

ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ЛІПІДІВ У ЗЕЛЕНИХ І СИНЬОЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЯХ В УМОВАХ ЛАБОРАТОРНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

О.В. БАЛАНДА кандидат біологічних наук
А.Г. МАЄВСЬКА провідний фахівець
О.А. МАРЧЕНКО кандидат біологічних наук
Т.І. СУСЛО, О.В. БАБУШОК студентки

*Досліджено вміст ліпідів у біомасі зелених та синьозелених водоростей за умов періодичної закритої лабораторної системи. Встановлено, що на стаціонарній фазі росту кількість сполук цього класу набагато вища порівняно з експоненційною. З восьми досліджених видів водоростей найбільший вміст ліпідів виявлений в клітинах видів порядку Chlorophyta: *Dunaliella salina*, *Selenastrum gracile* і *Chlorella vulgaris*, відповідно 14,8, 14,0 і 11,5% на суху масу*

Ключові слова: водорості, альгологічно чисті культури *Dunaliella salina*, *Selenastrum gracile*, *Chlorella vulgaris*, біомаса, ліпіди

Щорічно в Україні споживається близько 200 мільйонів тонн умовного палива, при цьому видобуток з природних джерел країни становить лише 80 млн. тонн [4, 11]. Тому, в сучасній економічній ситуації важливим потенційним ресурсом при такому балансі власної та імпортованої енергетичної сировини може стати біопаливо. Останнім часом у світі широко проводяться розробки технологій виробництва біопалива, джерелом якого є водорості. Це пов'язано з тим, що клітини водоростей природним чином синтезують значну кількість ліпідів, які за допомогою спеціальних методик можуть ефективно перероблятися на біодизель, тобто пальне, виготовлене з біологічної сировини — замітник звичайного дизельного пального з нафти. Крім того, властивостями ліпідів можна варіювати за допомогою модифікацій складу культурального середовища, на якому ці об'єкти вирощуються залежно від виду палива, що планується виготовити [1, 7, 9, 10, 12].

Водорості мають здатність до швидшого нарощування біомаси, ніж будь-які сільськогосподарські культури. Вони характеризуються високим коефіцієнтом корисної дії (ККД) використання світла. При застосуванні сучасних біотехнологій культивування мікрводоростей ККД перетворення енергії світла в процесі фотосинтезу в їх клітинах досягає 15 – 20 % [4]. Це дозволяє при промисловому культивуванні знизити енергетичні витрати на одиницю одержаної продукції.

Перевагою водоростевих біотехнологій є і те, що при контрольованому культивуванні фотосинтезуючих мікрводоростей практично немає втрат цінної біомаси. При традиційному способі вирощування технічних культур у сільському господарстві інтенсивність фотосинтезу залежить від кліматичних змін, наявності шкідників, хвороб та ін., що призводить до втрат врожаю.

Ліпіди – біологічна група речовин, які відрізняються за хімічною будовою, властивостями та фізіологічними функціями. Основною ознакою цих речовин є нерозчинність або погана розчинність у воді і розчинність в таких органічних розчинниках як рідкі вуглеводні, спирти, етери і естери, ацетон, хлороформ, чотирехлористий вуглець та ін. Ліпіди є запасуючою формою енергії і виконують важливу роль у властивостях плавучості водоростей.[3, 7, 10].

Загальний вміст ліпідів у клітинах водоростей коливається у значному діапазоні. У синьозелених водоростей він може становити від 2 до 18% від сухої речовини біомаси, у жовтозелених – 5 - 10%, у деяких зелених - 37,3%, у діатомових – 35% [4, 12, 13]. Абсолютний вміст ліпідів у клітинах водоростей значно нижчий, ніж білків та вуглеводів, однак змінюючи умови культивування можна значно його підвищити [4, 8, 10]. Наприклад, у середовищі з концентрацією азоту менше ніж 0,001М та при інтенсивному освітленні протягом двох місяців у клітинах хлорели накопичується до 80% ліпідів. У 4-тижневій культурі *Ankistrodesmus brauni* ліпідів виявлено 18,6%, а у 7-тижневій – 33,7% від сухої речовини [4].

