

УДК 602.4.582.28:577.114

## ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА ОСНОВЕ ЛИПИДОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

© 2013 г. В. В. Лунин\*, Я. Э. Сергеева\*\*, Л. А. Галанина\*\*, И. С. Мысякина\*\*,  
А. А. Ивашечкин\*\*, В. И. Богдан\*\*\*, Е. П. Феофилова\*\*

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991

\*\* Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117312

\*\*\* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991

e-mail: feofilov@inmi.host.ru

Поступила в редакцию 14.02.2012 г.

Рассмотрены основные этапы биотехнологии получения биодизельного топлива на основе липидов мицелиальных грибов порядка Mucorales. Проведен скрининг грибов семейства Cunninghamella-seae, получены данные о липогенной активности изученных штаммов, и найден продуцент, образующий до 50% липидов, представленных в основном триацилглицеринами. Изучено влияние замены источника углерода и азота на более дешевые компоненты (в том числе отходы от ряда производств), их влияние на количество и основные характеристики конечного продукта. Использована экологически чистая методика извлечения липидов из мицелия грибов с помощью сверхкритических технологий. Обнаружена зависимость между содержанием липидов в посевном споровом материале и максимальным содержанием липидов в биомассе, что предлагается использовать для оптимизации биотехнологии и увеличения выхода конечного продукта.

DOI: 10.7868/S0555109913010121

Биодизельное топливо, или биодизель, представляет собой смесь моноалкиловых (метиловых или этиловых) эфиров жирных кислот, полученных при переэтерификации возобновляемых биологических ресурсов. По своим техническим характеристикам биодизельное топливо близко к параметрам дизельного топлива, получаемого из нефти. В последнее десятилетие получение возобновляемого топлива из биологических ресурсов стало одной из основных проблем биотехнологии в связи с резким истощением разведанных запасов нефти и газа [1]. В настоящее время, кроме получения биодизеля из масел сельскохозяйственных растений, появилась новая тенденция — получение возобновляемого топлива из биомассы микроорганизмов, среди которых наибольший интерес представляют мицелиальные грибы [2]. Биодизель на основе липидов грибов по сравнению с растительными маслами имеет ряд существенных преимуществ: высокая скорость роста продуцента, независимость выхода продукта от сезонных и климатических условий, отсутствие потребности в посевных площадях, возможность создания экологически чистых, безотходных и многоцелевых технологий.

В Институте микробиологии РАН проводятся исследования [2, 3] совместно с химическим факультетом МГУ им. М.В. Ломоносова [4, 5] и Институт органической химии им. Н.Д. Зелин-

ского РАН по созданию нового биодизельного топлива на основе липидов мицелиальных грибов. Найден суперпродуцент, образующий около 50% липидов (от сухой биомассы), представленных в основном триацилглицеринами; определены основные характеристики полученного биодизельного топлива, создана биотехнологическая схема получения липидов, включающая микробиологический процесс и химический — извлечение и переэтерификация липидов [3].

Полученные данные позволяют перейти ко второму этапу создания биотехнологии получения биодизельного топлива — удешевлению процесса получения липидов из биомассы мицелиальных грибов.

Цель работы — скрининг новых олеагенных штаммов, уменьшение стоимости среды для выращивания продуцента, сокращение времени ферментации и увеличение стабильности и экологичности процесса.

### МЕТОДИКА

Работу проводили с мицелиальными грибами: *Cunninghamella echinulata* (старое название *C. japonica*) ВКМ-F-470(–), ВКМ-F-471(+), ВКМ-F-775(+), ВКМ-F-776(–), ВКМ-F-1204(–) и гомоталличным штаммом *C. homotallica* ВКМ F-930.

