

Литература

1. *Тепляков В.В.* Прогнозирование газоразделительных свойств полимерных мембран // Журнал ВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. XXXII. №. 6. С. 693.
2. *Karyakin A.A., Morozov S.V., Voronin O.G.* et al. The Limiting Performance Characteristics in Bioelectrocatalysis of Hydrogenase Enzymes // *Angewandte Chemie*. 2007. № 119. P. 7382.
3. *Морозов С.В., Воронин О.Г., Карякина Е.Е., Карякин А.А.* Водородные топливные электроды на основе ферментов // Нано- и микросистемная техника. 2006. №. 5. С. 9.
4. *Morozov S.V., Voronin O.G., Karyakina E.E.* et al. Tolerance to oxygen of hydrogen enzyme electrodes // *Electrochemistry Communications*. 2006. № 8. P. 851.
5. *Voronin O.G., van Haaster D.J., Karyakina E.E.* et al. Direct Bioelectrocatalysis by NADP-Reducing Hydrogenase from *Pyrococcus furiosus* // *Electroanalysis*. 2007. Vol. 19. № 21. P. 2264.
6. *Netrusov A., Abramov S., Sadraddinova E.* et al. Membrane-assisted separation of microbial gaseous fuels from renewable sources // *Desalination and Water Treatment*. 2010. № 14. P. 252.

УДК 602.4.582.28.582.28.577.114

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВОГО БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА

© 2010 г. **Я.Э. Сергеева**¹,
Л.А. Галанина¹, **В.В. Лунин**²,
Е.П. Феофилова¹

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

XXI век выдвинул перед человечеством новую проблему — замену нефтяного топлива, вызванную уменьшением мировых запасов нефти и выделением экологически вредных газов, образующихся при работе двигателей. Значимость решения указанной проблемы связана с тем, что по оценке специалистов к 2030 г. потребление энергии в мире вырастет на 60 %, для чего необходимо значительное увеличение запасов топлив, которые к тому времени могут быть достаточно исчерпаны. Поэтому в последние годы

усилия мирового сообщества направлены на поиск альтернативных видов топлив.

Один из видов биотоплива — биодизельное — метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). Для получения МЭЖК используются растительные масла, метанол и щелочь (в качестве катализатора).

Наиболее широко применяется биодизельное топливо на основе масел сельскохозяйственных культур: сои (США, Бразилия), рапса (до 80 % от всего биодизельного топлива, произведенного в Европе), подсолнечника (ряд стран Европы, в том числе Франция, Италия). Число исследований возможности получения биодизельного топлива из разных возобновляемых природных источников неуклонно растет. Эти исследования касаются, главным образом, растительных масел (кокосового, соевого, рапсового, оливкового, арахисового). Животные жиры, хотя и упоминаются в некоторых работах, по сравнению с растительными маслами изучены в меньшей степени. В качестве исходного сырья для получения биодизельного топлива в ряде работ рассмотрены

Сергеева Я.Э. — канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник Учреждения Российской академии наук Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Тел.: (499) 135-01-69. E-mail: yapaes2005@yandex.ru.

Галанина Л.А. — канд. биол. наук, науч. сотрудник того же института. Тел.: (499) 135-01-69.

Лунин В.В. — академик РАН, профессор, декан химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-35-71. E-mail: vvlunin@kge.msu.ru.

Феофилова Е.П. — докт. биол. наук, профессор, зав. лабораторией экспериментальной микологии Учреждения Российской академии наук Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Тел.: (499) 135-75-42. E-mail: feofilov@inmi.host.ru.

бактерии, авто- и гетеротрофные водоросли. В последнее время внимание исследователей привлекли олеагенные дрожжи и мицелиальные грибы [1–6].

Современное биотехнологическое производство выдвигает ряд требований к микроорганизмам-продуцентам липидов [7]:

- содержание не менее 40 % липидов в совокупности с высокой продуктивностью;
- необходимость безотходной технологии получения липидов;
- представление большей части липидов триацилглицеринами (ТАГ);
- недефицитность и дешевизна компонентов среды для ферментации, не вызывающих потерю качества липидов;
- отсутствие полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в составе нейтральных липидов;
- возможность масштабирования процесса получения конечного продукта.

