випарений розчинник	150 535 л (159 390 л – 8 855 л)			
		Концентровані ліпіди	8 855 л (159 390 л / 18)	143 л (1,6 %)	8 712 л (8 855 л – 143 л)	
<b>ТП 5. Виробництво біодизелю</b>						
10	ТП 5.1. Етерифікація ліпідів	Концентровані ліпіди	8 712 л			Реактор об'ємом 30 м <sup>3</sup>
		Підкислений метанол	17 424 л (8 712 * 2)			
		Розчин з метиловими ефірами			26 136 л (8 712 л – 17 424 л)	

11	ТП 5.2. Виділення біодизелю	Розчин з метиловими ефірами	26 136 л			Реактор об'ємом 40 м <sup>3</sup>
		Гексан	52 272 л (26 136 л * 2)			
		Біодизель-гексан (Верхня фаза 1)	48 000	480 (1 %)	47 520 л (48 000 л – 480 л)	4 екстрактори об'ємом 10 м <sup>3</sup>
		Побічні продукти етерифікації (Нижня фаза)	30 408	304 (1 %)	30 104 л (30 408 л – 304 л)	
12	ТП 5.3. Повторне виділення біодизелю з побічних продуктів етерифікації	Побічні продукти етерифікації	30 104 л			2 реактори об'ємом 40 м <sup>3</sup>
		Гексан	30 104 л			
		Біодизель-гексан (Верхня фаза 2)	29 000	290 (1 %)	28 710 л (29 000 л – 290 л)	4 екстрактори об'ємом 10 м <sup>3</sup>
		Побічні продукти етерифікації (Нижня фаза)	31 208			
<b>ТП 6. Очищення біодизелю</b>						
13	ТП 6.1. Дегідратація біодизелю	Біодизель-гексан (Верхня фаза 1)	47 520 л			Реактор об'ємом 100 м <sup>3</sup>
		Біодизель-гексан (Верхня фаза 2)	28 710 л			
		Безводний сульфат натрію	3 900 кг			
		Неочищений біодизель			82 630 л (47 520 л + 28 710 л + 3 900)	
14	ТП 6.2. Видалення осаду сульфату натрію	Неочищений біодизель	82 630 л			Мембранний фільтр прес
		Осад сульфату натрію	7 900 л			
		Безводний біодизель	74 730 л (82 630 л – 7 900 л)	1 868 л (2,5 %)	72 862 л (74 730 л – 1 868 л)	

15	ТП 6.3. Видалення гексану	Безводний біодизель	72 862 л			Вакуум-випарна установка з продуктивністю по випареній волозі 19,6 м <sup>3</sup> /год
		Випарений гексан	68 257 л (72 862 л – 4 605 л)			
		Біодизель	4 605 л	138 л (3 %)	4 467 л (4 605 л – 138 л)	
<b>ПМВ 7. Пакування та маркування біодизелю</b>						
16	ПМВ 7.1. Фасування біодизелю	Біодизель	4 467 л			Автоматична лінія розливу рідини в бочки по 200 л з продуктивністю 8 м <sup>3</sup> /год
		Металеві бочки 200 л	22			
		Готовий до реалізації біодизель			22 бочки (4 467 / 200)	

## 6.4. Специфікація виробничого обладнання

Таблиця 6.2

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
P-1 P-4 P-9 P-11 P-13 P-15 P-23 P-25 P-47	Реактор	9	Реактор об'ємом 100 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [77]
H-2 H-5 H-10 H-12 H-14 H-16 H-24 H-26 H-48	Насос відцентровий	9	Насос відцентровий CM 200-150-400/46, з продуктивністю 300 м <sup>3</sup> /год [78]
Ц-3	Центрифуга	1	Центрифуга LWY650 з продуктивністю 30 м <sup>3</sup> /год, швидкість обертання 2800 об/хв, габаритні розміри 6000×1550×1800 мм [79]
P-6 P-33 P-43 P-45	Реактор	3	Реактор FCH40000 об'ємом 40 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [80]
H-7 H-34 H-44 H-46	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий BGWH 150-315(I) (200/32), з продуктивністю 200 м <sup>3</sup> /год [81]
БМ-8	Бісерний млин	1	Бісерний млин EDW-400, з продуктивністю 3 м <sup>3</sup> /год, швидкістю обертання 480 об/хв, габаритні розміри 3300x1500x2600 мм [82].
E-17 E-19 E-21 E-35 E-37 E-39 E-41	Екстрактор	4	Екстрактор об'ємом 10 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі [83]

Закінчення табл. 6.2

Н-18 Н-20 Н-22 Н-28 Н-36 Н-38 Н-40 Н-42	Насос відцентровий	5	Насос відцентровий СВ 60/N, з продуктивністю 30 м <sup>3</sup> /год [84]
ВВУ-27	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установка, з продуктивністю по випареній волозі 19,6 м <sup>3</sup> /год [85]
Р-29	Реактор	1	Реактор FCH20000 об'ємом 20 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [80]
Н-30 Н-32	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий LX WEQ750, з продуктивністю 100 м <sup>3</sup> /год [86]
Р-31	Реактор	1	Реактор FCH30000 об'ємом 30 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [80]
МФП-49	Мембранний фільтр прес	1	Мембранний фільтр-прес XZ1000/2000-30U, з об'ємом камери 20 м <sup>3</sup> , габаритні розміри 15600×3000×2500 мм [87]
Р-50	Реактор	1	Реактор FCH80000 об'ємом 80 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [80]
Н-51	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Speroni CS 80-160D, з продуктивністю 180 м <sup>3</sup> /год [88]
Р-52	Реактор	1	Реактор FYF об'ємом 6 м <sup>3</sup> , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою та мішалкою [89]
Н-53	Насос	1	Насос для дизельного палива CG-8000, з продуктивністю 48 м <sup>3</sup> /год [90]
АЛР-54	Автоматична лінія розливу	1	Автоматична лінія розливу GZM-200EX, об'єм наповнення 200 л, продуктивність 8 м <sup>3</sup> /год [91]

## РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення ліпідів

Процес післяферментаційного виділення ліпідів складається з допоміжних етапів (зберігання культуральної рідини та приготування допоміжних розчинів на технологічний процес), технологічного процесу (виділення дріжджових клітин, екстракція ліпідів, виробництво біодизелю та очищення біодизелю) а також пакування готового продукту. Зображення процесу виділення ліпідів представлено на апаратурній та технологічній схемах та представлено в графічній частині курсового проекту.

### *ДР 1. Зберігання культуральної рідини*

#### *ДР 1.1. Зберігання культуральної рідини*

Культуральну рідину отриману в результаті культивування *Yarrowia lipolytica* NS432 об'ємом 78,3 м<sup>3</sup> зберігають в реакторі об'ємом 100 м<sup>3</sup> (Р-1). Зберігання відбувається при температурі = 4 °С з періодичним перемішуванням 25 об/хв.

### *ДР 2. Приготування допоміжних розчинів на технологічний процес*

#### *ДР 2.1. Приготування екстрагенту*

На стадію екстракції ліпідів органічним розчинником (ТП 4.2) необхідно приготувати 163,2 м<sup>3</sup> екстрагента гексан/ізопропанолу, для цього в реактори об'ємом 100 м<sup>3</sup> (Р-9 та Р-11) через лічильник вносять по 51 м<sup>3</sup> гексану та 30,6 м<sup>3</sup> ізопропанолу. Помістивши компоненти в реактор вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів. Приготований розчин зберігають в реакторі до подальшого використання.

#### *ДР 2.2. Приготування підкисленого метанолу*

На стадію естерифікації ліпідів (ТП 5.1) необхідно приготувати 17 424л підкисленого метанолу, для цього в реактор об'ємом 20 м<sup>3</sup> (Р-23) через

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення ліпідів	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сенін Є.А.					69	5
Перевір.		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

лічильник вносять 17 076 л метанолу та 348 л сульфатної кислоти. Помістивши компоненти в реактор вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів. Приготований розчин зберігають в реакторі до подальшого використання.

### ***ТП 3. Виділення дріжджових клітин***

#### ***ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини***

Культуральну рідину (від ДР 1.1) з реактор (Р-1) за допомогою відцентрового насоса (Н-2) направляють в центрифугу (Ц-3), для виділення дріжджових клітин. Процес виділення клітин з культуральної рідини проводять поетапно в центрифугі з продуктивністю 30 м<sup>3</sup>/год, центрифугування однієї партії проводять при 2800 об/хв, впродовж 15 хв. Отриманий супернатант направляють на знешкодження, а осад поміщають в реактор об'ємом 100 м<sup>3</sup> (Р-4).

#### ***ТП 3.2. Промивання біомаси***

В реактор (Р-4) з виділеною біомасою через лічильник вносять 40 м<sup>3</sup> дистильованої води. Після внесення води в реакторі вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) на 20 хв, для рівномірного розподілу компонентів. По завершенню перемішування, отриманий розчин частинами направляють в центрифугу (Ц-3). Процес центрифугування проводять при 2800 об/хв, впродовж 15 хв. Отриманий супернатант направляють на знешкодження, а осад поміщають в реактор об'ємом 40 м<sup>3</sup> (Р-6).

### ***ТП 4. Екстракція ліпідів***

#### ***ТП 4.1. Подрібнення клітин в бісерному млині***

Отриману промиту біомасу (від ТП 3.2) об'ємом 32,04 м<sup>3</sup> за допомогою відцентрового насосу (Н-7) направляють в бісерний млин (БМ-8), який завантажений скляними кульками. Клітини направляють в млин партіями та проводять процес подрібнення впродовж 10 хв, при 480 об/хв. По завершенню процесу отримують 31,4 м<sup>3</sup> подрібнених клітин, однак даний об'ємом ділять навпіл, тобто по 15,7 м<sup>3</sup>, та завантажують в два реактори об'ємом 100 м<sup>3</sup> (Р-13 та Р-15).

### ***ТП 4.2. Екстракція ліпідів органічним розчинником***

До реакторі (P-13 та P-15) з подрібненими клітинами з реакторів (P-9 та P-11) за допомогою відцентрових насосів (H-10 та H-12) вносять по 81,6 м<sup>3</sup> екстрагенту (від ДР 2.1). Помістивши екстрагент в реактор, вміст реактора нагрівають до 50 °С та вмикають перемішуючий пристрій 100 об/хв на 60 хв, для рівномірного розподілу компонентів. В подальшому за допомогою насосів (H-14 та H-16) направляють отриманий розчин в екстрактори (E-17, E-19, E-21) по 9,2 м<sup>3</sup>, де відбувається відстоювання розчину по 1,5 год. Після розділення розчину на фази, нижню фазу зливають на знешкодження, а верхню фазу за допомогою насосів (H-18, H-20, H-22) направляють в реактори об'ємом 100 м<sup>3</sup> (P-23 та P-25), процес повторюють допоки є розчин в реакторах (P-13 та P-15).

### ***ТП 4.3. Концентрування супернатанту***

Отриманий екстракт ліпідів (від ТП 4.2) з реакторів (P-23 та P-25) за допомогою відцентрових насосів (H-24 та H-26) направляють в вакуум-випарну установку (ВВУ-27) де відбувається концентрування розчину приблизно в 17 разів шляхом випаровування екстрагенту, процес проводять при 40 °С, та 0,04 МПа. Випарений екстрагент направляють на відновлення, а отриманий концентрат ліпідів за допомогою насоса (H-28) поміщають в реактор об'ємом 30 м<sup>3</sup> (P-31), де відбувається зберігання до подальшого використання.

## ***ТП 5. Виробництво біодизелю***

### ***ТП 5.1. Етерифікація ліпідів***

В реактор (P-31) з концентрованими ліпідами з реактора (P-29) за допомогою відцентрового насоса (H-30) вносять 17,242 м<sup>3</sup> підкисленого метанолу (від ДР 2.1). Внівши метанол в реактор, вміст реактора нагрівають до 55 °С, розчин витримують при заданій температурі впродовж 2 год, при постійному перемішуванні 100 об/хв. В подальшому отриманий розчин залишають в реакторі для охолодження до кімнатної температури.

### ***ТП 5.2. Виділення біодизелю***

Половину охолодженого розчину з реактора (P-31) за допомогою відцентрового насоса (H-32) направляють в реактор об'ємом 40 м<sup>3</sup> (P-33), та через лічильник в даний реактор подають 26,136 м<sup>3</sup> гексану. Внівши компоненти в реактор в ньому вмикають перемішуючий пристрій 100 об/хв на 20 хв, для рівномірного розподілу компонентів. По завершенню перемішування, розчин об'ємом 39 204 л направляють в екстрактори (E-35, E-37, E-39 та E-41) по 9,8 м<sup>3</sup>, де відбувається відстоювання розчину впродовж 2 год. Розливши розчин з реактора (P-33) в екстрактори в ньому проводять таку ж послідовність з іншою половиною охолодженого розчину. Коли розчин в екстракторах розділився на дві фази, нижню фазу направляють на повторне виділення (до ТП 5.3), а верхню фазу направляють в реактор об'ємом 100 м<sup>3</sup> (P-47).

### ***ТП 5.3. Повторне виділення біодизелю з побічних продуктів етерифікації***

Отримавши побічні продукти етерифікації (від ТП 5.2) їх направляють в реактори об'ємом 40 м<sup>3</sup> (P-43 та P-45) по 15,05 м<sup>3</sup>, в які також через лічильник подають по 15,05 м<sup>3</sup> гексану. Внівши компоненти в реакторах вмикають перемішуючий пристрій 100 об/хв на 20 хв, для рівномірного розподілу компонентів, та в подальшому за допомогою відцентрових насосів (H-44 та H-46) повторно направляють в екстрактори (E-35, E-37, E-39 та E-41), де відбувається відстоювання розчину впродовж 2 год. Коли розчин в екстракторах розділився на дві фази, нижню фазу направляють на відновлення побічних продуктів етерифікації, а верхню фазу направляють в реактор об'ємом 100 м<sup>3</sup> (P-47).