**Таблица 1.** Отходы производств, которые использовали в качестве замены источника углерода в ферментационной среде

Отход	Состав отхода	Количество отхода в среде, %
Мезга 1	Картофельная мезга	3.2
Мезга 2	Картофельная мезга	3.2
	Глюкоза	0.5
Шелуха 1	Картофельная шелуха	3.2
Шелуха 2	Картофельная шелуха	3.2
	Глюкоза	0.5
Очистки 1	Картофельные очистки	3.2
Очистки 2	Картофельные очистки	3.2
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.12
Крахмал	Крахмал	3.2
Глицерин 1	Глицерин	2
Глицерин 2	Глицерин	4
Глицерин 3	Глицерин (добавляли до засева культуры)	2
	картофельной мезги	3.2
Глицерин 4	Глицерин (добавляли к 48 ч культуре)	2
	картофельной мезги	3.2
Белый лепесток	Белый лепесток	3
Кофейный шлам	Кофейный шлам	3
Свекольный жом	Свекольный жом	3
Лузга	Лузга подсолнечника	3
Гидролизат древесины	Арабиноза	0.033
	Глюкоза	2.284
	Ксилоза	0.910

Культуру поддерживали в пробирках на скошенном сусло-агаре (7°Б, 2.5%) при комнатной температуре в течение 4 сут, затем хранили при температуре 4–5°С. Пересевы культуры в ходе работы осуществляли не реже одного раза в месяц.

Биомассу получали при глубинном культивировании на качалке (220 об/мин), при 26–27°С в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды. Колбы засеивали водной суспензией 5-суточных спор, полученных смывом культуры с агаризованного сусли, которую вносили в питательную среду в количестве 2–2.5%.

Для выращивания гриба использовали среду Гудвина следующего состава (%): глюкоза – 5.0, аспарагин – 0.2, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7Н<sub>2</sub>О – 0.025%, дрожжевой экстракт – 0.1%.

В процессе оптимизации среды для удешевления аспарагин заменяли на следующие источники азота, взятые в эквивалентном по азоту количестве (42 мг%, т.е. в каждой среде содержание азота составляло 42 мг на 100 мл среды (%)): нитрат натрия – 0.26, нитрат аммония – 0.12, хлорид аммония – 0.16, мочевины – 0.09.

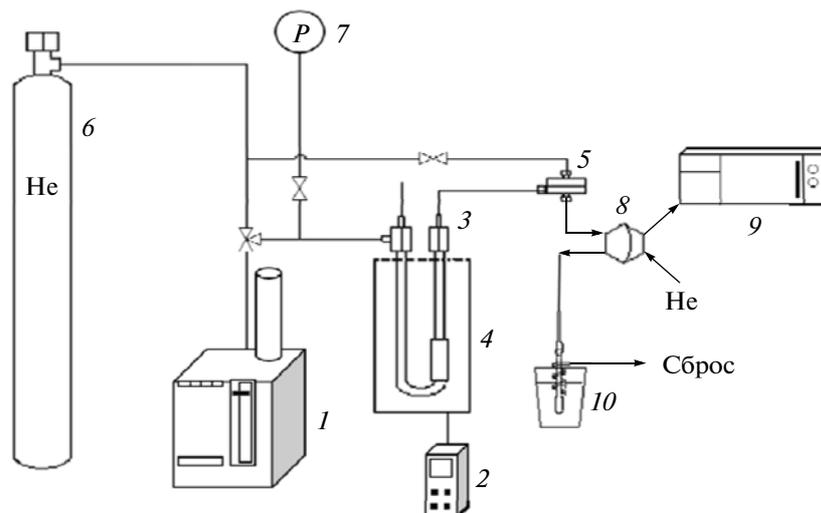
Также была испытана и мучная среда (%): кукурузная мука – 1.73, соевая мука – 4.00, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0.05%.

Источник углерода глюкозу заменяли на различные типы отходов других производств, в том числе и сельскохозяйственные (табл. 1). В этих опытах в качестве источника азота использовали нитрат аммония (0.12%) с добавлением дрожжевого экстракта (0.1%), КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (0.1%), MgSO<sub>4</sub> · 7Н<sub>2</sub>О (0.025%).

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча [6], а также сверхкритическим СО<sub>2</sub> на проточной установке (рис. 1). В реактор помещалась высушенная в термостате при 55°С биомасса и обрабатывалась сверхкритическим диоксидом углерода при 100°С и давлении СО<sub>2</sub> 32 МПа.

Качественный анализ общих липидов гриба проводили методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (“Merck”, Германия).

