

УДК 577.115.3:662.756.3

## Расчет характеристик биодизельного топлива на основе жирнокислотного состава липидов некоторых биотехнологически значимых микроорганизмов

© 2017 г. Я.Э. СЕРГЕЕВА<sup>1,\*</sup>, Е.Б. МОСТОВА<sup>2</sup>, К.В. ГОРИН<sup>1</sup>, А.В. КОМОВА<sup>1</sup>, И.А. КОНОВА<sup>1</sup>, В.М. ПОЖИДАЕВ<sup>1</sup>, П.М. ГОТОВЦЕВ<sup>1</sup>, Р.Г. ВАСИЛОВ<sup>1</sup>, С.П. СИНЕОКИЙ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 123182

<sup>2</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

\* e-mail: yanaes2005@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2016

Принята в печать 25.07.2016

В статье представлен краткий обзор данных о взаимосвязи между строением жирных кислот и свойствами полученного на их основе биотоплива. Изучен жирнокислотный состав липидов дрожжей и фототрофных микроорганизмов. На основе полученных данных проведены расчеты основных параметров биодизеля (иодное число, цетановое число, плотность, кинематическая вязкость), который можно получить из липидов указанных микроорганизмов, и их сравнение с действующими стандартами. Показано, что по составу и содержанию жирных кислот наиболее подходящим источником биотоплива являются липиды дрожжей *Rhodospiridium toruloides* ВКПМ У–3349. Рассмотрены пути снижения себестоимости микробных липидов, которые позволяют сделать их конкурентоспособным сырьем (наряду с растительными маслами) для получения биотоплива.

**Ключевые слова:** биодизель, дрожжи, жирные кислоты, иодное число, микроводоросли, получение биодизеля, фототрофные микроорганизмы, цетановое число, цианобактерии.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-53-61

Биодизель представляет собой смесь моноалкиловых (чаще всего метиловых или этиловых) эфиров жирных кислот, полученных в результате реакции переэтерификации возобновляемых биологических ресурсов, таких как растительные масла, реже животные жиры [1]. Наряду с традиционными источниками (растительными маслами) в качестве исходного сырья для получения биодизеля рассматриваются, в частности, рыбий жир, а также липиды микроорганизмов (бактерий, микроводорослей, дрожжей и мицелиальных грибов) [2–4].

Основные свойства биодизеля определяются составом и содержанием МЭЖК. По результатам проведенных на данный момент исследований [5–8], установлено, что ключевыми факторами, обуславливающими свойства биодизеля, являются длина и степень разветвленности углеродной цепи, а также степень ненасыщенности (т.е. число двойных связей в молекуле) жирной кисло-

ты, участвующей в формировании моноалкилового эфира.

Для характеристики свойств дизельного топлива используют, в частности, такие показатели, как цетановое и иодное числа, кинематическая вязкость, наивысшая теплота сгорания и др. [9,10].

Цетановое число – основной показатель воспламеняемости дизельного топлива. Чем выше цетановое число, тем больше способность топлива к воспламенению, тем короче промежуток времени между началом впрыска и воспламенением и, как следствие, тем более спокойным и плавным является горение дизельного топлива, которое определяет высокие мощностные и экономические показатели работы двигателя [11] и имеет большое значение при низких температурах использования топлива. Увеличение степени ненасыщенности липидов приводит к снижению цетанового числа.

*Список сокращений:* ГХ – газовая хроматография; ЖК – жирные кислоты; КУЖ – культуральная жидкость; МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат.

Цетановое число индивидуальной жирной кислоты уменьшается как при укорачивании, так и при увеличении разветвленности углеродной цепи. На величину цетанового числа эфиров жирных кислот влияет также природа спиртов, используемых для получения эфиров, длина и степень разветвленности их цепи.

Следует отметить, что разветвленные эфиры (производные изопропанола) представляют особый интерес в связи с тем, что они сохраняют свои свойства при низкой температуре [11]. Однако эти эфиры имеют более высокую себестоимость из-за высокой цены используемых спиртов и сложности технологического процесса их получения.

Согласно литературным данным, уровень ненасыщенности жирной кислоты оказывает большее влияние на ее цетановое число, чем степень разветвленности [12]. Насыщенные жирные кислоты и их эфиры (метиловые, этиловые) характеризуются высоким цетановым числом. Так, например, цетановое число метилового эфира миристиновой кислоты ( $C_{14:0}$ ) составляет 66,2, пальмитиновой ( $C_{16:0}$ ) – 74,5, стеариновой ( $C_{18:0}$ ) – 86,9. Появление же в молекуле указанных кислот только одной двойной связи приводит к резкому снижению величины данного показателя: так, в случае метилового эфира пальмитолеиновой кислоты ( $C_{16:1}$ ) величина цетанового числа составляет 51,5, олеиновой кислоты ( $C_{18:1}$ ) – 46,1. Дальнейшее увеличение степени ненасыщенности кислоты приводит к еще большему снижению цетанового числа: для метилового эфира линолевой кислоты ( $C_{18:2}$ ) данный показатель составляет 31,4, линоленовой ( $C_{18:3}$ ) – 22,7 [13].