## ***ТП 6. Очищення біодизелю***

### ***ТП 6.1. Дегідратація біодизелю***

В реактор (P-47) до 76,23 м<sup>3</sup> розчину за допомогою об'ємно вагового дозатора вносять 3,9 т безводного сульфату натрію. Внівши сіль в розчин в реакторі вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) на 20 хв, для

рівномірного розподілу компонентів. По завершенню перемішування отриманий розчин зберігають в реакторі до подальшого використання.

### ***ТП 6.2. Видалення осаду сульфату натрію***

Розчин (від ТП 6.1) з реактора (Р-47) за допомогою відцентрового насоса (Н-48) направляють в мембранний фільтр прес (МФП-49), для виділення осаду сульфату натрію. В фільтр-пресі встановлені фільтрувальні перегородки з тканиною діаметр пор яких становить 1 мкм, процес проводять при 0,15 МПа. Отриманий фільтрат направляють в реактор об'ємом 80 м<sup>3</sup> (Р-50), а осад направляють на відновлення.

### ***ТП 6.3. Видалення гексану***

Фільтрат об'ємом 72,862 м<sup>3</sup> з реактора (Р-50) за допомогою відцентрового насосу (Н-51) направляють в вакуум-випарну установку (ВВУ-28), де відбувається видалення гексану шляхом випаровування, процес проводять при 65 °С, та 0,034 МПа. Випарений екстрагент направляють на відновлення, а отриманий біодизель направляють в реактор об'ємом 6 м<sup>3</sup> (Р-52), де відбувається зберігання до подальшого використання.

### ***ПМВ 7. Пакування та маркування біодизелю***

Біодизель (від ТП 6.3) з реактор (Р-52) за допомогою насоса (Н-53) направляють в автоматичну лінію розливу рідини (АЛР-54), яка розливає біодизель в металеві бочки по 200 л. В подальшому на дані бочки наноситься маркування на якому зазначається назва продукту, дата виготовлення, номер та серія партії. Промарковані бочки направляють на склад де відбувається зберігання до подальшої реалізації.

## РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва біодизеля

Метиллові ефіри жирних кислот для дизельних двигунів (МЕЖК) – відповідно до Закону України від 14.01.2000 № 1391-XIV. Про альтернативні види палива – "метиллові та/або етилові етери вищих органічних кислот, отриманих з рослинних олій або тваринних жирів, що використовуються як паливо для дизельних двигунів". Контроль якості МЕЖК має надзвичайно важливе значення для забезпечення стабільності та якості кінцевого продукту.

У цьому розділі представлено комплексні підходи до контролю виробництва МЕЖК, що включають багатопараметричну оцінку, спрямовану на дотримання стандартів якості, встановлених європейськими та національними нормативними документами, зокрема EN 14214 та ДСТУ 6081:2009. Розглянуто методики, що дозволяють забезпечити стабільність продукції та відповідність усім необхідним вимогам для використання біодизеля в якості альтернативного палива.

Метиллові ефіри жирних кислот мають відповідати вимогам, наведеним у табл.8.1.

Таблиця 8.1

### Технічні вимоги до МЕЖК

№ з/п	Показник	Значення показника	Метод випробування
1	Масова частка ефірів, %, не менше ніж	96,5	Згідно з ДСТУ EN 14103
2	Густина за температури 15°C, кг/м <sup>3</sup> , у межах	860-900	Згідно з ДСТУ ISO 3675
3	В'язкість кінематична при 40°C, мм <sup>2</sup> /с, у межах	3,5-5,0	Згідно з ДСТУ ISO 3104
4	Температура спалаху в закритому тиглі, °C, не менше ніж	120	Згідно з ДСТУ ISO 2719

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін Є.А.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва біодизеля	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					74	25
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

5	Масова частка сірки, мг/кг, не більше ніж	10	Згідно з ДСТУ ISO 20846
6	Коксованість 10 % залишку перегонки, %, не більше ніж	0,30	Згідно з ДСТУ EN ISO 10370
7	Цетанове число, не менше ніж	51,0	Згідно з ДСТУ ISO 5165
8	Зольність, % мас., не більше ніж	0,02	Згідно з ДСТУ ISO 3987
9	Вміст води, мг/кг, не більше ніж	500	Згідно з ДСТУ ISO 8534
10	Вміст механічних домішок, мг/кг, не більше ніж	24	Згідно з ДСТУ 6370:2021
11	Випробовування на мідній пластинці (3 год за температури 50°C)	Витримує клас 1	Згідно з ДСТУ EN ISO 2160
12	Окисна стабільність за температури 110°C, год, не менше ніж	6,0	Згідно з ДСТУ EN 14112
13	Кислотне число, мг КОН на г, не більше ніж	0,50	Згідно з ДСТУ EN 14104
14	Йодне число, г йоду на 100 г, не більше ніж	120	Згідно з ДСТУ EN 14111
15	Масова частка метилового ефіру ліноленової кислоти, %, не більше ніж	12,0	Згідно з ДСТУ EN 14103
16	Масова частка метанолу, %, не більше ніж	0,20	Згідно з ДСТУ EN 14110
17	Масова частка моногліцеридів, %, не більше ніж	0,80	Згідно з ДСТУ EN 14105
18	Масова частка дигліцеридів, %, не більше ніж	0,20	Згідно з ДСТУ EN 14105
19	Масова частка тригліцеридів, %, не більше ніж	0,20	Згідно з ДСТУ EN 14105
20	Масова частка вільного гліцерину, %, не більше ніж	0,02	Згідно з ДСТУ EN 14105
21	Масова частка загального гліцерину, %, не більше ніж	0,25	Згідно з ДСТУ EN 14105
22	Масова частка лужних металів: (Na + K), мг/кг, не більше ніж	5,0	Згідно з ДСТУ EN 14108 та ДСТУ EN 14109 Згідно з ДСТУ EN 14538
	(Ca + Mg), мг/кг, не більше ніж	5,0	
23	Масова частка фосфору, мг/кг, не більше ніж	10	Згідно з ДСТУ EN 14107

### 8.1. Масова частка ефірів

Масова частка ефірів є одним із ключових параметрів контролю якості метилових ефірів жирних кислот, оскільки він визначає ступінь завершеності хімічної реакції перетворення жирних кислот у ефіри. Цей показник

відображає чистоту кінцевого продукту, що впливає на його стабільність, згоряння і загальну ефективність використання як біопалива. Контроль масової частки ефірів є критичним для забезпечення відповідності продукції стандартам якості, що дозволяє гарантувати безпечність та продуктивність біодизеля.

Даний метод – метод визначення вмісту основної речовини – складних ефірів у складних метилових ефірах жирних кислот, призначених для використання як біопаливо або як компонент змішування дизельного палива. Метод дає змогу визначити масову частку складних ефірів у МЕЖК понад 90 % мас, і масову частку метилового ефіру ліноленової кислоти в діапазоні від 1 % мас, до 15 % мас. Метод поширюється на метилові ефіри жирних кислот, що містять метилові ефіри з числом атомів вуглецю від C<sub>14</sub> до C<sub>24</sub> [92].

Визначення вмісту складних метилових ефірів жирних кислот, присутніх у зразку, проводять газовою хроматографією відповідно до ДСТУ EN 14103:2009 [92] з внутрішнім калібруванням за метилгептодеканоатом. Визначення відсоткового вмісту метилового ефіру ліноленової кислоти – методом газової хроматографії.

#### **Опрацювання результатів:**

Масову частку складного ефіру  $C$ , % мас., обчислюють за формулою:

$$C = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} * \frac{C_{EI} V_{EI}}{m} * 100,$$

де  $\Sigma A$  – сума площ піків від піка метилового ефіру C<sub>14</sub> до піка C<sub>24:1</sub>;

$A_{EI}$  – площа, що відповідає піку метилгептадеканоату;

$C_{EI}$  – масова концентрація розчину метилгептадеканоату, мг/см<sup>3</sup>;

$V_{EI}$  – використаний об'єм розчину метилгептадеканоату, см<sup>3</sup>;

$m$  – маса зразка, мг.

Масову частку метилового ефіру лінолевої кислоти  $L$ , % мас., обчислюють за формулою:

$$L = \frac{A_L}{(\Sigma A) - A_{EI}} * 100,$$

де  $A_L$  – площа, що відповідає піку метилового ефіру лінолевої кислоти;

( $\Sigma A$ ) – сума площ піків від площі піку метилового ефіру  $C_{14}$  до піка  $C_{24:1}$ ;

$A_{EI}$  – площа, що відповідає піку метилгептадеканоату.

Нормоване значення масової частки ефірів – не менше ніж 96,5%.

## 8.2. Густина

Вимірювання густини зразка проводять методом згідно з ДСТУ EN ISO 3675:2012, суть якого полягає у тому, що пробу доводять до заданої температури і переносять у циліндр. У пробу занурюють відповідний ареометр. Після досягнення температурної рівноваги відмічають показання ареометра і температуру випробуваної проби. За необхідності циліндр із випробуваним продуктом поміщають у баню із заданою постійною температурою, щоб уникнути значної похибки під час випробування. Відзначають показання ареометра за температури випробування. Потім густину приводять до температури 15°C, а відносну густину (питому вагу) і густину в градусах API приводять до температури 60°F за допомогою міжнародних стандартних таблиць [93].

### Опрацювання результатів:

Вводять відповідні поправки до показань термометра (для шкали або кульки) та ареометра (шкала). Записують скориговане показання шкали ареометра з точністю 0,0001 густини або відносної густини (питомої ваги) або 0,1° API. Після застосування відповідних поправок записують з точністю 0,5°C або 1°F середні температури, спостережувані безпосередньо до і після остаточного зняття показання ареометра.

Для отримання скоригованих значень стандартної температури слід застосовувати таблиці вимірювання параметрів нафти і нафтопродуктів по ASTM D1250.

Нормоване значення густини за температури 15°C – у межах 860-900 кг/м<sup>3</sup>.

## 8.3. В'язкість кінематична

Сутність методу визначення кінематичної в'язкості полягає у вимірюванні каліброваним скляним віскозиметром часу закінчення в секундах

певного об'єму випробовуваної рідини під впливом сили тяжіння за відомої та постійно контрольованої температури. Кінематична в'язкість є добутком виміряного часу витікання на постійну віскозиметра і виміряється згідно з ДСТУ EN ISO 3104:2022 [94].

#### **Опрацювання результатів:**

За результат випробування приймають середнє арифметичне значення результатів кінематичної в'язкості двох визначень, якщо розбіжність між ними не перевищує  $\pm 1,2$  % середньоарифметичного значення. Якщо результати вимірювання не узгоджуються – повторюють визначення.

Кінематичну в'язкість  $\nu$ , мм<sup>2</sup>/с, розраховують за формулою:

$$\nu = Ct$$

де  $C$  - постійна віскозиметра, мм<sup>2</sup>/с<sup>2</sup>;

$t$  - середньоарифметичне значення часу закінчення, с.

Нормоване значення кінематичної в'язкості за температури 40°C – у межах 3,5 - 5,0 мм<sup>2</sup>/с.

#### **8.4. Температура спалаху в закритому тиглі**

Вимірювання температури спалаху в закритому тиглі проводиться відповідно до ДСТУ EN ISO 2719:2022. Суть методу випробування температури спалаху в закритому тиглі полягає у тому, що випробувану порцію поміщають у прилад Пенскі-Мартенса, нагрівають таким чином, щоб при безперервному перемішуванні відбувалося постійне підвищення температури. Запальний пристрій підносять через отвір у кришці випробувального тигля через рівномірні проміжки часу, при цьому перемішування припиняють.

Найменша температура, за якої застосування запального пристрою спричиняє спалахування парів випробуваної порції і поширення полум'я поверхнею рідини, реєструється як температура спалаху за абсолютного атмосферного тиску. Ця температура коригується на стандартний атмосферний тиск за формулою [95].

#### **Опрацювання результатів:**

Перетворення значень атмосферного тиску.

Якщо абсолютний атмосферний тиск вимірюється в одиницях, відмінних від кілопаскалів, їх переводять у кілопаскалі.

Коригування спостережуваної температури спалаху на стандартний атмосферний тиск.

Обчислюють скориговану температуру спалаху  $T_c$  за формулою:

$$T_c = T_d + 0,25 * (101,3 - p),$$

де  $T_d$  – спостережувана температура спалаху, °С;

$p$  – абсолютний атмосферний тиск. кПа;

0,25 – постійний коефіцієнт. °С/кПа;

101,3 – стандартний атмосферний тиск. кПа.

Записують температуру спалаху з поправкою на стандартний атмосферний тиск, округлюючи до 0,5°С. Нормоване значення – не менше 120°С.

### **8.5. Масова частка сірки**

Масову частку сірки в МЕЖК визначають відповідно до ДСТУ ISO 20846:2009. Суть методу визначення масової частки сірки полягає у тому, що пробу вуглеводневого продукту вводять в аналізатор з ультрафіолетовим флуоресцентним детектором. Пробу впорскують у високотемпературну камеру згоряння (1000-1100°С), де відбувається окислення сірки до діоксиду сірки (SO<sub>2</sub>) у середовищі кисню. Видаляють воду, що утворилася при згорянні проби, а газоподібні продукти горіння проби піддають впливу ультрафіолетового випромінювання. SO<sub>2</sub> поглинаючи енергію ультрафіолетового випромінювання, перетворюється на збуджений діоксид сірки (SO<sub>2</sub>\*). Флуоресценція, що випромінюється збудженим SO<sub>2</sub>\* під час повернення його у вихідний стан, реєструється трубкою фотоелектронного помножувача, і результуючий сигнал є мірою вмісту сірки в пробі [96].

