

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2018, 28(2): 202–207

<https://doi.org/10.15407/alg28.02.202>

СМИТ Т.<sup>1</sup>, СМИТ ДЖ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Университет Аве Мария, Аве Мария, Флорида 31142, США

<sup>2</sup> Флоридская Виртуальная Школа,

2145, бульв. Метроцентр, 100, Орландо, Флорида 32835, США

## **ПОЛУЧЕНИЕ БИОЭТАНОЛА ИЗ МОРСКОЙ ВОДОРОСЛИ *ENTEROMORPHA FLEXUOSA* (WULFEN) J. AGARDH (*CHLOROPHYTA*)**

Обсуждается перспектива использования сырья из бурой морской водоросли *Enteromorpha flexuosa* для производства биоэтанола. В связи с возросшими потребностями в энергии очень актуальной остается проблема получения сырья для ее производства. В качестве такого источника предлагается морская водоросль *E. flexuosa*. Образцы водоросли отбирали в декабре 2017 г. в Парке Бейшор Лайв Ок, Шарлотта Каунти, штат Флорида, США. Талломы доводили до воздушно-сухого состояния, полученную навеску (544 г сухого вещества) ферментировали. Для разрушения крахмала и декстрина использовали  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазу. После завершения процесса ферментации полученный раствор подвергали дистилляции. В результате получено 35 мл дистиллята, что составляет 6,4% сухого вещества. Газо-хроматографический анализ дистиллята на содержание этанола и метанола показал, что объемные концентрации этих спиртов в полученном растворе составляли для этанола 8,8% об., для метанола 0,05%. Хроматограммы обоих спиртов не перекрывались и были легко различимы на графике. Этанол преобладал в полученном дистилляте, составляя 99,2%, остальная доля приходилась на метанол. Морские водоросли являются хорошим источником биомассы для производства биотоплива, поэтому необходимо продолжить их изучение.

Ключевые слова: биоэтанол, *Enteromorpha flexuosa*, морские водоросли, биотопливо, Флорида

### **Введение**

С ростом населения Земли повышается спрос на энергию. Все большее внимание уделяется возобновляемым ее источникам, среди которых ветер, солнечная энергия и биотопливо (Elliott, 2015). В качестве исходного сырья для производства биотоплива все чаще используют продовольственные культуры (например, кукурузу и соевые бобы). Однако использование сельскохозяйственных угодий для их выращивания нерентабельно. Исправить эту ситуацию можно за счет привлечения альтернативного сырья для получения биотоплива (этанола) (Larsen et al., 2008). Это позволит достигнуть существенного прогресса в производстве биотоплива, а также избежать вредного воздействия на окружающую среду.

© Смит Т., Смит Дж., 2018

Морские макроводоросли – универсальный продукт, широко используемый в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве.

В настоящее время общий объем производства морских водорослей в мире составляет около 6 млрд долл. США. Ежегодно добывается более 8 млн т сырой биомассы морских водорослей. Всего каждый год обрабатывается около 24 млн т морских макро- и микроводорослей для использования в пищевой промышленности, косметологии, фармакологии, сельском хозяйстве как добавки в корм животных (FAO, 2014). Красные и бурые водоросли используют для получения гидроколлоидов (альгинат, агар и каррагенан), которые являются природными загустителями и желеобразующими агентами. Наибольшую часть морских водорослей собирают и перерабатывают в Юго-Восточной Азии и Южной Америке. В Карибском бассейне или США такой вид деятельности почти не развит, несмотря на разнообразие и обилие морских водорослей, эндемичных для этого региона. Морские водоросли здесь пока не востребованы; они могут быть потенциально использованы для производства биоэтанола (Wei et al., 2013), но их считают отходами (Straker, 2015).

Считается, что для производства биоэтанола наиболее перспективными являются представители трех групп морских водорослей – *Chlorophyta*, *Rhodophyta* и *Phaeophyta*. Зеленые водоросли запасают углеводы в виде крахмала (амилозы), у *Rhodophyta* запасным углеводом является флоридский крахмал (амилопектин), а бурые водоросли накапливают глюкозный полисахарид ламинарин (Roberts, Whelan, 1960; Chesters, Bull, 1963; McCracken, Cain, 1981; Zemke-White, Clements, 1999). Известно, что фермент амилаза может разрушать амилозу и амилопектин, а ламинариназа расщепляет ламинарин до простых сахаров и, прежде всего, глюкозы (Roberts, Whelan, 1960; Chesters, Bull, 1963).

