

УДК 628.35

УДАЛЕНИЕ ИЗ ВОЗДУХА ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ТАБАЧНЫХ ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ БИОФИЛЬТРАЦИИ

© 2012 г. Н. А. Загустина*, Т. А. Мишарина**, А. А. Веприцкий***, В. Г. Жуков*,
А. О. Ружицкий*, М. Б. Теренина**, Н. И. Крикунова**, А. К. Куликова*, В. О. Попов*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва

***ООО “Инновационные биотехнологии”, Москва, 119071

e-mail: zagust@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.10.2011

Исследован состав летучих веществ различных сортов ферментированных табачных листьев и их смесей – сырья для производства табачных изделий. Показаны различия в содержании в них никотина, соланона, тетраметилгексадецениола, мегастигматриенонов и других веществ, определяющих специфические ароматические свойства табака. В лабораторном реакторе, работающем по принципу биофильтра с орошаемым слоем, в результате длительной адаптации на носителе сформировано сообщество микроорганизмов, способное осуществлять дезодорацию смоделированной воздушной смеси и деструкцию никотина. На биофильтре происходило удаление из воздуха, как 90% основного токсичного вещества никотина, так и веществ, определяющих запах. Эффективность биофильтрации не изменялась при использовании табака, с различными концентрациями летучих веществ, а также в присутствии посторонних примесей. Основные штаммы, участвующие в деструкции никотина, выделенные из сообщества микроорганизмов на биокатализаторе, принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. Исследование орошающей жидкости показало полную деструкцию никотина и летучих органических веществ, определяющих запах. Присутствующие в орошающей жидкости вещества не обладали запахом и не были токсичны. Полученные результаты позволили осуществить масштабирование процесса биофильтрации для удаления запаха вентиляционных выбросов табачного производства.

Производство табачных изделий – один из источников неприятного запаха в черте города, ощущаемого жителями в прилегающих к предприятиям районах. Для формирования комфортной и экологически чистой городской среды крайне важно использование городскими предприятиями пищевой, фармацевтической и некоторых других видов промышленности, в вентиляционных выбросах которых содержатся пахнущие вещества, эффективных и экологически чистых систем фильтрации вентиляционных выбросов. Метод биофильтрации зарекомендовал себя как способ удаления летучих органических веществ в пределах низких и средних концентраций, а также дезодорации вентиляционных выбросов различного состава, со сравнительно невысокими капитальными и эксплуатационными затратами [1–3]. Этот метод также существенно отличается от других способов фильтрации тем, что не вызывает вторичного загрязнения окружающей среды.

В процессах переработки табачного сырья: паротермической обработки, разрыхлении, резки, сушки, и др. видов обработки в аспирационные и пневмотранспортные системы попадают летучие органические вещества ферментированных та-

бачных листьев, в том числе и никотин. Никотин – основной алкалоид табачных листьев, ядовит, хорошо всасывается в организме человека и может вызывать тяжелые расстройства. Дезодорация таких многокомпонентных вентиляционных выбросов имеет свои специфические особенности, что связано с присутствием в выбросах широкого спектра соединений в низких концентрациях и полностью часто не идентифицированных. Несмотря на низкие концентрации органических веществ в таких выбросах, они могут достаточно сильно воздействовать на рецепторы человека, вызывая как психоэмоциональные, так и аллергические реакции.

Количественная оценка эффективности дезодорации может быть произведена при полной характеристике состава, что не исключает использования субъективной органолептической оценки эффективности удаления запаха.

Анализ патентной и научно-технической литературы показал, что практически отсутствует информация об использовании аппаратных систем биофильтрации для дезодорации вентиляционных выбросов табачных предприятий. На сайтах некоторых фирм Германии и США имеется ограниченная информация об использовании

системы биоскруберов и насыпных фильтров для удаления табачного запаха [4]. В России была разработана технология биофильтрации с орошаемым слоем, защищенная патентами РФ, отличающаяся от известных в мире [5–8]. Настоящая работа является дальнейшим развитием технологии биофильтрации с орошаемым слоем, которая расширяет возможности использования технологии для дезодорации многокомпонентных вентиляционных выбросов большого объема с низким содержанием органических веществ, характерных для предприятий пищевой промышленности.

Цель работы – исследование состава летучих веществ различных сортов табачных листьев, его влияния на степень удаления органических веществ и запаха из воздушной смеси в лабораторных биореакторах, работающих по принципу биофильтра с орошаемым слоем.

МЕТОДИКА

Выделение летучих веществ из ферментированных табачных листьев. Для объективной характеристики летучие соединения ферментированных табачных листьев, определяющих запах табака и подлежащие очистке на биофильтре, выделяли методом содистилляции с водой и диэтиловым эфиром [9, 10]. Для исследования брали как смеси различных сортов, наиболее часто используемые при производстве табачных изделий, так и отдельные сорта ферментированного табака. Исследован состав летучих веществ следующих образцов табака: табак тепловой сушки (Индонезия, IDA/C9, 12507118); табак ориентальный (Болгария, BGX/3K, 12506758); Вирджиния (UITFCG, 12596506); Вирджиния, (TNV/L9, 2507202); Тайланд, Берней, (ТНВ/Х8, 12507163).

Для выделения летучих веществ измельченные ферментированные табачные листья различных сортов (по 30 г) помещали в колбу, добавляли 300 мл дистиллированной воды, 50 мл свежеперегнанного диэтилового эфира, тщательно перемешивали, закрывали герметично пробкой и оставляли при комнатной температуре на 16 ч для экстракции летучих веществ. Затем водно-эфирный слой декантировали, оставшуюся смесь разделяли центрифугированием, водно-эфирные экстракты объединяли. В экстракт добавляли 30 мл диэтилового эфира, 1 мг н-додекана в качестве внутреннего стандарта, перемешивали встряхиванием в течение 2 мин и выделяли летучие вещества содистилляцией с эфиром и водой, как описано в работах [8–10]. Эфирный слой дистиллята отделяли, высушивали с 1 г безводного сульфата натрия и концентрировали до объема около 200 мкл отгонкой эфира при 40°C.