Установлено, что при увеличении длины цепи жирной кислоты кроме цетанового числа повышается также ее вязкость. Отмечено, что данные показатели уменьшаются при увеличении степени ненасыщенности [10, 14]. При этом такие характеристики, как плотность, иодное число и наивысшая теплота сгорания (количество тепла, которое выделяется при полном сгорании единицы топлива и охлаждении продуктов сгорания до температуры топлива и конденсации водяного пара, образовавшегося при окислении водорода, входящего в состав топлива) повышаются при увеличении степени ненасыщенности кислот и снижаются при увеличении длины цепи [11].

Иодное число, являясь показателем содержания в топливе ненасыщенных жирных кислот, тесно связано с таким свойством, как химическая стабильность топлива, которая, в свою очередь, характеризуется величиной индукционного периода – временем до начала окисления топлива при

определенных условиях испытания. Чем выше индукционный период, тем выше стойкость топлива к окислению.

Таким образом, использование жирных кислот с длинной цепью и низкой степенью ненасыщенности позволяет повысить качество топлива и увеличить его устойчивость к окислению при низких температурах [10, 11, 14].

В стандартах и требованиях к биодизелю существует ряд ограничений по профилю образующих его жирных кислот. Основой подобных ограничений, содержащихся, например, в стандарте EN 14214, является исключение из состава биодизельного топлива компонентов с нежелательными свойствами, например, чувствительностью к окислению. На практике же данные ограничения приводят к отказу от использования ряда потенциальных сырьевых материалов для производства биодизеля.

Указанные ограничения касаются, в частности, содержания метилового эфира линоленовой кислоты ( $C_{18:3}$ ), которое не должно превышать 12%, ввиду того, что данный компонент снижает способность топлива противостоять окислению. Следует отметить, что специально установлено такое пороговое значение данной величины, которое позволяет использовать в качестве основного исходного сырья рапсовое масло. Есть и ограничения (не выше 1%) по содержанию полиненасыщенных жирных кислот с четырьмя и более двойными связями в молекуле. Это требование связано с тем, что у данных жирных кислот, содержащихся, например, в рыбьем жире, еще ниже их окислительная стабильность, чем у линоленовой кислоты и ее эфиров.

Анализ экспериментальных данных, полученных при изучении влияния длины и степени ненасыщенности ЖК на свойства дизельного топлива, позволил вывести эмпирические формулы, устанавливающие зависимость основных характеристик этого вида топлива от указанных параметров входящих в его состав эфиров [15–18].

Цель данной работы состояла в оценке с использованием упомянутых выше эмпирических формул качества биодизеля, получаемого на основе липидов, выделенных из биомассы биотехнологически значимых штаммов микроводорослей и дрожжей (липомецетов).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Источники липидов.** Для изучения в этом качестве были выбраны три штамма дрожжей-липомецетов из Всероссийской коллекции про-

мышленных микроорганизмов (ВКПМ) (*Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3178, *Lipomyces starkeyi* ВКПМ Y-1876, *Rhodospiridium toruloides* ВКПМ Y-3349) и три штамма фототрофных микроорганизмов – два штамма микроводорослей (*Chlorella vulgaris* C-81 Beijer. var. *vulgaris* IPPAS, штамм 2-dDg-res CRS-7 из коллекции ИФР РАН и *Chlorella sorokiniana*, GenBank ID: KC 678067) и штамм цианобактерии (*Arthrospira platensis*, ВКПМ B-12619).

#### Условия культивирования дрожжей.

Предварительно дрожжи выращивали на агаризованной богатой среде (г/л: глюкоза – 20, триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5 (Sigma-Aldrich, США), NaCl – 10 (“Авилон Компанихим”, Россия), агар – 20 (Sigma-Aldrich) в течение суток при 25°C для *L. starkeyi* и при 30°C для *Y. lipolytica* и *R. toruloides*.

Инокулят растили на аналогичной жидкой среде без добавления агара в пробирках емкостью 50 мл с объемом среды 5 мл при соответствующей температуре в течение 20 ч.

Основное культивирование дрожжей проводили в течение 5 сут в колбах емкостью 750 мл с 50 мл среды при соответствующей температуре и постоянном перемешивании (250 об/мин). Среда имела следующий состав, %:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,085;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,015;  $\text{MgSO}_4$  – 0,05; NaCl – 0,01;  $\text{CaCl}_2$  – 0,01;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,1; глюкоза – 9,0 в 100 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6,8 (соли производства отечественных компаний “Русский химик”, “Авилон Компанихим” и “Лабтех”). Инокуляцию в питательную среду проводили из расчета  $5 \cdot 10^5$  кл/мл.

