

PROCEDEUL MODIFICAT DE PRODUCERE BIOCHIMICĂ A CIANCOBALAMINEI (VITAMINA B₁₂) DIN DEȘEURI AGROINDUSTRIALE

1. MODIFICĂRI TEHNOLOGICE PRIVIND INTENSIFICAREA PROCESULUI DE OBȚINERE A ADAOSULUI FURAJER

Victor COVALIOV, Valentin BOBEICĂ, Olga COVALIOVA

Universitatea de Stat din Moldova

Aplicarea combinată a unor soluții tehnologice noi, precum: stimularea chimică a metanogenezei, adaosul de compuși predecesori ai biosintezei vitaminei B₁₂, recircularea CO₂ și suplimentarea acestuia cu H₂, a condus la îmbogățirea sedimentelor epurării fermentativ-anaerobe a borhotului postdistilare alcoolică cu vitamina B₁₂ de 1,5-2 ori. Drept rezultat, a fost ridicată calitatea concentratului furajer vitaminizat, concomitent cu intensificarea producerii biometanului, astfel mărind eficiența ecologo-economică a epurării anaerobe a borhotului. O parte a cobalaminei se adsorbă pe particulele sedimentului în procesul de formare a lui, iar o parte rămasă în soluție se supune epurării avansate prin sorbție pe sorbentul mineral – diatomită. Produsul format poate fi utilizat în calitate de adaos furajer pentru animale și păsări din agricultură.

Cuvinte-cheie: cobalamină, concentrat furajer B₁₂-vitaminizat, borhot postalcoolic, metanogeneză, recircularea CO₂, predecesori ai vitaminei B₁₂.

MODIFIED METHOD OF CYANCOBALAMIN (VITAMIN B₁₂)

PRODUCTION FROM AGRO-INDUSTRIAL WASTES:

1. TECHNOLOGICAL IMPROVEMENTS REGARDING INTENSIFICATION OF FORAGE ADDITIVE PRODUCTION PROCESS

The combined application of a series of new approaches, including chemical stimulation of methanogenesis, introduction of the compounds precursors of vitamin B₁₂, recirculating of CO₂ and adding of H₂, have led to the 1,5-2 times enrichment with vitamin B₁₂ of the sludge resulted from anaerob-digestive treatment of post-distillery vinasse. As a result, the quality improvement of vitaminized forage concentrate was reached, at the same time with the intensification of biomethane production, thus enhancing the ecologico-economic efficiency of the vinasse anaerobic treatment. A part of cobalamin is adsorbed on the particles of the forming sludge, whereas the remaining part is subjected to the advanced adsorption treatment on the mineral adsorbent – diatomite. The product formed can be used as a forage additive for cattle and poultry in agriculture.

Keywords: cobalamin, forage concentrate vitaminized with B₁₂, post-distillery vinasse, methanogenesis, CO₂ recirculation, precursors of vitamin B₁₂.

Introducere

În afara importanței medicale a preparatelor vitaminei B₁₂ (ciancobalamina) pentru om, un rol mare pentru economie îl au și adaosurile furagere B₁₂-vitaminizate, dat fiind faptul că în hrana vegetală a vitelor această vitamină nu se conține. Introduse în hrana vitelor și păsărilor, adaosurile B₁₂-vitaminizate joacă un rol important în menținerea sănătății și ridicarea productivității acestora, fapt pentru care sunt privite ca un factor economic important.

Cianocobalamina (Fig.1) este o proteină, complex complex al cobaltului (Co), din seria porfirinei cu formula generală C₆₃H₉₀O₁₄N₁₄PCo și masa moleculară 1357,39, fiind cea mai mare moleculă metalorganică. Structura moleculară a fost determinată de laureatul Premiului Nobel Dorothy Hodgkin în 1956 [1].

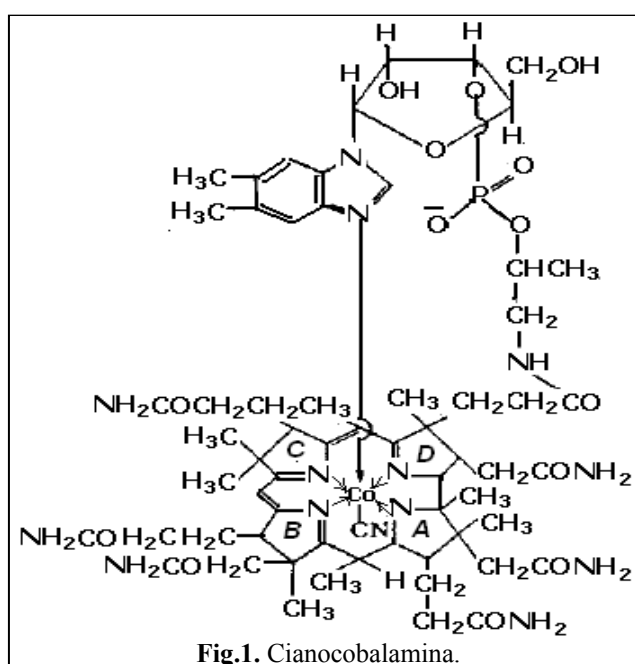


Fig.1. Cianocobalamina.

