

А.Ф. Ткаченко, Е.А. Тигунова, С.М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины,
ул. Осиповского, 2а, Киев-123, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 434 45 77,
e-mail: Shulga5@i.ua

МИКРОБНЫЕ ЛИПИДЫ – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СЫРЬЯ ДЛЯ БИОТОПЛИВА

В обзоре представлены основные направления отечественных и зарубежных исследований, экспериментальные данные поиска активных продуцентов липидов среди различных видов дрожжей и пути оптимизации процесса липидообразования у наиболее перспективных штаммов. Показано, что поддерживая необходимые условия культивирования, можно управлять ходом enzymатических процессов. Рассмотрено влияние на рост, развитие и биохимическую активность микроорганизмов состава среды, температуры, аэрации и окислительно-восстановительных условий. Изменение этих факторов влияет на биосинтетическую деятельность микроорганизмов, липогенную активность дрожжей и на состав синтезируемых ими липидов. Показано, что способность дрожжей к липидообразованию и сравнительно быстрая возможность изменения количества и состава липидов путем направленного культивирования, позволяет сделать вывод о том, что полученные микробиологическим синтезом липиды, могут служить источником сырья для получения биотоплива в промышленных масштабах.

Ключевые слова: дрожжи, *Rhodotorula gracilis*, *Pichia anomala*, микробные липиды, биотопливо.

Интенсивное развитие биоэнергетики становится актуальной задачей практически для всех регионов мира. Преимуществом биотоплива в сравнении с другими видами топлива является уменьшение вредных выбросов в атмосферу, уменьшение зависимости от импортных поставок энергоносителей, стоимость которых постоянно растет. Разрабатываемые новые технологии получения биотоплива в основном направлены на использование в качестве сырья бытовых и промышленных отходов и переработки их на экологически чистое топливо.

Одним из видов биотоплива является биодизель, для получения которого используют растительные или животные жиры. Производство биодизельного топлива из растительных масел осуществляется с использованием реакции трансэтерификации молекул в присутствии катализатора [1–5].

Липиды микробного происхождения (дрожжевые липиды) практически подобны по составу с растительными и животными жирами. Дрожжи имеют ряд свойств (скорость роста, неприхотливость к составу сред, высокий выход липидов, приемлемый жирнокислотный состав), которые позволяют рассматривать их как перспективный источник промышленного получения липидов — сырья для биодизеля.

С составом липидов (наличием длинных или коротких «хвостов» насыщенных и/или ненасыщенных жирных кислот, количеством углеродных атомов в цепи, положением, конфигурацией и количеством двойных связей) во многом связаны такие свойства микроорганизмов как термотолерантность, термофильность, кислотоустойчивость, вирулентность и другие признаки. Кроме того, в микроорганизмах липиды могут выполнять функцию запасных продуктов. К таковым относится поли-*b*-гидроксимасляная кислота, образуемая многими бактериями, и триацилглицериды, накапливаемые в больших количествах некоторыми дрожжами и другими представителями грибов. Фракционный состав внутриклеточных липидов некоторых видов дрожжей приведен в таблице 1.

Таблица 1

Состав дрожжевых липидов, % [6]

Table 1

The composition of yeast lipids,% [6]

| Фракция | <i>Lipomyces starkeyi</i> | <i>Lipomyces lipoferus</i> | <i>Sporobolomyces roseus</i> |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Фосфолипиды | 2,2 | 4,3 | 3,3 |
| Стерины | 2,5 | 5,3 | 3,7 |
| Моно- и диацилглицериды | 4,6 | 5,7 | 4,8 |
| Свободные жирные кислоты | 16,4 | 2,6 | 10,1 |
| Триглицериды | 71,4 | 78,1 | 72,2 |
| Стериновые эфиры и воска | 1,2 | 1,7 | 2,1 |

Как видно из таблицы 1, среди отдельных фракций дрожжевых липидов наибольшую часть (71,4–78,1%) занимают триглицериды. Аналогичный фракционный состав имеют липиды мицелиальных грибов и водорослей.

Общее количество липидов у микроорганизмов колеблется в пределах 0,2–10% от количества сухих веществ клеток (СВК). У дрожжей при благоприятных условиях содержание липидов может достигать 60–70% от СВК. Наиболее активные по признаку липидообразования микроорганизмы представлены в табл. 2.



Таблица 2

Общее содержание липидов у некоторых видов микроорганизмов [6]

Table 2

Total lipid content of some microorganisms [6]

| Микроорганизм | Липиды / (% от СВК) |
|--------------------------------|---------------------|
| <i>Actinomyces albaduncus</i> | 42-57 |
| <i>Alcaligenes eutrophus</i> | 40-60 |
| <i>Blakeslea trispora</i> | 54-56 |
| <i>Cryptococcus terricolus</i> | 65-70 |
| <i>Lipomyces lipoferus</i> | 50-63 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 35-36 |

Состав липидов различных микроорганизмов неодинаков. У бактерий, как правило, много фосфолипидов. Микобактерии содержат значительное количество восков. Молекулы кислот у эубактерий обычно содержат от 10 до 20 атомов углерода (преимущественно 15–19). Микобактерии, кориневобактерии и нокардии содержат в составе липидов кроме обычных кислот, своеобразные, характерные только для этих микроорганизмов миколовые кислоты, представляющие собой высокомолекулярные β-гидроксикислоты с длинной алифатической цепью в α-положении.