Исследователи уже пытались получать этанол из морских водорослей, а также использовать макрофиты для производства биоэтанола путем ферментации и дистилляции (Adams et al., 2009; Isa et al., 2009; John et al., 2011; Nikolaisen, 2011; Kumar et al., 2013). Так, некоторые авторы в качестве источника сырья использовали зеленую водоросль *Ulva lactuca* Linnaeus (Isa et al., 2009; Nikolaisen, 2011), другие подвергали ферментации талломы бурых водорослей из рода *Laminaria* (Adams et al., 2009), тестировали *Gracilaria* spp. из *Rhodophyta* (Kumar et al., 2013) Все три группы водорослей являются отличными источниками сырья для производства биоэтанола.

Зеленая водоросль *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen) J. Agardh широко распространена у побережья Флориды. В качестве продукта фотосинтеза она запасает крахмал.

Целью нашей работы было изучить перспективы использования морской водоросли *Enteromorpha flexuosa* для производства биоэтанола, в частности, проанализировать дистиллят и определить процентное соотношение образующихся спиртов. Данное исследование является частью проекта по обеспечению устойчивого экономического роста, направленного на сокращение спроса на импорт ископаемых видов топлива, укрепление глобальной конкурентоспособности и обеспечение устойчивой продовольственной безопасности Соединенных Штатов и стран Карибского бассейна.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы *Enteromorpha flexuosa*, отобранные в декабре 2017 г. в Парке Бейшор Лайв Ок, Шарлотта Каунти, штат Флорида, США. В лаборатории отобранную биомассу промывали пресной водой, затем выдерживали в сушильном шкафу при 100 °С в течение 24 ч. Полученный образец (544 г) помещали в две колбы Эрхлермейера емкостью 1000 мл каждая и кипятили при 100 °С в течение 45 мин, чтобы создать стерильную среду и разрушить клеточные стенки. Образец в жидкости гомогенизировали с помощью модели Beat-Beater 1107900 (Biospec Products, Inc.), затем раствор помещали в 20-литровую стерильную бутылку для кислот, предварительно стерилизованную 10%-ным раствором гипохлорита натрия.

#### Ферментация и дистилляция

Для разрушения крахмала и декстрина при превращении в простые сахара использовали  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазу (Nikolaisen, 2011). Для ферментации, которая длилась 2 недели, применяли пивные дрожжи Redstar (*Saccharomyces cerevisiae*). Затем образец помещали в аппарат для дистилляции емкостью 20 л (Pathonor®) и дистиллировали при температуре 90 °С в течение 120 мин.

#### Лабораторный анализ

Анализ дистиллята проводили методом газовой хроматографии с помощью газового хроматографа Varian CP-3800. Данный метод ранее был использован для определения концентраций этанола в пиве (Buckee, Mundy, 1993). Для этанола и метанола были созданы стандартные кривые (5, 10, 15, 20, 25 и 30%). Расчеты площади пиков и процентного соотношения спиртов выполняли с помощью Microsoft Excel.

#### Расчеты

На графике представлено соотношение площади пика отдельных спиртов и площади внутреннего стандартного пика.

$$\frac{\text{Area of individual alcohol peaks}}{\text{Area of internal standard peak}}$$

Приведены объемные концентрации ( $v/v$ ) метанола и этанола в дистилляте *E. flexuosa* (после коррекции по чистоте). Результаты получены для каждого из калибровочных стандартов. Граф должен быть линейным и проходить через начало координат.