Качественный и количественный анализ состава жирных кислот общих липидов гриба проводили на газожидкостном хроматографе Хроматэкс-Кристалл 5000.1 (Россия). Капиллярная



**Рис. 1.** Принципиальная схема лабораторной установки проточного типа для проведения сверхкритических экспериментов: 1 – насос высокого давления, 2 – терморегулятор электропечи, 3 – реактор, 4 – электропечь, 5 – мембранный клапан, 6 – баллон, 7 – манометр, 8 – шестипортовый кран, 9 – хроматограф, 10 – приемник продуктов.

колонка: Optima-240 (0.25 мм – 60 м – 0.25 мкм, “Macherey-Nagel” Германия) неподвижная фаза: 33% суанопропил-метил-67% dimethylpolysiloxane. Газ-носитель – гелий, режим изотермический: температура колонки 180°C, испарителя 250°C.

Жирные кислоты идентифицировали по относительному времени удерживания на колонке компонентов смеси в сравнении со стандартами. Повторность опытов 3–4 раза, результаты обработки с использованием медианы (Me) [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Способность различных видов разнополюх штаммов *Cunninghamella* к синтезу липидов.** Мы исходили из предположения, что некоторые разнополюе штаммы муконовых грибов, например

*Blakeslea trispora*, способны при совместном культивировании (+) и (–) штаммов образовывать во много раз больше нейтральных липидов, чем при отдельном выращивании [8]. Результаты выращивания (–) и (+) штаммов *C. echinulata*, а также *C. homothallica*, и накопление ими липидов представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2, все исследованные штаммы грибов на 5 сут роста накапливали более 15 г/л биомассы. Содержание липидов в мицелии всех штаммов превышало 35%, но совместное культивирование не увеличило содержания липидов в мицелии продуцентов, что еще раз подтвердило существование физиологических различий между грибами семейств Cunninghamellaceae и Choanephoraceae [9]. Анализ состава жирных кислот липидов исследуемых штаммов (рис. 2) показал присутствие насыщенных и ненасыщенных

**Таблица 2.** Показатели биомассы и выхода липидов у гетероталлических штаммов *C. echinulata* и гомоталлического штамма *C. homothallica*

Организм	Биомасса, г/л	Липиды	
		%	г/л
<i>Cunninghamella echinulata</i> ВКМ F-626 (–)	16.44	41.92	6.89
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-657 (–)	14.15	47.73	6.75
<i>C. japonica</i> ВКМ F-1204 (–)	19.16	42.37	8.12
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-470 (–)	15.54	44.23	6.87
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-471 (+)	15.44	40.58	6.26
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-775 (–)	18.35	43.21	7.93
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-776 (+)	16.02	37.82	6.06
<i>C. homothallica</i> ВКМ F-930	20.49	44.08	9.03
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-775 (–) + F-776 (+)	18.20	39.50	6.81

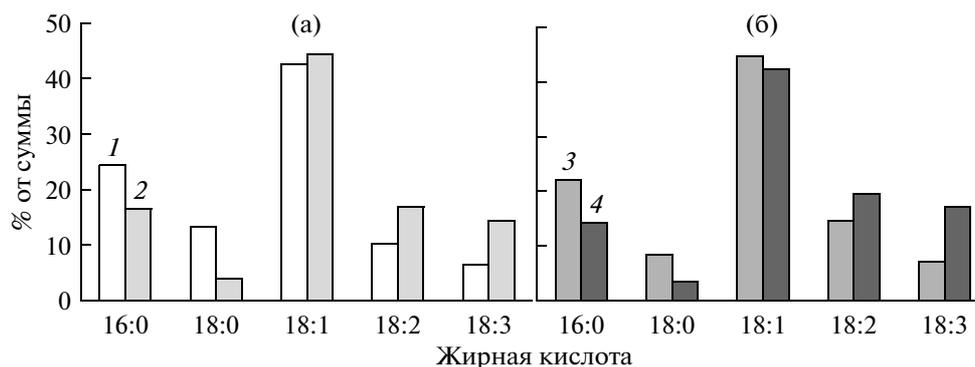


Рис. 2. Состав (% от суммы) жирных кислот в липидах гетероталлических штаммов *Cunninghamella echinulata*. а: 1 – ВКМ F-470 (–); 2 – ВКМ F-471 (+); б: 3 – ВКМ F-775 (–); 4 – ВКМ F-776 (+).