Отже, змінюючи склад поживного середовища, можна керувати процесами біосинтезу в клітинах зміщуючи їх в бік накопичення ліпідів, а також корегувати їх якісний склад.

Метою дослідження було провести лабораторне вирощування та встановлення стадій розвитку культур, на яких відбувається максимальна швидкість росту та утворення ліпідів деякими представниками Cyanophyta та Chlorophyta.

Матеріал і методика досліджень. Досліди проводили на альгологічно чистих культурах зелених водоростей: Chlorophyta (*Chlorella vulgaris* Beijer, *Selenastrum gracile* Reinsch, *Ankistrodesmus braunii* Nägeli і *Dunaliella salina* Teodoresco) та синьозелених водоростей: Cyanophyta (*Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb., *Lyngbya limnetica* Lemm., *Nostoc sp.* і *Nostoc linckia* (Roth.) Born. et Flah. sensu Elenk. з колекції Інституту ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України. Культури водоростей вирощували на середовищі Фітцджеральда у модифікації А.Цендера і П.Горема №11 [2, 5, 6] при температурі 22-25 °С і освітленні 3000 лк, з чергуванням світло/темрява 16/8 год.

Відносну швидкість росту біомаси культур водоростей (μ) визначали за допомогою формули [7]:

$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{dx}{dt},$$

де x – початкова біомаса; dx – приріст біомаси за певний час; dt – час росту культур.

Важливою задачею, яку необхідно вирішити при розробці технологій виробництва біодизеля з біомаси водоростей, є ефективна екстракція ліпідів. Цей етап технології є одним з найдорожчих, тому ефективні й недорогі способи вилучення ліпідної фракції з клітин мікрводоростей значною мірою визначають рентабельність усього виробництва. Порівняно з насінням олійних культур, біомаса мікрводоростей містить набагато більше води, що потребує додаткових енергетичних витрат при підготовці сировини до екстракції.

Часто на виробництві для одержання олії використовують комбінацію механічного пресування й хімічних розчинників. При використанні потужних пресів з біомаси водоростей можна видобути не більше 70% ліпідної фракції. Ефективнішим способом є вилучення мембранних ліпідів за допомогою органічних розчинників. Найчастіше для цього використовують бензол, ефір і, головним чином, відносно недорогі гексан або харчові бензини. Екстракцію ліпідів з мікрowodоростей органічними розчинниками можна провести шляхом багаторазових промивань біомаси розчинником при температурі його кипіння в скляному апараті Сокслета. Цей спосіб є набагато дорожчим, ніж проста гексанова екстракція, але з біомаси можна добути до 95% ліпідів [4]. Тому для визначення жиру в біомасі водоростей за масою сухого знежиреного залишку ми використали саме методику екстракції С.В. Рушковського у апараті Сокслета [7].

Результати досліджень та їх обговорення. Швидкість росту біомаси водоростей в першу чергу залежить від складу поживного середовища, чистоти вихідного посівного матеріалу, тривалості та умов культивування, а найбільше від інтенсивності освітлення культур. Досліджувані види водоростей культивували за методом закритої системи при освітленні 3000 лк та температурі $24^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, на середовищі Фіцджеральда в модифікації А. Цендера і П. Горема. Відносну швидкість росту вимірювали періодично кожні 10 днів протягом 60 діб. Результати досліджень показали, що найінтенсивніший приріст біомаси був у період з 10-ї до 20-ї доби в усіх досліджуваних видів. За умов періодичного культивування водоростей поживне середовище містило обмежену початкову кількість поживних речовин (субстратів) і культури росли доти поки вміст якогось необхідного їм компонента не досяг критичної величини, після чого ріст клітин сповільнювався і в подальшому на 60-ту добу майже зупинявся. Це пояснюється тим, що періодична культура, як і багатоклітинний організм має генетично обмежений ріст (таблиця).