### Результаты и обсуждение

В эксперименте использовали высушенную биомассу (544 г) *Enteromorpha flexuosa*. После ферментации полученный продукт помещали в дистилляционный аппарат. В результате было получено 35 мл дистиллята бледного сине-зеленого цвета. Вероятно, причиной такого цвета стали один или несколько пигментов хлорофилла (*a* и/или *b*) или медь, замещающая магний в порфириновом кольце. Этот пигмент называется фталоцианин и имеет светло-голубой цвет (McKeown, 1998). Согласно расчетам, выход дистиллята составляет 6,4% сухой биомассы. Возможно, этот процент еще выше, так как образец содержал песчинки, от которых так и не удалось избавиться. По литературным данным, при исследовании других морских зеленых водорослей было получено около 5% этанола (Isa et al., 2009; Yanagisawa et al., 2011) или еще меньшее количество (Schenk et al., 2008). Таким образом, наши результаты согласуются с данными других исследователей.

Результаты газохроматографического анализа полученного дистиллята на содержание метанола и этанола мы сравнили со стандартной кривой для каждого отдельного спирта. Как видно из рисунка, пик стандарта метанола (No 1) равнялся величине 1,45, тогда как пик стандарта этанола (No 2) был близок к 1,55.

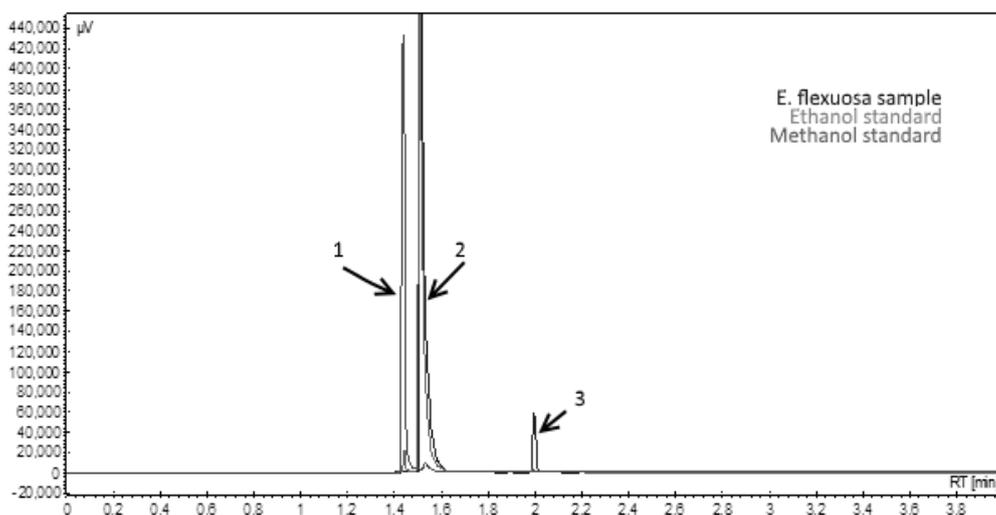


Рисунок. Хроматограммы *Enteromorpha flexuosa* и стандартные хроматограммы метилового и этилового спиртов: 1 – стандарт метанола; 2 – стандарт этанола и образец *E. flexuosa*; 3 – образец *E. flexuosa*

Хроматограммы обоих спиртов не перекрывались и были легко различимы на графике. Образец дистиллята *Enteromorpha flexuosa* имел три пика в Nos 1, 2 и 3. Наибольшей была площадь пика No 2, второй по величине площадь пика No 3, а наименьшей – пика No 1.

### Заключение

Морская зеленая водоросль *Enteromorpha flexuosa* является надежным источником сырья для получения биоэтанола. Морские водоросли-макрофиты остаются все еще неиспользованным источником потенциального биологического сырья для производства биотоплива. Более широкое применение такого сырья будет способствовать снижению объемов производства пищевых культур для получения биотоплива, что обеспечит значительную экономическую выгоду. Производство биоэтанола также может стать экономическим стимулом для стран с депрессивным состоянием экономики, у которых протяженная береговая линия (например, Карибские о-ова). В будущем необходимо продолжить исследования морских макроводорослей, обитающих у берегов Флориды, как потенциального источника биомассы для получения биотоплива.