Анализ литературных данных показывает, что этим требованиям при создании биодизельного топлива наиболее соответствуют мицелиальные грибы. Их рассматривают как наиболее биотехнологичные продуценты XXI в. вследствие того, что:

- мицелиальные грибы растут с наибольшей скоростью (до 100 мкм/мин) и быстро накапливают большой объем биомассы;
- процесс культивирования грибов лучше отработан биотехнологически, нежели выращивание водорослей, и способен к большему масштабированию, чем культивирование растений;
- выход продукта не зависит от сезонных колебаний температуры и величины посевных площадей, возможно круглогодичное получение целевого продукта;
- можно варьировать ацильные цепи липидов, изменяя параметры среды и другие факторы (температуру культивирования, факторы роста, C:N);
- основную массу липидов составляют ТАГ, близкие по жирно-кислотному составу к рапсу;
- нейтральные липиды мицелиальных грибов не содержат ПНЖК;
- способ сохранения посевного материала (спор) и поддержание его в активном состоянии лучше отработаны в биотехнологии для грибов, чем для других продуцентов липидов.

Цель данной работы: скрининг среди мицелиальных грибов для выявления наиболее активного продуцента липидов; создание биотехнологии получения биодизельного топлива, установление его

основных характеристик и их соответствия используемому в странах ЕС биодизельному топливу на основе рапсового масла; удешевление биотехнологии получения биодизельного топлива заменой источников азота и углерода в среде ферментации на отходы пищевой промышленности, использование отходов (клеточных стенок грибов, глицерина) при получении биотоплива для удешевления стоимости конечного продукта.

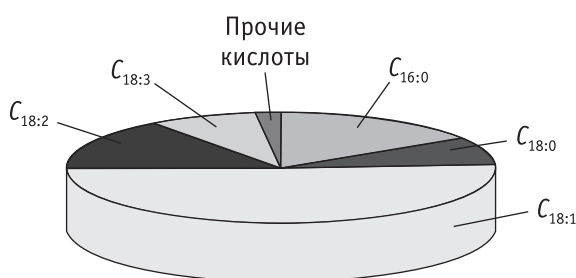
Выделение и анализ липидов в ходе исследований проводили согласно [8]. Состав и содержание индивидуальных жирных кислот липидов определяли методом ГЖХ, МЭЖК — на газо-жидкостном хроматографе «Кристалл 5000.1» капиллярной колонкой «Optima-240» (0,25 мм × 60 м × 0,25 мкм) фирмы «Macherey-Nagel». По данным о содержании индивидуальных жирных кислот рассчитывали степень ненасыщенности липидов, йодное число, низшую теплоту сгорания [9], цетановое число [10].

На первом этапе исследований отбирали олеагенные штаммы грибов, для чего проводили скрининг мицелиальных грибов. Основываясь на литературных данных, а также на результатах экспериментальных исследований в лаборатории экспериментальной микологии ИНМИ РАН, пришли к выводу, что представители *Basidiomycetes* и *Ascomycetes* не способны образовывать более 14–20 % липидов от веса сухой биомассы, поэтому основное внимание уделили представителям класса *Zygomycetes*, в частности пор *Mucorales*.

В результате проведенного скрининга среди представителей пор *Mucorales*, семейства *Cunninghamellaceae* был отобран штамм *Cunninghamella echinulata* ВКМ F-1204 (-). На пятые сутки культивирования на среде Галаниной [11] отобранный штамм образовал ~ 16 г/л биомассы и выход липидов составил 7 г/л, при содержании липидов в биомассе 47–50 %.

Одним из важных этапов исследований было определение состава и содержания жирных кислот липидов гриба *C. echinulata* (рисунок). Для анализа жирнокислотного состава использовали метод ГЖХ, реализуя который первоначально проводили реакцию переэтерификации для получения метиловых эфиров жирных кислот.

При этерификации липидов для получения метиловых эфиров жирных кислот предпочтительно использовать следующую технологию: перемешать в резервуаре липиды гриба, метанол и катализатор (KOH или NaOH) с массовым соотношением (90÷100):(9÷10):1; при этом из 1 т липидов и 111 кг



Состав и содержание (% от суммы) индивидуальных жирных кислот суммарных липидов мукурового гриба *C. echinulata* ВКМ F-1204 (–)

спирта в присутствии 12 кг катализатора получается приблизительно 970 кг (1100 л) МЭЖК (т.е. биодизельного топлива) и 153 кг первичного глицерина.