#### **Опрацювання результатів:**

Розраховують вміст сірки  $w_s$  у міліграмах на кілограм (мг/кг) за формулами:

$$w_s = \frac{(A-Y)}{m \cdot S_s \cdot F_g}, \text{ або}$$

$$w_s = \frac{(A-Y)}{V \cdot S_s \cdot F_v},$$

де  $A$  - сумарний відгук детектора для проби, виражений у кількості імпульсів;

$Y$  - відрізок, що відсікається на осі  $y$  від калібрувальної кривої, виражений у кількості імпульсів;

$S_s$  - кут нахилу калібрувальної кривої, виражений як відношення кількості імпульсів до нанограми сірки;

$F_g$  - коефіцієнт, який ураховує розбавлення за масою (відношення маси випробовуваної порції до маси випробовуваної порції та розчинника), г/г;

$V$  – об'єм випробовуваної випробовуваної порції розчину, мкл;

$F_v$  - коефіцієнт, що враховує розбавлення за об'ємом (відношення маси випробовуваної порції до об'єму випробовуваної порції та розчинника), г/мл;

$m$  - маса випробовуваної випробовуваної порції розчину, що впорскується, у міліграмах, визначена шляхом прямих вимірів або обчислена за значеннями виміряного об'єму випробовуваної порції та густини за формулою:

$$m = V \cdot D,$$

де  $D$  - густина випробовуваної порції розчину за температури випробування, г/мл.

Обчислюють середнє значення вмісту сірки в пробі після проведення трьох визначень. Записують вміст сірки в міліграмах на кілограм (мг/кг) з точністю до 0,1 мг/кг.

Нормоване значення вмісту сірки в МЕЖК – не більше 10 мг/кг.

### **8.6. Коксованість 10 % залишку перегонки**

Випробування коксованості відбувається за ДСТУ EN ISO 10370:2012. Сутність методу полягає у тому, що зважену масу МЕЖК поміщають у тигель і піддають випаровуванню і піролізу. Залишок піддають реакціям розпаду і коксування за інтенсивного нагрівання. потім тигель із вуглецевим залишком

охолоджують в ексикаторі і зважують. За результат випробування приймають залишок, що залишився, у відсотках [97].

#### **Опрацювання результатів:**

Коксованість 10 % залишку перегонки МЕЖК, %, обчислюють за формулою:

$$\text{Коксованість} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} * 100,$$

де  $m_1$  – маса порожнього тигля з двома скляними кульками, г;

$m_2$  – маса тигля зі зразком, г;

$m_3$  – маса тигля з двома скляними кульками і залишком, г.

За результат випробування приймають середнє арифметичне результатів двох визначень. Результат записують із точністю до 0,01 %. Нормативне значення коксованості 10 % залишку перегонки МЕЖК – не більше 0,30%.

### **8.7. Цетанове число**

Цетанове число визначається за ДСТУ ISO 5165:2013 і характеризує займистість дизельного палива в двигунах із запалюванням від стиснення. Цетанове число дизельного палива визначають порівнянням характеристик його згоряння в двигуні з характеристиками згоряння сумішей еталонних палив з відомими значеннями цетанових чисел під час випробування в стандартних робочих умовах. Порівняння проводять за показаннями мікрометра маховика зміни ступеня стиснення для зразка і двох еталонних палив із цетановими числами більшим та меншим, ніж у зразка (процедура "взяття у вилку"), шляхом зміни ступеня стиснення для отримання потрібного кута затримки займання, що дає змогу провести інтерполяцію цетанового числа в одиницях показання мікрометра маховика [98].

#### **Розрахунки:**

Обчислюють середнє арифметичне значення показань ручного маховика для зразка і кожної суміші еталонних палив.

Обчислюють цетанове число  $CN_S$  інтерполюванням середньоарифметичних значень показань ручного маховика, пропорційних цетановим числам еталонних палив, що "взяли у вилку" показання ручного

маховика для зразка палива, відповідно до наведеної нижче формули. Не слід проводити інтерполювання, використовуючи вміст Т-палива в об'ємних відсотках у суміші еталонних палив, і перетворювати цей еквівалентний відсотковий вміст у цетанове число.

Для процедури "взяття у вилку" цетанове число зразка  $CN_S$  обчислюють за показаннями мікрометра ручного маховика за формулою:

$$CN_S = CN_{LRF} + \left( \frac{HW_S - HW_{LRF}}{HW_{HRF} - HW_{LRF}} \right) * (CN_{HRF} - CN_{LRF}),$$

де  $CN_{LRF}$  – цетанове число низькоцетанового еталонного палива;

$HW_S$  – показання маховика для зразка;

$HW_{LRF}$  – показання маховика для низькоцетанового еталонного палива;

$HW_{HRF}$  – показання маховика для високоцетанового еталонного палива;

$CN_{HRF}$  – цетанове число високоцетанового еталонного палива.

Записують обчислене цетанове число з точністю до 0,1. Будь-яке значення цетанового числа, що закінчується точно на 5 у другому десятковому знаку, округлюють до найближчого парного десяткового знака. Наприклад, значення 50,95 і 51,05 округлюють до 51,0.

Нормоване значення цетанового числа для МЕЖК – не менше 51.

### **8.8. Зольність**

Зольність МЕЖК визначають згідно з ДСТУ ISO 3987:2019. Цей показник вказує на наявність твердих залишків після згоряння палива, які можуть включати мінеральні домішки, каталізatori або забруднення, що потрапляють у продукт під час виробництва або зберігання. Високий рівень зольності може призводити до утворення відкладень у двигуні, підвищення зносу деталей і зниження ефективності роботи двигуна. Суть методу полягає у тому, що зразок спалюють до золи та сажі. Після охолодження обробляють залишок сірчаною кислотою і прожарюють за температури 775°C до повного окислення вуглецю. Потім охолоджують, повторно обробляють сірчаною кислотою і прожарюють при температурі 775°C до постійної маси та обчислюють вміст отриманої сульфатної золи в масових відсотках [99].

### **Опрацювання результатів:**

Вміст сульфатної золи  $A$ , % мас., вихідного зразка обчислюють за формулою:

$$A = 100 \frac{m_2}{m_1},$$

де  $m_1$  – маса випробовуваного зразка, г,

$m_2$  – маса сульфатної золи (пункт 11 «Проведення випробування»), г.

Нормоване значення вмісту сульфатної золи  $A$ , % мас., вихідного зразка – не більше 0,02 %.

### **8.9. Масова частка води**

Наявність води в біодизелі може спричинити корозію паливної системи, зниження теплотворної здатності палива, а також сприяти розвитку мікроорганізмів під час зберігання. Крім того, вода може спричиняти розшарування палива та блокувати фільтри, що впливає на стабільність і надійність роботи двигуна. Контроль проводять методом Карла Фішера за ДСТУ ISO 8534:2019. Суть методу полягає у тому, що під час титрування розчиненого жиру розчином йоду, діоксид сірки  $SO_2$  окислюється йодом у присутності води, що міститься в пробі. Далі спирт вступає в реакцію з  $SO_2$  і азотистою основою  $RN$  з утворенням проміжної солі алкілсульфіту, яка потім окислюється йодом до солі алкілсульфату. У цій реакції окислення витрачається вода, що міститься в пробі. Кінцеву точку титрування визначають потенціометрично [100].

#### **Представлення результатів:**

Обчислення прилад, представлений у методі проводить автоматично.

Вміст води  $w_{H_2O,t}$  г/100 г проби для випробування, розраховують за формулою:

$$w_{H_2O,t} = \frac{V_{\text{titrant}} \cdot \rho_{H_2O} \cdot 100}{m_t \cdot 1000},$$

де  $V_{\text{titrant}}$  - об'єм використовуваного розчину для титрування, мл;

$\rho_{H_2O}$  - титр (водний еквівалент реактиву), мг води/мл;

$m_t$  - маса проби для випробування, г.

Нормований вміст води – не більше 500 мг/кг.

### **8.10. Вміст механічних домішок**

Механічні домішки в МЕЖК є небажаними частками, що можуть потрапляти у паливо під час виробництва, транспортування або зберігання. Їх присутність може спричиняти засмічення паливних фільтрів, підвищений знос елементів двигуна і паливної системи, а також порушення процесу згоряння. Сутність методу визначення вмісту механічних домішок полягає у фільтруванні продуктів, що випробовуються, з попереднім розчиненням продуктів, що повільно фільтруються, в бензині або толуолі, промиванні осаду на фільтрі розчинником з подальшим його висушуванням і зважуванням [101].

Випробування здійснюється відповідно до ДСТУ 6370:2021 [101].

#### **Опрацювання результатів:**

Масову частку механічних домішок  $X$ , %, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_3} * 100,$$

де  $m_1$  – маса стаканчика для зважування з паперовим фільтром і механічними домішками або маса скляного фільтра з механічними домішками після висушування, г;

$m_2$  – маса стаканчика для зважування з чистим підготовленим паперовим фільтром або маса підготовленого скляного фільтра, г;

$m_3$  – маса проби, г.

За результат випробування приймають середнє арифметичне значення результатів двох послідовних визначень і записують із точністю до двох значущих цифр після коми. Механічні домішки у досліджуваному зразку МЕЖК повинні бути відсутні. Масову частку механічних домішок 0,005 % і менше оцінюють як їх відсутність.

### **8.11. Випробування на мідній пластинці**

Випробування на мідній пластинці використовується для оцінки корозійного впливу МЕЖК на метали, зокрема мідь, яка часто використовується в паливних системах. Суть методу випробування корозійного впливу МЕЖК на мідну пластинку полягає у тому, що

відполіровану мідну пластинку занурюють у зразок певного об'єму, нагрівають до встановленої температури (50°C) та витримують упродовж часу, встановленого для випробуваного продукту (3 год). Після нагрівання мідну пластинку виймають, промивають і порівнюють її колір з еталонами ступеня корозії [102].

Випробування проводиться згідно з EN ISO 2160 [102].

### Опрацювання результатів:

Корозійність зразка визначають порівнянням зовнішнього вигляду досліджуваної пластинки з описом еталонів корозії, наведених у табл.8.2.

Таблиця 8.2

### Класифікація еталонів ступеня корозії

Класифікація еталонів	Ступінь корозії	Опис
Свіжо відполірована пластинка	-	-
1	Незначне потьмяніння	а) Світло-помаранчевий колір, майже такий самий, як у відполірованої пластинки. б) Темно-помаранчевий колір.
2	Помірне потьмяніння	а) Бордово-червоний колір. б) Блідо-ліловий колір (кольору лаванди). с) Багатобарвний - ліловато-синій та/або бордово-червоний зі срібним нальотом колір. д) Сріблястий колір. е) Латунно-жовтий або золотий колір.
3	Сильне потьмяніння	а) Однорідний пурпурно-червоний колір на мідній пластинці. б) Райдужний з червоним або зеленим відтінком колір, але не сірий
4	Корозія	а) Прозоро-чорний, темно-сірий або коричневий колір з ледь помітною побіжністю зеленого кольору. б) Колір графіту або тьмянний чорний колір. с) Блискучий чорний колір

Якщо зовнішній вигляд пластинки займає явно проміжне становище між двома сусідніми еталонами, то оцінюють за більш тьмянним еталоном. Якщо

колір пластинки більш темно-помаранчевий, ніж колір еталона 1, перелічення б), пластинку відносять до класу 1; якщо відзначають наявність червоного кольору, пластинку відносять до класу 2.

Бордово-червоний колір пластинки класу 2 може бути помилково прийнятий за однорідний пурпурно-червоний колір мідної пластинки класу 3, якщо латунно-жовте тло пластинки повністю заглушене пурпурно-червоним кольором. Для встановлення відмінності кольору пластинку занурюють у розчинник. Пластинка класу 2 набуває темно-оранжевого кольору, колір пластинки класу 3 не змінюється.

Різницю між багатобарвними пластинками класів 2 і 3 встановлюють, поміщаючи пластинку у випробувальну пробірку і нагріваючи на плитці до температури  $340 \pm 30^{\circ}\text{C}$  протягом 4-6 хв. Температуру контролюють термометром, використовуваним під час перегонки за високих температур, поміщеним для контролю в другу пробірку. Якщо пластинка належить до класу 2, вона набуде сріблястого, а потім золотистого кольору. Пластинка класу 3 набуде прозоро-чорного кольору, як зазначено для класу 4. перерахування а).

Випробування повторюють, якщо на пластинці виявляють відбитки пальців або плями від потрапляння сторонніх часток чи крапель води під час обробки пластинки. Випробування також повторюють, якщо забарвлення гострих країв плоских поверхонь пластинки відповідає вищим ступеням корозії, ніж забарвлення більшої частини поверхні пластинки.

Записують номер класу відповідно до описів, наведених у табл. 8.2, а також час і температуру випробування таким чином. Проба на мідну пластинку: (X год/У °C), клас Z, де X, Y, Z- час, температура і клас корозії відповідно.

При випробування МЕЖК на мідній пластинці протягом 3 год за температури  $50^{\circ}\text{C}$  – мідна пластинка повинна витримувати клас 1.

## 8.12. Окисна стабільність за температури 110°C

Окисна стабільність є важливим показником якості МЕЖК, оскільки вона визначає їхню стійкість до окислення під час зберігання та використання. МЕЖК – продукт, схильний до окислювальних процесів через наявність ненасичених жирних кислот, що можуть реагувати з киснем і утворювати небажані продукти, такі як перокси, альдегіди та кислоти. Низька окисна стабільність може призвести до утворення осаду, зменшення ефективності палива та підвищення корозійного впливу на обладнання.