В процессе культивирования осуществляли контроль pH среды; при уровне pH ниже 4,5 в КЖ добавляли мел (Sigma-Aldrich) в концентрации 1%.

По окончании культивирования биомассу дрожжей отделяли центрифугированием, предварительно растворив мел в КЖ добавлением эквивалентного количества 1 М HCl, лиофилизовали и хранили при –20°C.

**Условия культивирования штаммов фототрофных микроорганизмов.** Микроводоросли *Chlorella* выращивали на среде Basal следующего состава, г/л:  $\text{KNO}_3$  – 1,25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,00;  $\text{CaCl}_2$  – 0,0835;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,1142;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0498;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0882;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,0144;  $\text{MoO}_3$  – 0,0071;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,0157;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,0049;  $\text{Na}_2$ -ЭДТА – 0,5 (производители компонентов – отечественные фирмы “Русский химик”, “Лабтех” и “Авилон Компанихим”). Питательную сре-

ду готовили на фильтрованной водопроводной воде с начальным pH среды 7,0. Штамм цианобактерии *A. platensis* выращивали на среде Zarouk (производители компонентов – отечественные компании “Русский химик”, “Авилон Компанихим” и “Лабтех”) следующего состава, г/л:  $\text{NaHCO}_3$  – 10,8;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 7,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 1,00; NaCl – 1,00;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{Na}_2$  – ЭДТА  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,08.

Выращивание проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, затем 1000 мл и в итоге 5000 мл при постоянном перемешивании за счет пропускания атмосферного воздуха (250 мл/мин) и температуре  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  в условиях постоянной (круглосуточной) освещенности (интенсивность 3000 лк). При достижении концентрации  $20 \cdot 10^6$  кл/мл культуру микроводорослей отделяли центрифугированием, лиофилизовали и хранили при –20°C.

**Получение метиловых эфиров жирных кислот.** МЭЖК получали прямым метанолизом согласно [19].

**ГЖХ-анализ МЭЖК.** Качественный анализ МЭЖК проводили на газовом хроматографе Bruker 430 GC, снабженном пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой Select™ Biodiesel for FAME (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм), в режиме линейного программирования температуры: 190°C (3 мин); увеличение температуры на 3°C/мин; 230°C (5 мин). Температура инжектора составляла 250°C, температура детектора – 250°C, линейная скорость потока газа-носителя (азота) – 20 см/сек, деление потока – 1:20. Объем вводимой пробы был равен 1 мкл. Идентификацию индивидуальных жирных кислот проводили путем сравнения времени удерживания образца и стандартного препарата (FAME mix Supelco-37) (Supelco, США). Количественное содержание индивидуальных жирных кислот определяли с использованием внутреннего стандарта ( $\text{C}_{17:0}$ ).

**Математические методы.** На основе полученных данных о составе и содержании в биомассе штаммов индивидуальных жирных кислот и с использованием эмпирических уравнений были рассчитаны показатели некоторых регламентируемых характеристик и параметров биодизеля.

Иодное число рассчитывали согласно [20]:

$$IV = \sum_{i=1}^n (254 \cdot N \cdot w_i) / M_i,$$

где  $N$  – число двойных связей в молекуле кислоты;  $w_i$  – содержание данной кислоты в сумме жирных кислот;  $M_i$  – молекулярная масса жирной кислоты (или метилового эфира).

Цетановое число определяли по [17]:

$$CN = \sum_{i=1}^n w_i \cdot \phi_i,$$

где  $\phi_i$  – величина цетанового числа индивидуального метилового эфира жирной кислоты, рассчитанная по уравнению:

$$\phi_i = -7,8 + 0,302 \cdot M_i - 20 \cdot N.$$

Наивысшая теплота сгорания, МДж/кг, была рассчитана по формуле [16]:

$$HHV = \sum_{i=1}^n w_i \cdot \delta_i,$$

где  $\delta_i$  – величина наивысшей теплоты сгорания индивидуального метилового эфира жирной кислоты, рассчитанная по уравнению:

$$\delta_i = 46,19 - \frac{1794}{M_i} - 0,21N.$$

Кинематическую вязкость, мм<sup>2</sup>/с, определяли по [16]:

$$\eta = \exp\left(\sum_{i=1}^n w_i \cdot \ln(\eta_i)\right),$$

где

$$\ln(\eta_i) = -12,503 + 2,496 \cdot \ln(M_i) - 0,178 \cdot N,$$

[17]:  
Плотность, г/см<sup>3</sup>, рассчитывали согласно

$$\rho = \sum_{i=1}^n w_i \cdot \rho_i,$$

где

$$\rho_i = 0,8463 + \frac{4,9}{M_i} + 0,0118 \cdot N.$$

Все измерения проводили в трехкратной повторности; в таблицах и на рисунке приведено среднее значение трех измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты расчетов основных характеристик биодизеля, полученного на основе растительных масел, сравнивали с соответствующими литературными данными (табл. 1).