Среди различных групп микроорганизмов, имеющих практическое значение, дрожжам отводится ведущая роль. Жирнокислотный состав дрожжевых липидов практически идентичен составу растительных масел [6].

Дрожжи имеют ряд свойств (скорость роста, неприхотливость к составу сред, высокий выход липидов, приемлемый жирнокислотный состав), которые позволяют рассматривать их как наиболее перспективный источник промышленного получения липидов — сырья для биодизеля.

Процесс образования липидов у большинства дрожжей состоит из двух четко разграниченных стадий. Первая стадия характеризуется быстрым образованием белка в условиях усиленного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением липидов (в основном глицерофосфатов и нейтральных жиров); вторая — прекращением роста дрожжей и усиленным накоплением липидов (в основном нейтральных). Типичными липидообразователями являются дрожжи *Cryptococcus terricolus*, которые синтезируют большое количество липидов (до 60% от СВК) в условиях, даже неблагоприятных для синтеза белка [7].

Из других липидообразующих дрожжей промышленный интерес представляют дрожжи *S. guilliermondii*, утилизирующие алканы. Они синтезируют в основном фосфолипиды, накапливают большие количества липидов, активно развиваются на углеводных субстратах (мелассе, ги-

дрозизатах торфа и дресесины). Такими свойствами обладают и дрощи видов *Lipomyces lipoferus* и *Rhodotorula gracilis*. Их липогинез существенно зависит от условий культивирования, при этом накапливаются значительные количества (до 70%) триацилглицеридов [8].

Из отдельных групп липидообразующих дрощей наиболее широко распространены в природе дрощи *Rhodotorula* и *Pichia*, продуцирующие липиды в пределах 30–40% СВК.

В результате скрининга [9] дрощевых культур — липидообразователей (табл. 3) отобраны штаммы с повышенным синтезом липидов. Эффективность синтеза липидов определяли по жировому коэффициенту. Дрощи *P. anomala* L1 и *R. gracilis* SK-4 синтезировали наибольшее количество липидов (220 и 240 мг/100 см³, соответственно), при этом показатель жирового коэффициента был 7,8 и 8,0, соответственно.

Таблица 3

Штаммы дрощей с повышенным синтезом липидов [9]

Table 3

Yeast strains with increased synthesis of lipids [9]

| Дрощи | Усвоенный сахар (%) | Сухая биомасса (мг/100 мл) | Липиды | | Жировой коэффициент |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|-----------|------------------|---------------------|
| | | | мг/100 мл | % сухой биомассы | |
| <i>C. valida y-691</i> | 61,0 | 1000 | 42 | 4,2 | 2,1 |
| <i>C. utilis L-35</i> | 47,0 | 750 | 105 | 14,0 | 6,7 |
| <i>P. anomala M-1</i> | 17,5 | 215 | 39 | 18,1 | 6,7 |
| <i>P. polymorpha v-1</i> | 41,5 | 650 | 92 | 14,1 | 6,6 |
| <i>P. anomala L1</i> | 85,0 | 1500 | 220 | 14,0 | 7,8 |
| <i>R. glutinis K-1</i> | 85,0 | 1450 | 200 | 13,8 | 7,0 |
| <i>R. gracilis SK-4</i> | 90,0 | 1600 | 240 | 15,0 | 8,0 |
| <i>S. cerevisiae M-5</i> | 45,0 | 695 | 60 | 8,6 | 4,3 |
| <i>S. uvarum H-7</i> | 52,0 | 870 | 58 | 6,7 | 3,5 |

Одним из критериев выбора этих культур было предварительное изучение их естественной изменчивости по признаку липидообразования [9].

Естественная изменчивость (диссоциация) присуща любому виду микроорганизмов и возникает как в обычных условиях культивирования, так и под влиянием самых разнообразных факторов. По этой причине актуален вопрос о сохранении штаммов от вырождения. Невозможно использовать в промышленном производстве культуры, которые в процессе длительного культивирования теряют свои первоначальные свойства и требуют немало усилий для их восстановления [10, 11].



По мнению авторов [12] диссоциация является специфической формой внутривидовой изменчивости микроорганизмов, возникающей только под действием неблагоприятных условий существования. У дрожжей *S. roseus*, *R. gracilis* и *P. anomala* естественная диссоциация по признаку липидообразования выражена слабо. Для этих дрожжей характерны сравнительно небольшие по липидообразованию отклонения от исходной культуры, и довольно устойчив признак активного липидообразования [13].

С культурами дрожжей *P. anomala* L1, *R. gracilis* SK 4 проведены исследования, направленные на повышение выхода липидной фракции при минимальных затратах питательных веществ [9]. Показана возможность увеличения липидообразования путем оптимизации состава питательной среды и условий культивирования.

Проявление жизненного цикла микроорганизмов во многом зависит от условий среды. Поддерживая необходимые условия культивирования, можно в известной мере управлять ходом ферментативных процессов. Особенно большое влияние на рост, развитие и биохимическую активность микроорганизмов оказывают такие факторы как состав среды, температура, аэрация и окислительно-восстановительные условия. Эти факторы влияют на рост и интенсивность обменных процессов, что сказывается на биосинтетической деятельности микроорганизмов, липогенной активности дрожжей и на составе синтезируемых ими липидов [14].