жирных кислот  $C_{14}$ – $C_{20}$  с преобладанием пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислот, суммарное содержание  $C_{20}$  жирных кислот составляло менее 2%. Интересным представляется тот факт, что все штаммы, независимо от их половой принадлежности, синтезировали линоленовую кислоту ( $C_{18:3}$ ). Более того, в отличие от других мукоровых грибов, например *Blakeslea trispora* [10], (+) штаммы *Cunninghamella* синтезировали больше  $C_{18:3}$ , чем (–) штаммы. Так, резкое увеличение (более чем в два раза) отмечено для линоленовой кислоты: у штамма 471 (+) по сравнению с 470 (–) – с 6.58 до 14.69%, а у штамма 775 (+) по сравнению с 776 (–) с 7.31 до 17.09%. Повышение содержания линолевой и линоленовой кислот на фоне снижения пальмитиновой и стеариновой кислот может указывать на большую активность десатураз у грибов сем. Cunninghamellaceae, ответственных за синтез  $C_{18:2}$  и  $C_{18:3}$  кислот соответственно.

Таким образом, исследованные разнополюе штаммы *Cunninghamella* характеризовались по сравнению с другими Mucogales (например, *B. trispora*) более высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот. Все штаммы *Cunninghamella* синтезировали линоленовую кислоту, при этом содержание данной кислоты в липидах (+) штаммов превышало соответствующий показатель (–) штаммов более чем в 2 раза. Таким образом, впервые показано, что существуют различия в метаболизме липидов у грибов порядка Mucogales. В отличие от других Choanephoraceae, у представителей рода *Cunninghamella* не только не увеличивался выход нейтральных липидов при копуляции разнополюх штаммов, но (+) и (–) штаммы имели практически идентичный состав жирных кислот. Все исследованные штаммы обладали способностью накапливать липиды, содержание которых в мицелии превышало 35–38%. По составу и содержанию жирных кислот рассмотренные липиды можно отнести к маслам олеинового типа [11].

Ранее [12] сообщалось о способе экстракции липидов из биомассы мукоровых грибов при давлениях 20–35 МПа и температурах 40–70°C. В настоящей работе нами впервые проведено извлечение липидов сверхкритическим диоксидом углерода с применением новых параметров экстракции из биомассы грибов штамма *Cunninghamella echinulata*. Из навески высушенного до постоянной массы мицелия в токе сверхкритического  $CO_2$  при температуре 100°C и давлении 32 МПа было извлечено 56 вес. % липидов. ГЖХ анализ состава жирных кислот подтвердил идентичность липидному составу, экстрагированному по методике Фолча [6].

**Основные характеристики биодизеля на основе липидов мицелиальных грибов.** В связи с тем, что в ряде стран для создания биодизеля используется рапс, липиды которого соответствуют требованиям, предъявляемым к биодизелю, мы сравнили основные характеристики нашего биодизеля с созданным на основе липидов рапса. Полученные результаты показали (табл. 3), что значение цетанового числа (ЦЧ) биодизеля, полученного из липидов гриба, составила 55.68, а биодизеля, полученного на основе рапсового масла, 51.74 МДж/кг. В требованиях европейских стандартов установлена минимальная граница данного показателя – 51 ед. ЦЧ – основной показатель воспламеняемости дизельного топлива. Это число характеризует способность топлива к воспламенению. Оно влияет также на запуск двигателя, жесткость работы, расход топлива и дымность отработанных газов. Чем выше ЦЧ тем более спокойное и плавное горение дизельного топлива, которое обеспечивает высокие мощностные и экономические показатели работы двигателя [15].