Structura chimică a ciancobalaminei (vitamina B₁₂) [1]

Gruparea CN din molecula vitaminei B₁₂ poate fi substituită cu OH, ONO, SO₃, SCN, CI, Br și cu alte grupuri, formând derivații cobalaminelor, mulți dintre care posedă activitate biologică.

În pofida eforturilor pe termen lung ale cercetătorilor, printre care și Woodward Eshengover [2,3], sinteza chimică a cobalaminei a rămas a fi extrem de complicată și cu randament foarte mic. Prin urmare, obținerea industrială a ciancobalaminei se realizează exclusiv prin metode microbiologice cu bacterii metanogene ca produs al activității vitale a acestora. Tehnologia tipică de producere se bazează pe procesele de digestie anaerobă, în principal a vinasăei de la distilarea alcoolului din vin. Nămolul postdistilare are un conținut brut de proteină – de 34,2-37,2% din masă uscată a substanței. Mai conține aminoacizi, substanțe grase (10-14,7%) și alte componente valoroase. Însă, randamentul produsului este scăzut, procesul este energofag. Datorită solubilității sale în apă, cobalamina se obține din fracția apoasă a fermentării prin evaporare.

Prin faptul că vitamina B₁₂ are un rol important la formarea sângelui și sinteza unor aminoacizi esențiali, premixurile vitaminizate din furaje contribuie la prevenirea și vindecarea anemiei maligne la animale, la sporirea adaosului de masă. Adaosurile nutritive vitamino-proteice se aplică în raționul de hrană al fiarelor, vitorilor, păsărilor în calitate de preparate profilactice antianemice, dar și în cazurile deficitului cancerigen de sânge (boala Adison-Birmer), altor dereglări ale formării sângelui, sistemului nervos ș.a. Insuficiența conținutului de vitamina B₁₂ în hrana păsărilor reduce conținutul de vitamină în gălbenușul ouălor și, ca urmare, acestea pierd capacitatea de reproducere a speciei. Adaosul de 10-15 mg/kg de vitamină B₁₂ în hrană mărește dezvoltarea porcinelor cu 10-15%, productivitatea găinilor în ouă, ieșirea puilor crește cu 20%. Există mai multe căi de obținere a unor asemenea adaosuri, toate bazate pe capacitatea microorganismelor metanogene de a produce ciancobalamina [4], dat fiind că metodele cunoscute de sinteză includ zeci de etape greu de realizat tehnologic la scară industrială [8]. De aceea, la momentul dat vitamina B₁₂ se obține exclusiv prin metode biotehnologice. Una dintre aceste căi este utilizarea sedimentelor de la fermentarea metanogenă a unor deșeuri lichide cu conținut de substanțe organice anaerob-biodegradabile [9,10], în scopul epurării acestora sau obținerii biogazului cu conținut de metan ca agent energetic. În condițiile obișnuite ale fermentării anaerobe a reziduurilor organice formarea vitaminei este cantitativ joasă, în dependență de mai mulți factori. Principalii factori limitativi sunt conținutul foarte mic de cobalt (Co) (metalul coordonativ al compusului complex ciancobalamina – vitamina B₁₂) și alți compuși intermediari în biosistemele supuse fermentării anaerobe, profunzimea relativ mică a degradării fermentative a substratului, care în condiții obișnuite atinge în jur de 60% din totalul poluanților degradabili.

Despre profunzimea digestiei anaerobe se judecă și după conținutul de metan în biogazul format, care rareori depășește 60-70%. Cu cât mai mare era cota metanului, cu atât mai profundă a fost digestia și, în consecință, s-a format mai multă ciancobalamina, dacă, bineînțeles, a fost prezent în cantități suficiente elementul Co. Pornind de la aceste premise, scopul prezentei lucrări este de a ridica conținutul de ciancobalamina în produsele metanogenezei substraturilor organice prin combinarea mai multor procedee de formare a vitaminei în procesele fermentării anaerobe.