Таблица 1

**Расчетные и опубликованные в литературе характеристики биодизеля, полученного на основе растительных масел**

**Calculated and reported characteristics of biodiesel obtained on the basis of plant oils**

| Показатель / Тип масла             | Цетановое число | Иодное число | Наивысшая теплота сгорания, МДж/кг | Плотность, г/см <sup>3</sup> | Источник                |
|------------------------------------|-----------------|--------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Масло <i>Jatropha gossypifolia</i> | 58,5            | 54,90        | 36,72                              | 0,8100                       | Расчетное значение [21] |
|                                    | –               | –            | 40,32                              | 0,8874                       |                         |
| Масло <i>Jatropha curcas L.</i>    | 53,1            | 105,46       | 38,58                              | 0,8549                       | Расчетное значение [21] |
|                                    | –               | –            | 41,72                              | 0,8826                       |                         |
| Масло <i>Jatropha curcas L.</i>    | 59,1            | 94,83        | 39,79                              | 0,8756                       | Расчетное значение [22] |
|                                    | 52,0            | 93,00        | –                                  | 0,8800                       |                         |
| Пальмовое масло                    | 65,19           | 57,95        | 39,46                              | 0,8712                       | Расчетное значение [23] |
|                                    | –               | 54,50        | 37,90                              | 0,8800                       |                         |
| Соевое масло                       | 49,39           | 136,73       | 39,32                              | 0,8723                       | Расчетное значение [23] |
|                                    | –               | 136,40       | 39,60                              | 0,8850                       |                         |

Знак «–» – данные отсутствуют, not detected.

Как видно из данных табл. 1, расчетные характеристики биодизеля согласуются с имеющимися в литературе экспериментальными данными.

Данные по составу и содержанию жирных кислот в липидах исследуемых штаммов дрожжей, микроводорослей и цианобактерии приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Состав и содержание (% от суммы) индивидуальных жирных кислот, отдельных групп жирных кислот и степень ненасыщенности исследуемых образцов липидов дрожжей и фототрофных микроорганизмов**

**Composition and content (% of total) of individual fatty acids, individual groups of fatty acids, and degree of unsaturation of analyzed samples of lipids from yeast and phototrophic microorganisms**

| Жирные кислоты              | Дрожжи               |                    |                      | Микроводоросли     |                       | Циано-бактерия      |
|-----------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
|                             | <i>Y. lipolytica</i> | <i>L. starkeyi</i> | <i>R. toruloides</i> | <i>C. vulgaris</i> | <i>C. sorokiniana</i> | <i>A. platensis</i> |
| <i>Насыщенные</i>           |                      |                    |                      |                    |                       |                     |
| 14:0                        | сл                   | сл                 | сл                   | сл                 | сл                    | сл                  |
| 16:0                        | 23,42                | 11,78              | 22,95                | 21,57              | 19,72                 | 40,33               |
| 18:0                        | 5,72                 | 4,91               | 4,43                 | 0,54               | 7,14                  | 1,70                |
| <i>Ненасыщенные</i>         |                      |                    |                      |                    |                       |                     |
| <i>Мононенасыщенные</i>     |                      |                    |                      |                    |                       |                     |
| 16:1                        | 10,40                | 37,23              | сл                   | 2,08               | 0,68                  | 5,48                |
| 17:1                        | –                    | –                  | –                    | –                  | 12,43                 | –                   |
| 18:1                        | 43,24                | 43,30              | 60,86                | 3,60               | 3,04                  | 2,32                |
| <i>Полиненасыщенные</i>     |                      |                    |                      |                    |                       |                     |
| 16:2                        | –                    | –                  | –                    | 7,75               | 1,80                  | –                   |
| 16:3                        | –                    | –                  | –                    | 13,44              | 5,54                  | –                   |
| 18:2                        | 11,78                | 0,65               | 8,42                 | 31,54              | 13,61                 | 17,89               |
| 18:3                        | 3,86                 | –                  | 1,59                 | 15,50              | 26,82                 | 23,32               |
| <i>Прочие</i>               |                      |                    |                      |                    |                       |                     |
|                             | 1,58                 | 2,13               | 1,75                 | 3,98               | 9,22                  | 8,96                |
| <i>Суммарное содержание</i> |                      |                    |                      |                    |                       |                     |
| C <sub>16</sub> -ЖК         | 33,82                | 49,01              | 22,95                | 44,84              | 27,74                 | 45,81               |
| C <sub>18</sub> -ЖК         | 64,60                | 48,86              | 75,30                | 51,18              | 50,61                 | 45,23               |
| Коэффициент ненасыщенности* | 2,38                 | 4,86               | 2,59                 | 2,38               | 1,64                  | 1,17                |
| Степень ненасыщенности**    | 0,89                 | 0,82               | 0,82                 | 1,71               | 1,44                  | 1,13                |