Сутність методу випробування окисної стабільності МЕЖК полягає у тому, що потік очищеного повітря пропускають через зразок за точно встановленої температури 110°C. Пари, що виділяються протягом процесу окислення, разом із повітрям проходять у колбу з демінералізованою та дистильованою водою, у якій знаходиться електрод для вимірювання питомої електричної провідності. Електрод з'єднаний з вимірювальним і реєструвальним приладом, що показує кінець індукційного періоду, коли питома електрична провідність починає швидко збільшуватися. Це прискорене підвищення викликається дисоціацією летких кислот, які утворюються під час процесу окислення і переходять у воду [103].

Визначення окисної стабільності відповідно до ДСТУ EN 14112 [103].

### **Опрацювання результатів:**

#### *Ручний розрахунок.*

Проводять оптимальну дотичну вздовж першої частини кривої, що помірно підвищується. Проводять оптимальну дотичну вздовж верхньої частини кривої, що швидко підвищується. Знову виконують визначення, якщо неможливо накреслити оптимальну дотичну. Визначають окислювальну стабільність, знімаючи показання часу в точці перетину двох ліній (індукційний час).

#### *Автоматичний розрахунок.*

Обладнання дає змогу проводити автоматичне калібрування індукційного періоду за допомогою застосування максимуму другої похідної.

Окислювальну стабільність виражають у годинах, округлюючи значення до найближчої 0,1 год.

Окисна стабільність МЕЖК відповідає стандартним вимогам, якщо при температурі 110°C вони залишаються стабільними щонайменше 6 годин.

### 8.13. Кислотне число

Кислотне число визначає кількість міліграмів гідроксиду калію (КОН), необхідного для нейтралізації вільних жирних кислот в 1 грамі МЕЖК і визначається за ДСТУ EN 14104:2009. Високе кислотне число може свідчити про наявність залишків незмиливих жирів, продуктів окислення або гідролізу, що утворюються під час виробництва, транспортування чи зберігання. Суть методу визначення вмісту вільних жирних кислот полягає у тому, що вільні жирні кислоти у зразку титрують розчином гідроксиду калію (КОН) у присутності індикатора фенолфталеїну. Спочатку випробуваний зразок розчиняють у суміші нейтралізованого етанолу і діетилового ефіру для отримання однорідного розчину. До зразка додають кілька крапель фенолфталеїну, що викликає зміну кольору при нейтралізації кислот. Далі зразок титрують стандартним розчином лугу до появи стійкого рожевого кольору, що свідчить про досягнення кінцевої точки реакції [104].

#### Розрахунки:

Кислотне число розраховують за формулою:

$$\text{Кислотне число} = \frac{56,1 \cdot V \cdot c}{m},$$

Де 56,1 – молекулярна маса гідроксиду калію;

$V$  – об'єм витраченого на титрування стандартного розчину гідроксиду калію, см<sup>3</sup>;

$c$  – точна концентрація використовуваного стандартного розчину гідроксиду калію, моль/дм<sup>3</sup>;

$m$  – маса випробуваного зразка, г.

Нормоване значення для показника «Кислотне число» – не більше 0,5 мг КОН на г МЕЖК.

## 8.14. Йодне число

Йодне число визначає ступінь ненасиченості ліпідів і визначається згідно з ДСТУ EN 14111:2009. Цей показник є важливим для оцінки хімічної стабільності та окисної стійкості біодизеля. Ненасичені жири можуть окислюватися під час зберігання, що призводить до зниження їх стабільності. Суть метода визначення полягає у тому, що випробуваний зразок розчиняють у змішаному розчиннику, потім додають реактив Wijs. Після закінчення встановленого часу додають до зразка йодид калію і воду, і виділений йод титрують, використовуючи стандартний розчин тіосульфату натрію [105].

### Розрахунок йодного числа:

Йодне число, виражене в г йоду на 100 г МЕЖК, визначають за такою формулою:

$$\frac{12,69 * c * (V_1 - V_2)}{m}$$

де  $c$  – точна концентрація використовуваного стандартного титрованого розчину тіосульфату натрію, моль/дм<sup>3</sup>;

$V_1$  – об'єм стандартного титрованого розчину натрій тіосульфату натрію, що використовується для холостого випробування, см<sup>3</sup>;

$V_2$  – об'єм стандартного титрованого розчину тіосульфату натрію, що використовується для титрування зразка, см<sup>3</sup>;

$m$  – маса випробуваного зразка, г.

Результати слід подати з точністю 1 г йоду на 100 г МЕЖК.

Нормативне значення йодного числа становить – не більше ніж 120 г йоду на 100 г МЕЖК.

## 8.15. Масова частка метилового ефіру ліноленової кислоти

Ліноленова кислота є поліненасиченою, що робить її більш схильною до окислення, ніж інші жирні кислоти. Це може призводити до утворення небажаних продуктів розпаду, таких як кислоти та альдегіди. Обмеження її вмісту допомагає покращити окисну стабільність палива, забезпечуючи його якість і надійність під час тривалого зберігання та експлуатації [92].

Визначення вмісту метилового ефіру ліноленової кислоти проводиться згідно з ДСТУ EN 14103:2009, методом, описаним в «Масова частка ефірів».

Масова частка метилового ефіру ліноленової кислоти відповідає вимогам специфікації, якщо не перевищує 12% мас.

### **8.16. Масова частка метанолу**

Надлишок метанолу в МЕЖК може спричиняти корозію паливної системи, пошкодження гумових ущільнень, а також підвищувати ризик розшарування палива. Суть методу визначення масової частки метанолу в МЕЖК полягає у тому, що зразок МЕЖК нагрівають при 80°C у герметично закупореній пробірці, щоб забезпечити десорбцію метанолу в газову фазу. Після досягнення рівноваги певну частину газової фази вводять у газовий хроматограф, де метанол визначають із використанням полум'яно-іонізаційного детектора. Як правило, на хроматограмі метанолу відповідає тільки один пік. Кількість метанолу розраховують із використанням зовнішнього стандарту. Метанол також можна визначити після додавання внутрішнього стандарту до зразка перед нагріванням і подальшим розрахунком з використанням коефіцієнта внутрішнього стандарту [106].

Метод відповідає ДСТУ EN 14110 [106].

*Аналіз і розрахунок при використанні внутрішнього стандарту, описаного в методі.*

Зразки мають бути приготовані та проаналізовані в точно таких самих експериментальних умовах, які використовують під час калібрування за внутрішнім стандартом.

Вміст метанолу в зразку  $C_m$ , % мас., розраховують за наступною формулою і округлятися до двох десяткових знаків після коми:

$$C_m = \frac{FS_m C_i}{S_i},$$

де  $F$  – коефіцієнт калібрування, отриманий відповідно до калібрування за внутрішнім стандартом;

$S_m$  – площа піка метанолу;

$C_i$  – вміст 2-пропанолу в калібрувальному розчині, % мас.;

(якщо введено 5 мкл 2-пропанолу в 5,0 г калібрувального розчину, то  $C_i = 0,0785$  % мас.);

$S_i$  – площа піка 2-пропанолу.

*Аналіз і розрахунок при використанні зовнішнього стандарту, описаного в методі.*

Зразки мають бути приготовані та проаналізовані за точно таких самих експериментальних умов, що представлені під час калібрування за зовнішнім стандартом. Вміст метанолу  $C_m$  у зразку (% мас.) округлюють до 0,01 % мас.

Нормоване значення масової частки метанолу в МЕЖК – не більше ніж 0,20%.

### **8.17. Масова частка моно-; ди-; тригліцеридів. Масова частка вільного гліцерину та загального гліцерину**

Наступний метод, описаний в ДСТУ EN 14105 установлює метод визначення вільного гліцерину та моно-; ди-; тригліцеридів, що містяться в МЕЖК. Загальний вміст гліцерину розраховують з отриманих результатів вмісту вільного гліцерину та моно-; ди-; тригліцеридів [107].

Суть методу визначення вільного гліцерину та моно-; ди-; тригліцеридів, що містяться в МЕЖК полягає у перетворенні гліцерину, моно-, ди-, тригліцеридів на більш летучі силільні похідні в присутності піридину та N-метил-N-(триметилсиліл)трифторацетаміду (MSTFA) [107].

Аналіз сильних похідних здійснюють методом газової хроматографії на короткій капілярній колонці з тонким шаром нерухомої фази, з інжектором введення зразка в колонку з полум'яно-іонізаційним детектором або на аналогічному обладнанні.

Після проведення процедури калібрування випробування зразка виконують у присутності двох внутрішніх стандартів:

- 1,2,4-бутантріолу, призначеного для визначення вільного гліцерину;
- 1,2,3-трикапроілгліцерину (трикаприну), призначеного для визначення моно-, ди- і тригліцеридів.

#### **Опрацювання результатів.**

*Калібрувальна функція гліцерину.*

Калібрувальну функцію розраховують за такою формулою, отриманою з експериментальних даних під час використання методу лінійної регресії:

$$M_g / M_{ei1} = a_g \left( A_g / A_{ei1} \right) + b_g,$$

де  $M_g$  – маса гліцерину, мг;

$M_{ei1}$  – маса внутрішнього стандарту № 1, мг;

$a_g$  і  $b_g$  – константи регресійної залежності для гліцерину;

$A_g$  – площа піка гліцерину;

$A_{ei1}$  – площа піка внутрішнього стандарту № 1.

Калібрувальна функція вважається прийнятною тільки в тому разі, якщо коефіцієнт кореляції дорівнює або більший за 0,95.

*Калібрувальні функції гліцеридів.*

Калібрувальні функції розраховують на основі наступних формул, отриманих з експериментальних даних під час використання методу лінійної регресії:

$$M_m / M_{ei2} = a_m \left( A_m / A_{ei2} \right) + b_m;$$

$$M_d / M_{ei2} = a_d \left( A_d / A_{ei2} \right) + b_d;$$

$$M_t / M_{ei2} = a_t \left( A_t / A_{ei2} \right) + b_t,$$

де  $M_m$ ,  $M_d$ ,  $M_t$  – маси відповідно моноолеїну, діолеїну, триолеїну. мг;

$M_{ei2}$  – маса внутрішнього стандарту № 2, мг;

$a_m$  і  $b_m$  – константи регресійної залежності для моногліцерину;

$a_d$  та  $b_d$  – константи регресійної залежності для дигліцерину;

$a_t$  та  $b_t$  – константи регресійної залежності для тригліцерину;

$A_m$ ,  $A_d$ ,  $A_t$  – площі піку відповідно моноолеїну, діолеїну, триолеїну;

$A_{ei2}$  – площа піку внутрішнього стандарту № 2.

Калібрувальні функції можуть бути розглянуті як допустимі, якщо коефіцієнт кореляції дорівнює або більший за 0,95.

*Розрахунок масової частки вільного гліцерину.*

Розраховують масову частку, % мас., вільного гліцерину у зразку за формулою:

$$G = \left[ a_g \left( \frac{A_g}{A_{ei1}} \right) + b_g \right] \left( \frac{M_{ei1}}{m} \right) * 100,$$

де  $G$  – масова частка вільного гліцерину в зразку, % мас.;

$a_g$  і  $b_g$  – константи, отримані методом регресії для гліцерину;

$A_g$  – площа піку гліцерину, см<sup>2</sup>;

$A_{ei1}$  – площа піку внутрішнього стандарту № 1, см<sup>2</sup>;

$M_{ei1}$  – маса внутрішнього стандарту № 1, мг;

$m$  – маса зразка, мг.

*Розрахунок масової частки гліцеридів.*

Розраховують масову частку, % мас., моно-; ди-; і тригліцеридів за формулами:

$$M = \left[ a_m \left( \frac{\Sigma A_{mi}}{A_{ei2}} \right) + b_m \right] \left( \frac{M_{ei2}}{m} \right) * 100;$$

$$D = \left[ a_d \left( \frac{\Sigma A_{di}}{A_{ei2}} \right) + b_d \right] \left( \frac{M_{ei2}}{m} \right) * 100;$$

$$T = \left[ a_t \left( \frac{\Sigma A_{ti}}{A_{ei2}} \right) + b_t \right] \left( \frac{M_{ei2}}{m} \right) * 100,$$

де  $M, D, T$  – масові частки відповідно моно-; ди-; тригліцеридів у зразку, % мас.;

$a_m$  і  $b_m$  – константи регресійної залежності для моногліцерину;

$a_d$  і  $b_d$  – константи регресійної залежності для дигліцерину;

$a_t$  і  $b_t$  – константи регресійної залежності для тригліцерину;

$\Sigma A_{mi}, \Sigma A_{di}, \Sigma A_{ti}$  – суми площ піків відповідно моно-; ди-; тригліцеридів, см<sup>2</sup>;

$A_{ei2}$  – площа піка внутрішнього стандарту № 2, см<sup>2</sup>;

$M_{ei2}$  – маса внутрішнього стандарту № 2, мг;

$m$  – маса зразка, мг.

Розрахунок масової частки загального гліцерину.

Розраховують масову частку загального гліцерину в зразку, % мас., за формулою:

$$G_t = G + 0,255M + 0,146D + 0,103T,$$

де  $G_t$  - масова частка загального гліцерину (вільного та зв'язаного) у зразку, % мас.;

$G$  - масова частка вільного гліцерину у зразку. % мас.;

$M$  - масова частка моногліцеридів у зразку. % мас.;

$D$  - масова частка дигліцеридів у зразку. % мас.;

$T$  - масова частка тригліцеридів у зразку. % мас.

Усі отримані значення масових часток виражають у відсотках з точністю до 0,01 %.