Відносна швидкість росту біомаси досліджуваних видів водоростей,

M±m, n=3-4

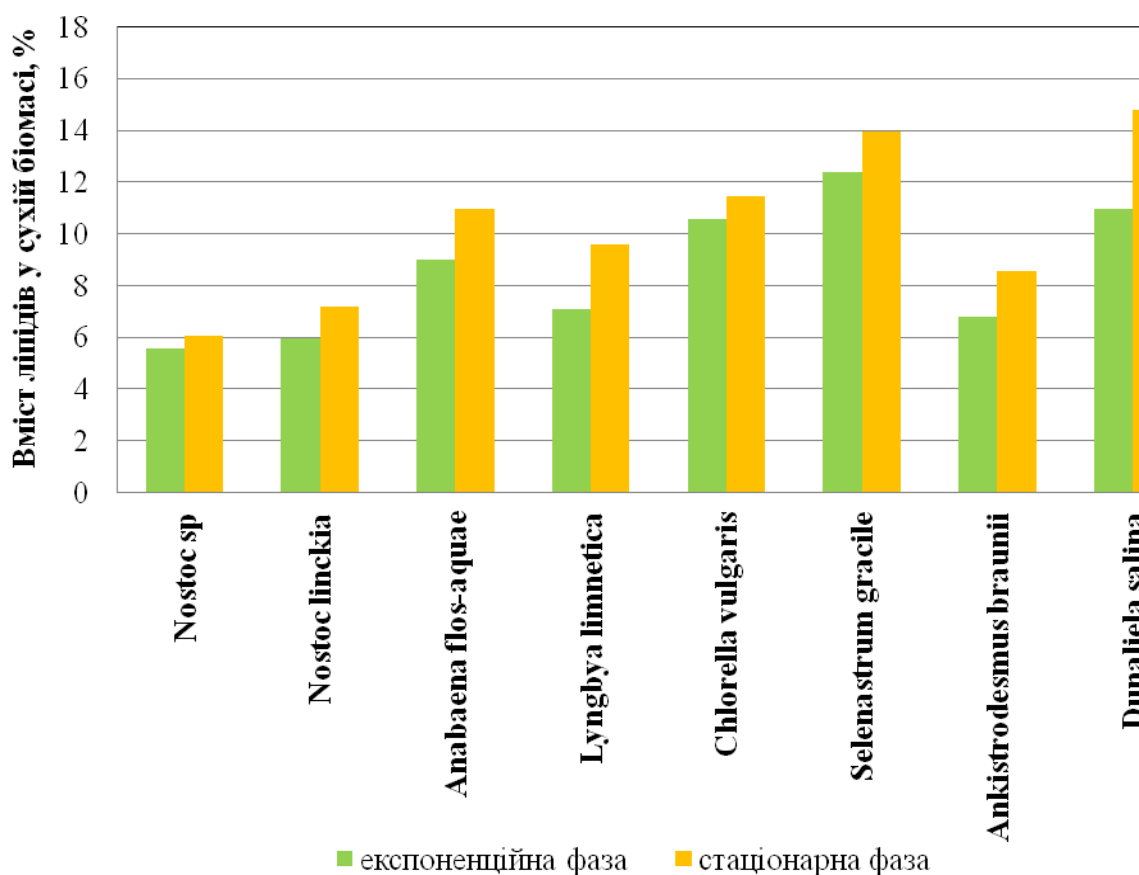
Вид	Відносна швидкість росту, мг/дм ³					
	Період культивування, доба					
	10	20	30	40	50	60
<i>Nostoc sp.</i>	2,62±0,08	1,26±0,04	0,41±0,01	0,22±0,13	0,11±0,08	0,06±0,02
<i>Nostoc linckia</i>	3,41±0,10	2,74±0,08	0,36±0,10	0,27±0,08	0,14±0,10	0,05±0,03
<i>Anabaena flos-aquae</i>	8,25±1,31	3,39±0,22	1,46±0,41	0,91±0,35	0,49±0,12	0,14±0,08
<i>Lyngbya limnetica</i>	5,63±1,02	1,28±0,10	0,29±0,12	0,20±0,14	0,09±0,03	0,06±0,023
<i>Chlorella vulgaris</i>	2,71±0,32	1,22±0,65	0,38±0,28	0,23±0,18	0,11±0,09	0,08±0,04
<i>Selenastrum gracile</i>	5,35±0,47	3,02±0,33	1,83±0,31	0,47±0,14	0,28±0,03	0,10±0,02
<i>Ankistrodesmus braunii</i>	10,97±0,52	4,30±0,44	1,63±0,20	0,48±0,02	0,41±0,08	0,19±0,01
<i>Dunaliella salina</i>	5,09±0,86	2,40±0,12	1,18±0,33	0,71±0,52	0,26±0,22	0,13±0,01