Исследование состава летучих веществ ферментированных табачных листьев. Для определения

количественного содержания летучих веществ в качестве внутреннего стандарта добавляли н-тридекан. Газовую хроматографию (ГХ) и анализы ГХ с масс-спектрометрической детекцией проводили на капиллярной кварцевой колонке с неполярной полиметилсилоновой стационарной фазой в режиме программирования температуры. Для определения качества запаха хроматографических зон элюата использовали методику сиффинг-анализа, когда используется делитель потока, с помощью которого половину элюата направляли на детектор, а другую для оценки запаха соответствующих компонентов. Описание запаха зон проводили три тренированных профессиональных дегустатора.

ГХ-анализ проводили на капиллярном газовом хроматографе HP 5730A (“Hewlett Packard”, США) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м × 0.25 мм, слой фазы 0.3 мкм) при программировании температуры колонки от 60°C до 250°C со скоростью 8°C/мин. Температура инжектора и детектора составляла 250°C. Скорость газа-носителя гелия через колонку составляла 1.5 мл/мин. Анализировали по 2 мкл эфирных экстрактов. Хроматограммы регистрировали с помощью системы сбора и обработки хроматографических данных Экохром (Россия). В аликвоту концентратов летучих веществ добавили 1 мкл смеси н-алканов с числом атомов углерода 6–22 и анализировали в тех же условиях. По временам удерживания компонентов анализировали смеси и нормальных алканов рассчитывали величины индексов удерживания (ИУ). Из площадей пиков веществ и площади пика внутреннего стандарта на хроматограммах образцов методом простой нормировки рассчитывали относительное содержание каждого компонента в изученных образцах и выражали в мкг на 100 г сухих табачных листьев.

Условия работы лабораторного реактора. Для создания процесса биологической дезодорации использовали серию изготовленных из стекла лабораторных микрореакторов размером 200–250 × 30 мм. Стекланный реактор заполняли носителем из полиамидного волокна. На полиамидное волокно наносили суспензию клеток предварительно селекционированного сообщества микроорганизмов-деструкторов. При постоянном орошении носителя циркулирующей суспензией происходила иммобилизация клеток, образование биопленки на носителе и формирование биокатализатора – основного элемента биофильтра (рис. 1).

Бактерии для иммобилизации собирали с эффективных биокатализаторов, а также выделяли из накопительных культур, полученных на среде Эванса с экстрактивными веществами табачных листьев. Дальнейшую селекцию сообщества про-

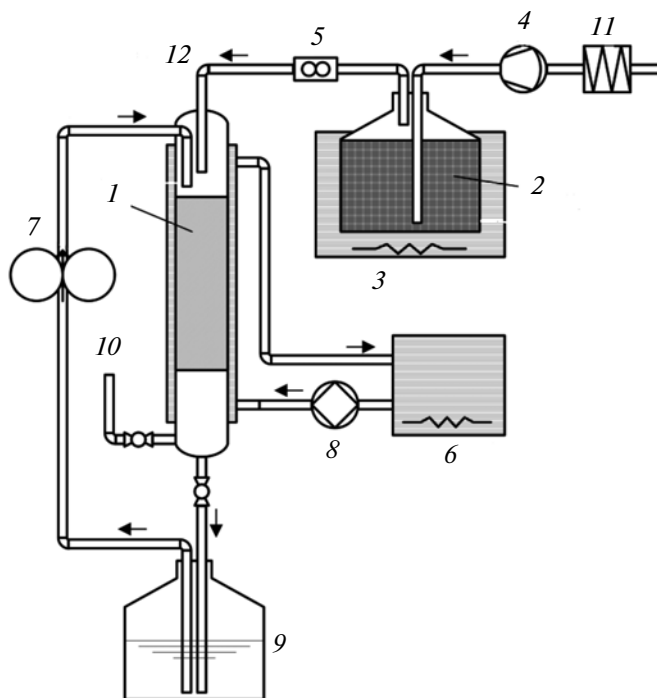


Рис. 1. Принципиальная схема лабораторного биореактора:

1 – иммобилизованные клетки сообщества на носителе (биокатализатор) в стеклянном корпусе с рубашкой для термостатирования; 2 – измельченные табачные листья; 3 – термостат на 60°C; 4 – микрокомпрессор; 5 – ротаметр; 6 – термостат; 7, 8 – перистальтический насос; 9 – емкость с орошающей жидкостью; 10 – выход (отбор пробы); 11 – воздушный фильтр; 12 – вход (отбор пробы); стрелками обозначены направления воздушного потока и орошающей жидкости.

водили в микрореакторах. Активное сообщество бактерий создавали с использованием микроорганизмов, выделенных из проб, взятых на табачном предприятии, а также бактерий-деструкторов летучих органических соединений из коллекции Института биохимии РАН, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Micrococcus*. Суспензия смеси культур готовилась на основе модифицированной минеральной среды Эванаса, которая в дальнейшем использовалась также в качестве орошающей биокатализатор жидкости. Модифицированная минеральная среда Эванса, имела следующий состав (г/л): KH_2PO_4 – 2.1; Na_2HPO_4 – 3.4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1.0, MgSO_4 – 0.04; микроэлементы (мг/л): Na_2MoO_4 – 4.0; CuSO_4 – 0.15; H_3BO_3 – 0.35; CaCl_2 – 0.026; ZnSO_4 – 1.5; MnCl_2 – 1.0; FeSO_4 – 2.4. Скорость подачи орошающей жидкости составляла 40 мл/ч.

Через 1–3 нед. после формирования эффективной биопленки работа реактора характеризовалась следующими оптимальными для процесса параметрами: скорость орошения биокатализатора составляла 40 мл/ч; скорость подачи воздушной смеси 36 л/ч, температура поступающего воздуха 20–30°C; время контакта 2–8 с; влажность поступающего воздуха до 100%, направление по-

тока сверху вниз; объем биокатализатора около 25 см³; режим работы установки непрерывный.