Нормовані значення вмісту в МЕЖК:

- моногліцеридів – не більше 0,80%;
- дигліцеридів – не більше 0,20%;
- тригліцеридів – не більше 0,20%;
- вільного гліцерину – не більше 0,02%;
- загального гліцерину – не більше 0,25%

## **8.18. Масова частка лужних металів**

### **8.18.1. (Na + K)**

#### ***Визначення масової частки Na.***

Вміст натрію в зразку визначають методом полум'яної атомно-абсорбційної спектрометрії згідно з ДСТУ EN 14108 за довжини хвилі 589 нм. Калібрувальні розчини, що використовуються, готують з металорганічної солі натрію, розчиненої в суміші з ксилолом і вихідною олією. Додавання вихідної олії до калібрувальних розчинів необхідне для поліпшення їхньої здатності до зберігання (розчини з низьким вмістом натрію нестабільні) і лінійності калібрування [108].

#### **Опрацювання результатів.**

Визначають вміст натрію  $c_1$  і  $c_2$ , мг/дм<sup>3</sup>, двох випробуваних порцій зразка за калібрувальною кривою.

Розраховують вміст натрію  $C_1$  і  $C_2$  у зразку, мг/кг, за формулою:

$$C = c * \frac{V}{m},$$

де  $c$  - вміст натрію у двох випробовуваних порціях зразка, що визначається за калібрувальною кривою ( $c_1, c_2$ );

$V$  – об'єм розчину зразка, см<sup>3</sup>;

$m$  - маса випробовуваної порції зразка, г.

Розраховують середній вміст  $C$  натрію в зразку на основі  $C_1$  і  $C_2$ .

Виражають результат у міліграмах на кілограм і округлюють до 0,1 мг/кг.

#### ***Визначення масової частки К.***

Вміст калію у зразку безпосередньо визначають полум'яною атомно-абсорбційною спектрометрією відповідно до ДСТУ EN 14109 за довжини хвилі 766,5 нм. Калібрувальні розчини, що використовуються, готують із металорганічної солі калію, розчиненої в суміші ксилолу та стабілізатора. Додавання стабілізатора до калібрувальних розчинів є необхідним для того, щоб поліпшити їхнє зберігання (розчини з низьким вмістом калію нестабільні) і лінійність калібрування [109].

#### **Опрацювання результатів.**

Визначають вміст калію  $c_1$  і  $c_2$ , мг/дм<sup>3</sup>, двох випробуваних порцій зразка за калібрувальною кривою.

Розраховують вміст калію  $C_1$  і  $C_2$  у зразку, мг/кг, за формулою:

$$C = c * \frac{V}{m},$$

де  $c$  - вміст калію у двох випробовуваних порціях зразка, що визначається за калібрувальною кривою ( $c_1, c_2$ );

$V$  – об'єм розчину зразка, см<sup>3</sup>;

$m$  - маса випробовуваної порції зразка, г.

Розраховують середній вміст  $C$  калію в зразку на основі  $C_1$  і  $C_2$ .

Виражають результат у міліграмах на кілограм і округлюють до 0,1 мг/кг.

Загальний вміст (Na + K) вважають як суму результатів вмісту кожного такого окремого елемента. Нормоване значення масової частки лужних металів (Na + K) – не більше 5,0 мг/кг.

### **8.18.2. (Ca + Mg)**

Метод визначений за ДСТУ ISO EN 14538 установлює визначення вмісту кальцію (Ca) та магнію (Mg), що є компонентами мила, методом оптичної емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP OES) у діапазоні від 1 до 10 мг/кг у МЕЖК [110].

Суть методу полягає у тому, що точно зважену випробувану порцію зразка розбавляють керосином у масовому співвідношенні 1:1. Отриманий у результаті розведення розчин вводять у плазму ICP OES спектрометра. Для довідкових цілей і калібрування використовують калібрувальні зразки з відомим вмістом елементів у діапазоні від 0,5 до 10 мг/кг. Фіксують сумарний вміст кальцію і магнію та сумарний вміст натрію і калію [110].

#### **Опрацювання результатів.**

Вміст кожного елемента, що розглядається, розраховують із результуючих імпульсів, використовуючи зворотну функцію калібрування та беручи до уваги коефіцієнт розведення, що фактично використовується під час вимірювання. Це може бути зроблено як вручну, так і з використанням відповідних функцій програмного забезпечення ICP OES-спектрометра. Сумарний вміст кальцію і магнію та сумарний вміст натрію і калію розраховують із неокруглених значень вмісту відповідних окремих елементів. Коли вміст одного елемента нижчий за область застосування методу (< 1 мг/кг), вміст елемента не враховують при розрахунку суми.

Результати сумарного вмісту кальцію і магнію, натрію і калію мають бути виражені в міліграмах на кілограм і округлені до десятих часток.

Нормоване значення масової частки лужних металів (Ca + Mg) – не більше 5,0 мг/кг.

### 8.19. Масова частка фосфору

Наступний метод, описаний у ДСТУ EN 14107, емісійної спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP) призначений для визначення вмісту фосфору від 4 до 20 мг/кг у МЕЖК. Метою цього методу є оцінка якості МЕЖК шляхом визначення вмісту фосфоровмісних побічних продуктів переестерифікації, присутність яких може впливати на поведінку палив [111].

Суть методу визначення масової частки фосфору полягає у тому, що зважений випробуваний зразок розбавляють ксилолом. Стандартні зразки готують із фосфорорганічної сполуки, розчиненої в мінеральній олії та розбавленої в суміші ксилолу і вихідної олії. Додавання вихідної олії дає змогу зменшити відмінності у в'язкості між випробовуваними і стандартними зразками та покращує їхнє зберігання. Розчини вводять в індуктивно зв'язану аргонову плазму в аерозольній формі. Вміст фосфору визначають шляхом порівняння емісії елемента в розчині випробовуваного зразка з емісією стандартного зразка за такої самої довжини хвилі (зазвичай використовують довжини хвиль 213,6 і 178,3 нм.).

#### Опрацювання результатів.

Визначають відповідно до калібрувальної кривої концентрацію фосфору  $c$  (мг/дм<sup>3</sup>) двох випробовуваних проб одного і того ж зразка.

Розраховують концентрацію фосфору в зразку  $C$ , мг/кг, за наступною формулою:

$$C = c * \frac{V}{m},$$

де  $c$  - концентрація фосфору в розчині зразка, мг/дм<sup>3</sup>;

$V$  – об'єм розчину зразка, см<sup>3</sup>;

$m$  - маса випробовуваної порції зразка, г.

Розраховують вміст фосфору в зразку  $C$  із середньоарифметичного значення двох отриманих вимірювань. Виражають результат (мг/кг) з точністю до 0,1 мг/кг.

Якщо концентрації розчинів виражені у відсотках за масою, розраховують вміст фосфору в зразку  $C$  за формулою:

$$C = c_p * \frac{P}{m},$$

де  $c_p$  - концентрація розчину зразка, мг/кг;

$P$  – загальна маса розчину, г.

Нормоване значення масової частки фосфору в МЕЖК – не більше 10 мг/кг.

## РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки

МПК C10L 1/00

### Комбінація стабілізаторів для подовження терміну зберігання біодизеля.

Цей винахід стосується галузі альтернативних палив, зокрема біодизеля (метилові ефіри жирних кислот, FAME). Пропонована комбінація стабілізаторів – токоферолі/ВНТ/лецитин (8/3/6), призначена для запобігання окисленню та деградації біодизеля під час тривалого зберігання, що дозволяє зберегти його фізико-хімічні показники відповідно до затверджених стандартів (ДСТУ EN 14214:2019, ДСТУ 6081:2009). Винахід може застосовуватися на підприємствах з виробництва та зберігання біопалива, а також у сфері відновлювальних джерел енергії, що спрямована на зниження використання викопного палива та зменшення викидів парникових газів.

Біодизель, або метилові ефіри жирних кислот (FAME — Fatty Acid Methyl Esters) – це суміш моноалкілестерів жирних кислот, отриманих шляхом переестерифікації тригліцеридів. FAME використовується як альтернатива традиційному дизельному пальному завдяки своїй екологічності та здатності зменшувати викиди парникових газів. Біодизель має високу біорозкладність, відновлюваність і здатність до зниження токсичності викидів, що робить його перспективним паливом у глобальній боротьбі зі зміною клімату [112].

Проте одним із ключових викликів у використанні біодизеля є його обмежена стабільність під час зберігання. На відміну від викопного дизельного палива, FAME є більш вразливим до процесів окислення, що призводить до погіршення його якості, збільшення кислотного числа, зниження окисної стабільності, утворення осадів і домішок. Це, у свою чергу, скорочує термін придатності біодизеля та може спричинити корозію та

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сенін Є.А.			РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					99	12
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

забруднення паливної системи [113].

Актуальність досліджень і розробок у цій галузі полягає в тому, щоб забезпечити тривалу стабільність біодизеля без порушення його фізико-хімічних характеристик. Дана заявка пропонує спосіб стабілізації біодизеля за допомогою комбінації антиоксидантів та стабілізаторів (токофероли, бутилгідрокситолуен, лецитин), які дозволяють значно подовжити термін зберігання FAME без шкоди для його якості. Така стабілізація забезпечує захист біодизеля від окислення та збереження його технічних показників на період до 16 місяців, що є важливим кроком для комерціалізації біодизеля та збільшення його застосування в паливній галузі [114].

Відомий спосіб використання бутилгідрокситолуену (ВНТ) як стабілізатора біодизеля [115].

Бутилгідрокситолуен (ВНТ) є синтетичним антиоксидантом, що використовується для стабілізації жирів і масел від окислення, зокрема в харчовій промисловості, а також у паливній. ВНТ також широко застосовується для стабілізації біодизеля, оскільки він ефективно знижує швидкість окислення, продовжуючи термін придатності палива [115].

Технічна характеристика ВНТ:

- Концентрація: ВНТ зазвичай використовують у концентрації 100-200 ppm, що дозволяє ефективно знижувати швидкість окислення біодизеля без значного впливу на його фізико-хімічні властивості.
- Переваги: ВНТ є добре дослідженим антиоксидантом, який ефективно запобігає утворенню осадів, покращує окисну стабільність біодизеля і може збільшити його термін придатності до 12 місяців.
- Недоліки: Хоча ВНТ є ефективним стабілізатором, його синтетичне походження може бути небажаним для екологічно чистих палив. Крім того, його використання у високих концентраціях може вплинути на цетанове число.

Відомий спосіб використання екстракту розмарину як природного антиоксиданту для стабілізації біодизеля [116].

Екстракт розмарину є природним антиоксидантом, який широко використовується в харчовій промисловості для запобігання окисленню жирів і масел. Його ефективність також була підтверджена в паливній промисловості для стабілізації біодизеля, оскільки він містить активні компоненти, такі як карнозол і карнозинова кислота, які мають антиоксидантні властивості [116].

Технічна характеристика екстракту розмарину:

- Концентрація: Зазвичай застосовується в концентрації 100-500 ppm, що дозволяє покращити окисну стабільність біодизеля на тривалий час.
- Переваги: Природне походження екстракту розмарину робить його екологічно чистою альтернативою синтетичним антиоксидантам, таким як ВНТ. Він також підвищує термін придатності біодизеля, покращуючи його стійкість до окислення.
- Недоліки: Ефективність екстракту розмарину сильно варіюється залежно від його концентрації та якості. Також цей природний антиоксидант може мати незначний вплив на кислотне або йодне число біодизеля.

Відомий спосіб використання комбінації бутилгідрокситолуену (ВНТ) та лецитину для стабілізації біодизеля [115].

Одним із широко відомих способів стабілізації біодизеля є використання комбінації синтетичних антиоксидантів і емульгаторів. У цьому випадку застосовується бутилгідрокситолуен (ВНТ) у поєднанні з лецитином. Така комбінація забезпечує тривалий термін зберігання біодизеля, покращуючи його окисну стабільність [115].

Технічна характеристика комбінації бутилгідрокситолуену (ВНТ) та лецитину:

- ВНТ (концентрація 50-150 ppm): Запобігає утворенню вільних радикалів, що сприяють окисленню ліпідів. ВНТ добре відомий своєю здатністю захищати жирні кислоти від деградації, що дозволяє зберігати біодизель стабільним протягом тривалого періоду.

- Лецитин (концентрація 100-300 ppm): Емульгатор, що забезпечує стабілізацію ліпідів та запобігає утворенню осадів і розшаруванню. Лецитин також має властивості природного антиоксиданту, що доповнює дію ВНТ.
- Переваги: Комбінація ВНТ і лецитину дозволяє значно підвищити стабільність біодизеля, продовжуючи його термін зберігання на 12-18 місяців. Лецитин додатково сприяє стабілізації тригліцеридів, що знижує потребу в додаткових етапах очищення.
- Недоліки: Використання ВНТ може викликати питання щодо екологічності продукту. Крім того, можливе накопичення домішок через наявність лецитину, якщо його використовувати у високих концентраціях.

Спосіб з використанням комбінації бутилгідрокситолуену та лецитину прийнято за прототип.

Задача винаходу полягає в розробці стабілізуючої комбінації для метилових ефірів жирних кислот (FAME), яка забезпечить значне підвищення їхньої окисної стабільності та подовження терміну придатності без негативного впливу на фізико-хімічні показники біодизеля, відповідно до затверджених стандартів (ДСТУ EN 14214:2019, ДСТУ 6081:2009).

Відомо, що FAME схильні до окислення, що негативно впливає на їхнє цетанове число, густину, в'язкість та інші фізико-хімічні властивості. Використання синтетичних антиоксидантів, таких як бутилгідрокситолуен (ВНТ), викликає екологічні питання, а застосування деяких стабілізаторів у високих концентраціях, як-от лецитин, призводить до накопичення домішок.

Для вирішення цих проблем запропоновано використання комбінації стабілізаторів, що включає токоферолі в концентрації 250 ppm, бутилгідрокситолуен (ВНТ) у концентрації 70 ppm, та лецитин в концентрації 120 ppm. Така комбінація забезпечує високий рівень антиоксидантного захисту FAME і дозволяє підтримувати їхню якість на належному рівні

протягом 12-18 місяців зберігання, не впливаючи на ключові показники палива.