Процесс метанолиза проводят в кавитационном режиме. Для этого предварительно перемешанные компоненты (липиды, спирт и катализатор) обрабатывают в кавитационном реакторе при воздействии импульсов направленной кавитации. В результате разрыва молекул жирных кислот вследствие микровзрывов снижается вязкость, увеличивается цетановое число, улучшаются энергетические характеристики МЭЖК, а также значительно возрастает скорость и качество этерификации. Реакция идет при комнатной температуре без необходимости нагревания липидов и других компонентов. После кавитационного реактора обработанную смесь направляют в сепаратор для разделения смеси на две фракции: глицериновую и биодизельную (МЭЖК).

Было проведено сравнительное изучение состава липидов мукурового гриба *C. echinulata* ВКМ F-1204 (–) и масла рапса *Brassica napus*. Преобладающей фракцией нейтральных липидов как у рапса, так и у гриба являются ТАГ, хотя у последнего присутствуют фракции свободных жирных кислот (СЖК), свободных стероидов (ССст), диацилглицеринов (ДАГ). Основные характеристики биодизельного топлива на основе липидов грибов и масла рапса по сравнению с дизельным топливом представлены в таблице.

Низшая теплота сгорания биодизельного топлива на основе липидов гриба, была определена экспериментально (в РГГУ нефти и газа им. И.М. Губкина) и составила 37,13 МДж/кг.

Основываясь на полученных результатах и литературных данных (см. таблицу) можно сказать, что биодизельное топливо, полученное на основе липидов мукурового гриба *C. Echinulata*, по ряду по-

казателей соответствует требованиям европейских стандартов и сходно с наиболее широко используемым в странах ЕС биодизельным топливом на основе рапсового масла.

В работе намечены пути удешевления стоимости технологического процесса получения биодизельного топлива: 1) отказ от использования в ферментационной среде (где источник азота — нитрат аммония) глюкозы (хотя, благодаря новому способу получения глюкозы, в современной биотехнологии этот источник углерода считается экономически выгодным); 2) совмещения получения двух целевых продуктов в одной ферментации; 3) сокращения времени ферментации. Нам удалось дополнительно понизить стоимость процесса, используя биомассу гриба по прямому назначению, предварительно не извлекая липиды, а также установить возможность более полного извлечения липидов (повышения, соответственно, их выхода), благодаря совершенствованию системы растворителей.

Показано, что для удешевления стоимости среды ферментации, в частности замены глюкозы, можно использовать отходы пищевых производств: картофельные мезгу, шелуху, очистки, кофейный шлам, свекольный жом, подсолнечную лузгу и водные фильтраты этих отходов. Наиболее перспективны картофельная мезга, свекловичный жом и кофейный шлам, при использовании которых с одновременным внесением 0,2 % глюкозы, выход липидов увеличивается на 60 % по сравнению с контролем. При этом основные показатели биодизельного топлива остаются неизменными.

Значительное удешевление конечного продукта биотехнологического процесса возможно совместным получением нескольких целевых продуктов в одной ферментации.

Основные характеристики биодизельного топлива

Источник	Йодное число	Цетановое число	Теплота сгорания (МДж/кг)	Источник
Дизельное топливо	—	47	45,3	[12]
Биодизельное топливо (EN 14214)	≤ 120	≥ 51	≥ 35	[12]
<i>Brassica napus</i>	94–120	44–65	37,38	[9, 10, 13]
	114,9	51,74	37,31	Собственные данные
<i>Cunninghamella echinulata</i> ВКМ F-1204 (–)	90,81	55,68	37,27	

Известно, что при получении биодизельного топлива образуется отход — глицерин, который можно использовать, согласно нашим данным, в качестве добавки углерода в ферментационную среду. Выход биомассы при совместном использовании 2 г/л глицерина и картофельной мезги составляет приблизительно 20 %, липидов — 16 %. Повысить выход липидов до 25 % также удастся при дробном внесении глицерина.