Источником энергии, необходимой для жизнедеятельности дрожжей-продуцентов, могут быть различные углеродсодержащие соединения. Исследования липогенной активности дрожжей на различных углеводах показало [13], что наибольшая активность липидообразования наблюдается на средах с сахарозой (накопление липидов – 8,2 г/л), с глюкозой и фруктозой – 7,8 и 6,5 г/л, соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Синтез липидов и дыхательная активность *Rhodotorula gracilis* SK-4 на средах с разными моносахаридами [13]

Table 4

Lipids synthesis and respiratory activity of *Rhodotorula gracilis* SK-4 in medium with different monosaccharides [13]

| Сахара | Липиды, г/л | Дыхательная активность, % |
|-----------|-------------|---------------------------|
| Глюкоза | 7,8 | 100 |
| Фруктоза | 6,5 | 104 |
| Сахароза | 8,2 | 110 |
| Галактоза | 6,8 | 66 |
| Ксилоза | 6,7 | 29 |



В качестве оптимального источника углерода для дальнейших исследований была выбрана сахароза. Наибольшая дыхательная активность на сахарозе установлена у *R. gracilis SK-4* (110%).

Определенное влияние на липогенную активность дрожжей оказывали не только источники углерода, но и их концентрации (рис. 1).

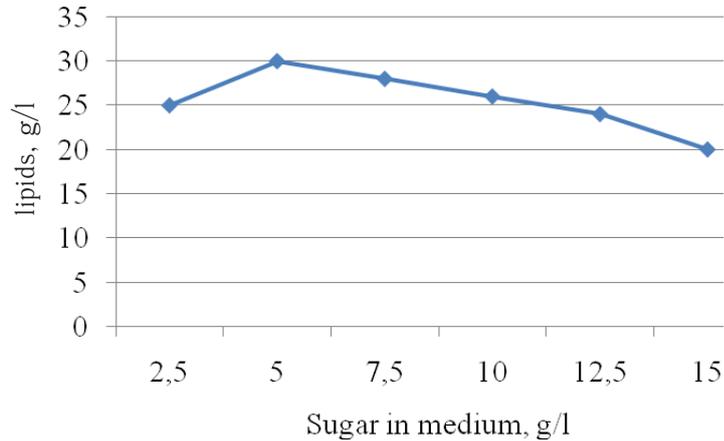


Рис. 1 Влияние содержания сахарозы в среде на синтез липидов дрожжами *R. gracilis SK-4*

Fig. 1. Effect of sugar in the medium for lipids synthesis by yeasts *R. gracilis SK-4*

Исследованиями липидообразования у *R. gracilis SK-4* установлено, что максимальное образование липидов происходит при 5%-ной концентрации сахарозы в среде. Увеличение концентрации сахарозы до 6% приводило к уменьшению содержания липидов. При дальнейшем повышении концентрации сахарозы процесс липидообразования ингибировался [13].

Лучшими источниками азота являлись мочеви́на и аммоний азотнокислый, которые обеспечивали повышенный синтез липидов [13]. Определено, что не только источники азота и углерода влияют на процесс липидообразования, но и их соотношение (табл. 5).

В процессе образования липидов у дрожжей значительную роль играет кислород воздуха. Суспендирование дрожжей, содержащих запасные углеводы, в среде богатой кислородом приводило к трансформации углеводов в липиды [15]. В условиях аэробного развития дрожжей кислород необходим для окисления различных источников углерода. Обильное снабжение растущей культуры кислородом воздуха требовалось, прежде всего для создания нормальных условий окисления источников углерода и высвобождения необходимой энергии для роста и образования различных компонентов клетки. Ряд авторов [15–17] предположили, что кислород, задерживая липолитическое действие липазы, способствовал процессам

обратного действия, а именно биосинтезу липидов и связыванию водорода, высвобождающегося при образовании промежуточных продуктов распада углеводов.

Таблица 5

Влияние источников азота на рост и образование липидов
P. anomala и *R. gracilis* [13]

Table 5

Effect of nitrogen sources on the growth and lipids formation
of *P. anomala* and *R. gracilis* [13]

| Источник азота | <i>R. gracilis</i> | | | <i>P. anomala</i> | | |
|---|--------------------|--------|------|-------------------|--------|------|
| | СВК г/л | Липиды | | СВК г/л | Липиды | |
| | | г/л | % | | г/л | % |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 12,2 | 4,31 | 32,9 | 9,6 | 3,73 | 38,9 |
| NH ₄ NO ₃ | 10,9 | 5,65 | 46,3 | 12,1 | 6,41 | 53,5 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 12,7 | 3,25 | 29,8 | 13,9 | 5,66 | 40,7 |
| Мочевина | 13,9 | 7,80 | 56,1 | 13,5 | 6,95 | 51,5 |
| Аспарагин | 13,1 | 5,56 | 43,8 | 9,6 | 3,73 | 38,9 |

В результате исследований установлено [9], что для максимального накопления биомассы и липидов скорость аэрации различна. Если максимальная скорость растворения кислорода в среде для синтеза биомассы составляла 6 г O₂/л/час, то для получения максимального количества липидов – 12 г O₂/л/час. Последующее увеличение скорости аэрации среды приводило к угнетению роста дрожжей и образования липидов (рис. 2).