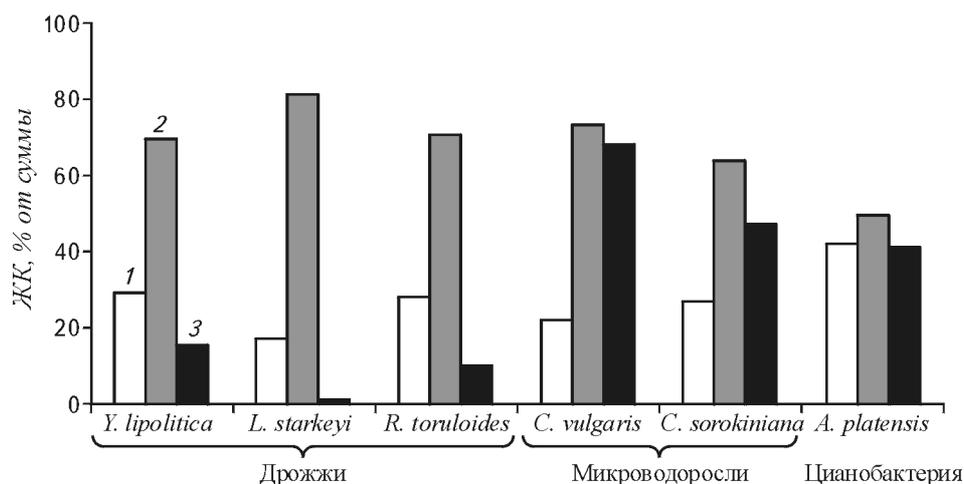
*Примечание:* сл – следовые количества (менее 1%), trace amount (less than 1%); знак «–» компонент отсутствует, not detected.

\* Отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных жирных кислот.

Ratio of amount of unsaturated to amount of saturated fatty acids.

\*\*  $[1(\% \text{ моноеновые кислоты}) + 2(\% \text{ диеновые кислоты}) + 3(\% \text{ триеновые кислоты})] / 100.$

$[1(\Sigma \% \text{ monoenes}) + 2(\Sigma \% \text{ dienes}) + 3(\Sigma \% \text{ trienes})] \text{ divided by } 100.$



Содержание отдельных групп жирных кислот (% от суммы) в липидах исследуемых штаммов дрожжей и фототрофных микроорганизмов: 1 – насыщенные ЖК; 2 – ненасыщенные ЖК; 3 – полиненасыщенные ЖК

Content of fatty acid individual groups (% of total fatty acids) in lipids of investigated yeast and phototrophic microorganism strains: (1), saturated fatty acids; (2), unsaturated fatty acids; and (3), polyunsaturated fatty acids

Установлено, что основными в составе тотальных жирных кислот являются С<sub>16</sub>- и С<sub>18</sub>-кислоты, причем для штаммов дрожжей *Y. lipolytica* и *R. toruloides*, а также штамма микроводоросли *C. sorokiniana* характерно преобладание С<sub>18</sub>-жирных кислот, в то время как в липидах *L. starkeyi*, *C. vulgaris* и *A. platensis* содержание С<sub>16</sub>- и С<sub>18</sub>-кислот приблизительно одинаково (см. табл. 2).

При рассмотрении содержания отдельных групп жирных кислот отмечено, что практически во всех исследованных образцах липидов преобладают ненасыщенные жирные кислоты (рисунок).

Величина коэффициента ненасыщенности (который представляет собой отношение суммы насыщенных жирных кислот к сумме ненасыщенных жирных кислот) лежала в пределах от 1,64 (для микроводоросли *C. sorokiniana*) до 4,9 (для представителя дрожжей *L. starkeyi*) (см. табл. 2). Единственным исключением являлся штамм цианобактерии *A. platensis*, в липидах которого величина данного показателя была заметно ниже и составляла 1,17.

В отличие от липидов исследованных штаммов дрожжей, где наибольшее содержание полиненасыщенных (суммы ди- и триеновых) жирных кислот составляло 15,64% (*Y. lipolytica*), в липидах всех исследованных штаммов микроводорослей было обнаружено высокое содержание ПНЖК (47,77% и 68,23% для *C. sorokiniana* и *C. vulgaris*, соответственно) (см. рисунок) с преобладанием С<sub>18</sub>-ПНЖК, а именно линолевой (С<sub>18:2</sub>) и линоленовой (С<sub>18:3</sub>) кислот (см. табл. 2).