Моделирование воздушной смеси. Воздушную смесь для очистки моделировали, пропуская воздух через прогретые табачные листья. Измельченные ферментированные листья различных сортов табака, а также смеси табаков по 200 г помещали в колбу на 1.0 л и постоянно поддерживали на водяной бане при температуре 60°C, меняя их через каждые 3 сут, а в некоторых случаях каждые сутки, так как при использовании некоторых партий табачных листьев концентрация летучих веществ быстро снижалась. Воздух с помощью компрессора подавали в колбу с прогретыми листьями, а затем в реактор на биокатализатор.

Анализ летучих веществ в моделируемой воздушной смеси. Созданную искусственно воздушную смесь, содержащую летучие вещества табачных листьев и никотин, анализировали на хроматографе с масс селективным детектором Shimadzu QP2010 (Япония). Для анализа использовали капиллярную кварцевую колонку MDN-1 длиной 30 м диаметром 0.32 мм с нейтральным носителем метилсиликоном фирмы “Supelco” (США). Температура термостата от 50 до 250°C программировалась в следующем режиме: 50°C – 0 мин, 2°C/мин до 56°C; 4°C/мин до 60°C; 10°C/мин до

100°C; 15°C/мин до 130°C; 20°C/мин до 190°C; 30°C/мин до 250°C; изотерма – 250°C 2 мин. Детекцию производили в диапазоне от 41 до 250 m/Z, температура источника ионов 200°C, температура интерфейса 210°C. Газ-носитель – гелий хроматографической чистоты, скорость потока 6 мл/мин с делением (коэффициент 2). Для идентификации веществ использовали библиотеку масс-спектров.

Степень конверсии органических веществ рассчитывали по соотношению площадей пиков веществ на хроматограмме на входе и выходе из реактора. В качестве реперного вещества для оценки полноты деструкции органических веществ использовали содержание наиболее токсичного компонента – никотина. Концентрацию никотина рассчитывали по предварительно построенной калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали никотин фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Для оценки степени удаления пахнущих соединений анализ органических веществ, содержащихся в воздушной смеси на входе и выходе из реактора, проводили также после концентрирования на хроматографическом адсорбенте Chromosorb 106 (“Markes Ltd.”, Великобритания) в течении 3 сут с последующей элюцией адсорбированных соединений диэтиловым эфиром как описано ранее [7] и идентификацией на ГХ-МС.

Определение органических веществ в орошающей жидкости. Орошающий раствор анализировали через 5–6 месяцев работы биореактора. Жидкость (100 мл) пропускали через Chromosorb 106, затем высушивали над Na_2SO_4 , проводили элюцию диэтиловым эфиром. Элюат анализировали на газовом хроматографе с масс-селективным детектором Shimadzu QP2010 (Япония) в тех же условиях, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее был разработан лабораторный биореактор, работающий по принципу биофильтра с орошаемым слоем, для удаления летучих веществ табачных листьев [8]. Было показано, что лабораторный биофильтр с иммобилизованными на носителе клетками подобранного сообщества микроорганизмов-деструкторов способен удалять летучие вещества табачных листьев и никотин из смоделированной воздушной смеси. В дальнейшем серия таких лабораторных реакторов исследовалась более полутора лет. Схема лабораторной установки, использованная в работе, представлена на рис. 1. Длительное поддержание работы биофильтра позволило сформировать устойчивое сообщество микроорганизмов, эффективно удаляющее из воздушной смеси никотин и летучие вещества, обладающие запахом. В

результате длительной адаптации и обогащения сообщества на носителе эффективными микроорганизмами-деструкторами удаление органических веществ в биореакторе практически не зависело от колебаний их содержания в воздушной смеси при использовании различных партий табака с различным содержанием летучих веществ.

Для изучения возможности масштабирования процесса биофильтрации необходимо было приблизить исследуемую воздушную смесь для очистки в лабораторных биореакторах к имеющейся на производстве. Воздушная смесь моделировалась на основе ферментированных табачных листьев различных сортов и их смесей. Листья измельчали, помещали в колбу, укрепленную в термостате на 60°C. Через измельченные листья пропускать с помощью компрессора воздух, который затем поступал в реактор на биокатализатор (рис. 1).

При производстве табачных изделий колебания состава летучих соединений достаточно велики, потому создаваемый биофильтр должен работать в режиме постоянно меняющихся концентраций компонентов воздушной смеси, которые тем не менее должны быть удалены, причем это, в первую очередь, никотин и вещества, обладающие запахом. Состав летучих веществ табачных листьев различных сортов и их смесей исследовался методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-спектрометрической (МС) детекцией.

Летучие вещества, синтезируемые в табачных листьях в процессе роста и развития растения, а также образующиеся в процессе их ферментации, изучены и подробно описаны в книге Родгмана А. и Перфетти Т.А. [11]. Однако партии табака могут иметь существенные различия в составе и содержании летучих органических веществ, зависящие не только от сортовых особенностей, но и от очень многих факторов: климатической зоны произрастания растений, времени сбора, температуры обработки табака, условий хранения и др. Нами был исследован состав нескольких сортов, наиболее часто используемых на табачных предприятиях в качестве сырья, а также две смеси табачных листьев. Результаты представлены в табл. 1 и 2. Как видно из табл. 1, различные сорта табачных листьев близки по составу летучих веществ, но сильно различаются по их содержанию, что и определяет специфические особенности аромата табака различных сортов. В результате проведенного анализа идентифицировано более 200 соединений, принадлежащих к различным классам [8]. В табл. 2 представлено описание запаха основных идентифицированных компонентов, обладающих запахом, проведенное методом сниффинг-анализа тремя аттестованными дегустаторами.