Оставшаяся после извлечения липидов обезжиренная биомасса для получения хитина подвергается обработке по методу [14] с некоторыми модификациями: (без обработки ацетоном, хлороформом и спиртом). Отметим, что хитин муковых грибов обладает рядом преимуществ по сравнению с хитином крабов, в частности более высокой ранозаживляющей активностью, в настоящее время он используется в медицине (препарат «Микоран») для лечения ожоговых ран, пролежней и незаживающих ран у больных диабетом [15]. Полученный хитин *C. echinulata* имеет элементный состав, %: N — 5,43, C — 42,72, H — 6,72, что достаточно близко к теоретически вычисленному по содержанию элементов в хитине. Угол вращения D-глюкозамина — $[-\alpha]_D^{20} = 68 \div 69^\circ$, ИК-спектры хитина *C. echinulata* показывают сильную вибрацию в области амид 1 (область 1656—1620 см⁻¹) и амид 2 (область 1550 см⁻¹), что характерно для хитина грибов. Хитин *C. echinulata* отличается также наличием дополнительного пика в области 1200—1000 см⁻¹.

Выход обезжиренной биомассы составляет не менее 40 % сухой. Выход хитина — около 3,5 %. Таким образом, возможность одновременного получения двух конечных продуктов — биодизельного топлива и хитина позволяет получить экологически более чистую технологию и уменьшить стоимость первого. Кроме того, обезжиренная биомасса *C. echinulata* помимо хитина содержит также ряд ценных полисахаридов, в частности, специфический для *Mucorales* гетерополисахарид — мукоран, который также представляет интерес для медицины и может быть востребован.

Дальнейшего улучшения биотехнологического процесса можно достичь сокращением сроков ферментации посредством «засева проснувшимися спорами» (суть способа в том, что перед засевом ферментера посевной материал подвергается инкубации с внесением стимуляторов прорастания, которыми могут быть D-глюкоза, L-пролин, некоторые жирные кислоты).

На основании этих данных было предложено использовать для смыва с косяков с конидиями гриба 0,2 %-ный раствор глюкозы и выдерживать пробирки с посевным материалом 20—30 мин при слабом встряхивании. Такой прием позволяет на 2—3 ч сократить длительность ферментации *C. Echinulata*. Сокращение сроков ферментации и, особенно, синхронизацию этого процесса обеспечивает также добавление миристиновой кислоты.

Итак, впервые в мире создана биотехнология получения биодизельного топлива с использованием в виде альтернативного топлива липидов мицелиальных грибов. По основным характеристикам созданное биодизельное топливо аналогично топливу на основе рапсового масла и удовлетворяет требованиям европейскому (EN 14214) и мировых стандартов.

Рекомендуемая биотехнология нуждается в доработках для достижения экономического эффекта, некоторые из них предложены выше. Учитывая возможность улучшения полезных свойств штамма-продуцента, получение нескольких целевых продуктов в одной ферментации (что приводит к созданию безотходной технологии), сокращение сроков ферментации и др., следует говорить о дальнейшем удешевлении стоимости биодизельного топлива и необходимости испытания процесса его получения в условиях опытных производств.

В заключение отметим следующее. Разработан биотехнологический способ производства биодизельного топлива на основе липидов мицелиальных грибов. Катализаторы получения липидов — грибы, относящиеся к царству *Fungi*, классу *Zygomycetes*, порядку *Mucorales*, семейству *Cunninghamellaceae*. Процесс ферментации осуществляется на среде, содержащей (NH₄)NO₃ — источник азота. Вместо глюкозы предполагается в качестве источника углерода использовать отходы пищевых производств и гидролизаты древесины. Процесс получения липидов не зависит от площадей и погодных условий, идет в ферментере 4—5 сут. при 27—28 °С. Выход липидов составляет 48—50 % сухой биомассы и представлен, в основном, нейтральными липидами — триацилглицеринами. Жирнокислотный состав этих липидов сходен с таковыми из рапса, преобладающей жирной кислотой является олеиновая. По основным характеристикам созданное биодизельное топливо соответствует европейским стандартам (EN 14214). Намечены основные пути удешевления процесса получения биодизельного

топлива и создания замкнутой, экологически более чистой технологии: утилизация отходов от целевого производства — глицерина, который может быть использован в ферментациях в качестве источника углерода, и отход после экстракции липидов из биомассы (клеточные стенки грибных гиф, содержащие аминополисахариды — хитин и хитозан — активное начало препарата «Микоран» для лечения ожоговых ран, пролежней и трофических язв при диабете).

