

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 582.263; 662.75

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА ИЗ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

© 2023 г. А. А. Шестакова¹, В. М. Пожидаев², К. В. Горин^{2,*}

¹Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*E-mail: Gorin_KV@nrcki.ru

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 10.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Рост мирового энергопотребления в последние десятилетия и ограниченная доступность природного ископаемого сырья привели к спросу на использование возобновляемых источников энергии, в том числе биомассы микроводорослей. Биомасса микроводорослей представляет большой интерес как один из ценных источников возобновляемого сырья для получения различных коммерчески значимых продуктов, используемых в химической, нефтехимической и пищевой промышленности. Рассмотрена возможность культивирования фототрофного микроорганизма *Scenedesmus obliquus* в условиях естественного освещения. Исследован жирнокислотный профиль биомассы с целью получения биодизельного топлива.

DOI: 10.56304/S2782375X23010126

ВВЕДЕНИЕ

Scenedesmus — один из наиболее распространенных родов пресноводных микроводорослей [1]. Изображение микроводоросли *Scenedesmus obliquus* штамм ССАР 276/3А, полученное с помощью световой микроскопии в проходящем свете, представлено на рис. 1. У рода *Scenedesmus* ценобии имеют вид плоских, прямых или изогнутых пластинок из 4–8 (реже 2–32) продолговатых или округлых клеток, соединенных по бокам в простые или двойные ряды [2].

Оболочки гладкие или с ребрами, или шипами, часто на концах клеток с длинными шипами-рогами. Хлоропласт пластинчатый, с боковым пиреноидом и центральным ядром. Размножается автоспорами, которые внутри материнской клетки слагаются в дочерний ценобий [2].

Известно, что *Scenedesmus* обладает высокой продуктивностью биомассы среди зеленых микроводорослей и активно исследуется на предмет его использования для производства биодизеля. В [3, 4] показано, что его гетеротрофное производство биомассы и липидов в оптимальных условиях имеет более высокую эффективность, чем его автотрофное производство.

Сегодня наиболее распространенным способом получения биодизельного топлива является процесс переэтерификации липидов микроводо-

рослей, в котором один моль триацилглицеридов реагирует в присутствии катализатора с тремя молями спирта (чаще метанола) с образованием одного моля глицерина и трех молей метиловых эфиров. В качестве катализатора часто используют концентрированную серную кислоту.

Основные свойства биодизеля определяются составом и содержанием метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Одним из ключевых факторов, влияющих на качество биодизеля, является степень ненасыщенности жирных кислот (ЖК), входящих в его состав. Уменьшение степени ненасыщенности приводит к повышению эффективности воспламеняемости получаемого из опытной биомассы топлива.

Хотя *Scenedesmus* может производить многие виды биотоплива, такие как биоводород, биодизель, биоэтанол и альтернативные виды топлива, наиболее обширные исследования были проведены по использованию *Scenedesmus* для производства биодизельного топлива. Как и все системы, внедрение интегрированного производства биотоплива, полученного из биомассы *Scenedesmus* на основе лабораторных исследований, имеет проблемы при крупномасштабном производстве. Основные проблемы включают в себя поставку и переработку питательных веществ, перенос и обмен газа, доставку PAR (фотосинтетически активного излучения), культурную целостность,

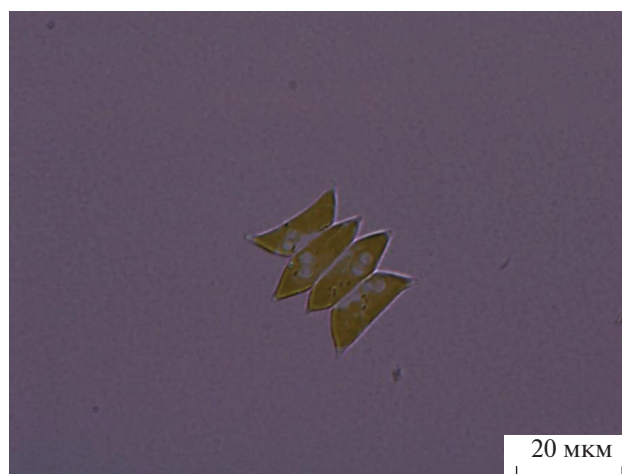


Рис. 1. Фотография микроводоросли *S. obliquus* штамм CCAP 276/3A, полученное в проходящем свете (увеличение объектива $\times 100$).