Material și metode

1. Borhotul (materia primă) utilizat pentru obținerea concentratului de vitamina B₁₂. În calitate de materie primă pentru obținerea biotehnologică a concentratului de vitamina B₁₂ a fost utilizat borhotul postdistilare alcoolică a vinului, reziduu al procesului tehnologic corespunzător de la uzina oenologică din s. Bardar, r-nul Hâncești, Republica Moldova. Acesta prezintă un lichid de culoare gălbuie caracterizat cu următorii indicatori, chimici și microbiologici, cantitativi (Tab.1).

Tabelul 1**Indicatorii chimici și microbiologici, cantitativi, ai borhotului**

Materia primă	pH	Umiditatea, %	Reziduu sec, %	C, % din masa totală	C, % din reziduu sec	CCO ₂ , mgO ₂ /l	CBO ₅ , mgO ₂ /l	Bacterii heterotrofe, *UFC·10 ⁶ /ml
borhot post-alcoolic	5,4	91,25-91,59	8,41-8,75	4,25	49,5	28250	17800	7,39

*UFC – unități formatoare de colonii

2. Agentul de neutralizare a borhotului. Pentru neutralizarea borhotului postdistilare alcoolică a fost folosită făina calcaroasă (meluza), reziduu al tăierii pietrei calcaroase în minele de calcar, o pilitură măcinată a pietrei de calcar. Meluza măcinată, utilizată în scopul neutralizării borhotului, prezintă un material macroporic cu porozitatea de 22...60%, posedă o capacitate mare de adsorbție, având o greutate specifică de 1100...2240 kg/m³. Gradul de dispersie al meluzei utilizate constituie 100...400 μm. Componenta chimică cantitativă se caracterizează, în medie, prin următorul conținut (% din masă): carbonat de calciu – 94,20...94,70; oxid de siliciu – 2,16...2,50; carbonat de magneziu – 1,66...2,73; oxid de magneziu – 0,79...1,30; fracțiunea masică a altor componente nenocive (oxizii de fier, aluminiu ș.a.) constituie cel mult 0,8%.

3. Nămolul utilizat ca sursă de microorganisme metanogene. În calitate de sursă de microorganisme metanogene a fost utilizat un nămol rezidual de la epurarea anaerobă a apelor uzate comunale, material biologic activ cu reacție slab bazică (~7,5), aproximativ 23% conținut de materie organică, diversitate mare de microorganisme, dominată de comunități de microbi, dar și cu conținut de fungi și bacterii metanogene, cu activitate dihidrogenazică și capacitate de producere a CO₂. Conținutul de carbon microbial în reziduu sec al nămolului este de 2,5 mg C/g⁻¹. O tonă de acest nămol conține circa 5 kg reziduu sec microbiologic. Nămolul utilizat se caracterizează prin următoarele valori ale indicatorilor microbiologici și biochimici (Tab.2).

Tabelul 2

Caracteristica microbiologică și biochimică a borhotului

MB	Bacterii heterotrofe	Nocardia	Actinomicete	Bacterii metanogene	Fungi	CO ₂	Activitatea dehidrogenazică
mg C/g ⁻¹	UFC · 10 ⁶ /g			UFC · 10 ³ /g		mg /100 g / 24 ore	mg TPF /10 g / 24 ore
2,5	1286,8	249,3	22,8	350	5,4	1,91	11,8

4. Suplimentarea dioxidului de carbon cu hidrogen. Hidrogenul utilizat pentru îmbogățirea amestecului gazos implicat în procesul biochimic al metanogenezei a fost obținut prin electroliza soluției apoase de NaOH într-un electrolizor compact de construcție proprie cu destinație specială pentru obținerea hidrogenului în cadrul cercetărilor din prezenta lucrare [12,13].

5. Fitostimulenții metanogenezei. Substanțele fitochimice utilizate în calitate de stimulente ale metanogenezei în procesul de epurare prin fermentare anaerobă a apelor reziduale postdistilare alcoolică a vinului au fost compuși chimici și componente biochimice de proveniență vegetală izolați prin metodele standard (extragere cu solvenți organici, precipitare, separare cromatografică, distilare în vid ș.a.) din reziduuri ale industriilor de prelucrare a fructelor și legumelor, forestieră, organe nealimentare ale plantelor agricole, ale unor plante decorative și spontane. Cercetărilor au fost supuse uleiuri vegetale, uleiuri volatile, mono-, di-, tri- și tetraterpenoizi, steroizi, saponine.