Среди летучих веществ табака были обнаружены следующие классы соединений: кислоты с

Таблица 1. Состав и содержание летучих веществ в листьях 5 различных сортов табака и их смесей

№*	ИУ	Соединение	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
1	721	Ацеталь	192	118	141	368	106	137	108
2	757	Пентанол	38	47	15	42	34	45	45
3	776	Гексаналь	19	809	142	597	361	452	602
4	—	Октан	—	—	6	4	34	7	11
5	804	Фурфурол	40	39	8	2	361	8	12
6	—	Амилформиат	—	—	4	—	18	6	—
7	825	Фурфуриловый спирт	69	49	24	6	21	6	—
7*	832	2-Гексеналь	33	4	25	5	—	—	—
7'	834	Изовалериановая к-та	33	2	—	—	—	—	—
8	838	Циклопента-2-ен-1,4-дион	41	51	8	—	8	4	—
9	852	2-Метилмасляная кислота	22	16	9	—	19	2	—
10	854	2,3-Диметилпиридин	12	1	2	4	2	2	—
11	859	4-Метилгексанон-2	12	18	5	9	4	12	13
12	873	Гептаналь	19	14	4	16	8	15	17
14	925	5-Метилфурфурол + бензальдегид	91	9	20	—	120	—	—
15	932	2-Гептеналь	91	11	29	60	—	14	48
16	941	3-Метилпентановая к-та	172	3	31	16	—	9	11
17	949	1-Октен-3-ол	120	26	24	50	36	48	58
18	958	2-Пентилфуран	12	45	33	36	22	54	31
19	964	Октаналь	70	9	7	19	9	—	11
20	971	Гексановая кислота	79	2	106	—	30	+	—
21	1011	Фенилацетальдегид	137	61	104	51	155	107	23
22	1019	3-Октен-2-он	27	15	23	49	36	43	54
23	—	Триметилсилилкапроат	—	—	31	12	9	12	—
24	1022	2-Ацетилпиррол	26	92	16	—	5	14	—
25	1047	Фуранеол	42	—	23	—	—	9	16
26	1064	N-Изопропиланилин	73	19	20	21	19	16	26
27	1071	Гептановая к-та ТМС	22	8	36	—	—	12	—
28	1080	Фенилэтанол	175	36	147	55	58	170	38
29	1118	23-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пир-ан-4-он	10	16	24	—	23	2	2
30	1127	2-Ноненаль*	18	—	5	15	15	16	20
34	1211	Кумарин	5	14	13	19	13	33	26
36	1236	2-Деценаль	35	109	25	21	43	41	55
37	1249	Индолицин (пирроколин)	14	—	14	51	14	12	11
39	1257	Нонановая к-та ТМС	53	29	30	31	31	18	23
40	—	Не идентифицировано	—	—	32	52	41	42	58
41	1262	2,4-Декадиеналь	17	13	19	80	24	44	83
43	—	Бензоуксусная к-та	—	—	15	23	15	—	9
44	1284	4-Винилгваякол	23	45	6	—	16	—	67
45	—	2,4-Декадиеналь	—	—	45	191	94	86	185
46	1300	Тридекан	3300	3300	3300	3300	3300	3300	3300
47	1326	Никотин	25	9	563	14282	3492	6332	1096
48	1346	Соланон	1506	380	1372	241	455	586	178
49	1357	2-Бутил2-октеналь	19	123	126	188	183	185	261

Таблица 1. Окончание

№*	ИУ	Соединение	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
50	1362	бета-Дамасценон	35	6	45	34	37	46	30
51	1368	Изотуйол	132	78	31	51	86	106	51
52	1374	α-Ионон	16	5	13	—	16	30	—
54	1426	Цис-геранилацетон	31	21	21	19	17	16	19
56	1450	1,3,7,7-Тетраметил-9-оксо-2-оксабицикло[4.4.0]-дец-5-ен	67	52	14	39	18	19	35
57	—	1,3,7,7-Тетраметил-9-оксо-2-оксабицикло[4.4.0]-дец-5-ен	—	—	21	21	16	24	15
58	1486	5,6,7,7а-Тетрагидро-4,4,7а-триметил-2(4Н)-бензофуранон	15	11	121	122	93	66	95
59	1501	Мегастигматриенон	61	6	85	38	69	66	47
60	1545	3-Гидрокси-бета-дамаскон	21	4	18	18	26	18	20
61	1559	Мегастигматриенон	111	96	95	35	84	64	32
62	1620	3-Оксо-α-ионол	54	4	60	51	95	81	20
63	1664	Триметилсилилдодеканоат	22	5	32			21	20
64	—	3-Оксо-7,8-дигидро-α-ионол	—	—	19	18		15	12
65	—	Гексагидрофарнезилацетон	—	—	39	23	18		18
66	1854	3,7,11,15-Тетраметил-2-гексадецен-1-ол ***	950	680	800	222	844	370	184
67	1886	Триметилсилилтридеканоат	14	2	209	56	63	63	45
68	1890	6-Метил-8-(2,6,6-триметил-1-циклогесен-1-ил)-5-октен-2-он	17	5	28	—	—	—	—
69	1919	Фарнезилацетон	49	4	19	—	—	—	—
70	1966	Гексадекановая к-та	491	1	385	21	531	576	221
71	2000	Триметилсилилгексадеканоат	12	7	1363	947	840	844	685
74	2164	Октадекановая кислота	162	586	458	2398	532	621	299
75	—	Моноглицерид гексадекановой кислоты	—	—	7818	7633	11831	11539	6574

* — Не идентифицировано или не найдено;

№ 1, 2 смеси табаков, № 3 — табак тепловой сушки, Индонезия; № 4 - табак ориентальный, Болгария; № 5 — Вирджиния (UITFCG); № 6 — Вирджиния, (TNV/L9, 4); № 7 — Тайланд, Берней.