Как следует из данных, приведенных в табл. 2, степень ненасыщенности липидов штам-

мов микроводорослей в 1,4–2 раза выше, чем степень ненасыщенности липидов дрожжей, что обусловлено высоким суммарным содержанием ПНЖК.

В табл. 3 представлен ряд показателей биодизеля, рассчитанных на основе полученных данных о жирнокислотном составе исследуемых образцов липидов по уравнениям, приведенным в экспериментальной части. В этой же таблице для сравнения показаны соответствующие характеристики принятых стандартов биодизеля: EN 14213 и EN 14214 (Европа), ASTM D6751–08 (США) и ГОСТ 53605–2009 (Россия).

В принятых стандартах существует ограничение по величине иодного числа, согласно которому оно не должно превышать 120. Из данных табл. 2 и 3 следует, что увеличение степени ненасыщенности липидов приводит к повышению иодного числа и для штаммов микроводорослей этот показатель превышает максимально допустимую величину. Следовательно, биодизель, полученный на основе липидов данных штаммов микроводорослей, более восприимчив к окислению, чем это допускается существующими стандартами.

Увеличение степени ненасыщенности липидов приводит и к снижению величины цетанового числа (см. табл. 2 и 3). Так, при использовании исследованных штаммов микроводорослей *Chlorella* получены низкие значения цетанового числа, что говорит о возможной недостаточно эффективной воспламеняемости получаемого из данной биомассы топлива.

**Характеристики биодизеля, полученного из липидов исследуемых штаммов дрожжей, фототрофных микроорганизмов и рапсового масла****Characteristics of lipids from yeast and phototrophic microorganisms studied strains and rape oil**

| Источник биодизеля    | Иодное число | Цетановое число | Плотность, г/см <sup>3</sup> | Наивысшая теплота сгорания, МДж/кг | Кинематическая вязкость, мм <sup>2</sup> /с |
|-----------------------|--------------|-----------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| Липиды дрожжей        |              |                 |                              |                                    |   |
| <i>Y. lipolytica</i>  | 80,95        | 60,11           | 0,86                         | 39,13                              | 3,25  |
| <i>L. starkeyi</i>    | 77,07        | 59,80           | 0,85                         | 38,83                              | 3,20  |
| <i>R. toruloides</i>  | 74,13        | 62,19           | 0,86                         | 39,14                              | 3,43  |
| Липиды микрооорослей  |              |                 |                              |                                    |   |
| <i>C. vulgaris</i>    | 160,90       | 40,24           | 0,85                         | 37,88                              | 2,02  |
| <i>C. sorokiniana</i> | 133,33       | 42,40           | 0,80                         | 35,92                              | 2,16  |
| Липиды цианобактерии  |              |                 |                              |                                    |   |
| <i>A. platensis</i>   | 103,50       | 47,90           | 0,80                         | 36,02                              | 2,46  |
| Рапсовое масло        | 97,4–109     | 56–61,8         | 0,88                         | 40,54                              | 4,83–5,65                                   |
| Биодизель (стандарты) |              |                 |                              |                                    |   |
| EN 14213              | –            | –               | –                            | ≥ 35                               | –   |
| EN 14214              | ≤ 120        | ≥ 51            | 0,86–0,90                    | –                                  | 3,5–5,0                                     |
| ASTM D6751–02         | –            | ≥ 47            | 0,86–0,91                    | –                                  | 1,9–6,0                                     |
| ГОСТ 53605–2009       | ≤ 120        | ≥ 51            | 0,86–0,90                    | –                                  | 3,5–5,0                                     |

Теплота сгорания также является одной из важнейших характеристик топлива, служащих для оценки его энергетических возможностей и экономической эффективности. В требованиях европейского стандарта EN 14213 установлена минимальная граница данного показателя – 35 МДж/кг. Согласно проведенным расчетам (см. табл. 3), наивысшая теплота сгорания всех исследованных образцов удовлетворяет этому требованию (т.е. равна или превышает 35 МДж/кг).

Кинематическая вязкость – важная характеристика биодизеля, поскольку она влияет на качество распыления топлива и размер капли. Топливо, характеризующееся высокой вязкостью, как правило, образует более крупные капли при впрыскивании, что может привести к неэффективному его распылению, увеличению количества отложений в двигателе и повышению уровня энергии, необходимой для перекачки топлива, а также росту количества выхлопных газов и выбросов. Как видно из приведенных результатов расчета, чем выше степень ненасыщенности липидов, тем ниже вязкость биодизеля: так, вязкость биодизеля, полученного из липидов дрож-

жей, выше данного показателя для микроводорослей и лежит практически на границе нижнего предела установленных стандартов (см. табл. 3).