На основании полученных данных были определены другие характеристики биодизельного топлива, полученного на основе липидов мукорового гриба *C. echinulata*. В качестве сравнения использовали масло рапса *Brassica napus*. На основании данных о количественном и качественном

**Таблица 3.** Характеристика биодизельного топлива

Источник	Йодное число	Цетановое число	Теплота сгорания, МДж/кг	Источник
Дизельное топливо	–	47	45.3	[9]
Биодизель (EN 14214)	≤120	≥51	≥5	[10]
Рапс <i>Brassica napus</i>	94–120	54.4	40.4	[9]
<i>Cunninghamella japonica</i> F-1204	114.9	51.74	37.31	собственные данные
	90.81	55.68	37.27	собственные данные

составе жирных кислот были рассчитаны такие показатели, как степень ненасыщенности липидов и йодное число. Степень ненасыщенности липидов мукорового гриба составила 1.06, липидов рапса – 1.34, величина йодного числа 90.81 и 114.91 соответственно. Согласно данным литературы [16], величина йодного числа для рапса находится в пределах от 94 до 120. В России нет принятых стандартов для биодизеля, поэтому сравнение проводили на основе европейских стандартов (EN 14214 и EN 14213), согласно которым йодное число не должно превышать 120 и 130 ед. соответственно. Содержание линоленовой кислоты в биодизеле не должно превышать 12%, а также суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот с 4 и более двойными связями не должно превышать 1% от суммы жирных кислот.

Теплота сгорания является одной из важнейших характеристик топлива, при оценке его энергетических возможностей и экономической эффективности. Полученные результаты показали, что низшая теплота сгорания биодизеля, полученного из липидов гриба, составила 37.27 МДж/кг, а биодизеля, полученного на основе рапсового масла, 37.31 МДж/кг. Следует отметить, что низшая теплота сгорания биодизеля на основе липидов гриба, была определена экспериментально (в РГГУ нефти и газа им. И.М. Губкина) и составила 37.13 МДж/кг, т.е. расхождение теоретически рассчитанной и экспериментально полученной величины составило менее 1%. В требованиях европейских стандартов установлена минимальная граница данного показателя – 35 МДж/кг.

Таким образом, основываясь на результатах и данных литературы (табл. 3), можно сказать, что биодизель на основе липидов мукорового гриба *C. echinulata* по ряду основных показателей соответствует требованиям европейских стандартов для биодизеля и аналогичен наиболее широко используемому в странах ЕС биодизелю на основе рапсового масла.

**Оптимизация состава среды.** При удешевлении стоимости среды ферментации в биотехнологии

используют “оптимальный показатель (ОП) выхода конечного продукта”, который получают без учета стоимости процесса. Ферментация грибов при получении биодизеля проводили на среде Гудвина, высокая стоимость которой определяется наличием аспарагина (источник азота) и глюкозы (источник углерода), поэтому основные усилия по оптимизации среды были направлены на снижение стоимости источника азота и углерода.

Нами показано, что в качестве источника азота вместо аспарагина может быть использован нитрат аммония, при этом ОП липидов не понижается и не меняется их жирнокислотный состав. Результаты влияния различных источников азота на показатели роста и выход липидов на примере *C. japonica* F-1204 представлены в табл. 4.

Таким образом, замена аспарагина на нитрат аммония вызывала интенсификацию ростовых процессов у всех исследованных штаммов, накопление биомассы превышало контроль более чем в два раза; использование минерального источника азота практически не влияло на липогенную активность культур, выход липидов у всех штаммов увеличивался более чем в 1.5 раза за счет увеличения количества биомассы.

Для замены источника углерода в среде выращивания продуцента в целях ее удешевления ис-

**Таблица 4.** Показатели биомассы и выхода липидов при культивировании *C. japonica* F-1204 на средах с использованием различных источников азота

Источник азота	Биомасса, г/л	Липиды	
		%	г/л
Аспарагин	10.50	50.68	5.32
Нитрат натрия	17.42	27.71	4.83
Нитрат аммония	16.01	46.59	7.46
Хлорид аммония	5.16	31.20	1.61
Мочевина	12.92	25.96	3.35
Кукурузно-соевая мука	18.49	11.96	2.21

**Таблица 5.** Состав и содержание (% от суммы) жирных кислот в липидах, синтезируемых при культивировании *S. japonica* на средах с использованием картофельной мезги

Жирная кислота	Контроль	Мезга 1	Мезга 2
16 : 0	19.68	25.51	26.24
18 : 0	7.48	7.78	7.20
18 : 1	46.4	37.42	34.32
18 : 2	18.82	20.33	23.24
18 : 3	6.30	6.87	6.94
прочие	1.62	2.09	2.06