числом углеродных атомов от 4 до 20, большое количество разветвленных и нормальных углеводов, алифатические и ароматические альдегиды и кетоны, спирты. В наибольшей степени аромат табака формировали такие соединения как соланон, изомерные мегастигматриеноны (табаноны), присутствующие в наибольшем количестве. Большой вклад в аромат вносили также ароматические альдегиды и кетоны: геранилацетон, тетраметилгексадеценон, франезен, ледол, дамасценон и ионон. В формировании аромата участвовали также соединения, относящиеся к замещенным циклопентанам, циклогексанам и пиранам, содержащим спиртовые, кето- или альдегидные группы. Во всех образцах табачных листьев в наибольшем количестве, присутствовали никотин, а из веществ, обладающих характерным запахом, 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол, соланон, ацеталь, гексаналь, мегастигматриеноны, фенолацетальдегид, фенолэтанол. Содержание этих лету-

чих веществ в различных образцах ферментированных табачных листьев различалось от 2 до 10 раз. Все эти вещества принадлежат к различным классам соединений и при удалении их на биокатализаторе должны подвергаться деструкции отобраным сообществом микроорганизмов. Многие из идентифицированных летучих веществ табачных листьев могут использоваться микроорганизмами. Из литературных источников известно, что алканы с числом атомов углерода 5–9 тормозят рост многих микроорганизмов, но некоторыми из них могут утилизироваться. Алканы C10–C22 обычно легко метаболизируются, изоалканы утилизируются труднее, в особенности при наличии нескольких метильных групп. Алкены являются наихудшими ростовыми субстратами. Ароматические углеводороды расщепляются различными микроорганизмами в небольших количествах. Для некоторых сложных соединений, входящих в состав летучих веществ табачных листьев, не най-

Таблица 2. Идентифицированные методом снифинг-анализа вещества табачных листьев, обладающие запахом

№ пика	Относительное содержание (мкг/100 г)	Соединения, ГХ и ГХ-МС идентификация	Запах
7	87	Изомасляная к-та	Сернистый
9	38	Масляная к-та	Слабый табачный
10	19	Гексаналь	Зелени
11	40	Фурфурол	Острый
14	69	Фурфуриловый спирт	Бензольный
17	41	Циклопента-2-ен-1,4-дион	Неприятный сернистый
22	31	2-Ацетилфуран	Свежий, травы
23	19	2-Метилциклопента-2-ен-2-он	Табачный сильный
24	32	2,6-Диметилпиразин	Семечек, пищевой
33	73	Фенол	Кислотный
34	120	1-Октен-3-ол	Сырых грибов
36	70	6-Метил-5-гептен-2-он	Зелени
40	14	н-Декан	Табачный
42	102	4-Метилбензальдегид	Пиразиновый
43	137	Фенилацетальдегид	Цветочный
47	72	Лимонен	Цветочный
49	23	Метилфенилкетон	Жареный, горелый
53	73	Гваякол	Трубочный табак
55	22	Гептановая к-та	Свежий, табачный
56	175	Фенилэтанол	Горелый
58	15	Этилгексаноат	Химический
60	10	23-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он	Семечек
62	18	2-Ноненаль	Арбуза
64	10	3-Метилацетофенон	Зелени
65	10	Индолизин (пирроколин)	Огурца
66	9	Крезол	Химический
67	4	Октановая кислота	Плохого табака
68	15	Вербенон	Табачного листа
69	7	н-Додекан	Жареный тон, ореховый
70	5	4,5,6,7-Тетрагидро-3Н-циклопентапиран-2-он	Ореховый
71	11	Индол	Фруктовый приятный
82	23	4- Винилгваякол	Едкий
87	1506	Соланон	Табачно-медовый
91	35	бета-Дамасценон	Сладкого яблока
98	31	Цис-геранилацетон	Дыма, табака
99	41	Фарнезен	Сухофруктов
110	61	Мегастигматриенон	Сухих яблок
122	117	Мегастигматриенон (табанон)	Сухофруктов, трубочной смолы
129	22	Пентадеканаль	Горячей древесины
137	525	Тетрадекановая кислота	Бальзамического ладана
145	950	3,7,11,15-Тетраметил-2-гексадецен-1-ол	Медовых сот, воска
183	540	Ледол	Хорошего табака, меда

дено информации об использовании их микроорганизмами в качестве источников углерода. Наиболее активными деструкторами перечисленных соединений, являются представители родов *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и некоторые другие.

Основной алкалоид табака — никотин наиболее опасен для человека [12, 13]. Кроме того его содержание в табачном листе (6% от сухой массы листа и выше), намного превышает содержание других летучих веществ, он наиболее токсичен и поэтому служил в качестве реперного соединения для оценки эффективности процесса очистки воздушной смеси в биореакторе. Есть сведения также, что от содержания никотина зависит общий характерный для табачных листьев запах [14]. Никотин попадает в вентиляционные системы предприятий, поэтому сформированное микробное сообщество должно включать штаммы, способные эффективно осуществлять его деструкцию в процессе биофильтрации.

Исследование деструкции никотина бактериями проводилось довольно давно [15–18]. В настоящее время известны несколько путей его превращения, однако до сих пор некоторые промежуточные продукты деградации этого вещества являются гипотетическими [18]. Деструкцию никотина могут осуществлять различные виды микроорганизмов, принадлежащие к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Agrobacterium* sp. и др. [18–20]. Окислительная деградация молекулы никотина бактериальными ферментами осуществляется последовательно, причем различают два пути метаболической деструкции этого вещества [21]. Известно, что грамположительные бактерии осуществляют деструкцию никотина по пирролидиновому пути. Например *Arthrobacter nicotinovorans*, трансформирует никотин в 6-гидроксиникотин до раскрытия пирролидинового кольца, а после его разрыва и удаления боковой цепи образуется 2,6-дигидроксипиридин [16]. Грамотрицательные штаммы, осуществляющие деструкцию никотина по пиридиновому пути, например *Pseudomonas putida*, из никотина образуют 6,N-метилмиосмин до разрыва пирролидинового кольца. После разрыва кольца и удаления боковой цепи через ряд превращений образуется 2,5-дигидроксипиридин и сукцинат [20–22].