6. Adaosurile de intermediari ai biosintezei ciancobolaminei

Sinteza complexilor citrat-amoniacali și tartrat-amoniacali aplicați în procesul de intensificare a biosintezei vitaminei B₁₂ s-a realizat astfel: 200 g sulfat de cobalt bivalent au fost dizolvate în 2 l de apă distilată, apoi prin barbotare prin soluție a aerului și agitare intensivă timp de 30 de minute sulfatul s-a oxidat până la sulfat de Co³⁺. După aceasta în amestecul reactant au fost introduse și dizolvate 400 g acid citric (HOOC-CH₂-C(COOH)(OH)-CH₂-COOH) și 1500 ml soluție concentrată de amoniac. După 90 de minute soluția a fost supusă evaporării în condiții moi; precipitatul format s-a uscat. Produsul format – complexul citrat-amoniacal al cobaltului (III) [2C₆H₅O₇Co(III)·C₆H₆O₇(NH₄)₂·nH₂O], obținut în stare cristalină, are culoare roșie-liliachie și este ușor hidrosolubil. Similar s-a obținut și complexul tartrat-amoniacal al cobaltului (III) [2C₄H₃O₆Co(III)·C₄H₄O₆(NH₄)₂·nH₂O].

Ferrocianura de potasiu, (K₄[Fe(CN)₆]), ne-a fost oferită de Departamentul Chimie Generală al Facultății de Chimie și Tehnologie Chimică a Universității de Stat din Moldova.

Rezultate și discuții

1. Descrierea generală a cercetării

Pornind de la scopul propus de a ridica conținutul de vitamina B₁₂ în sedimentul fermentării anaerobe, a fost selectat borhotul postdistilare alcoolică din produse agricole. Au fost cercetate posibilitățile îmbunătățirii

tehnologiei standard de obținere a biogazului din substraturi lichide prin combinarea a trei modificări tehnologice, fiecare având un anumit potențial de ridicare a conținutului de vitamină în produsele postfermentare anaerobă. Ridicarea conținutului de vitamină B₁₂, conform intenției noastre, se soldează cu transformarea sedimentului-deșeu de la fermentarea anaerobă într-un potențial concentrat furajer B₁₂-vitaminizat. Rezultatul pozitiv al cercetărilor experimentale în cauză și al încercărilor semiindustriale conferă tehnologiei de distilare industrială a bioetanolului caracterul unui ciclu închis, fără deșeuri, cu eficiență energetică înaltă și impact minim asupra mediului înconjurător, în corespundere cu principiile ecologiei industriale. În prezenta lucrare se examinează elaborarea, modificarea și combinarea optimală a unor procedee tehnologice în care apele reziduale postdistilare alcoolică sunt privite ca materie primă pentru obținerea sedimentelor B₁₂ vitamino-proteice în calitate de adaosuri furajere [8,9] în cuplu cu biogazul cu conținut înalt de biometan ca agent energetic din surse regenerabile. Obținerea și utilizarea acestui sediment în calitate de concentrat furajer vitaminizat are două mari avantaje: de mediu – prevenirea eliminării în mediu a unui deșeu, și economic – asigurarea sectorului zootehnic cu adaos B₁₂-vitaminizat relativ ieftin.

S-a pornit de la premisa că activizarea, prin diferite procedee, a microorganismelor metanogene duce și la intensificarea biosintezei intracelulare a vitaminei B₁₂ și la ridicarea randamentului asimilării de către acestea a adaosurilor premergătoare pentru biosinteza vitaminei B₁₂, fapt ce conduce real la creșterea cantității de compuși cu activitate B₁₂-vitaminică în produsele epurării anaerobe a borhotului postdistilare alcoolică și altor deșeuri și reziduuri agroindustriale lichide.

Astfel, în cadrul cercetărilor noastre s-a recurs la elaborarea și aplicarea combinată a trei abordări tehnologice privind obținerea sedimentului cu nivel ridicat al conținutului de compuși cu activitate B₁₂-vitaminică ca produs complementar al procesului de intensificare a proceselor de obținere a metanului din apele postdistilare a bioetanolului:

- 1) intensificarea și direcționarea proceselor de fermentare prin stimularea chimică a activității microorganismelor anaerobe;
- 2) reutilizarea dioxidului de carbon și suplimentarea acestuia cu hidrogen exogen;
- 3) suplimentarea exogenă a substratului cu predecesori ai biosintezei vitaminei B₁₂ în forme asimilabile.