**Таблица 6.** Показатели роста и содержания липидов при культивировании *S. japonica* F-1204 на средах с использованием различных видов отходов

Отход	Биомасса, г/л	Липиды, %
Контроль	16.35	39.27
Белый лепесток	11.49	11.77
Кофейный шлам	18.54	24.57
Свекольный жом	12.07	9.22
Лузга	13.69	13.98

пользовали среды, указанные в табл. 1. Во всех вариантах опыта замена источника углерода глюкозы на картофельную мезгу не оказала какого-либо влияния на активность ростовых процессов, при этом величина накопленной биомассы была на уровне контроля. Что касается липогенной активности культуры, содержание липидов во всех рассмотренных вариантах сред с использованием мезги, было ниже, чем в контроле (табл. 5), при этом состав жирных кислот остался практически без изменения.

Были рассмотрены и другие виды отходов: белый лепесток, кофейный шлам, свекольный жом, лузга подсолнуха (отходы получены от Градовой Н.Б., за что выражаем ей глубокую благодарность). Как видно из табл. 6, муковровый гриб способен утилизировать все испытанные виды отходов, величина накопленной биомассы составила более 10 г/л. Что касается содержания липидов в клетках гриба, то наибольшее их содержание, составившее около 60% от контроля, было отмечено на среде с кофейным шламом.

Наилучший результат был получен при использовании отходов от маслодельных заводов (сточные воды производства оливкового масла) при значении редуцирующих веществ (РВ) 2.5%. В состав РВ входили в основном глюкоза, сахароза, ксилоза и арабиноза. В данном случае выход липидов составил около 40%.

*Использование гидролизатов древесины.* Сотрудниками лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха (зав. лаб. проф. Синецын А.П.) был любезно предоставлен образец гидролизата древесины хвойных пород для изучения возможности замены глюкозы на данный тип гидролизата. Следует отметить, что ранее нами [17] при работе с *S. japonica* было показано, что для роста гриба можно использовать смеси различных моносахаридов (как пентоз, так и гексоз), при этом отдельные компоненты смеси утилизировались организмом в определенной последовательности и степень потребления того или иного компонента зависела от состава исходной смеси. Полученные результаты показали, что лучшим моносахаридом является глюкоза, но полнота ее использования определяется ее содержанием в среде.

Предоставленный для исследований гидролизат древесины был получен из хвойных пород деревьев (отходы лесоперерабатывающей промышленности) под действием ферментов карбогидраз (целлюлаз и сопутствующих ферментов), синтезированных промышленными штаммами *Trichoderma* sp. и *Penicillium* sp. — суперпродуцентами карбогидраз, выделенных в Институте биохимии им. А.Н. Баха [18]. Суммарное содержание сахаров в гидролизате составило 3.2%, при этом преобладающим компонентом была глюкоза, в меньших количествах присутствовали ксилоза и арабиноза.

Полученные результаты указывают на то, что среда с гидролизатом древесины пригодна для роста гриба, при этом величина накопленной биомассы и содержания в ней липидов несколько меньше соответствующих величин контроля, что может быть объяснено меньшим начальным содержанием сахаров в среде. Был рассчитан экономический показатель как для синтетической среды с глюкозой, так и для опытной среды с гидролизатом древесины. Для синтетической среды величина данного показателя составила 3.2 и 3.6 для штамма F-470 и F-930 соответственно и на среде с гидролизатом древесины — 3.3 и 3.4 соответственно. Таким образом, с учетом экономического показателя среда с гидролизатом древесины может рассматриваться в качестве перспективной замены среды с глюкозой.

В биотехнологии известен еще один путь удешевления стоимости конечного продукта — *использование побочных продуктов производства*. С этой целью исследовали возможность применения глицерина — побочного продукта при получении биодизеля в качестве источника углерода вместо глюкозы. Было рассмотрено несколько вариантов сред: **глицерин 1** — 2% глицерина; **глицерин 2** — 4% глицерина; **глицерин 3** — глицерин с дополнительным внесением мезги; **глицерин 4** —

среда с картофельной мезгой с дополнительным внесением к 48-часовой культуре. Как видно из приведенной таблицы (табл. 7), гриб обладал способностью к росту на среде с глицерином, и совместное применение глицерина и картофельной мезги дает лучшие результаты, чем глицерин. Повысить выход липидов можно также за счет увеличения начального содержания глицерина в среде. Кроме того, внесение вместе с посевным материалом 0.2% глюкозы увеличивает потребление глицерина и повышает выход липидов до 19–20%.