экологический контроль, сбор биомассы, а также генетическую и метаболическую инженерию [5].

В данной работе рассмотрена возможность культивирования фототрофного микроорганизма *Scenedesmus obliquus* CCAP 276/3A при естественном освещении, а также исследован жирно-кислотный профиль выращенной биомассы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования выбран штамм культуры *Scenedesmus obliquus* CCAP 276/3A, полученный из коллекции водорослей и простейших (CCAP, Великобритания).

Получение посевного материала. Посевной материал микроводоросли *Scenedesmus obliquus* культивировали на среде Bold's Basal Media (BBM) [6]. Состав питательной среды BBM представлен в табл. 1. В питательную среду добавляли 1 мл исходного раствора микроэлементов [7], его состав представлен в табл. 2. Питательную среду готовили на дистиллированной воде, pH питательной среды доводили до 7 с помощью pH-метра путем добавления в среду раствора гидроксида

Таблица 1. Состав среды BBM

Компонент	Концентрация, г/л
NaNO ₃	0.75
KH ₂ PO ₄	0.175
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.075
NaCl	0.025
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.025

натрия или соляной кислоты. Среду перед использованием автоклавировали 30 мин при температуре 121°C и давлении 1 атм.

Культивирование проводили в конической колбе с рабочим объемом 250 мл при постоянном барботировании атмосферным воздухом. Температуру при культивировании поддерживали на уровне $24 \pm 2^\circ\text{C}$ путем кондиционирования воздуха в помещении. Культура росла в условиях постоянной интенсивности освещения 3000 Люкс в течение 11 дней.

Метод анализа на состав и содержание жирных кислот. Анализ на состав и содержание ЖК в биомассе выполняли согласно [8]. Для анализа отбирали навеску (5.0 ± 0.5 мг) лиофилизированно высушенной биомассы *Scenedesmus obliquus* в стеклянные виалы с рабочим объемом 4 мл. Биомассу тщательно измельчали шпателем.

Таблица 2. Раствор микроэлементов по Пфеннигу

Компонент	Концентрация, г/л
ЭДТА	5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
MnCl ₂	0.03
H ₃ BO ₃	0.3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2
CuCl ₂	0.01
NiCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.02

Таблица 3. Состав метилирующей смеси

Компонент	Объем, мл
CH ₃ OH	20
H ₂ SO ₄ к	0.2

После измельчения навески добавляли 2 мл метилирующей смеси 2%-ной H₂SO₄ в метаноле (табл. 3) и вносили хроматографическим шприцом 0.02 мл внутреннего стандарта. Хроматографический шприц предварительно промывали хлороформом. В качестве внутреннего стандарта использовали лауриновую кислоту (C12:0).

Реакцию проводили на водяной бане при температуре 78°C в течение двух часов. Полученные МЭЖК экстрагировали гексаном. Для этого реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и переливали в эппендорфы с рабочим объемом 5 мл. Виалы омывали 1 мл гексана, затем гексан с остатками МЭЖК приливали к реакционной смеси. Объем смеси в эппендорфах довели до 4 мл дистиллированной водой.

Разделение фаз проводили центрифугированием (7500 об./мин, 5 мин), после чего гексанный (верхний) слой, содержащий МЭЖК, отбирали в виалы с рабочим объемом 2 мл для дальнейшего анализа.

Анализ МЭЖК проводили методом газовой хроматографии (ГХ) на газовом хроматографе Bruker 430 GC (Varian Inc., США), снабженном пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой Select TM Biodiesel (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм). Количество вводимой пробы составляло 1 мкл [9].