Исследовано много штаммов, принадлежащих к перечисленным выше родам, способных к деструкции никотина, перспективных для использования с целью удаления никотина из отходов табачной промышленности, в том числе при их компостировании [20–23].

Степень удаления никотина из воздушной смеси на биокатализаторе, включающем адапти-

рованные в течение длительного времени клетки микроорганизмов (рис. 2) была близка к 90% в течение года и практически не зависела от изменения его концентрации на входе в реактор. Эффективность работы реакторов оценивали при использовании 5 различных сортов табака и их смесей, имеющих различное содержание никотина и веществ, определяющих запах. Изменение содержания никотина и колебания концентраций других веществ, входящих в состав летучих соединений табачных листьев, в воздушной смеси, поступающей в биореактор, не отражалось на степени его конверсии и дезодорации. Степень дезодорации воздушной смеси оценивали дегустационным методом. Степень удаления никотина из воздушной смеси рассчитывалась на основании определения его содержания во входящем и выходящем воздушном потоке из реактора по предварительно построенным калибровочным кривым. На рис. 2 представлен график зависимости степени удаления никотина от колебания его содержания в воздушной смеси на входе в реактор. Показано, что в пределах испытанных концентраций его конверсия на биокатализаторе не опускалась ниже $80 \pm 5\%$. Исследование орошающей жидкости, которая в течение 6 мес. могла не заменяться при использовании адаптированного в течение длительного времени сообщества, показало отсутствие в ней каких-либо производных пиридина или промежуточных продуктов деструкции никотина. В составе орошающей жидкости были идентифицированы органические кислоты, углеводороды, некоторые альдегиды, эфиры, ароматические углеводороды, утилизация которых сообществом микроорганизмов на биокатализаторе, по-видимому, была затруднена, либо они являлись конечными продуктами трансформации более сложных соединений, имеющих в составе летучих веществ табачных листьев [8]. ГХ-МС-анализ соединений в жидкой циркулирующей фазе, которая при масштабировании процесса будет попадать в стоки, показал отсутствие никотина, соланона, а также каких-либо токсичных соединений — промежуточных продуктов деструкции, присутствующих в табачных листьях.

Штаммы микроорганизмов-деструкторов, входящие в состав сообщества на биокатализаторе были способны полностью разрушать никотин. Для выделения и идентификации штаммов, способных разрушать никотин биомассу из биокатализатора высевали на поверхность агаризованной среды Эванса, содержащей 1.0 г/л никотина. В результате были выделены три чистые культуры, которые по предварительным данным на основании определения последовательности 16S РНК и физиолого-биохимических признаков были отнесены к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacil-*

Таблица 3. Характеристика пиков летучих веществ на хроматограмме на входе и выходе из биофильтра (ГХ-МС-анализ проводили после концентрирования веществ на хромосорбе)*

№ пика на входе/на выходе	Название вещества	Время удерживания, на входе/на выходе	Площадь пика на входе/на выходе	Площадь пика, % на входе/на выходе	Удаление вещества, %
1/1	Никотин	8.093/8.067	995011268/4748827	55.98/24.93	95.2
2	Пропиловый эфир октадекановой кислоты	10.242	1325879	0.75	100
3/2	2,2,4-триметил-3-карбоксиизопропил изобутиловый эфир пентановой кислоты	11.284/11.278	2477914/4094229	1.39/21.49	—/**
4	9-Октадеценамид	12.466	20075921	1.13	100
5	N-бутил-октадеканамид	12.821	825337	1.03	100
6/3	3, 7, 11, 15-Тетра-метил-2-гексадецен-1-ол	13.158/13.146	19523736/1407326	10.98/7.39	92.8
7	Пентадециловый эфир пальмитиновой кислоты	13.611	2054409	1.16	100
8/4	Пальмитиновая кислота	13.738/13.722	7765177/2646573	4.37/13.89	66.0
9	Дигидроксипропиловый эфир гексадекановой кислоты	14.159	18584670	10.46	100
10/5	Олеиновая кислота	14.632/14.608	17275186/934152	9.72/4.90	94.6
11/6	Стеариновая кислота	14.744/14.723	5403356/5217791	3.04/27.39	3.5

* В таблице в числителе — данные, полученные на входе, в знаменателе — на выходе. ** Площадь пика вещества на выходе больше, чем на входе.

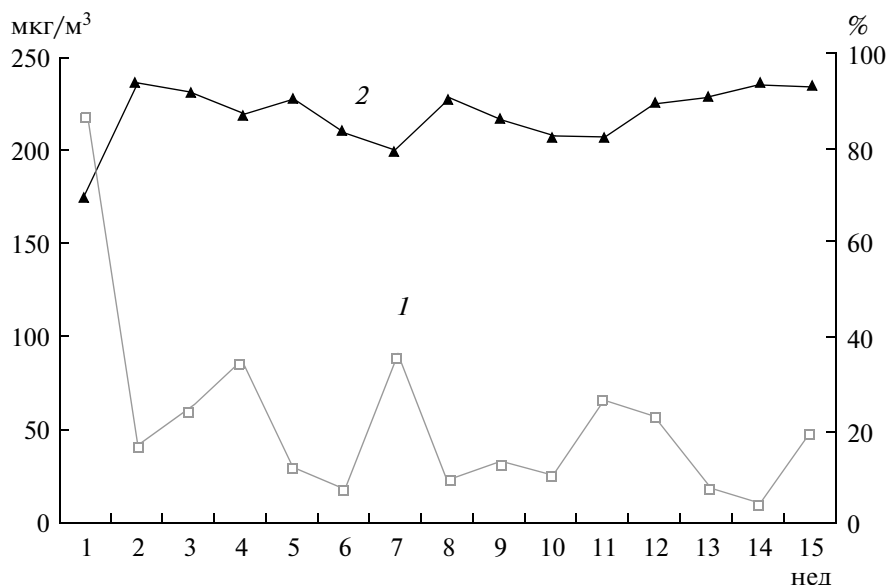


Рис. 2. Зависимость степени удаления никотина от его концентрации на входе в биофильтр. 1 — содержание никотина на входе в реактор, мкг/м³; 2 — удаление никотина из воздушной смеси, %.

lus, т.е. родам, представители которых способны активно осуществлять деструкцию никотина.