За одержаними даними, альгологічно чисті культури видів *Ankistrodesmus braunii* та *Anabaena flos-aquae* мали найбільшу відносну швидкість росту біомаси порівняно з усіма досліджуваними видами водоростей, а саме: вид *Anabaena flos-aquae* – 8,25 мг/дм³ за добу під час експоненційної фази, а вид *Ankistrodesmus braunii* – 10,97 мг/дм³. У наступних фазах росту спостерігали динаміку зменшення приросту біомаси з поступовим відмиранням клітин мікрводоростей. Альгологічно чисті культури *Chlorella vulgaris* та *Nostoc sp.* у наших дослідженнях показали найменшу відносну швидкість приросту біомаси.

Отже, при промисловому культивуванні мікрводоростей для отримання великої кількості їх біомаси найперспективнішими є види *Ankistrodesmus braunii* та *Anabaena flos-aquae*.

Порівнюючи вміст ліпідів на різних стадіях росту культур водоростей, встановлено, що абсолютно в усіх видів відсотковий вміст цих сполук був вищим на стаціонарній фазі росту порівняно з експоненційною (рисунок). Так, наприклад, вміст ліпідів в клітинах *Anabaena flos-aquae* на стаціонарній фазі становив 11,0%, а на експоненційній - 9,0%. Найбільший кількісний вміст виявлено у представників зелених водоростей: *Dunaliella salina* – 14,8%, *Selenastrum gracile* – 14,0% і *Chlorella vulgaris* – 11,5%. Відомо, що на хімічний склад біомаси водоростей крім освітлення і температури

вирощування значно впливає наявність у середовищі поживних речовин. При закритій технології культивування водоростей, яку ми використовували, до культур після початку їх росту не вводили додатково мікро- і макроелементи, вітаміни та інші складові поживного середовища, а також не видаляли біомасу чи кінцеві продукти обміну. Тому, ліпідний склад у клітинах синьозелених водоростей може також змінюватись протягом їх вирощування. Відомо, що збільшення рівня освітлення може призвести до зростання вмісту ненасичених жирних кислот у хімічному складі клітин водоростей [1, 4].



Вміст ліпідів у біомасі досліджених видів водоростей на різних стадіях росту

Ці зміни, на нашу думку, можливо пов'язані з окисленням жирних кислот. У фазі інтенсивного росту водоростей цей процес був сповільненим, тобто в культурі спостерігали максимальну антиокислювальну активність, яка в міру їх старіння знижувалась. Із збільшенням клітинного розпаду органічних речовин протягом культивування водоростей відносний вміст ліпідів збільшувався, відповідно вміст білків і вуглеводів зменшувався. Це

пов'язано з тим, що для ліпідів характерна найменша швидкість розщеплення.

Одержані нами дані свідчать про те, що максимальна кількість ліпідів, синтезованих впродовж усього періоду культивування, виявлена у зелених водоростей таких видів: *Dunaliella salina*, *Selenastrum gracile* і *Chlorella vulgaris*, відповідно 14,8, 14,0 і 11,5%. На нашу думку, ці альгологічно чисті культури є найперспективнішими для промислового їх культивування та використання в технологіях виробництва біодизеля.