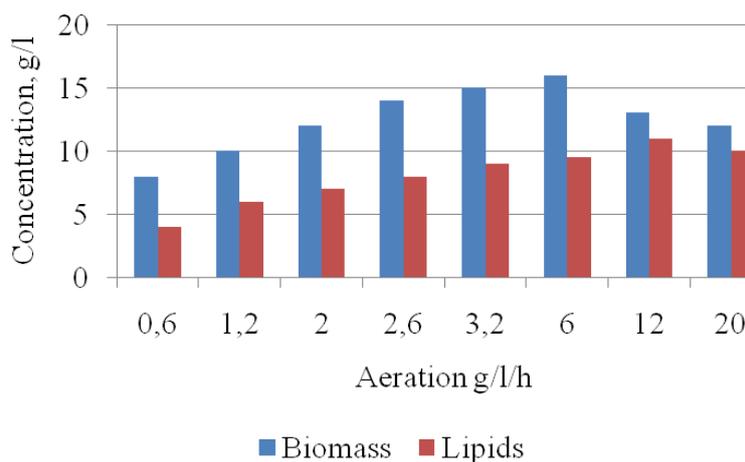


Рис.2. Влияние скорости аэрации среды на накопление биомассы и синтез липидов у *R. gracilis* SK-4

Fig. 2. Medium aeration levels for biomass and lipids accumulation by *R. gracilis* SK-4

Одним из факторов, определяющих рост микроорганизмов и их физиологическую активность, является величина рН. У дрожжей чувствительность к различным значениям рН в среде менее выражена. В результате исследований установлено [9], что максимальное накопление биомассы дрожжей происходило при рН 5,5 (при этом значении отмечен наибольший жировой коэффициент 18,1), однако максимальное содержание липидов (в процентах к сухому веществу) наблюдалось при рН 6,0. Результаты влияния рН среды на накопление биомассы и синтез липидов дрожжами *R. gracilis SK-4* представлены в таблице 6.

Таблица 6

Влияние рН среды на синтез биомассы и липидов дрожжами *R. gracilis SK-4* [9]
Table 6

Effect of pH on the synthesis of biomass and lipids by yeasts *R. gracilis SK-4* [9]

| рН | Биомасса | | Липиды | | |
|-----|----------|-------------|--------|-------------|--------------------|
| | г/л | % от сахара | г/л | % от сахара | % от сухих веществ |
| 4,0 | 9,8 | 24,5 | 3,2 | 8,1 | 31,2 |
| 4,5 | 12,5 | 30,7 | 4,8 | 9,6 | 32,9 |
| 5,0 | 13,9 | 34,7 | 6,7 | 15,3 | 44,9 |
| 5,5 | 15,9 | 39,7 | 7,2 | 18,1 | 45,6 |
| 6,0 | 14,8 | 37,0 | 7,0 | 17,5 | 47,0 |
| 6,5 | 4,8 | 12,0 | 2,0 | 5,0 | 41,5 |
| 7,0 | 3,9 | 9,7 | 1,3 | 3,1 | 29,8 |

Исследование влияния температуры на накопление биомассы и синтез липидов показало [9], что повышение температуры с 34 до 37 °С приводило к увеличению накопления биомассы и синтеза липидов. Дальнейшее повышение температуры (до 38 °С и выше) уменьшало содержание биомассы, а синтез липидов незначительно возрастал (рис. 3).

Изменение температуры культивирования дрожжей в пределах, обеспечивающих нормальный рост, влияет на их состав и незначительно сказывается на процентном содержании липидов. При этом температурный режим выращивания зависел от используемого вида и штамма дрожжей, состава среды и условий культивирования организма.

При выращивании дрожжей *Rhodotorula* обнаружено, что изменение состава липидов в значительной степени зависит от характера используемой среды. Дрожжи на органической среде (экстракт пивных дрожжей) при 20 °С синтезировали липиды с небольшим содержанием пальмитиновой кислоты и высоким содержанием олеиновой, а при 35 °С соотношение этих кислот было обратным [18–20].



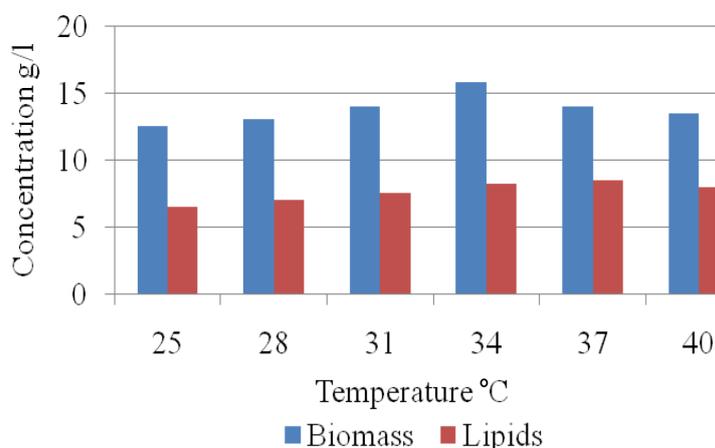


Рис. 3. Влияние температуры на накопление биомассы и синтез липидов дрожжами *R. gracilis SK-4*

Fig. 3. Temperature effect upon biomass and lipids accumulation by yeasts *R. gracilis SK-4*

Использование жирных кислот в качестве дополнительного источника углерода способствовало увеличению содержания в липидах дрожжей именно вносимых кислот. Введение в среду олеиновой кислоты привело к увеличению содержания ее в липидной фракции на 45% по сравнению с содержанием в липидной фракции дрожжей, выращенных только на глюкозе. Аналогичные результаты получены и в случае использования линолевой (увеличение в 12,5 раза) и пальмитиновой (увеличение на 49%) кислот [9]. Это объяснялось снижением энергетических затрат на биосинтез липидов, а использование дрожжами жирных кислот в качестве продуктов синтеза липидов происходило без предварительного их декарбоксилирования [13]. Результаты влияния жирных кислот, как источника углерода среды, на жирнокислотный состав липидов *R. gracilis SK-4* представлены в таблице 7.