Плотность влияет на массу топлива, впрыскиваемого в камеру сгорания, и на соотношение в ней воздух : топливо. Поскольку подача топлива насосом определяется его объемом, а не массой, то впрыск топлива с большей плотностью обеспечивает доставку в двигатель большей массы топлива. Как следует из результатов расчета (см. табл. 3), плотность биодизеля, полученного на основе липидов трех штаммов дрожжей и штамма микроводоросли *C. vulgaris*, практически соответствует нижнему пределу стандартов, в то время как для штамма микроводоросли *C. sorokiniana* и штамма цианобактерии *A. platensis* данный показатель меньше величины нижнего предела.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что липиды изученных штаммов микроводорослей *C. vulgaris* и *C. sorokiniana*, а также цианобактерии *A. platensis* характеризуются высокой степенью ненасыщенности, что обусловлено значительным содержанием линоленовой и линолевой кислот (содержание

последней превышает допустимый лимит европейского стандарта). Высокая степень ненасыщенности оказывает влияние на величину таких регламентированных показателей для биодизеля, как иодное число и цетановое число. Высокое значение иодного числа и низкое значение цетанового числа свидетельствуют о высокой восприимчивости к окислению биодизеля, полученного из биомассы микроводорослей и цианобактерии. В случае необходимости использования данного вида сырья для получения биодизеля необходимо понизить степень ненасыщенности липидов микроводорослей или цианобактерии.

Липиды изученных штаммов дрожжей *Y. lipolytica*, *L. starkeyi*, *R. toruloides* характеризуются высоким (до 80%) содержанием мононенасыщенных жирных кислот (олеиновой и пальмитолеиновой) (см. табл. 2). Согласно расчетам, проведенным на основании полученных данных о составе и содержании индивидуальных жирных кислот, биодизель, полученный из липидов исследованных штаммов дрожжей, по ряду рассмотренных параметров соответствует принятым стандартам для биотоплива. Наиболее подходящим для производства биодизеля при этом является штамм *R. toruloides*.

Перспективы масштабного использования микробных масел для получения биодизеля в значительной степени зависят от возможности снижения их себестоимости и достижения ценовой конкурентоспособности по сравнению с рапсовым маслом. Биодизель, получаемый из рапса сегодня, имеет себестоимость от 0,69 долл. за 1 л [28], в то время как оценочная себестоимость различных микробных жиров находится в диапазоне от 1 до 4 долл. за 1 л [24–28].

Снижению себестоимости микробных масел способствуют успехи в использовании методологии генетической инженерии для увеличения (до 90%) накопления жиров в клетках дрожжей [29, 30]. В то же время, основным фактором, влияющим на себестоимость биодизеля из биомассы дрожжей–липомицетов, остается стоимость используемых для их культивирования источников углерода (сахаров), составляющая около 50% от себестоимости жиров, поскольку для получения 1 кг жиров требуется около 4 кг сахаров. Перспективы снижения стоимости сахаров, в свою очередь, зависят от масштабов глубокой промышленной переработки зерна с получением ценных белковых продуктов для пищевой и кормовой промышленности и глюкозы в качестве побочного продукта. Возможное снижение стоимости сахаров связано также с развитием эффективных технологий их по-

лучения из растительного целлюлозосодержащего сырья при условии, что с помощью этих методов удастся достичь уменьшения этого показателя до уровня ниже 0,1 долл. за 1 кг.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках соглашения о предоставлении субсидии №14.607.21.0034.

Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60714X0034.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Krawczyk T. Biodiesel—alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM*, 1996, 7, 801–829.
2. Bajpai D. and Tyagi V.K. Biodiesel: source, production, composition, properties and its benefits. *J. Oleo Sci.*, 2006, 55, 487–502.
3. Ma F., and M.A. Hanna. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 1999, 70, 1–15.
4. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 2007, 25, 294–306.
5. Knothe G. Production and properties of biodiesel from algal oils. In: *Algae for biofuels and energy*. Eds. M.A. Borowitzka and N.R. Moheimani. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2013, 207–221.
6. Ramos M. J., Fernández C.M., Rodríguez Casas A., et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 2009, 102, 10131–10135.
7. Lang X., Dalai A.K., Bakhshi N.N., et al. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, 2001, 80, 53–62.
8. Dmytryshyn S.L., Dalai A.K., Chaudhari S.T., et al. Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties. *Bioresource Technology*, 2004, 92, 55–64.
9. Knothe G. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. algae. Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chemistry*, 2011, 13, 3048–3065.
10. Hoekman S.K., Broch A., Robbins C. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable Sustainable Energy Review*, 2012, 16, 143–169.
11. Refaat A.A. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. *Int. J. Sci. Tech.*, 2009, 6, 677–694.
12. Knothe G., Matheaus A.C., Ryan T.W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. *Fuel*, 2003, 82, 971–975.
13. Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 2005, 86, P.1059–1070.
14. Francisco E.C., Neves D.B., Jacob-Lopes E., and Franco T.T. Microalgae feedstock for biodiesel production: carbon diox-