Поєднання токоферолів, як природних антиоксидантів, і невеликої кількості ВНТ забезпечує ефективне запобігання окисленню без негативного впливу на екологічність продукту. Лецитин у зазначеній комбінації стабілізаторів міститься у достатньо низькій концентрації, щоб не спричиняти накопичення домішок, але у достатній, щоб створювати синергічний ефект з іншими компонентами суміші, стабілізуючи ліпіди і запобігаючи розшаруванню фаз.

Запропонована комбінація стабілізаторів для біодизеля в співвідношенні 250 ppm токоферолів, 70 ppm ВНТ і 120 ppm лецитину забезпечує продовження терміну придатності біодизеля до 16 місяців. Досягнення цього результату обумовлено взаємодією природних і синтетичних антиоксидантів, що впливають на різні етапи процесів окислення.

Токофероли, відомі своїми природними антиоксидантними властивостями, ефективно нейтралізують первинні вільні радикали, які ініціюють окислення ліпідів у біодизелі. Зазначена концентрація токоферолів 250 ppm була обрана з урахуванням не тільки їхньої здатності нейтралізувати вільні радикали, але й з огляду на їхню стійкість під час тривалого зберігання. Токофероли також володіють високою температурною стійкістю, що робить їх ідеальними для зберігання біодизеля у різних кліматичних умовах.

ВНТ у концентрації 70 ppm підсилює дію токоферолів, запобігаючи вторинним процесам окислення, що виникають після виснаження природних антиоксидантів. Важливо зазначити, що синтетичні антиоксиданти, такі як ВНТ, краще справляються з окисленням ліпідів на пізніх стадіях, коли концентрація вільних радикалів збільшується. Використання ВНТ у невисокій концентрації дозволяє досягти балансу між його ефективністю та екологічними вимогами до біодизеля, що важливо для дотримання стандартів якості палива. Крім того, ВНТ не впливає на критично важливі параметри якості FAME, що дозволяє уникнути небажаних хімічних змін у паливі.

Лецитин у концентрації 120 ppm виконує одразу кілька функцій. По-перше, він забезпечує стабілізацію фазового розподілу, запобігаючи розшаруванню біодизеля, що може виникати при тривалому зберіганні. Це особливо важливо у випадках, коли біодизель зберігається за змінних температур, оскільки фазова стабільність впливає на однорідність палива. По-друге, лецитин знижує ризик утворення осадів та механічних домішок, що дозволяє покращити такі показники біодизеля, як зольність та вміст механічних домішок.

Окрім цього, взаємодія токоферолів і лецитину забезпечує додатковий синергічний ефект у сфері стабілізації такого показника якості FAME, як кислотне число.

Таким чином, запропонована комбінація стабілізаторів дозволяє не лише значно продовжити термін зберігання біодизеля до 16 місяців, але й забезпечити стабільність його основних фізико-хімічних характеристик, включаючи густину, в'язкість, цетанове число, кислотне число та окисну стабільність. Використання токоферолів у комбінації з ВНТ та лецитином дозволяє уникнути утворення небажаних домішок, стабілізувати ліпіди та гарантувати високі стандарти якості палива протягом всього терміну зберігання.

Приклад 1 (відомий спосіб). Використання бутилгідрокситолуену (ВНТ) для стабілізації біодизеля [115].

ВНТ є синтетичним антиоксидантом, що широко використовується для стабілізації жирних кислот, в тому числі в біодизелі. У відомих методах ВНТ застосовують у концентрації 100-200 ppm для продовження терміну зберігання біодизеля та запобігання його окисленню. Цей спосіб був впроваджений на підприємствах паливної промисловості, оскільки ВНТ ефективно запобігає утворенню вільних радикалів, що сприяють окисленню ліпідів, і тим самим значно подовжує термін придатності біодизеля.

Однак, основним недоліком цього методу є можливий вплив ВНТ на екологічність біопалива, а також ризик зміни фізико-хімічних властивостей

біодизеля при тривалому зберіганні, особливо при застосуванні високих концентрацій ВНТ. Незважаючи на те, що цей антиоксидант ефективний у запобіганні окисленню, його надмірна кількість може спричинити зміну показників, таких як кислотне число або зольність.

Приклад 2 (відомий спосіб). Використання екстракту розмарину як природного стабілізатора [116].

Екстракт розмарину, який містить потужні природні антиоксиданти, такі як карнозол і карнозинова кислота, також використовується для стабілізації біодизеля. У відомих методах екстракт розмарину застосовують у концентрації 100-500 ppm для запобігання окисленню та продовження терміну зберігання біодизеля. Завдяки природному походженню цей антиоксидант не має негативного впливу на екологічність продукту, що робить його популярним серед виробників, які прагнуть отримати екологічно чистий біодизель.

Проте цей метод має певні обмеження, оскільки ефективність екстракту розмарину залежить від умов зберігання та специфіки вихідної сировини, з якої був отриманий екстракт. Природні коливання в концентрації активних компонентів можуть впливати на стабільність біодизеля при тривалому зберіганні. Крім того, екстракт розмарину, зазвичай менш стійкий до високих температур або інших екстремальних умов зберігання, що може знижувати його загальну ефективність у порівнянні із синтетичними антиоксидантами.

Приклад 3 (спосіб, що заявляється).

Запропонований спосіб стабілізації біодизеля передбачає додавання заздалегідь підготовленої суміші стабілізаторів, яка включає 250 ppm токоферолів, 70 ppm ВНТ та 120 ppm лецитину. Стабілізатори готуються у вигляді концентрованого розчину перед додаванням до FAME.

Зберігання компонентів стабілізаційної композиції:

Токофероли в рідкій, концентрованій формі у вигляді в'язкого розчину, зберігаються при температурі 10-25°C у темному місці, щоб уникнути фотодеградації. Для зберігання токоферолів використовують герметичні

контейнери зі скла з темним покриттям або нержавіючої сталі. Рекомендовано уникати довготривалого впливу світла та високих температур, оскільки це може знизити їх антиоксидантну активність.

ВНТ у вигляді кристалічного порошку зберігається при температурі 10-25°C в умовах низької вологості, щоб запобігти злипанню часток. Для цього компоненту використовують щільно закриті контейнери з пластику або нержавіючої сталі з внутрішнім антикорозійним покриттям. Пластикові контейнери виготовляються з поліетилену високої щільності (HDPE), що запобігає поглинанню вологи й забезпечує належну ізоляцію.

Лецитин, представлений у вигляді сухих гранул, зберігають за оптимальної температури 10-25°C у сухому місці з контролем вологості. Для зберігання використовують контейнери з нержавіючої сталі з внутрішнім антикорозійним покриттям або захисні пластикові контейнери з поліетилену високої щільності (HDPE) із герметичною кришкою.

Під час зберігання компонентів суміші проводиться постійний моніторинг температурних і вологісних умов у місцях зберігання для запобігання небажаним змінам властивостей компонентів.

Вибір розчинника для підготовки стабілізуючої суміші ґрунтується на вимогах, щоб він забезпечував ефективне розчинення компонентів (токоферолів, ВНТ та лецитину), не впливав на фізико-хімічні показники FAME і повністю випаровувався після введення в FAME. Оптимальним розчинником у цьому випадку є ізопропанол. Ізопропанол має високу розчинну здатність для всіх компонентів нашої стабілізуючої суміші, легко випаровується за умов перемішування і температури, необхідної для процесу. Крім того, ізопропанол добре сумісний з біодизелем у мінімальних концентраціях, не спричиняє зміни його в'язкості, густини або інших фізико-хімічних характеристик, регламентованих міжнародними стандартами для FAME. Завдяки своїй леткості ізопропанол швидко випаровується під час процесу змішування з біодизелем, залишаючи лише активні компоненти стабілізатора, що сприяє оптимальній стабільності кінцевого продукту.

Процес підготовки суміші стабілізаторів:

Для підготовки стабілізуючої суміші компоненти tokoferoli (250 ppm), ВНТ (70 ppm) та гранульований лецитин (120 ppm) попередньо змішують в окремому реакторі з мінімальною кількістю ізопропанолу, необхідному для розчинення компонентів, при температурі 20-25°C. Спочатку до реактора додають tokoferoli та ВНТ і розчиняють їх, перемішуючи суміш зі швидкістю 150 об/хв протягом 5 хвилин. Потім додають гранульований лецитин, і суміш продовжують перемішувати ще 5-7 хвилин, щоб забезпечити повну гомогенізацію. Загальний час підготовки суміші становить близько 10-12 хвилин, що забезпечує рівномірний розподіл стабілізаторів у розчиннику. Після завершення приготування стабілізуюча суміш повинна бути використана протягом 12 годин, оскільки ізопропанол є летким розчинником і може поступово випаровуватися, що вплине на концентрацію та стабільність суміші. Зберігання до моменту застосування стабілізуючої суміші здійснюється у герметичному контейнері при температурі до 10°C, у темному сухому місці.

Процес додавання готової суміші стабілізаторів до FAME:

Даний процес включає кілька етапів, перш ніж вводити суміш стабілізаторів, FAME у реакторі нагрівають до 25-30°C – оптимальної температури, яка забезпечить плавне змішування та ефективно випаровування розчинника. Після досягнення необхідної температури стабілізуючу суміш додають у FAME тонкою рівномірною струєю, щоб уникнути локального насичення стабілізаторами та досягти рівномірного розподілу з самого початку.

Після додавання стабілізуючої суміші перемішування здійснюється при швидкості 200 об/хв протягом 10-15 хвилин. Це дозволяє компонентам стабілізатора повністю розподілитися по всьому об'єму біодизеля. Температура 25-30°C також підтримується протягом усього процесу, оскільки є оптимальною для збереження властивостей стабілізаторів, не допускаючи їхньої деградації чи зниження ефективності.

Після завершення основного етапу перемішування, процес перемішування продовжують ще на 5 хвилин, зменшуючи швидкість до 100 об/хв. Цей додатковий етап мінімізує залишковий вміст розчинника у FAME. Уповільнене перемішування забезпечує рівномірне випаровування ізопропанолу, не створюючи зайвого потоку повітря у реакторі.

Крім того, рекомендується використовувати реактор із закритою системою вентиляції для безпечного відведення парів ізопропанолу.

Після завершення процесу додавання стабілізуючої суміші до FAME і випаровування залишків ізопропанолу, стабілізований біодизель пакують у герметичні металеві бочки місткістю 200 дм<sup>3</sup> з вузькою горловиною, з внутрішнім антикорозійним покриттям із щільними кришками та захистом від проникнення повітря. Перед використанням металевих бочок слід переконатися в цілісності внутрішнього антикорозійного покриття для уникнення контакту біодизеля з металом, який може каталізувати окисні процеси. Зазначене пакування FAME відповідає вимогам ДСТУ 4454.

Умови зберігання стабілізованого біодизеля:

Стабілізований біодизель зберігають у закритих складських приміщеннях при температурі 15-25°C з низьким рівнем вологості. Температура зберігання не повинна перевищувати 30°C, оскільки підвищена температура прискорює процеси окислення, навіть за наявності стабілізаторів. Герметичність пакування підтримується протягом усього терміну зберігання. Приміщення повинно бути захищене від прямого сонячного світла, щоб запобігти впливу ультрафіолетового випромінювання, яке може знижувати стабільність біодизеля та сприяти утворенню перекисних сполук. Складські приміщення повинні бути обладнані системами контролю для запобігання контакту біодизеля з відкритими джерелами тепла чи іскроутворенням, оскільки біодизель є легкозаймистою речовиною.

Дотримання цих умов зберігання забезпечує збереження фізико-хімічних властивостей стабілізованого біодизеля протягом усього терміну придатності, який становить 16 місяців.

Таблиця 9.1.

**Порівняння характеристик заявленої композиції стабілізаторів з аналогами:**

Характеристика	Запропонований спосіб (токофероли + ВНТ + лецитин)	Аналог 1 (ВНТ)	Аналог 2 (екстракт розмарину)	Прототип (ВНТ + лецитин)
<b>Основні компоненти</b>	Токофероли, ВНТ, лецитин	ВНТ	Карнозол, карнозинова кислота	ВНТ, лецитин
<b>Концентрація компонентів (ppm)</b>	Токофероли (250), ВНТ (70), лецитин (120)	100-200	100-500	ВНТ (50-150), лецитин (100-300)
<b>Термін придатності</b>	До 16 місяців	До 12 місяців	До 8 місяців	До 12 місяців
<b>Тип стабілізації</b>	Комплексна, первинні та вторинні антиоксиданти	Вторинна стабілізація	Природна стабілізація	Комплексна, первинні та вторинні антиоксиданти
<b>Вплив на кислотне число</b>	Не впливає	Можливе збільшення при високих концентраціях	Не впливає	Не впливає при концентраціях лецитину $\leq 200$ ppm
<b>Здатність запобігати утворенню домішок</b>	Висока, мінімізує механічні домішки	Помірна, при підвищених концентраціях	Низька	Висока
<b>Екологічність</b>	Помірна	Низька, синтетичний компонент	Висока, природний екстракт	Помірна

Таблиця 9.2.