Жирные кислоты идентифицировали по относительному времени удерживания на колонке компонентов смеси в сравнении со стандартом, относительное количественное содержание индивидуальных ЖК определяли методом нормализации площадей. Коэффициент ненасыщенности липидов микроводорослей (K_{ненас}) определяли по данным ГХ по формуле

$$K_{\text{ненас}} = \sum_{\text{ненасыщ}} / \sum_{\text{насыщ}}$$

где $\sum_{\text{ненасыщ}}$ – суммарное содержание ненасыщенных ЖК, %; $\sum_{\text{насыщ}}$ – суммарное содержание насыщенных ЖК, %.

Условия проведения экспериментов по культивированию. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера с рабочим объемом 250 мл и объемом среды 150 мл в течение 10 сут с непрерывным барботированием. Посев проводили так, чтобы начальная оптическая плотность культуры во всех колбах была равна 0.1 при длине волны 750 нм. В качестве контроля использовали культивирование в люминостае с использованием люминесцентных дневного света, опытные образцы культивировали при естественном освещении, исходящем от оконных проемов. Значения освещенности и фотосинтетически активной радиации приведены в табл. 4.

Рост биомассы контролировали путем измерения оптической плотности суспензии микроводоросли при длине волны 750 нм с помощью спектрофотометра (Thermo Scientific Varioscan LUX), измерения проводили 1 раз в сутки, в трех повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выращивание культуры *S. obliquus* осуществляли при условиях, описанных выше, в течение 10 дней. Кривые роста культуры представлены на рис. 2. На основе полученных данных можно сделать вывод, что в контрольном и опытных образцах динамика роста культуры схожа.

Значения конечной оптической плотности у образцов, которые культивировали в люминостае, были выше на 20.5%.

Значения pH в течение всего культивирования представлены на рис. 3. Происходило постепенное защелачивание культуральной среды в результате жизнедеятельности микроводоросли. У всех образцов конечное значение pH было выше 10.

Для анализа состава ЖК, входящих в состав липидов исследуемой микроводоросли, использовали ГХ. Анализ проводили в конце культивирования после сбора биомассы и лиофильной сушки для выявления существенных отличий в содержании отдельных ЖК по сравнению с контролем. Полученные данные представлены на рис. 4. У опытного образца наблюдалось увели-

Таблица 4. Условия культивирования опытных и контрольных образцов

Образец	Место культивирования	Значение освещенности, Люкс	ФАР*, мкмоль/(м ² · с)
1	Люминостае	1500	8
2	Естественное освещение	745–2400	2–20

*ФАР – фотосинтетически активная радиация.

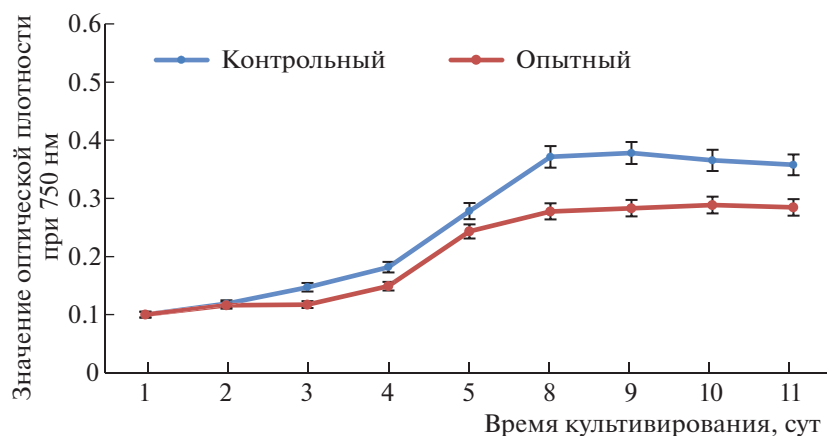


Рис. 2. Кривые роста культуры *S. obliquus*.