Кроме источников углеродного и азотного питания, а также условий культивирования, на рост дрожжевой популяции, а следовательно, и на скорость синтеза липидов определенное влияние оказывают различные источники минерального питания, а также биологические факторы, среди которых, в основном, витамины, провитамины и их производные.

Многие виды дрожжей богаты витаминами комплекса В и могут развиваться на обедненных средах. Дополнение среды некоторыми витаминами стимулировало синтез липидов дрожжами *R. gracilis* и *P. anomala*. Для нормального роста и липидообразования этих культур на синтетической среде необходимо присутствие пантотеновой кислоты, тиамина и биотина. Отсутствие пантотеновой кислоты отрицательно влияет на синтез липидов. Связывают это с пантотеином (производное

Таблица 7

Влияние жирных кислот на состав липидов *R. gracilis* SK-4 [13]

Table 7

The influence of fatty acids on lipids composition of *R. gracilis* SK-4 [13]

| Жирная кислота | Источник углерода среды, % от общего количества | | | |
|--------------------|---|-------------------|-------------------|-----------------------|
| | Глюкоза | Олеиновая кислота | Линолевая кислота | Пальмитиновая кислота |
| Гексадекановая C16 | 34,5 | 13,5 | 21,0 | 49,2 |
| Октадекановая C18 | 61,3 | 79,5 | 78,5 | 43,8 |
| Пальмитиновая | 29,0 | 12,0 | 21,0 | 43,2 |
| Стеариновая | 3,4 | 2,5 | 3,5 | 2,0 |
| Пальмитолеиновая | 5,5 | 1,5 | - | 6,0 |
| Олеиновая | 54,5 | 79,5 | 32,5 | 39,0 |
| Линолевая | 3,4 | - | 42,5 | 1,5 |
| Линоленовая | - | - | - | 1,3 |

пантотеновой кислоты и цистеина), который участвует в синтезе высших жирных кислот и стероидов (табл. 8).

Таблица 8

Накопление биомассы (г/л) *P. anomala* L1 и *R. gracilis* SK-4 на среде с ростовыми добавками [6]

Table 8

Accumulation of biomass (g / l) *P. anomala* L1 and *R. gracilis* SK-4 on additives growth substances [6]

| Штамм | Без витаминов | С дрожжевым автолизатом | С витаминами | | | | | |
|-------------------------|---------------|-------------------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | | | В1 s | В2 | В6 | В7 | В8 | ПАБК |
| <i>P. anomala</i> L1 | 10,3 | 30,4 | 8,2 | 9,6 | 8,6 | 28,4 | 11,2 | 9,4 |
| <i>R. gracilis</i> SK-4 | 16,8 | 26,5 | 16,4 | 18,5 | 16,4 | 30,5 | 16,0 | 10,2 |

В среде с тиаминном, но при недостатке парааминобензойной кислоты (ПАБК) в дрожжах *R. gracilis* SK-4 наблюдается нарушение липидного обмена, что выражается в усиленном накоплении липидов [13].

Особое место в липогенезе дрожжей занимает инозит. При условии его дефицита в среде повышается содержание липидов в клетках, но уменьшается количество фосфолипидов. Действие инозита проявляется прежде всего у видов дрожжей, которые не способны к его биосинтезу.



У дрожжей *R. gracilis* SK-4 не наблюдается увеличения общего содержания липидов при недостатке инозита [6].

При выращивании дрожжей *P. anomala* L1 на среде с пиридоксином наблюдается увеличение содержания общих липидов по сравнению с культивированием на среде без пиридоксина [6]. Отмечено падение содержания мононенасыщенных жирных кислот (в основном пальмитолеиновой) при постоянном количестве насыщенных жирных кислот.

Показано, что никотиновая кислота не оказывает влияния на рост дрожжей *R. gracilis* SK-4, так как данная культура обладала способностью к ее биосинтезу, как и к биосинтезу пиридоксина и рибофлавина [9].

Установлено, что на рост и образование липидов дрожжами *R. gracilis* определенное влияние оказывает оротовая кислота (2,6-диоксипиримидин-4-карбоновая). В концентрации 0,1% оротовая кислота вызывает ускорение роста дрожжей и стимулирует скорость синтеза липидов [6].