**Матеріальний баланс для процесу стабілізації 1 тонни FAME**

Компонент	Витрати на 1 тону FAME (кг)	Масова частка (%)
FAME (біодизель)	1000,00	99,881%
Токофероли	0,25	0,025%
ВНТ (бутилгідрокситолуен)	0,07	0,007%
Лецитин	0,12	0,012%
Ізопропанол	0,74	0,075%
<b>Всього:</b>	1001,19	100%

## **Формула корисної моделі**

Спосіб стабілізації біодизеля (метилових ефірів жирних кислот, FAME) шляхом додавання комбінації стабілізаторів, який відрізняється тим, що як стабілізатори використовують комбінація токоферолів в концентрації 250 ppm, бутилгідрокситолуену (BHT) у концентрації 70 ppm та лецитину в концентрації 120 ppm, що попередньо розчиняються в ізопропанолі у кількості 0,075% від загальної маси біодизеля з подальшим додаванням до FAME для забезпечення тривалого терміну придатності та збереження фізико-хімічних параметрів біодизеля на термін до 16 місяців.

## **Реферат**

### **Комбінація стабілізаторів для подовження терміну зберігання біодизеля.**

У заявці представлено спосіб стабілізації біодизеля (метилових ефірів жирних кислот, FAME) за допомогою комбінації стабілізаторів, що забезпечує тривалий термін придатності продукту та збереження його фізико-хімічних параметрів. Спосіб включає додавання стабілізуючої суміші, яка містить токофероли в концентрації 250 ppm, бутилгідрокситолуен (BHT) у концентрації 70 ppm та лецитин у концентрації 120 ppm. Для підготовки суміші використовують ізопропанол у кількості 0,075% від маси біодизеля як розчинник, який випаровується після введення суміші у біодизель. Додавання стабілізаторів здійснюється шляхом перемішування протягом 10-15 хвилин при температурі 25-30°C. Застосування цього способу дозволяє подовжити термін зберігання біодизеля до 16 місяців, запобігаючи окисленню та утворенню осадів, забезпечуючи стабільність його основних показників якості.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Guo, M., Song, W., & Buhain, J. (2015). Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and sustainable energy reviews*, 42, 712-725.
2. Nayak, S., Das, M., Pradhan, B., & Kundu, S. N. (2019). Environmental Impacts of Fossil Fuels. In *Sustainable Energy and Environment* (pp. 245-270). Apple Academic Press.
3. Demirbas, A., Bafail, A., Ahmad, W., & Sheikh, M. (2016). Biodiesel production from non-edible plant oils. *Energy Exploration & Exploitation*, 34(2), 290-318.
4. Renzaho, A. M., Kamara, J. K., & Toole, M. (2017). Biofuel production and its impact on food security in low and middle income countries: Implications for the post-2015 sustainable development goals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 503-516.
5. Shields-Menard, S. A., Amirsadeghi, M., French, W. T., & Boopathy, R. (2018). A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresource technology*, 259, 451-460.
6. Kim, J. Y., Lee, H. W., Lee, S. M., Jae, J., & Park, Y. K. (2019). Overview of the recent advances in lignocellulose liquefaction for producing biofuels, bio-based materials and chemicals. *Bioresource technology*, 279, 373-384. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.055>
7. Energy statistics of bitcoin mining in 2023. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://coinmarketcap.com/community/articles/659d6096f7b08836e412b596/>
8. Всеукраїнська Енергетична Асамблея. Динаміка і структура споживання електроенергії в Україні. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uaea.com.ua/dysp/ee-cons.html>
9. Mizik, T., & Gyarmati, G. (2021). Economic and sustainability of biodiesel production—a systematic literature review. *Clean Technologies*, 3(1), 19-36. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol3010002>

10. Sales, M. B., Borges, P. T., Ribeiro Filho, M. N., Miranda da Silva, L. R., Castro, A. P., Sanders Lopes, A. A., ... & Santos, J. C. D. (2022). Sustainable feedstocks and challenges in biodiesel production: an advanced bibliometric analysis. *Bioengineering*, 9(10), 539. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9100539>
11. Ma, Y., Gao, Z., Wang, Q., & Liu, Y. (2018). Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. *Bioresource technology*, 263, 631-641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.028>
12. OECD-FAO agricultural outlook 2015, OECD (2015). [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015\\_agr\\_outlook-2015-en](https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015_agr_outlook-2015-en)
13. Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01539>
14. Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. S., Sarris, D., Philippoussis, A., & Papanikolaou, S. (2018). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 336-367. <https://doi.org/10.1111/jam.13633>
15. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.009>
16. Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2019). Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2631-z>
17. Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>

18. Klymchuk, O., Khodakivska, O., Kireytseva, O., Podolska, O., & Mushenyk, I. (2022). Prospects of biodiesel production: the place and role of Ukraine in the context of implementation of the EU green course. *Independent Journal of Management & Production*, 13(3), s225-s240. <https://doi.org/10.14807/ijmp.v13i3.1990>
19. Zhang, X., Chen, J., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Li, J. (2017). Lipid production for biodiesel from sludge and crude glycerol. *Water Environment Research*, 89(5), 424-439. <https://doi.org/10.2175/106143017X14839994523424>
20. Souza, K. S. T., Ramos, C. L., Schwan, R. F., & Dias, D. R. (2017). Lipid production by yeasts grown on crude glycerol from biodiesel industry. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(4), 357-363. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1244689>
21. Brandenburg, Jule; Blomqvist, Johanna; Pickova, Jana; Bonturi, Nemailla; Sandgren, Mats; Passoth, Volkmar (2016). Lipid production from hemicellulose with *Lipomyces starkeyi* in a pH regulated fed batch cultivation. *Yeast*, (), n/a–n/a <https://doi.org/10.1002/yea.3160>
22. Chen, L., Zhang, Y., Liu, G. L., Chi, Z., Hu, Z., & Chi, Z. M. (2020). Cellular lipid production by the fatty acid synthase-duplicated *Lipomyces kononenkoae* BF1S57 strain for biodiesel making. *Renewable Energy*, 151, 707-714. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.11.074>
23. Chmielarz, M., Blomqvist, J., Sampels, S., Sandgren, M., & Passoth, V. (2021). Microbial lipid production from crude glycerol and hemicellulosic hydrolysate with oleaginous yeasts. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01916-y>
24. i Nogué, V. S., Black, B. A., Kruger, J. S., Singer, C. A., Ramirez, K. J., Reed, M. L., ... & Beckham, G. T. (2018). Integrated diesel production from lignocellulosic sugars via oleaginous yeast. *Green Chemistry*, 20(18), 4349-4365. <https://doi.org/10.1039/C8GC01905C>

25. Chen, J., Zhang, X., Tyagi, R. D., & Drogui, P. (2018). Utilization of methanol in crude glycerol to assist lipid production in non-sterilized fermentation from *Trichosporon oleaginosus*. *Bioresource technology*, 253, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.008>
26. Maza, D. D., Viñarta, S. C., Su, Y., Guillamón, J. M., & Aybar, M. J. (2020). Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. *Journal of biotechnology*, 310, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>
27. Sara, M., Brar, S. K., & Blais, J. F. (2016). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* grown on biodiesel-derived crude glycerol: optimization of growth parameters and their effects on the fermentation efficiency. *RSC advances*, 6(93), 90547-90558. <https://doi.org/10.1039/C6RA16382C>
28. Boonyarit, J., Polburee, P., Khaenda, B., Zhao, Z. K., & Limtong, S. (2020). Lipid production from sugarcane top hydrolysate and crude glycerol with *rhodosporidiobolus fluvialis* using a two-stage batch-cultivation strategy with separate optimization of each stage. *Microorganisms*, 8(3), 453. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030453>
29. Ayadi, I., Belghith, H., Gargouri, A., & Guerfali, M. (2019). Utilization of wheat bran acid hydrolysate by *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 for microbial lipid production as feedstock for biodiesel synthesis. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3213521>
30. Miao, Z., Tian, X., Liang, W., He, Y., & Wang, G. (2020). Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. *Renewable Energy*, 161, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.007>
31. Friedlander, J., Tsakraklides, V., Kamineni, A., Greenhagen, E. H., Consiglio, A. L., MacEwen, K., ... & Brevnova, E. E. (2016). Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnology for biofuels*, 9, 1-12. doi: 10.1186/s13068-016-0492-3

32. Yu, D., Wang, X., Fan, X., Ren, H., Hu, S., Wang, L., ... & Qiao, N. (2018). Refined soybean oil wastewater treatment and its utilization for lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1306-6>
33. Saraf, C., & Dutt, K. (2021). Oleaginous potential of indigenously isolated fresh water microalgae for biofuel production. *International Journal of Sustainable Energy*, 40(4), 326-343. <https://doi.org/10.1080/14786451.2020.1806840>
34. Narayanan, G. S., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S., & Premalatha, M. (2018). Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp. FI69 in bubble column reactor for the application of biofuel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.022>
35. Sangapillai, K., & Marimuthu, T. (2019). Isolation and selection of growth medium for freshwater microalgae *Asterarcys quadricellulare* for maximum biomass production. *Water Science and Technology*, 80(11), 2027-2036. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.015>
36. Paramasivam, P., Kanagesan, K., Bhuyar, P., Govindan, N., Ab. Rahim, M. H., & Maniam, G. P. (2021). Biomass and lipid production from indigenous *Nannochloropsis* sp. by employing stress factors for improved biodiesel production. *Environment, Development and Sustainability*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01910-2>
37. Fawzy, M. A., & Alharthi, S. (2021). Use of response surface methodology in optimization of biomass, lipid productivity and fatty acid profiles of marine microalga *Dunaliella parva* for biodiesel production. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101485. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101485>
38. Jeong, D., & Jang, A. (2020). Exploration of microalgal species for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. *Environmental Research*, 188, 109772. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109772>

39. Polat, E., & Altınbaş, M. (2022). Optimization of *Auxenochlorella protothecoides* lipid content using response surface methodology for biofuel production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(6), 2133-2147. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00798-8>
40. Neag, E., Török, A. I., Cadar, O., Băbălău–Fuss, V., & Roman, C. (2019). Enhancing lipid production of *Synechocystis* PCC 6803 for biofuels production, through environmental stress exposure. *Renewable Energy*, 143, 243-251. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.005>
41. Yang, L., Ren, L., Tan, X., Chu, H., Chen, J., Zhang, Y., & Zhou, X. (2020). Removal of ofloxacin with biofuel production by oleaginous microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, 315, 123738. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123738>
42. Song, X., Liu, B. F., Kong, F., Song, Q., Ren, N. Q., & Ren, H. Y. (2023). Lipid accumulation by a novel microalga *Parachlorella kessleri* R-3 with wide pH tolerance for promising biodiesel production. *Algal Research*, 69, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102925>
43. Patel, A., Hrušová, K., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2019). Sustainable biorefinery concept for biofuel production through holistic valorization of food waste. *Bioresource technology*, 294, 122247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122247>
44. Arora, N., Patel, A., Mehtani, J., Pruthi, P. A., Pruthi, V., & Poluri, K. M. (2019). Co-culturing of oleaginous microalgae and yeast: paradigm shift towards enhanced lipid productivity. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 16952-16973. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05138-6>
45. Cheirsilp, B., Suwannarat, W., & Niyomdecha, R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology*, 28(4), 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.01.004>
46. Qin, L., Liu, L., Wang, Z., Chen, W., & Wei, D. (2018). Efficient resource recycling from liquid digestate by microalgae-yeast mixed culture and the

- assessment of key gene transcription related to nitrogen assimilation in microalgae. *Bioresource technology*, 264, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.061>
47. Liu, L., Chen, J., Lim, P. E., & Wei, D. (2018). Enhanced single cell oil production by mixed culture of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula glutinis* using cassava bagasse hydrolysate as carbon source. *Bioresource technology*, 255, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.114>
48. Wang, S. K., Wang, X., Tao, H. H., Sun, X. S., & Tian, Y. T. (2018). Heterotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with immobilized yeast. *Bioresource Technology*, 249, 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.049>
49. Li, T., Li, C. T., Butler, K., Hays, S. G., Guarnieri, M. T., Oyler, G. A., & Betenbaugh, M. J. (2017). Mimicking lichens: incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal, and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform. *Biotechnology for biofuels*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0736-x>
50. Jiang, X., Liu, L., Chen, J., & Wei, D. (2018). Effects of *Xanthophyllomyces dendrorhous* on cell growth, lipid, and astaxanthin production of *Chromochloris zofingiensis* by mixed culture strategy. *Journal of Applied Phycology*, 30, 3009-3015. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1553-8>
51. Kitcha, S., & Cheirsilp, B. (2014). Enhanced lipid production by co-cultivation and co-encapsulation of oleaginous yeast *Trichosporonoides spathulata* with microalgae in alginate gel beads. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173, 522-534. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0859-5>
52. Zhang, K., Zheng, J., Xue, D., Ren, D., & Lu, J. (2017). Effect of photoautotrophic and heteroautotrophic conditions on growth and lipid production in *Chlorella vulgaris* cultured in industrial wastewater with the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2783-2788. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1168-5>
53. Ling, J., Nip, S., Cheok, W. L., de Toledo, R. A., & Shim, H. (2014). Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from

distillery and domestic mixed wastewater. *Bioresource Technology*, 173, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.047>

54. Yen, H. W., Chen, P. W., & Chen, L. J. (2015). The synergistic effects for the co-cultivation of oleaginous yeast-*Rhodotorula glutinis* and microalgae-*Scenedesmus obliquus* on the biomass and total lipids accumulation. *Bioresource technology*, 184, 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.113>

55. Suastes-Rivas, J. K., Hernández-Altamirano, R., Mena-Cervantes, V. Y., Valdez-Ojeda, R., Toledano-Thompson, T., Tovar-Gálvez, L. R., ... & Chairez, I. (2020). Efficient production of fatty acid methyl esters by a wastewater-isolated microalgae-yeast co-culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 28490-28499. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07286-1>

56. Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. S., Sarris, D., Philippoussis, A., & Papanikolaou, S. (2018). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 336-367.

57. Guendouzi, A., & Mekelleche, S. M. (2012). Prediction of the melting points of fatty acids from computed molecular descriptors: A quantitative structure–property relationship study. *Chemistry and physics of lipids*, 165(1), 1-6.