- de sequestration, lipid production and biofuel quality. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010, 85, 395–403.
15. Bigelow N.W., Hardin W.R., Barker J.P., et al. A comprehensive GC–MS sub–microscale assay for fatty acids and its applications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, 88, 1329–1338.
  16. Knothe G. Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Energy Fuels*, 2012, 26, 5265–5273.
  17. Ramнrez–Verduzco L.F., Rodrнguez–Rodrнguez J.E., and Jaramillo–Jacob A.D.R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. *Fuel*, 2012, 91, 102–111.
  18. Talebi A.F., Mohtashami S.K., Tabatabaei M., et al. Fatty acids profiling; a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res.*, 2013, 2, 258–267.
  19. Liu J., Liu Y., Wang H., and Xue S., Direct transesterification of fresh microalgal cells. *Bioresource Technology*, 2015, 176, 284–287.
  20. Kalayasiri P., Jayashke N., and Krisnangkura K., Survey of seed oils for use as diesel fuels. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, 73, 471–474.
  21. de Oliveira J.S., Leite P.M., de Souza L.B., et al. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. *Bio-mass and Bioenergy*, 2009, 33, 449–453.
  22. Rao P.V. Experimental investigations on the influence of properties of *Jatropha* biodiesel on performance, combustion, and emission characteristics of a DI–CI Engine. *World Academy of Science, Engineering and Technology Applied Energy*, 2011, 5, 629–642.
  23. dos Santos I.C.F., de Carvalho S.H.V., Solleti J.I., et al. Studies of *Terminalia catappa* L. oil: characterization and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 6545–6549.
  24. Gallagher B.J. The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, 2011, 36, 158–162.
  25. Sitepu I.R., Garay L.A., Sestric R., et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 1336–1360.
  26. Fei Q., Chang H.N., Shang L., et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 2695–2701.
  27. Gomez J. A., Höffner K., and Barton P.I. From sugars to biodiesel using microalgae and yeast. *Green Chemistry*, Advance Article, doi: 10.1039/C5GC01843A
  28. Haas M.J., McAloon A.J., Yee W.C., and Fogli T.A. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource Technology*. 2006, 97, 671–678. doi:10.1016/j.biortech.2005.03.039
  29. S. From the first drop to the first truckload: commercialization of microbial processes for renewable chemicals – *Curr. Opinion Biotechnol.* 2013, 24, 1061–1068.
  30. Jakociūnas T., Bonde I., Herrgard M., Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2015, 28, 213–222.

## Biodiesel Fuel Performance Calculation on the basis of Fatty Acid Composition of Lipids of Some Biotechnologically Important Microorganisms

Ya.E. SERGEEVA<sup>1,\*</sup>, E.B. MOSTOVA<sup>2</sup>, K.V. GORIN<sup>1</sup>, A.V. KOMOVA<sup>1</sup>, I.A. KONOVA<sup>1</sup>, V.M. POJIDAEV<sup>1</sup>, P.M. GOTOVTSEV<sup>1</sup>, R.G. VASILOV<sup>1</sup>, and S.P. SINEOKY<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow 123182, Russia

<sup>2</sup>The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), Moscow, 117545 Russia

\*e-mail: yanaes2005@yandex.ru

Received July 06, 2016

Accepted July 25, 2016

**Abstract** – A short review of the interrelation between the structure of fatty acids and the characteristics of biofuel obtained on their basis is represented. The fatty acid composition of yeast and phototrophic microorganisms' lipids was analyzed. Based on this analysis, the main parameters of biodiesel (iodine value, cetane number, density, and kinematic viscosity) that can be obtained from those lipids were calculated and compared with the existing standards. It was shown that the lipids of the *Rhodospiridium toruloides* VKPM Y–3349 yeast are the most suitable source for the biodiesel obtaining judging by the fatty acid composition and content. The ways to reduce the cost of microbial lipids in order to make them competitive material along with plant oils for biofuel production are discussed.

**Key words:** biodiesel, cetane number, cyanobacteria, fatty acids, iodine value, microalgae, obtaining of biodiesel, phototrophic microorganisms, yeast.

**Acknowledgements** – The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF within the frames of the Grant Agreement 14.607.21.0034. The Applied Research Unique Identifier (Project) is RFMEFI60714X0034.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-1-53-61