На рост и накопление липидов дрожжами наиболее сильное влияние оказывают фосфаты. Нормальный процесс накопления липидов возможен только при наличии в среде определенной концентрации фосфора. Однако в зависимости от свойств дрожжей-липидообразователей оптимальная концентрация фосфора в среде может быть различной. Недостаток фосфора в среде приводит к неполному использованию сахара среды, избыток же фосфора меняет направление процесса в сторону накопления биомассы, а не синтеза липидов. Повышение концентрации в среде фосфора подавляет включение ацетат-С¹⁴ в жирные кислоты и неомыляемые липиды *R. gracilis* SK-4 [21]. Действие фосфорных солей можно объяснить их ролью в метаболических процессах дрожжевой клетки. Недостаток фосфора в среде влияет на процессы синтеза белка. Обильное снабжение фосфором способствовало повышенному синтезу белка, а недостаток — усилению липидообразования.

Действие фосфатов на липогенез дрожжей, в известной степени, аналогично действию солей азота. Избыток угнетает, а недостаток стимулирует процессы биосинтеза липидов. Однако повышение количества липидов в дрожжах при недостатке фосфора гораздо меньше, чем при недостатке азота.

Накопление дрожжами липидов было максимальным (рис. 4) при добавлении в среду 0,03 г/л фосфора, причем эта норма оказалась оптимальной для *R. gracilis* и для *P. anomala* [13].

Исследования влияния фосфорного питания на фракционный состав липидов *P. anomala* показали, что внесение в среду 1,39 г/л фосфора ведет к некоторому увеличению относительной доли фосфолипидов и снижению стерина, моно- и диглицеридов (табл. 9). В целом же влияние фосфорного питания на фракционный состав липидов невелико [13].

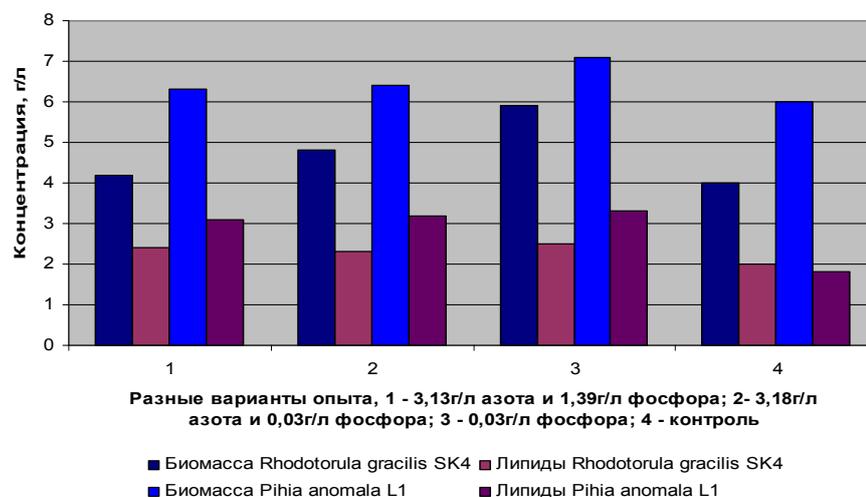


Рис. 4. Влияние разных концентраций фосфора на рост и липидообразование *R. gracilis* SK-4 и *Pichia anomala* L1

1 – излишек азота и фосфора; 2 – излишек азота и норма фосфора;
3 – норма фосфора без азота и 4 – без азота и фосфора

Fig. 4. The effect of different concentrations of phosphorus upon biomass and lipids accumulation by yeasts *R. gracilis* SK-4 and *Pichia anomala* L1
1 – nitrogen and phosphorus surplus; 2 – nitrogen surplus and rate of phosphorus;
3 – rate of phosphorus without nitrogen; 4 – without nitrogen and phosphorus.

Влияние на липогенез дрожжей магния, калия, натрия и других компонентов противоречивы. Ионы магния тормозят процесс липидообразования в покоящихся клетках дрожжей [22–23], в то же время отмечается положительное влияние ионов магния на синтез биомассы в логарифмической фазе роста.

Таблица 9
Влияние фосфорного питания на фракционный состав липидов *P. anomala* L1* [13]
Table 9
The effect of phosphorus supply upon fractional composition of *P. anomala* L1 lipids [13]

| Фракция | Без фосфора, (г/л) | Добавлено в среду 1,9 фосфора, (г/л) |
|--------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Фосфолипиды | 1,5±0,01 | 2,1±0,01 |
| Неидентифицированная | 2,3±0,03 | 2,9±0,03 |
| Стерины | 3,9±0,05 | 3,2±0,05 |
| Моно- и диглицериды | 3,9±0,06 | 3,0±0,06 |
| Свободные жирные кислоты | 6,1±0,04 | 6,7±0,04 |
| Триглицериды | 76,5±0,08 | 78,9±0,08 |
| Стериновые эфиры и воска | 1,6±0,02 | 1,8±0,02 |

*/источник азота – мочевины, 1,39 г/л



Добавление в среду сернокислого магния оказывает положительное влияние на уровень использования редуцирующих веществ (РВ) среды и накопления биомассы дрожжей (табл. 10). Наибольшее количество липидов дрожжи синтезируют при добавлении 2,5 г/л сернокислого магния. Внесение больших количеств сернокислого магния (10 и 20 г/л) приводит к заметному торможению синтеза липидов дрожжами.