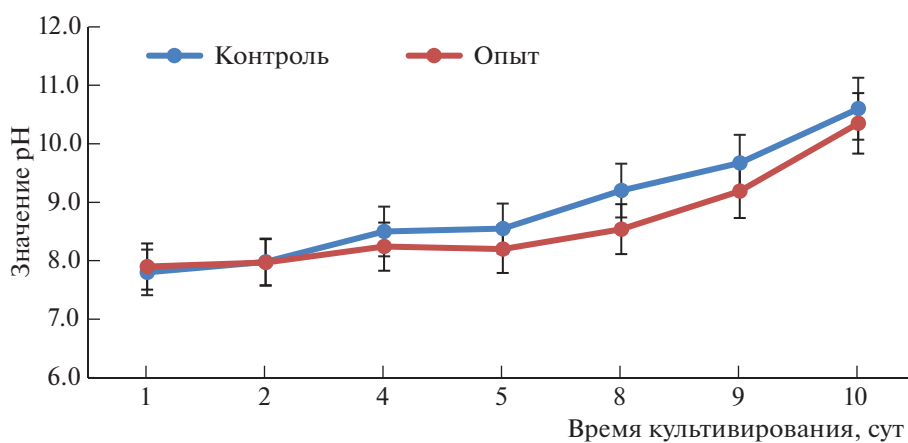


Рис. 3. Значения pH образцов в течение культивирования.

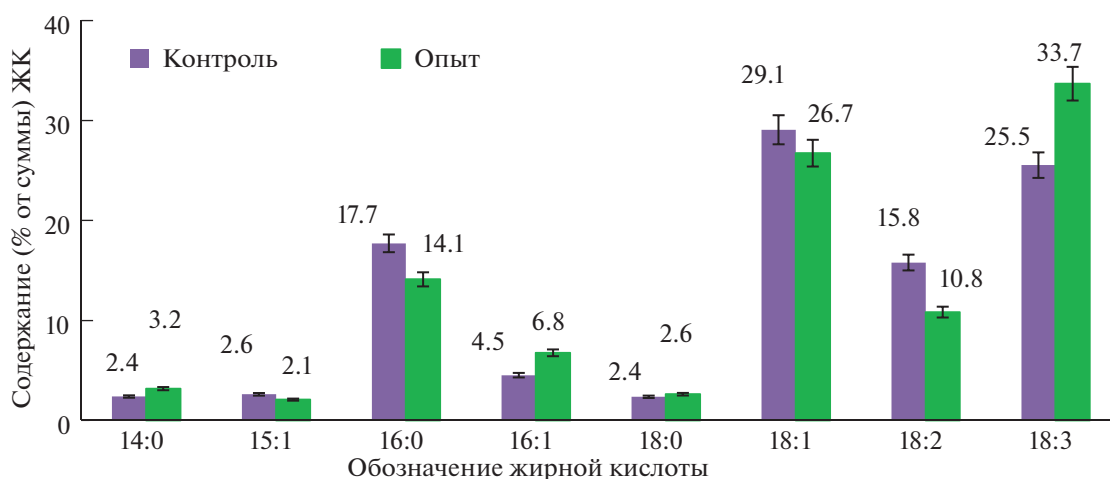


Рис. 4. Содержание индивидуальных жирных кислот в биомассе: 14:0 – миристиновая кислота, 15:1 – пентадеценая кислота, 16:0 – пальмитиновая кислота, 16:1 – пальмитолеиновая кислота, 18:0 – стеариновая кислота, 18:1 – олеиновая кислота, 18:2 – линолевая кислота, 18:3 – линоленовая кислота.

Таблица 5. Состав отдельных групп жирных кислот биомассы *S. obliquus*

Код жирной кислоты	Образец	
	Контроль	Опыт
ΣНасыщенных ЖК	22.5	19.9
ΣНенасыщенных ЖК	77.5	80.1
ΣМононенасыщенные жирные кислоты	36.2	35.6
ΣПолиненасыщенные жирные кислоты	41.3	44.5
K _{ненас}	3.5	4.0
Степень ненасыщенности*	1.4	1.6

*[1(% моноеновые кислоты) + 2(% диеновые кислоты) + 3(% триеновые кислоты)]/100.

ченное содержание полиненасыщенной линоленовой ЖК по сравнению с контрольным – 33.7 и 25.5% соответственно.