În calitate de materie primă experimentală a fost utilizat lichidul rezidual de la distilarea bioetanolului din material oenologic, numit în cadrul prezentei lucrări „borhot”. În condițiile producerii industriale a bioetanolului borhotul, înainte de a fi deversat în mediul natural, se supune epurării prin diferite metode de tratare – aerobă sau anaerobă – cu scopul de a reduce conținutul de reziduuri organice până la nivelul admisibil pentru evacuarea în mediul acvatic. Epurarea biologică prin fermentarea microbiologică anaerobă deschide și perspectivele de a obține biogaz cu conținut de metan și produse (nămol, faza lichidă) cu conținut de vitamina B₁₂. Aceste produse transformă deșeurile în cauză în sursă potențială de energie regenerabilă și materie primă pentru diferite produse cu destinație agricolă: nămol fertilizant, adaos furajer vitaminizat, apă pentru irigare. Astfel, utilizând acest procedeu de epurare a deșeurilor lichide, industria bioalcoolului poate deveni o producere conformă principiilor dezvoltării durabile, fără deșeuri, cu funcționare în ciclu închis. Însă, dezvoltarea domeniului într-o astfel de direcție are de depășit câteva bariere. Una dintre acestea este aciditatea borhotului. Datorită conținutului de acizi organici, aciditatea borhotului variază între valorile pH = 3,5-5,5. În asemenea mediu bacteriile metanogene nu funcționează sau manifestă activitate slabă. Valorile optime ale pH-ului pentru fermentarea metanogenă fiind 5,5-6,5. Pentru depășirea situației se cere neutralizarea prealabilă a borhotului. Mostrele de borhot industrial prelevate pentru experimentele privind intensificarea formării vitaminei B₁₂ au fost în prealabil neutralizate până la valorile optime ale pH-ului printr-un procedeu nou, energetic și material mai avantajos, elaborat în cadrul cercetărilor noastre. Procedeu include tratarea borhotului fierbinte, la ieșirea de la distilare, cu meluză măcinată, un reziduu de la carierele de piatră calcaroasă. Meluza sedimentată după neutralizare poate fi utilizată în scopuri agricole: tratarea solurilor acide, adaos în hrana păsărilor, vitelor. Făina calcaroasă este un reactiv ecologic pur, se utilizează pentru neutralizarea diferitelor lichide cu mediu acid și ca supliment mineral în hrana animalelor și păsărilor agricole, adaos la producerea nutrețurilor combinate (GOST 26826-86).

2. Intensificarea indirectă a formării vitaminei B₁₂ prin stimularea fitochimică a procesului de fermentare metanogenă. Intensificarea formării vitaminei B₁₂, descrisă în cele ce urmează, prevede intervenții chimice în procesul fermentării anaerobe a borhotului în scopul intensificării formării și măririi conținutului de biometan, avându-se în vedere că în aceste condiții va crește și randamentul vitaminei B₁₂. Principiul stimulării și intensificării chimice a procesului de fermentare anaerobă cu ridicarea randamentului de biometan

este cunoscut. În acest scop se elaborează diferite preparate cu activitate catalitică asupra procesului biochimic de metanogeneză. Însă, preparatele sintetice propuse pentru stimularea fermentării posedă și un anumit potențial de poluare a sedimentului, ceea ce face inacceptabilă utilizarea acestuia ca adaos furajer. Preparatele microbiologice, nepoluante, sunt costisitoare, nu în toate cazurile manifestă eficacitate înaltă și, ca urmare, ar putea să nu îndreptățească cheltuielile. Pornind de la aceste premise și de la scopul obținerii unui adaos furajer vitaminizat în cuplu cu ridicarea conținutului de metan în biogaz, în cadrul cercetărilor din prezenta lucrare unul din obiective a fost identificarea unor stimulenți naturali ai fermentării anaerobe.

În această ordine de idei, în scopul eficientizării procesului de epurare a apei uzate prin fermentarea anaerobă cu creșterea cantității de metan în biogaz și de vitamină B₁₂ în sediment și în faza lichidă, s-a recurs la stimularea procesului metanogenezei prin introducerea în lichidul aflat în faza metanogenă a fermentării unor microadaosuri de substanțe bioactive vegetale [7,8], în special din categoria celor caracterizate ca stimulenți exogeni ai creșterii și dezvoltării plantelor, posesoare de proprietăți antioxidante, antihipoxante, transportatoare de oxigen în procesele biochimice ș.a. Efectul acestor proprietăți ale adaosurilor ar putea fi stabilizarea membranelor celulare ale microorganismelor, ridicarea rezistenței celulelor la hipoxie (deficit de oxigen), reducerea peroxidării lipidelor și, respectiv, prevenirea deteriorării membranelor celulare. Această asociere de activități contribuie la accelerarea proceselor biochimice metanogene și duce la creșterea randamentului de biogaz. Concomitent, unele substanțe biochimic active ar putea participa la saturarea țesuturilor microorganismelor cu oxigen, fapt ce asigură un ciclu mai complet al procesului de metanogeneză și, ca urmare, contribuie la creșterea randamentului de biometan în componența biogazului.