Таблица 10

Влияние ионов магния на рост и липидообразование дрожжей
R. gracilis SK-4 и *P. anomala* L1 [16]

Table 10

The effect of magnesium ions upon the growth and formation of lipid yeasts
R. gracilis SK-4 and *P. anomala* L1 [16]

| Дрожжи | MgSO ₄ , г/л | Используй- вано РВ, % | Биомасса | | Липиды | | |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------------------------------------|
| | | | г/л | в % от использо- ванных РВ | г/л | в % от использо- ванных РВ | в % от сухих веществ клеток |
| <i>R. gracilis</i> SK-4 | 20 | 82,7 | 4,7 | 37,8 | 1,5 | 11,9 | 31,6 |
| | 10 | 90,7 | 5,2 | 38,1 | 1,6 | 13,3 | 31,5 |
| | 5 | 80,0 | 4,0 | 32,0 | 1,6 | 12,8 | 40,2 |
| | 2,5 | 85,3 | 3,8 | 29,4 | 1,6 | 12,2 | 43,6 |
| | 0,1 | 77,3 | 3,3 | 28,3 | 1,4 | 12,0 | 43,0 |
| <i>P. anomala</i> L1 | 20 | 93,7 | 6,0 | 40,8 | 2,4 | 16,6 | 40,8 |
| | 10 | 87,3 | 6,0 | 45,4 | 2,2 | 16,9 | 37,2 |
| | 5 | 74,7 | 3,7 | 33,4 | 1,8 | 16,2 | 48,4 |
| | 2,5 | 81,3 | 4,2 | 34,1 | 2,2 | 17,9 | 52,6 |
| | 0,1 | 74,7 | 3,9 | 34,9 | 2,0 | 17,8 | 50,9 |

Добавление хлористого калия приводит к некоторому улучшению степени использования РВ среды и повышению общего выхода биомассы дрожжей (табл. 11). Ионы калия оказывают положительное влияние на биосинтез липидов. По своему действию введение в среду калия аналогично введению магния. Не оказывая непосредственного влияния на липогенез дрожжей, ионы калия и магния в известной мере влияют на степень использования углерода и азота среды и на скорость накопления дрожжевой биомассы. В свою очередь это способствует некоторому увеличению общего выхода липидной фракции дрожжей.

При культивировании дрожжей *P. anomala* L1 на среде с хлористым натрием отмечена гибель дрожжей и уменьшение веса клеток, однако содержание липидов в них увеличивается. Жирнокислотный состав липидов на среде с хлористым натрием также подвергается некоторому

изменению. При увеличении концентрации соли до 10% в клетках накапливаются в значительном количестве кислоты $C_{12:0}$ и резко уменьшается концентрация кислот $C_{18:1}$. В зависимости от концентрации соли меняется соотношение между насыщенными и ненасыщенными кислотами [15].

Таблица 11

Влияние ионов калия на рост и липидообразование дрожжей [16]

Table 11

The effect of potassium ions upon the growth and lipid formation of yeasts [16]

| Концентрация КСl, г/л | <i>R. gracilis</i> SK-4 | | | | <i>P. anomala</i> L1 | | | |
|-----------------------|-------------------------|---------------|--------|------|----------------------|---------------|--------|------|
| | Использовано РВ, % | Биомасса, г/л | Липиды | | Использовано РВ, % | Биомасса, г/л | Липиды | |
| | | | г/л | % | | | г/л | % |
| 2,0 | 87,5 | 5,2 | 1,5 | 28,7 | 88,1 | 5,8 | 2,5 | 42,9 |
| 1,0 | 86,9 | 5,1 | 1,5 | 28,9 | 85,6 | 5,0 | 2,1 | 41,0 |
| 0,5 | 84,4 | 4,7 | 1,3 | 27,9 | 83,8 | 4,9 | 2,1 | 42,7 |
| 0,25 | 84,4 | 4,7 | 1,3 | 26,9 | 83,8 | 4,9 | 2,1 | 41,8 |

Микроскопические грибы пока не получили большого распространения как продуценты липидов, хотя жир грибов по своему составу также близок к растительному. Выход жиров у *Aspergillus terreus*, например, на углеводных средах достигает 51% от СВК. Липидный состав представлен в основном нейтральными жирами и фосфолипидами [8].

Способность дрожжей к липидообразованию и сравнительно быстрая возможность изменения количества и состава липидов путем направленного культивирования, позволяет сделать вывод о том, что полученные микробиологическим синтезом липиды, могут служить источником сырья для получения биотоплива в промышленных масштабах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carioca J.O.B.* Biofuels: Problems, challenges and perspectives // *Bio-technol. J.* — 2010. — № 5. — P. 260–273.
2. *Hirsch R.L., Bezdek R., Wendling R.* Peaking of World Oil Production and Its Mitigation // *AIChE J.* — 2006. — № 52. — P. 2–8.
3. *Kerr R.A.* CLIMATE CHANGE: Global warming is changing the world // *Science* — 2007. — № 316. — P. 188–190.
4. *Олійничук С., Кизюн Г., Шиян П., Сосницький В.* Сучасні й перспективні технології виробництва біопалив на світовому ринку // *Харчова і переробна промисловість.* — 2009. — № 6(358). — С. 11–13.
5. *Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наукова думка, 2010. — 328 с.