ГХ-МС-анализ воздушной смеси на входе в биофильтр показал, что такая модельная воздушная смесь по составу мало отличалась от реальных вентиляционных выбросов. Основное отличие состояло в присутствии в вентиляционных выбросах веществ, используемых для ароматизации табака, а также веществ, попадающих в вентиляционные системы в процессе подготовки табака к резке, умягчению табачного листа и др. обработок, а именно глицерина, этанола, легко метаболизируемых микроорганизмами. Для изучения влияния этих соединений воздушную смесь, полученную как описано в методике, пропускали через дополнительную емкость, в которой находились исследуемые соединения или их смесь. Воздушная смесь на входе и выходе из реактора анализировалась методом ГХ-МС. Было показано, что присутствие посторонних веществ, иногда обнаруживаемых в составе вентиляционных выбросов на предприятии, не оказывало влияния на конверсию никотина и эффективность дезодорации воздушной смеси на биофильтре.

Лабораторные реакторы с иммобилизованными на носителе клетками работали в течение года при стабильном уровне удаления никотина, более 90%, при температуре 20–30°C с удельной производительностью 1000 ч⁻¹ и временем удерживания в пределах 2–6 с. Время выхода реактора на режим при использовании селекционированного сообщества микроорганизмов существенно сократилось с 1 мес. до 1 нед.

Модельная воздушная смесь, создаваемая в результате пропускания воздуха через разогретые табачные листья, характеризовалась достаточно низким содержанием соединений, определяющих запах табака, что не позволяло определять минорные компоненты в пробах, взятых непосредственно из воздушной смеси. Для более полной оценки степени удаления пахнущих соединений анализ органических веществ проводили на входе и выходе из лабораторного реактора после их концентрирования в течение 3 сут на колонке с хроматографическим сорбентом Chromosorb 106. Сорбированные из воздушной смеси вещества (на входе и выходе из реактора) элюировали диэтиловым эфиром и анализировали методом ГХ-МС. Анализ полученных эфирных фракций показал, что в биофильтре происходит удаление никотина на 95.2% вещества, определяющего запах, — 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ола на 92.8%, значительное удаление пальмитиновой и олеиновой кислот на 66 и 94.6% соответственно. На рис. 3 представлены хроматограммы основных летучих веществ на входе и выходе из реактора, полученные после концентрирования на сорбенте, в табл. 3 — результаты их обработки на одной из партий табачных листьев. Степень удаления органических веществ и никотина рассчитывали по соотношению площадей пиков веществ на хроматограмме на входе и выходе из реактора. Некоторые соединения в процессе очистки исчезали совсем, однако появлялись некоторые новые соединения — продукты трансформации, не являющиеся опасными веществами и не имеющие запаха.

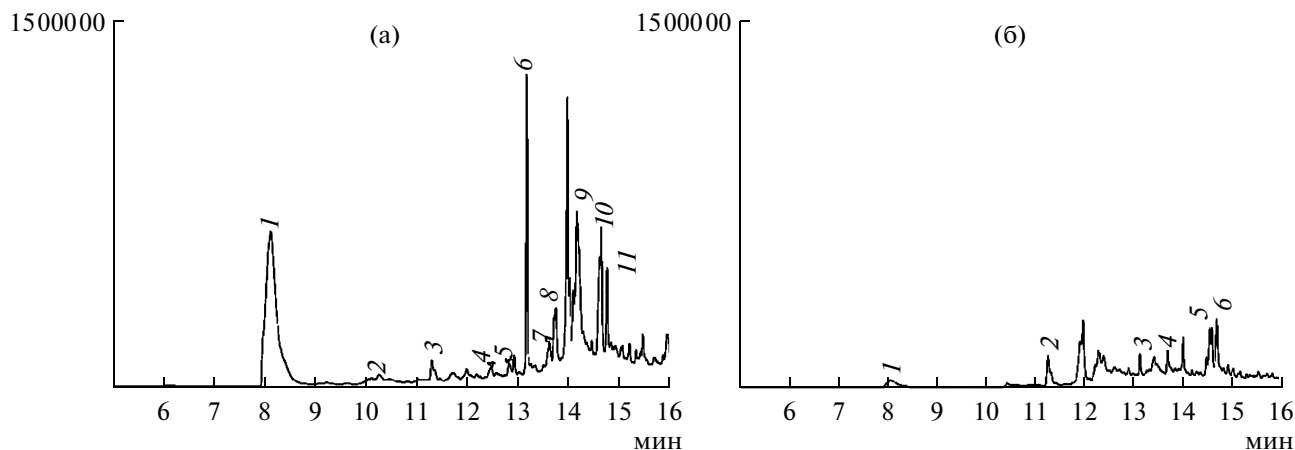


Рис. 3. ГХ-МС-анализ летучих веществ табачных листьев на входе (а) и выходе (б) из реактора после концентрирования на хроматографическом сорбенте.

Для создания процесса биологической очистки и дезодорации воздуха от пахнущих органических примесей использовали лабораторные реакторы, работающие по принципу биофильтров с орошаемым слоем. Работа лабораторных реакторов изучалась в течение длительного времени. Результаты показали, что сообщество микроорганизмов, адаптированное в течение длительного времени к использованию летучих веществ ферментированных табачных листьев, может обеспечить стабильное удаление из воздушной смеси веществ, определяющих запах табака, а также более, чем 90%-ное удаление никотина. Выделенные из сообщества на среде с никотином бактерии принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, известным деструкторам токсиканта.

Исследован состав летучих веществ листьев табака. Показано, что существенные колебания в концентрации никотина в воздушной смеси, а также посторонних примесей не влияли на эффективность удаления этих веществ и дезодорацию в лабораторном биофилтре.