58. Finley, J.W., deMan, J.M. (2018). Lipids. In: *Principles of Food Chemistry*. Food Science Text Series. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63607-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63607-8_2)

59. Yellapu, S. K., Kaur, R., Kumar, L. R., Tiwari, B., Zhang, X., & Tyagi, R. D. (2018). Recent developments of downstream processing for microbial lipids and conversion to biodiesel. *Bioresource technology*, 256, 515-528.

60. Cui, L., & Decker, E. A. (2016). Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 18-31.

61. Siepmann, J., Faham, A., Clas, S. D., Boyd, B. J., Jannin, V., Bernkop-Schnürch, A., ... & Leroux, J. C. (2019). Lipids and polymers in pharmaceutical technology: Lifelong companions. *International journal of pharmaceutics*, 558, 128-142.

62. Traversier, M., Gaslondes, T., Milesi, S., Michel, S., & Delannay, E. (2018). Polar lipids in cosmetics: Recent trends in extraction, separation, analysis and main applications. *Phytochemistry reviews*, 17, 1179-1210.
63. Україна у цифрах статистичний збірник 2022, Київ 2023 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/2023/zb/08/zb\\_Ukraine\\_in\\_figures\\_22.pdf](https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2023/zb/08/zb_Ukraine_in_figures_22.pdf)
64. Паливно-енергетичні ресурси України 2020 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/2021/zb/12/Zb\\_per.pdf](https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2021/zb/12/Zb_per.pdf)
65. У 2023 році імпорт дизельного пального [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://skilky-skilky.info/u-2023-rotsi-import-dyzelnoho-palnoho-zris-na-23/>
66. Рідкі біопалива: біоетанол та біодизель [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uabio.org/liquid-biofuels/>
67. Vasaki, M., Sithan, M., Ravindran, G., Paramasivan, B., Ekambaram, G., & Karri, R. R. (2022). Biodiesel production from lignocellulosic biomass using *Yarrowia lipolytica*. *Energy Conversion and Management*: X, 13, 100167.
68. Friedlander, J., Tsakraklides, V., Kamineni, A., Greenhagen, E. H., Consiglio, A. L., MacEwen, K., ... & Brevnova, E. E. (2016). Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnology for biofuels*, 9, 1-12.
69. Bhutada, G., Kavšček, M., Hofer, F., Gogg-Fassolter, G., Schweiger, M., Darnhofer, B., ... Natter, K. (2018). Characterization of a lipid droplet protein from *Yarrowia lipolytica* that is required for its oleaginous phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(10), 1193–1205. doi:10.1016/j.bbalip.2018.07.010
70. Martinez-Silveira, A., Villarreal, R., Garmendia, G., Rufo, C., & Vero, S. (2019). Process conditions for a rapid in situ transesterification for biodiesel production from oleaginous yeasts. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 1-9.

71. Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative food science & emerging technologies*, 36, 181-192.

72. Meullemiestre, A., Breil, C., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2016). Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. *Bioresource Technology*, 211, 190–199. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.040

73. Imatoukene, N., Koubaa, M., PERDRIX, E., Benali, M., & Vorobiev, E. (2019). Combination of cell disruption technologies for lipid recovery from dry and wet biomass of *Yarrowia lipolytica* and using green solvents. *Process Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2019.11.011

74. Vasaki, M., Sithan, M., Ravindran, G., Paramasivan, B., Ekambaram, G., & Karri, R. R. (2022). Biodiesel production from lignocellulosic biomass using *Yarrowia lipolytica*. *Energy Conversion and Management: X*, 13, 100167.

75. Milanesio, J., Hegel, P., Medina-González, Y., Camy, S., & Condoret, J. S. (2013). Extraction of lipids from *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(3), 378-387.

76. Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., Maneerat, S., & Prasertsan, P. (2018). Direct transesterification of oleaginous yeast lipids into biodiesel: development of vigorously stirred tank reactor and process optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 232-238.

77. reactor 100000 liter [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.alibaba.com/product-detail/NEW-design-fluidized-bed-reactor-100000\\_1600838452534.html?spm=a2700.details.popular\\_products.1.13e62488McpjqG](https://www.alibaba.com/product-detail/NEW-design-fluidized-bed-reactor-100000_1600838452534.html?spm=a2700.details.popular_products.1.13e62488McpjqG)

78. Насос СМ 200-150-400/46 [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://agrospecteh.com.ua/ua/p1016550866-nasos-200-150.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_term=&utm\\_content=g&google\\_ad=624376803068&utm\\_campaign=%D0%A2](https://agrospecteh.com.ua/ua/p1016550866-nasos-200-150.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=g&google_ad=624376803068&utm_campaign=%D0%A2)

%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B0%20%D0%90%D0%B3%D1%80%D0%BE%D0%A1%D0%BF%D0%B5%D1%86%D0%A2%D0%B5%D1%85%20%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D0%B8%D0%BD%D0%B0&gad\_source=1&gclid=CjwKCAiAl4a6BhBqEiwAqvrqura284KqxamKH3ZoQuFaEMTTUgGCzxI6I2G5T9dV1msxudVJE445TBoCDwoQAvD\_BwE

79. ZK Fermentation Industry Centrifuge Series [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.zkcentrifuge.com/product/fermentation-decanter.html>

80. Chemical Reactor [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.alibaba.com/product-detail/HXCHEM-NEW-ASME-40000L-Industrial-Gas\\_62573273180.html?spm=a2700.7724857.0.0.5fadb296Sn80sg](https://www.alibaba.com/product-detail/HXCHEM-NEW-ASME-40000L-Industrial-Gas_62573273180.html?spm=a2700.7724857.0.0.5fadb296Sn80sg)

81. BGWH 150-315(I) (200/32) [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console\\_pumps/bgwh-150-315-i-200-32-30kw-1480-nasos-nerzhav-yuchiy-gorizontalny/?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAl4a6BhBqEiwAqvrquhDR4qlp\\_WLRbQamoC\\_oBwlZ93fJYq6ajyyQthj94vvQnxR0J7BkOxoCkg0QAvD\\_BwE](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console_pumps/bgwh-150-315-i-200-32-30kw-1480-nasos-nerzhav-yuchiy-gorizontalny/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAl4a6BhBqEiwAqvrquhDR4qlp_WLRbQamoC_oBwlZ93fJYq6ajyyQthj94vvQnxR0J7BkOxoCkg0QAvD_BwE)

82. Bead Mill [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.ele-mix.com/bead-mill/bead-mills.html>

83. Industrial Automatic Medicine Water Percolation Tank 10000l Stainless Steel [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.drinkprocessing.com/sale-14555148-industrial-automatic-medicine-water-percolation-tank-10000l-stainless-steel.html?clid=ec\\_ads&k=stainless+steel+tanks](https://www.drinkprocessing.com/sale-14555148-industrial-automatic-medicine-water-percolation-tank-10000l-stainless-steel.html?clid=ec_ads&k=stainless+steel+tanks)

84. Відцентровий насос Speroni CB 60/N [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://teploradost.com.ua/ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cb-60n>

85. 19,6Т вакуум-випарна установка [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prod-corn.com.ua/ua/vacuum-evaporators/19-6t-vakuum-viparna-ustanovka-dlya-bardi-4-stupen-/>

86. Насос Aquaviva LX WEQ750 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://aqb.com.ua/ua/nasosy-dlya-basseyna/9155/?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=21481409405&utm\\_content=&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAjw5qC2BhB8EiwAvqa41iHj6yMDOdAqPfJcr5Rq-1cXobEir4go7CBmjKV4\\_TzNgTLRbaVzrxoCM2oQAvD\\_BwE](https://aqb.com.ua/ua/nasosy-dlya-basseyna/9155/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=21481409405&utm_content=&gad_source=1&gclid=CjwKCAjw5qC2BhB8EiwAvqa41iHj6yMDOdAqPfJcr5Rq-1cXobEir4go7CBmjKV4_TzNgTLRbaVzrxoCM2oQAvD_BwE)

87. Membrane Filter Press [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://zhengzhoutoper.en.made-in-china.com/product/SyTmGslCAqcu/China-Membrane-Filter-Press-Used-for-Sludge-Dehydrator-Filter-Press-Factory-in-China.html?pv\\_id=1i60c5k26fee&faw\\_id=1i60c5ubu9d8](https://zhengzhoutoper.en.made-in-china.com/product/SyTmGslCAqcu/China-Membrane-Filter-Press-Used-for-Sludge-Dehydrator-Filter-Press-Factory-in-China.html?pv_id=1i60c5k26fee&faw_id=1i60c5ubu9d8)

88. Насос Speroni CS 80-160 D [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console\\_pumps/nasos-v-dcentroviy-cs-80-160-d/](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console_pumps/nasos-v-dcentroviy-cs-80-160-d/)

89. 6000L Stainless Steel Chemical Jacketed Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.alibaba.com/product-detail/6000L-Stainless-Steel-Chemical-Jacketed-Reactor\\_60727846650.html?spm=a2700.7724857.0.0.5b5d7531DEvs7E](https://www.alibaba.com/product-detail/6000L-Stainless-Steel-Chemical-Jacketed-Reactor_60727846650.html?spm=a2700.7724857.0.0.5b5d7531DEvs7E)

90. Насос для перекачування палива CG-800 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://petroline.ua/nasos-dlya-perekachuvannya-palyva-do-800-l-khv-cg-800/>

91. Fully Automatic Steel Drum Filling Sealing Line, 210.5L, 220L Bitumen Barrel Drum Filling Line [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.longtermmachinery.com/Fully-Automatic-Steel-Drum-Filling-Sealing-Line-210-5L-220L-Bitumen-Barrel-Drum-Filling-Line-pd42541660.html>

92. ДСТУ EN 14103:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення вмісту ефіру та метилового ефіру ліноленової кислоти (EN 14103:2003, IDT).

93. ДСТУ EN ISO 3675:2012 Нафта сира та нафтопродукти рідкі. Метод лабораторного визначення густини ареометром (EN ISO 3675:1998, IDT).

94. ДСТУ EN ISO 3104:2022 Нафтопродукти. Прозорі та непрозорі рідини. Визначення кінематичної в'язкості та обчислення динамічної в'язкості (EN ISO 3104:2020, IDT; ISO 3104:2020, IDT).

95. ДСТУ EN ISO 2719:2022 Визначення температури спалаху. Метод Пенскі-Мартенса в закритій чашці (EN ISO 2719:2016, IDT; ISO 2719:2016, IDT).

96. ДСТУ ISO 20846:2009 Нафтопродукти. Визначення вмісту сірки в автомобільному пальному методом ультрафіолетової флуоресценції (ISO 20846:2004, IDT).

97. ДСТУ EN ISO 10370:2012 Нафтопродукти. Визначення коксового залишку мікрометодом (EN ISO 10370:1996, IDT).

98. ДСТУ ISO 5165:2013 Нафтопродукти. Визначення характеристики спалахування дизельних палив. Метод цетанового числа на двигуні (ISO 5165:1998, IDT).

99. ДСТУ ISO 3987:2019 Нафтопродукти. Визначення масової частки сульфатної золи в мастильних оливах і добавках (ISO 3987:2010, IDT).

100. ДСТУ EN ISO 8534:2019 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення вмісту води. Метод Карла Фішера (без піридину) (EN ISO 8534:2017, IDT; ISO 8534:2017, IDT).

101. ДСТУ ГОСТ 6370:2021 Нафта, нафтопродукти та добавки. Метод визначення механічних домішок (ГОСТ 6370-2018, IDT).

102. ДСТУ EN ISO 2160:2012 Нафтопродукти. Метод визначення корозійної дії на мідну пластинку (EN ISO 2160:1998, IDT).

103. ДСТУ EN 14112:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення стійкості до окиснювання (прискорений метод) (EN 14112:2003, IDT).

104. ДСТУ EN 14104:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення кислотного числа (EN 14104:2003, IDT).

105. ДСТУ EN 14111:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення йодного числа (EN 14111:2003, IDT).

106. ДСТУ EN 14110:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення вмісту метанолу (EN 14110:2003, IDT).

107. ДСТУ EN 14105:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення вмісту вільного та загального гліцерину та моно-, ди- та тригліцеридів (контрольний метод) (EN 14105:2003, IDT).

108. ДСТУ EN 14108:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення вмісту натрію атомною абсорбційною спектрометрією (EN 14108:2003, IDT).

109. ДСТУ EN 14109:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення вмісту калію атомною абсорбційною спектрометрією (EN 14109:2003, IDT).

110. ДСТУ EN 14538:2022 Похідні жиру та олії. Метилловий ефір жирної кислоти (FAME). Визначення вмісту Ca, K, Mg і Na за допомогою спектрального аналізу оптичної емісії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP OES) (EN 14538:2006, IDT).

111. ДСТУ EN 14107:2009 Похідні жирів та олій. Метиллові ефіри жирних кислот (МЕЖК). Метод визначення вмісту фосфору емісійною спектрометрією з індуктивно наведеною плазмою (EN 14107:2003, IDT).

112. Mittelbach M, Remschmidt C. Biodiesel, The Comprehensive Handbook, Boersedruck, Ges.m.b.H., Vienna, Austria, First Edition, 2004.

113. Meher, L. C., Vidya Sagar, D., & Naik, S. N. "Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 10.3 (2006): 248-268. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>

114. Jain, S., & Sharma, M. P. "Stability of biodiesel and its blends: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14.2 (2010): 667-678. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.011>

115. Knothe, G., Krahl, J., & Van Gerpen, J. (2015). *The Biodiesel Handbook*. AOCS Press.

116. Nascimento, I. A., Marques, L. L., & Rios, J. C. (2017). Application of natural antioxidants in biodiesel. *Renewable Energy*, 113, 1096-1105.