**Оптимизация получения спорового посевного материала.** Третья задача получения биодизеля включала изучение посевного материала с целью повышения его всхожести, стабильности хранения и увеличения выхода конечного продукта.

*Влияние возраста посевных спор на содержание липидов в опытном мицелии.* Установлено, что использование 5 сут спор обеспечивало наиболее высокий выход липидов в мицелии гриба (рис. 3). С увеличением возраста посевных спор количество липидов в мицелии уменьшалось, причем особенно заметно при использовании спор 20–30-суточных. Установлена обратная зависимость между количеством липидов в спорах и их возрастом. Максимальное содержание липидов отмечено в 7-суточных спорах – 6.4%, при увеличении возраста посевных спор содержание липидов в них уменьшалось, например, в 14 сут спорах содержалось почти в два раза меньше липидов – 3.3%.

При исследовании влияния возраста посевного материала на выход конечного продукта – липидов установлено, что максимальное содержание липидов в мицелии гриба отмечалось на 4 сут культивирования и наибольшее их содержание наблюдается при посеве 5–7 сут спорами, т.е. спорами, наиболее богатыми липидами. Таким образом, впервые обнаружена прямая взаимосвязь между количественным содержанием липидов в спорах и выросшего из них мицелия.

**Улучшение экологии производственного процесса.** Улучшение достигнуто удалением растворителей при извлечении липидов из биомассы грибов и использование вместо них на этой стадии процесса сверхкритической CO<sub>2</sub>.

Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать среду для выращивания продуцента, введя в нее дешевый источник азота – аммонийный азот, и тем самым, одновременно увеличить выход липидов. Наиболее дешевым источником углерода могут служить отходы от картофельных производств или отход от производства биодизеля – глицерин, которые могут заменить почти половину глюкозы в ферментационной среде без снижения выхода конечного продукта. Изучение состава липидов посевного материала позволило установить новую закономерность – прямую зависимость между содержа-

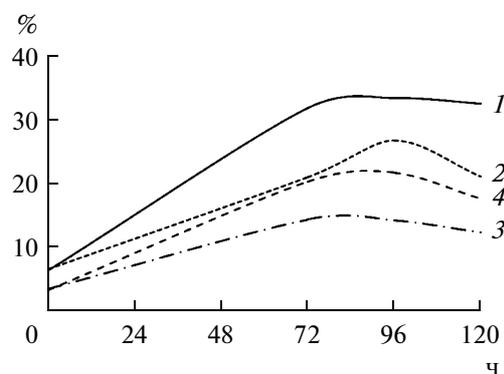
**Таблица 7.** Накопление биомассы и липидов при культивировании *C. japonica* F-1204 на различных средах с глицерином

Отход	Биомасса, г/л	Липиды, %
Глицерин 1	6.84	10.15
Глицерин 2	5.60	8.82
Глицерин 3	19.55	11.32
Глицерин 4	17.43	14.35

нием липидов в посевных спорах и в выращенном из них мицелием, которая может найти применение в других грибных производствах. Установлена возможность, эффективность и экологичность извлечения образованных липидов из мицелия грибов *C. japonica* с помощью сверхкритических технологий.

Для таксономии Mucorales важны данные, свидетельствующие о ряде отличий грибов рода *Cunninghamella* и других мукоровых грибов в отношении липидообразования гетероталлических штаммов, в частности способность (+) и (–) штаммов *C. japonica* синтезировать в одинаковых количествах линоленовую кислоту. Для других Mucorales, например *B. trispora*, эта кислота рассматривается в настоящее время как надежный критерий при определении половой принадлежности гетероталлических штаммов [19], так как отличительной особенностью (–) штаммов *B. trispora* является неспособность синтезировать  $\gamma$ -линоленовую кислоту.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (контракт № 11-1135/26 от 08 августа 2011 г.) и компании ООО “ЭНВАЙРОКЕТ”.