*Авторы выражают благодарность Др. Джеймсу Рэнишу (Dr. James Vranish) из университета Аве Мария за помощь в проведении газохроматографического анализа дистиллята и сбор данных.*

### REFERENCES

- Adams J., Gallagher J., Donnison I. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.* 2009. 21: 569–574.
- Buckee G., Mundy A. Determination of Ethanol in Beer by Gas Chromatography (Direct Injection)-Collaborative Trial. *J. Inst. Brew.* 1993. 99: 381–384.
- Chesters C., Bull A. The enzymic degradation of laminarin. 1. The distribution of laminarinase among micro-organisms. *Biochem. J.* 1963. 86(1): 28–31.
- Elliott K. *Biofuel Policies: Fuel versus Food, Forests, and Climate. CGD Climate and Forest Paper Series #18.* Center Global Develop., Washington DC, 2015.
- Food and Agriculture Organization of the United National. *The State of World Fisheries and Aquaculture.* Rome, Italy: FAO, 2014.
- Isa A., Mishima Y., Takimura O., Minowa T. Preliminary study on ethanol production by using macro green algae. *J. Jpn. Inst. Energy.* 2009. 88: 912–917.
- John R., Anisha G., Nampoothiri K., Ashok Pandey. *Micro- and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. Biores. Technol.* 2011. 102: 186–193.
- Kumar S., Gupta R., Kumar G., Sahoo D., Kuhad R. Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. *Biores. Technol.* 2013. 135: 150–156.

- Larsen D.P., Olsen A.R., Stevens D.L. Using a master sample to integrate stream monitoring programs. *J. Agricult., Biol. and Environ. Stat.* 2008. 13(3): 243–254.
- McCracken D., Cain J. Amylose in Floridean Starch. *New Phytol.* 1981. 88(1): 67–71.
- McKeown N. *Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function. Chemistry of Solid State Materials Series.* Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1998.
- Nikolaisen L. Energy Production from Marine Biomass (*Ulva lactuca*), PSO Project No., Vol. 50, 2008-1. Danish Technol. Inst., Denmark, 2011.
- Roberts P., Whelan W. The mechanism of carbohydrase action. 5. Action of human salivary  $\alpha$ -amylase on amylopectin and glycogen. *Biochem J.* 1960. 76(2): 246–253.
- Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussnug J., Posten C., Kruse O., Hankamer B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Res.* 2008. 1: 20–43.
- Straker L. *Sargassum Seaweed Research.* St. George: New Grenada, 2015.
- Wei N., Quarterman J., Jin Y. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends in Biotechnol.* 2013. 31(2): 70–77.
- Yanagisawa M., Nakamura K., Ariga O., Nakasaki K. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Proc. Biochem.* 2011. 46(11): 2111–2116.
- Zemke-White W., Clements K. Chlorophyte and rhodophyte starches as factors in diet choice by marine herbivorous fish. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 1999. 240(1): 137–149.

Поступила 20 февраля 2018 г.

Подписала в печать Е.К. Золотарева

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia.* 2018, 28(2): 202–207

<https://doi.org/10.15407/alg28.02.202>

*Smith Th.*<sup>1</sup> & *Smith J.*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ave Maria University, Ave Maria, FL 31142, USA

<sup>2</sup>Florida Virtual School,

2145 Metrocenter Blvd #100, Orlando, FL 32835, USA

BIOETHANOL PRODUCTION FROM A MARINE ALGA, *ENTEROMORPHA FLEXUOSA* (WULFEN) J. AGARDH (*CHLOROPHYTA*)

Sustainable feedstocks are solutions to growing energy demands. *Enteromorpha flexuosa* was collected (December 2017) at the Bayshore Live Oak Park, Charlotte County, FL, USA. *Enteromorpha flexuosa* was oven dried and fermented 544 g dry weight. We used  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase to break down starch and dextrin. After distillation, 35 mL of distillate were produced and corresponded to 6.4% of the dry weight. Ethanol was measured at 8.8% v/v and methanol at 0.05% v/v using gas chromatography. Ethanol was the most abundant at 99.2% and the rest was made up of methanol. Marine algae are good sources of biomass for biofuel production and should be explored further.

**Key words:** bioethanol, *Enteromorpha flexuosa*, marine algae, biofuel, Florida, seaweed