Raționamentele expuse privind mecanismele de manifestare a activității de stimulare a procesului de fermentare metanogenă au caracter ipotetic; stabilirea concretă a acestora rămâne o sarcină de viitor. Însă, existența fenomenului stimulării formării biometanului și vitaminei B₁₂ cu substanțe biochimice a fost demonstrată prin mai multe experimente discutate în cele ce urmează.

Testărilor privind capacitatea de stimulare și intensificare a metanogenezei a fost supus un șir de componente biochimice și substanțe fitochimice izolate din organe reziduale postprelucrare industrială ale unor plante agricole și arbori: semințe de la prelucrarea legumelor, de la plante furajere, scoarțe de la copacii colectați pentru diferite scopuri ș.a. Selectarea inițială a componentelor bio- și fitochimice a fost realizată conform datelor din literatura de specialitate privind activitatea biologică stimulentă, accesibilitatea materiei prime (prioritar – deșeuri agroindustriale), simplitatea tehnologiei și metodelor de izolare (sinteză în caz de necesitate). Aplicarea în procesul fermentării anaerobe a mai multor microadaosuri, potențiali stimulenți ai metanogenezei, din diferite clase fitochimice în amestecul de fermentare a condus la evidențierea a cel puțin două substanțe stimulente de mare eficacitate în intensificarea procesului de fermentare și la ridicarea cotei metanului în biogazul format: uleiul semințelor unor specii de amarant (*Amaranthus*) și fracția compușilor triterpenici din scoarța copacului de mesteacăn (*Betula pendula L.*), numită în continuare compuși betulinici, după numirea componentului principal – betulinolul.

Astfel, aplicarea unui preparat din uleiul de amarant în amestec cu compuși betulinici în intervalul de concentrații, găsit experimental, de 10⁻⁵-10⁻³% din masa substratului supus biodigestiei metanogene a redus timpul de fermentare cu cca 60%, indicatorii CCO și CBO₅ cu 20% fiecare, emisia specifică de biogaz a crescut cu 20% și conținutul de metan în biogaz cu 35% față de experimentul în condițiile standard ale fermentării.

3. Suplimentarea mediului metanogen cu CO₂ și H₂. Rezultatele au fost și mai impresionante în experimentele cu introducerea unor cantități suplimentare de amestec de CO₂ cu H₂ în zona metanogenă a fermentării anaerobe a borhotului oenologic în cuplu cu stimulentele pe bază de ulei de amarant. În acest caz, volumul specific de biogaz eliminat a crescut cu 12% față de condițiile standard, iar conținutul de metan în biogaz a crescut cu cca 50%, valorile CCO și CBO au scăzut de aproape 1,5 ori. Totodată, au fost experimental identificate condițiile reducerii consumului de energie necesară asigurării temperaturii optime pentru decurgerea procesului de fermentare anaerobă stimulat de substanțe bioactive. În prezența stimulenților în cauză, procesul decurge în condiții mezofile, 32-34°C, evitând astfel necesitatea menținerii condițiilor termofile – 40-50°C. În consecință, s-a redus mai bine de două ori consumul specific de energie pentru întreținerea procesului de epurare anaerob-fermentativă a borhotului.

Este de presupus că în aceste condiții a crescut și cantitatea de vitamină care s-a format în proces. Însă, procesul sintezei biochimice a vitaminei în condiții anaerobe depinde și mai mult de cel mai important factor

limitativ – conținutul de cobalt și de alți intermediari în substratul supus biodigestiei metanogene. De aceea, pentru obținerea unui rezultat mai mare privind scopul principal al lucrării date – creșterea cantității de vitamină B₁₂ care se formează în procesul de epurare anaerob-fermentativă a borhotului – metodele indirecte de influențare a acestuia au fost combinate cu procedeul de stimulare a biosintezei vitaminei prin adaosul cu acțiune directă asupra biosintezei și acumulării ciancobalaminei în produsele fermentării – compuși de Co și Fe asimilabili de către bacteriile metanogene.

4. Identificarea și suplimentarea exogenă a substratului cu predecesori ai biosintezei vitaminei B₁₂ în forme asimilabile. Aplicarea suplimentelor de compuși intermediari ai biosintezei vitaminei B₁₂ este un alt procedeul de intervenții chimice în procesul de fermentare anaerobă a borhotului. Concomitent cu procesele metanogenezei, în condițiile optime pentru aceasta, la suprafața membranei celulare proteice a bacteriilor metanogenice se produce formarea extracelulară a vitaminei B₁₂ (ciancobalaminei). Formarea ciancobalaminei depinde atât de activitatea microorganismelor, cât și de prezența compușilor chimici intermediari ai biosintezei vitaminei. Vitamina B₁₂ este un produs al interacțiunii microbiologice a proteinelor din borhotul în fermentare cu compușii cobaltului, unor cianuri și alți compuși, care se găsesc în cantități minuscule în componența borhotului și participă direct la formarea moleculei vitaminei. Adaosul suplimentar de asemenea compuși în procesul de fermentare metanogenică a borhotului creează condiții pentru o reacție mai completă și eficientă de formare a ciancobalaminei.