**Рис. 3.** Изменение содержания липидов (%) в биомассе *C. japonica* F-1204 в зависимости от возраста посевного материала (сут):

1 – 7; 2 – 14; 3 – 21; 4 – 28.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wei Du, Wei Li, Tang Sun, Xin Chen, Dehna Lin* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 79. № 2. P. 331–337.
2. *Феофилова Е.П., Сергеева Я.Э., Иващечкин А.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 45. № 4. С. 405–415.
3. *Сергеева Я.Э., Андриянова Д.А., Феофилова Е.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 5. С. 1–6.
4. *Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Лунин В.В., Феофилова Е.П.* // *Катализ в промышленности.* 2009. № 5. С. 84–88.
5. *Сергеева Я.Э., Иващечкин А.А., Алехин А.И., Андриянова Д.А., Гальченко В.Ф., Мысякина И.С., Галанина Л.А., Феофилова Е.П., Лунин В.В.* Способ получения липидов. Заявка на патент РФ номер 2011104913.
6. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H.* // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
7. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медицина. 1972. 180 с.
8. *Феофилова Е.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 5. С. 501–519.
9. *Андриянова Д.А., Сергеева Я.Э., Кочкина Г.А., Галанина Л.А., Усов А.И., Феофилова Е.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2011. Т. 48. № 4. С. 448–451.
10. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.* // *Микробиология.* 2005. Т. 74. № 6. С. 750–755.
11. *Тютюнников Б.Н.* Химия жиров. М.: Пищпром, 1966. 632 с.
12. *Certik M., Horenitzky R.* // *Biotechnol. Techniq.* 1999. V. 13. № 11. P. 11–15.
13. *Gunstone F.D.* // *The Lipid Handbook 3<sup>rd</sup> ed / Eds. F.D. Gunstone, J.L. Harwood, A.J. Dijkstra.* Boca Raton–London–New York: CRC Press, 2007. 656 p.
14. *The Biodiesel Handbook / Eds. G. Knothe, J.V. Gerpen, J. Krahl.* Illinois: AOCS Press, 2005. P. 278–285.
15. *Refaat A.A.* // *Inter. J. Environ. Sci. and Technol.* 2009. V. 6. № 4. P. 677–694.
16. *Gunstone F.D., Harwood J.L., Radley F.B.* *The Lipid Handbook, 2 ed.* L.: Chapman and Hall, 1994. 1273 p.
17. *Галанина Л.А., Бехтерева М.Н., Павлова Т.А., Цветкова Е.В.* // *Микробиология.* 1988. Т. 57. № 2. С. 213–217.
18. *Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Рубцова Е.А., Правильников А.Г., Зоров И.Н., Синицына О.А., Овешников И.Н., Давидов Е.Р., Синицын А.П.* // *Катализ в промышленности.* 2010. № 5. С. 63–70.
19. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Хохлова Н.М.* // *Микробиология.* 2000. Т. 69. № 5. С. 606–612.

## Biodiesel Fuel Production from Lipids of Filamentous Fungi

V. V. Lunin<sup>a</sup>, Ya. E. Sergeeva<sup>b</sup>, L. A. Galanina<sup>b</sup>, I. S. Mysyakina<sup>b</sup>, A. A. Ivashchkin<sup>b</sup>,  
V. I. Bogdan<sup>c</sup>, and E. P. Feofilova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>b</sup> *Vinogradsk Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

<sup>c</sup> *Zelinsk Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: feofilov@inmi.host.ru*

Received February 14, 2012

**Abstract**—The main stages in the production of biodiesel fuel from lipids of filamentous fungi belonging to the order Mucorales are described. Fungi of the family Cunninghamhamellaceae have been screened; the lipogenic activity of the examined strains has been assessed; and a producer generating up to 50% of lipids, represented by triacylglycerols, has been found. The substitution effect of a source of carbon and nitrogen with less expensive components (in particular, various industrial wastes) has been studied, as well as their influence on the quantity and major characteristics of the final product. An ecologically friendly method for extracting lipids from fungal mycelia, utilizing supercritical technologies, has been used. A correlation between the lipid content in the spore inoculum and the maximal lipid content in biomass has been discovered; this correlation is proposed for optimizing the biotechnology and increasing the yield of final products.