Литература

1. Liu B., Zhao Z.K. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2007. Vol. 82. № 8. P. 775.
2. Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vpl. 80. № 5. P. 749.
3. D'Urso A., Bubbico R., Scarsella M., Bravi M. Fungal Biomass-Based Production of Lipids for Biodiesel Synthesis // Chem. Eng. Trans. 2008. Vol. 14. P. 251.
4. Meng X., Yang J., Xu X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms // Renewable Energy. 2009. Vol. 34. № 1. P. 1.
5. Raposo S., Pardro J., Lima-Costa M.E. Oleaginous microorganisms as sustainable feedstock for biodiesel production // New Biotechnology. 2009. Vol. 25 (Suppl. 1). P. S276.
6. Vicente G., Bautista F. L., Rodriguez R. et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus // Biochemical Engineering Journal. 2009. Vol. 48. № 1. P. 22.
7. Феофилова Е.П. Липиды мицелиальных грибов и перспективы развития олеобиотехнологии. II. Использование липидов грибов в биотехнологии // Биологические науки. 1991. №1. С. 5.
8. Kates M. Techniques in lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. Second edition. Amsterdam: Elsevier Press. 1986.
9. Семенов В.Г., Зинченко А.А. Вычисление теплоты сгорания биотоплив по данным калориметрии и хроматографии // Химия и технология топлив и масел. 2006. № 6. С. 42.
10. Bamgboye A.I., Hansen A.C. Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition // Int. Agrophysics. 2008. Vol. 22. P. 21.
11. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Андриянова Д.А. и др. Липиды мицелиальных грибов как альтернативный вид топлива для дизельного двигателя // Микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 1.
12. Appendix B: Biodiesel Standards // The Biodiesel Handbook / Eds. Knothe G., Gerpen J.V., Krahl J. Illinois: AOCS Press, 2005. P. 278.
13. The Lipid Handbook. / First edition Eds. Gunstone F.D., Harwood J. L., Padley F. B. London: Chapman and Hall., 1986.
14. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. Хитин мицелиальных грибов: методы выделения, идентификации и физико-химические свойства // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 27.
15. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. и др. Новая отрасль биотехнологии — ранозаживляющие препараты на основе полиаминосахаров // Микробиология. 1999. Т. 68. № 6. С. 834.

Книги издательства «Калвис»:

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПАРАДИГМА ГЛАЗАМИ ИНЖЕНЕРА

Кальнер В.Д. М : Калвис, 2009. – 400 с. – ISBN 978-5-89530-014-5

В книге на основе официальных документов и результатов оценки изменения состояния биосферы вследствие хозяйственной деятельности человека показана необходимость участия каждого в сохранении и реабилитации окружающей природы и среды обитания.

Опираясь на точные знания инженера и исследователя, с которых начинается творческая мысль, автор приходит к изложению современных взглядов на окружающий мир. Анализируя историю возникновения и развития термина «экология» и его трансформацию в философское обобщение, автором сформулированы представления об экологическом мировоззрении и экологической культуре – основах для разработчиков и создателей современной товарной продукции и услуг, прослежены причины интенсивного нарастания экологического кризиса, деградации природы и рассмотрены пути их преодоления.

Книга рассчитана на широкий круг читателей, обеспокоенных катастрофическим загрязнением и деградацией окружающей среды. Будет полезна студентам и преподавателям всех специальностей, инженерам, конструкторам и технологам, представителям власти и бизнеса – всем, кто думает о смысле и качестве жизни своих современников и ближайших потомков.

По вопросам приобретения обращаться: ЗАО «Калвис»: тел.: (495) 955-01-97, e-mail: podpiska@kalvis.ru
«БИБКОМ» (Центральный коллектор библиотек): 115193, ул. Петра Романова, д.12. Тел.: (495) 995-95-77, e-mail: ckbib@ckbib.ru