6. Залашко М.В. Биосинтез липидов дрожжами. — Мн., «Наука и техника», 1971. — 216 с.
7. Asselinean J., Lederer E. **Chemistry and metabolism of bacterial lipids**. “Lipide metabolism”. — John Wiley a. Sons. New York, 1960 — 200 p.
8. Губарев Е.М. Основные процессы обмена веществ у микробов. — М. Мир, 1961 — 165 с.
9. Шульга С.М., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Е., Хоменко А.И., Андрияш А.С. Биосинтез липидов дрожжами *Rhodotorula gracilis*. // Ж. Биотехнология — 2010. — т. 3, № 3. — С. 58–65
10. Ганбаров Х.Г., Абдулгамидова С.М. Изучение внутривидовых морфо-культуральных изменений дрожжевых грибов, хранившихся в коллекции культур. Вестник Бакинского Государственного Университета // Журнал серия биологических наук. — 2007. — № 1. — С. 42–46.
11. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Демушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. — 2009. — № 4. — С. 99–121.
12. Лукин А.А. Экспериментальное исследование диссоциации у *Bacillus brevis* var. G.-B.: Автореф. канд. дисс. М., 1965. — 20 с.
13. Shulga S.M., Tkachenko A.F., Beyko N. E. Biosynthesis of lipids by the yeast *Rhodotorula gracilis* // III International conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology «BioMicroWord 2009» (Lisbon, Portugal, 2–4 December, 2009): abstr. — P. «World Scientific», 2009. — p. 385.
14. Шульга С.М., Тигунова О.О., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Е., Хоменко А.И. Вплив ліофільного висушування на життєздатність дріжджів *Pichia anomala*. // Ж. Біотехнологія. — 2011. — том 4, № 4. — С. 83–86
15. Rattray J.B., Schibeci A., Kidby D.K. Lipids of yeasts // Bacteriol. Rev. — 1975. — V. 39, № 3. — P. 197–231.
16. Hall M.J., Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture // Appl. Environ. Microbiol. — 1977. — V. 33, № 3. — P. 577–584.
17. Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. — М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1984. — 160 с.
18. Ratledge C., Wynn J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms // Adv. Appl. Microbiol. — 2002. — № 51. — P. 1–44.
19. Alvarez H., Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — № 60. — P. 367–376.

20. Meng X., Yang J., Xu X. Zhang L. et. al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. // *Renew. Energ.* — 2009. — № 34. — P. 1–5
21. Van Hamme J.D., Ward O.P. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas sp.* strain JA5-B45 and *Rhodococcus sp.* stain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them// *Ibid.* — 2001. — V. 67, N 10. — P. 4874–4879.
22. Steen E., Kang Y., Bokinsky G., Hu Z., et. al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass // *Nature.* — 2010. — № 463. — P. 559–562.
23. Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2008. — № 80. — P. 749–756.

Стаття надійшла до редакції 05.06. 2012 р.

А.Ф. Ткаченко, О.О. Тигунова, С.М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України,
вул. Осиповського, 2а, Київ-123, 04123, Україна, тел.: +38 (044) 434 45 77,
e-mail: Shulga5@i.ua

МІКРОБНІ ЛІПІДИ — АЛЬТЕРНАТИВНЕ ДЖЕРЕЛО СИРОВИНИ ДЛЯ БІОПАЛИВА

Реферат

В огляді представлені основні напрямки досліджень вітчизняних та закордонних авторів, а також експериментальні дані направлені на пошук активних продуцентів ліпідів серед різних видів дріжджів та шляхів оптимізації процесу ліпидоутворення у найбільш перспективних штамів. Показано, що підтримуючи необхідні умови культивування можна керувати ходом ензиматичних процесів. Розглянуто вплив на ріст, розвиток та біохімічну активність мікроорганізмів складу середовища, температури, аерації та окиснювально-відновлювальних умов. Зміна цих факторів впливала на біосинтетичну діяльність мікроорганізмів, ліпогенну активність дріжджів та на склад синтезованих ними ліпідів. Показано, що властивість дріжджів до ліпидоутворення та відносно швидка можливість змінення кількості та складу ліпідів шляхом направленою культивування, дає змогу зробити висновок про те, що отримані мікробіологічним синтезом ліпіди, можуть слугувати джерелом сировини для отримання біопалива в промислових масштабах.

Ключові слова: дріжджі, *Rhodotorula gracilis*, *Pichia anomala*, мікробні ліпіди, біопаливо.



A. Tkachenko, O. Tgunova, S. Shulga

State organization “Institute of Food Biotechnology and Genomics”, NASU,
2a, Osipovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine,
tel.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

MICROBIAL LIPIDS ARE AN ALTERNATIVE RAW MATERIAL FOR BIOFUEL

Summary

This review presents the main directions of domestic and foreign research, also experimental data to search among the different species of yeasts – active producers of lipids and the ways to lipidogenesis process optimization in the most promising strains. It was shown that maintaining the necessary conditions of cultivation can direct enzymatic processes course. The influence of microbial medium composition, temperature, aeration and oxidation-reduction conditions on the growth, development and biochemical activity was investigated. These factors changing has affected the microorganisms biosynthetic activity, lipidogenic yeasts activity and has synthesized lipids composition. It is proved that lipidogenic yeasts ability and relatively rapid ability of changing the amount and composition of lipids by the direct cultivation leads to the conclusion that lipids obtained by microbial synthesis can be commercially a source of raw materials for biofuel.

Key words: *Rhodotorula gracilis*, *Pichia anomala*, yeast, microbial lipids, biofuel.