ГХ-МС-анализ соединений в составе жидкой циркулирующей фазы, которая при масштабировании процесса будет попадать в стоки, показал отсутствие никотина, а также каких-либо токсичных веществ — промежуточных продуктов деструкции, присутствующих в табачных листьях органических соединений. Разрабатываемая технология выгодно отличается от альтернативных отсутствием вторичного загрязнения окружающей среды.

Полученные результаты послужили основанием для проведения испытаний работы биореактора в масштабах пилотной установки в условиях производства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 16.512.11.2025 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по при-

оритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McNevin D., Barford J. // J. Biochem. Ingenin. 2000. V. 5. P. 231–242.
2. Nikiema J., Dastous P.A., Heitz M. // Rev. Environ. Helth. 2007. V. 22. P. 273–294.
3. Popov V.O., Zhukov V.G. Biotechnology for Odor and Air Pollution Control / Ed. Z. Shareefdeen, A. Singh. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. P. 305–325.
4. Briški F., Horgas N., Vuković M., Gomzi Z. // Clean Techn. Environ. Policy. 2003. V. 5. P. 295–301.
5. Безбородов, А.М., Жуков В.Г., Попов В.О., Рогожин И.С. Патент РФ. 1997. № 2090246.
6. Zhukov V.G., Rogozhin I.S., Ushakova N.A., Zagustina N.A., Popov V.O., and Bezborodov A.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 1998. V. 34. № 4. P. 370–376.
7. Хоменков В.Г., Шевелев А.Б., Жуков В.Г., Курлович А.Е., Загустина Н.А., Попов В.О. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 176–185.
8. Zagustina N.A., Krikunova A.K., Romanov M.E., Ruzhitsky A.O., Zhukov V.G., Popov V.O., Krikunova N.I., Misharina T.A., Terenina M.B., Vepriky A.A., Zhukov V.G. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 3. P. 320–327.
9. Мишарина Т.А., Головня Р.В. // Журн. аналитической химии. 1992. Т. 47. № 4. С. 650–659.
10. Golovnya R.V., Misharina T.A. // Trends in Flavour Research / Eds. H. Maarse, D.G. van der Veij. Amsterdam: Elsevier Sci. B.V., 1994. P. 117–120.
11. Rodgman A., Perfetti T.A. The Chemical Components of Tobacco and Tobacco smoke. Boca Raton: CRC Press, 2009. 1210 p.
12. Gorrod J.W., Wahren J. Nicotine and Related Alkaloids. London, UK: Chapman and Hall, 1993. 299 p.
13. Shi H.-Z., Di.-H., Zhao X.-D., Liu G.-Sh., Ma Y.-J. et al. // Acta Agron. Sin. 2009. V. 35. № 7. P. 1299–1305.

14. Djordjevic M.V., Sigountos C.W., Hoffmann D., Brunne-
mann K.D., Kagan M.R., Bush L.P., Safaev R.D., Bel-
itsky G.A., Zaridze D. // *Int. J. Cancer*. 1991. V. 47.
P. 348–351.
15. Civilini M., Venuti F., De Bertoldi M., Lonigro L., Dam-
ante G. // *Ann. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 307–315
16. Brandsch R. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006.
V. 69. № 5. P. 493–498.
17. Meng X.J., Lu L.L., Gu G.F., Xiao M. // *Research Mi-
crobiol.* 2010. V. 161. P. 626–633.
18. Yuan Y.J., Lu Z.X., Huang L.J., Li Y., Lu F.X.,
Bie X.M., Teng Y.Q., Lin Q. // *J. Ind. Microbiol. Bio-
technol.* 2007. V. 34. P. 567–570.
19. Wang S.N., Xu P., Tang H.Z., Meng J., Liu X.L.,
Huang J. // *Biotechnol. Lett.* 2004. V. 26. P. 1493–1496.
20. Ruan A., Ming D.H., Peng X.H., Huang Z. // *Res. Mi-
crobiol.* 2005. V. 156. P. 700–706.
21. Li H., Duan Y., Ma G., Lei L., Zang K.-Q., Yang J. //
Afr. J. Microbiol. Res. 2011. V. 5. № 11. P. 1335–1341.
22. Civilini M., Domenis C., Sebastianutto N., de Bertoldi M. //
Waste Manag. Res. 1997. V. 15. P. 349–358.
23. Novotny T.E., Zhao F. // *Tob. Control.* 1999. V. 8.
P. 75–80.

Elimination of Volatile Compounds of Leaf Tobacco from Air Emissions Using Biofiltration

N. A. Zagustina^a, T. A. Misharina^b, A. A. Vepriiskii^c, V. G. Zhukov^a, A. O. Ruzhitskii^a, M. B. Terenina^b,
N. I. Krikunova^b, A. K. Kulikova^a, and V. O. Popov^a

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

e-mail: zagust@inbi.ras.ru

^b *Emmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

^c *Innovative Biotechnologies Ltd., Moscow, 119071 Russia*

Received October 15, 2011

Abstract—The composition of the volatile organic compounds (VOCs) of various leaf tobacco brands and their blends has been studied. The differences in the content of nicotine, solanone, tetramethyl hexadecanol, megastigmatrienones, and other compounds, determining the specific tobacco smell, have been revealed. A microbial consortium, which is able to deodorize simulated tobacco emissions and decompose nicotine, has been formed by long-term adaptation to the VOCs of tobacco leaves in a laboratory reactor, functioning as a trickle-bed biofilter. Such a biofilter eliminates 90% of the basic toxic compound (nicotine) and odor-active compounds; the filtration efficiency does not change for tobacco brands with different VOC concentrations or in the presence of foreign substances. The main strains, isolated from the formed consortium and participating in the nicotine decomposition process, belong to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Rhodococcus*. An examination of the biofilter trickling fluid has shown full decomposition of nicotine and odor-active VOCs. The compounds, revealed in the trickling fluid, did not have any odor and were nontoxic. The obtained results make it possible to conduct scaling of the biofiltration process to eliminate odor from air emissions in the tobacco industry.