При рассмотрении отдельных групп ЖК отмечено, что в обоих образцах преобладают ненасыщенные ЖК (табл. 5). Сумма ненасыщенных ЖК в опытном образце была выше, чем в контрольном, и составляла 80.1%. Данная тенденция приводит к увеличению степени ненасыщенности и снижению цетанового числа биодизеля, что негативно сказывается на его качестве. Величина коэффициента ненасыщенности (который представляет собой отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных ЖК) у опытного и контрольного образцов составляла 4 и 3.5 соответственно.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что содержание как отдельных кислот, так и по сумме насыщенных и ненасыщенных контрольный и опытный образцы различались незначительно. То же утверждение закономерно для коэффициента и степени ненасыщенности. Для опытного образца, выращенного при естественном освещении, наблюдается пониженное содержание насыщенных ЖК на 11.5% и повышенное на 3.2% ненасыщенных кислот по сравнению с контролем.

В [6] была проведена количественная оценка отдельных групп ЖК, выделенных из биомассы микроводоросли *Scenedesmus obliquus* штамм ССАР 276/3А: сумма насыщенных ЖК составляет 37.8%, моно- и полиненасыщенных ЖК – 20.1 и 34.5% соответственно, коэффициент ненасыщенности составлял 1.44. Отметим, что по сравнению с этими данными в рассматриваемом случае биомасса как для контроля, так и для опытного образца имела порядка 15% меньше насыщенных ЖК и порядка 44 и 16% больше моно- и полиненасыщенных ЖК соответственно. Хотя культура и питательная среда были одинаковыми как в данном случае, так и в [6], наблюдается явный сдвиг по содержанию насыщенных и ненасыщенных ЖК, что, ве-

роятно, связано с условиями культивирования. Поэтому можно предположить, что соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК в меньшей степени зависит от светового режима и в большей от температуры культивирования.

В действующих стандартах к биодизелю присутствуют ограничения по профилю ЖК, входящих в его состав. Содержание метилового эфира линоленовой кислоты не должно превышать 12%, так как данный компонент снижает способность топлива противостоять окислению. Из этого следует, что биодизель, полученный на основе липидов биомассы *Scenedesmus obliquus* штамм ССАР 276/3А, более восприимчив к окислению, чем это допускается стандартами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность культивирования фототрофного микроорганизма *Scenedesmus obliquus* в условиях естественного освещения. В опытном и контрольном образцах динамика роста культуры схожа. Значения конечной оптической плотности образцов, которые культивировались в люминостате, были выше на 20.5% ввиду более благоприятных условий культивирования. По результатам анализа экспериментальных данных и сравнению их с литературными можно сделать вывод о том, что соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК в меньшей степени зависит светового режима и в большей от температуры культивирования.

Дальнейшая работа будет направлена на варьирование параметров культивирования *Scenedesmus obliquus* для получения наиболее качественных показателей биодизельного топлива.

Работа выполнена в рамках тематического плана “Разработка платформенных технологий на основе фототрофных микроорганизмов для интенсивной утилизации CO₂ и производства биотоплив и других полезных продуктов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lurling M., Van Donk E.* // *Oikos*. 2000. V. 88. P. 111.
2. *Мелькумов Г.М.* // *Альгология: учебное пособие*. 2015. С. 43.
3. *Mandal S., Mallick N.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 84. № 2. P. 281.
4. *El-Sheekh M., Abomohra A.E.F., Hanelt D.* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 29. № 5. P. 915.
5. *Christenson L., Sims R.* // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. № 6. P. 686.
6. *Trivedi J., Atray N., Agrawal D., Ray A.* // *Fuel*. 2022. V. 316. P. 123.
7. *Gorin K., Pojidaev V., Borgolov A., Sergeeva Y.* // *IOP Conf. Ser.: Earth and Environmental Science*. 2019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/337/1/012006>
8. *Liu J., Liu Y., Wang H., Xue S.* // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 176. P. 284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.094>
9. *Сергеева Я.Э., Мостова Е.Б., Горин К.В. и др.* // *Биотехнология*. 2017. Т. 33. № 1. С. 53.