În prezența unui supliment de asemenea compuși, care în cazul dat se introduc printr-un agitator special prevăzut în construcția bioreactorului, sporește conținutul cantitativ de vitamina B₁₂ în mediul apos procesat, care ulterior se elimină din bioreactor printr-un tub de evacuare special prevăzut.

Există diferite procedee de sporire a biosintezei ciancobalaminei (vitaminei B₁₂) de către microorganismele metanogene bazate pe introducerea în amestecul de fermentare a diferiților compuși care participă direct la formarea moleculei vitaminei B₁₂. Stimularea cea mai efectivă a biosintezei ciancobalaminei de către microorganismele metanogene se obține prin adaosul în amestecul de fermentare a 5,6-dimetilbenzimidazolului (5,6 DMB), bază azotică care este a doua structură inelară a moleculei de vitamină, și a unor compuși de cobalt și de fier. Compușul 5,6 DMB nu stimulează direct sinteza vitaminei, ci contribuie la transformarea formelor neactive ale acesteia în forme active. Sărurile de cobalt pun la dispoziția microorganismelor, suplimentar, ioni de Co⁺³, care unesc prin legături coordinative cele patru cicluri pirolice din moleculele vitaminei. Ferocianurile asigură procesul biosintezei vitaminei cu grupa – CN, care se unește cu ionul de Co în molecula vitaminei prin legătură covalentă. Concomitent, microadaosurile de compuși ai cobaltului și ferului au și efect catalitic asupra procesului de metanogeneză, dat fiind că accelerează procesul de fermentare a compușilor greu degradabili din borhotul oenologic: antocianele, taninurile, polifenolii, ceea ce conduce atât la sporirea cantității de metan, cât și la creșterea eficacității reacțiilor de formare a vitaminei B₁₂ ca produs extracelular în borhotul fermentat. Anume în aceste două scopuri, în prezenta cercetare, în calitate de microadaosuri în cantități stabilite experimental, au fost selectate ca substanțe predecesoare pentru biosinteza anaerobă a vitaminei B₁₂, furnizori de Co, Fe și cianură, compuși neorganici mai accesibili microorganismelor metanogene – complecșii cobaltului(Co): citrat-amoniacal [2C₆H₅O₇Co(III)·C₆H₆O₇(NH₄)₂·nH₂O] și tartrat-amoniacal [2C₄H₃O₆Co(III)·C₄H₄O₆(NH₄)₂·nH₂O] și ferocianura de potasiu (K₄[Fe(CN)₆]) [8]. Cobaltul și ferocianura introduse astfel în procesul de tratare anaerobă a borhotului, la etapa metanogenezei, servesc ca nutrienți suplimentari pentru bacteriile producătoare de vitamina B₁₂. Concomitent cu intensificarea formării biogazului și ridicării conținutului de metan în acesta, introducerea compușilor de Co și a ferocianurilor contribuie la sinteza biochimică a ciancobalaminei (vitamina B₁₂) și la acumularea acesteia în cantități mai mari în produsele fermentării metanogene.

Astfel, introducerea compușilor în cauză, suplimentar la adaosul de biostimulent (uleiul de amarant și compușii betulinici) și amestecul gazos de hidrogen cu dioxid de carbon a redus de două ori timpul fermentării anaerobe a borhotului în condițiile propuse față de condițiile standard, iar conținutul de vitamina B₁₂ în compoziția concentratului vitamino-proteic furajer a crescut de aproximativ 2-3 ori. Cantitatea specifică de biogaz eliminat, m³/1kg CCO, a crescut cu 30%. Conținutul de CO₂ în biogaz s-a redus mai jos de 4% și, respectiv, a crescut conținutul de metan, consecință a echilibrării cantității și raportului de hidrogen și dioxid de carbon. Totodată, în aceste condiții, consumurile de energie au scăzut de 3,2 ori (*a se vedea* Tabelul 3).

Tabelul 3

**Conținutul de vitamină B₁₂ în concentratul vitamino-proteic obținut
în diferite condiții de fermentare anaerobă a borhotului**

Nr. crt.	Caracteristica proceselor	Condițiile experimentelor	
		Condițiile experimentului	Condițiile standard (fără modificări)
1	Timpul tratamentului biochimic, ore	6	12
2	CCO, mg O ₂ /l	725	975
3	CBO, mg O ₂ /l	424	539
4	Cantitatea specifică de biogaz eliminat, m ³ /1kg CCO	0,68	0,49
5	Conținutul de CO ₂ în biogaz, % din vol.	3,8	34,5
6	Conținutul de vitamină în concentratul vitamino-proteic furajer, mg B ₁₂ /kg	78	27

Concluzii

Abordarea tehnologică propusă, bazată pe aplicarea în comun a trei modificări:

- intensificarea și direcționarea proceselor de fermentare prin stimularea chimică a activității microorganismelor anaerobe;
- reutilizarea dioxidului de carbon și suplimentarea acestuia cu hidrogen exogen și
- suplimentarea exogenă a substratului cu predecesori ai biosintezei vitaminei B₁₂ în forme asimilabile,

asigură atingerea obiectivelor, care vizează intensificarea fermentării biochimice anaerobe și reducerea corespunzătoare a consumului de energie și a volumului de lucru necesar asigurării procesului, îmbunătățește eficiența sintezei vitaminei B₁₂ și conținutul acesteia în produsul final, precum și eficiența procesului de metanogeneză, contribuind la o transformare mai completă a CO₂ în CH₄ și la o creștere corespunzătoare a valorii calorice a biogazului din contul creșterii concentrației metanului în compoziția sa.

Bibliografie:

1. HODGKIN, D. CROWFOOT, KAMPER, J., MACKAY, M., PICKWORTH, J., TRUEBLOOD, K.N., WHITE, J.G. Structure of Vitamin B₁₂. In: *Nature*, 1956, no.178(4524), p.64-66.
2. WOODWARD, R.B. The total synthesis of vitamin B₁₂. In: *Pure Appl. Chem*, 1973, no.33(1), p.145-178.
3. ESCHENMOSER, A., WINTNER, C.E. Natural Product Synthesis and Vitamin B₁₂. In: *Science (Washington, DC, U. S.)*, 1977, no.196 (4297), p.1410-1420.
4. YONGSMITH, B., SONOMOTO, K. et al. Production of vitamin B₁₂ by immobilized cells of Propionic acid bacteria. In: *Eur. J. Appl. Micr. Biotechnol.*, 1982, vol.16, p.70-74.
5. POMORȚEVA, N.V. Perspectivă polucenia vitaminov i cofermentov c pomoshchiu microorganismov. V: *Himico-farmatzevticheskiy jurnal*, 1986, № 8, c.965-976. (Поморцева Н.В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов. В: *Химико-фармацевтический журнал*, 1986, № 8, с.965-976).
6. FRANCESE, A.P., ABOAGYE-MATHIESEN, G., OLESEN, T., CÓRDOBA, P.R., SIÑERIZ, F. Feeding approaches for biogas production from animal wastes and industrial effluents. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol.16, Issue 2, p.147-150.
7. BELTRAN, F.J., GARCIA-ARAIA, J.F., ALVARES, P.M. Wine distillery wastewater degradation. In: *J. Agric. Food. Chem.*, 1999, vol.47, no.9, p.3919-3924.
8. UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA. Process of vitamin-protein forage supplement obtaining; Brevet MD Nr.4129, Inventatori: COVALIOV, V., COVALIOVA, O., UNGUREANU, D., NENNO, V., CLICHICI, I. Publ. 2011, BOPI, nr.10.
9. UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA. Procedeu de obținere a suplimentului furajer cu conținut de vitamina B₁₂; Brevet MD nr.4192. Inventatori: COVALIOV, V., COVALIOVA, O., PORUBIN, D. Publ. 2013, BOPI, nr.1.
10. UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA. Process for anaerobic fermentation of liquid organic waste. Patent of invention, no.4189 MD. Inventatori: COVALIOV, V., BOBEICA, V., UNGUREANU, D., COVALIOVA, O., DUCA, Gh., SENICOVSCAIA, I. Publ. 2012, BOPI, no.12, p.21.

11. COVALIOV, V., NENNO, V., BOBEICA, V., SENICOVSICAIA, I.A., COVALIOVA, O., UNGUREANU, D. Stimulation of the methanogenic fermentation processes of liquid organic wastes. In: *Studia Universitatis. Seria „Științe Reale și ale Naturii”*, 2012, nr.1(51), p.160-168.
12. UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA. Electrolizor compact pentru obținerea hidrogenului: Brevet MD nr. 322Y. Inventatori: COVALIOV, V., COVALIOVA, O., DUCA, G. Publ. 2011, BOPI, nr.1.
13. UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA. Bloc modular electrochimic pentru generarea hidrogenului: Brevet MD Nr.4109. Inventatori: COVALIOV, V., COVALIOVA, O. Publ. 2011, BOPI, nr.4.

Prezentat la 22.09.2015