Висновки

1. Найінтенсивніший приріст біомаси водоростей спостерігався з 10-ї до 20-ї доби в усіх досліджуваних видів.
2. Відносна швидкість росту представників зелених та синьозелених водоростей на різних фазах росту культур є неоднаковою. Найбільша швидкість росту відзначена у культури виду *Ankistrodesmus braunii*, яка на 10-ту добу становила 10,97 мг/дм³, у виду *Anabaena flos-aquae* – 8,25 мг/дм³.
3. Кількісний вміст ліпідів у клітинах водоростей залежить від таксономічної приналежності виду, умов вирощування та стадії розвитку. З восьми досліджуваних видів водоростей, найбільший вміст ліпідів виявлено у сухій біомасі *Chlorophyta* на стаціонарній фазі росту: *Dunaliella salina* – 14,8%, *Selenastrum gracile* – 14,0% і *Chlorella vulgaris* – 11,5%.
4. Альгологічно чисті культури зелених водоростей *Dunaliella salina*, *Selenastrum gracile* і *Chlorella vulgaris* найперспективніші для отримання біодизеля.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей / Г.К. Барашков – М.: Пищ. пром-сть, 1972. – 336 с.
2. Биотехнология культивирования гидробионтов. / [Романенко В. Д., Крот Ю. Г., Сиренко Л. А., Соломатина В. Д.] / Підручник. – К.: Наукова думка, 1999. – 264с.
3. Біохімія гідробіонтів. Практикум. / Л. М. Вогнівенко, М. Ю. Євтушенко, М.В. Шевряков [та ін.] / Практикум. – Херсон: Олді-плюс, 2009. – 536с.
4. Золотарьова О.К. Перспективи використання мікрводоростей у біотехнології / [О.К. Золотарьова, Є.І. Шнюкова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко]; під ред. О.К. Золотарьової – К.: Альтерпрес, 2008. – 235с.
5. Родина А.Г. Методы водной микробиологии. Практическое руководство / А.Г. Родина – М.-Л.: Наука, 1965. – 363 с.
6. Ржетовский Р.И. Непрерывное культивирование микроорганизмов. Теоретические и методологические основы / Р.И. Ржетовский – М.: Пищ. пром-сть, 1968. – 359 с.
7. Сакевич О.Й. Біохімічний аналіз водяних рослин / О.Й. Сакевич, О.М. Усенко, О.В. Баланда – К.: Логос, 2009. – 372 с.
8. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: пер. с англ. / А. Сассон [под ред., с предисл. и дополн. В.Г. Дебабова] - М.: Мир, 1987. - 411с.
9. Цыганков А.А. Лабораторные фотобиореакторы / А.А. Цыганков // Приклад. биохим. и микробиол. – 2001. – 37, №4. – С. 387–397.
10. Шнюкова Е.И. Внеклеточные углеводы Cyanophyta и их функции / Е.И. Шнюкова, В.Д. Романенко // Альгология. – 1999. – 9, № 2. – С. 162 – 163.
11. Chisti Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // Biotechnology Advances – 2007. – 25 (3) – p. 294–306.
12. Harwood J.L. Lipid metabolism in algae / J.L. Harwood, A.L. Jones // Adv. Bot. Res. – 1989. – 16. – P. 1 – 53.
13. Kyle D.J. Production and use lipids from microalgae / D.J. Kyle // Lipid Technol. – 1992. – 4, №3. – P. 59 – 64.

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ В ЗЕЛЕННЫХ И СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЯХ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Исследовано содержание липидов в биомассе зеленых и синезеленых водорослей в условиях периодической закрытой лабораторной системы. Установлено, что на стационарной фазе роста количество веществ данного класса намного выше по сравнению с экспоненциальной. Из восьми исследованных видов водорослей наибольшее содержание липидов выявлено в клетках видов порядка Chlorophyta: Dunaliella salina, Selenastrum gracile и Chlorella vulgaris, соответственно 14,8, 14,0 и 11,5% на сухую массу

Ключевые слова: водоросли, альгологически чистые культуры, Dunaliella salina, Selenastrum gracile, Chlorella vulgaris, биомасса, липиды

THE TOTAL LIPID MAINTENANCE OF THE GREEN AND BLUE-GREEN ALGAE IN THE LABORATORY CULTURE

Content of the lipids in the biomass of the green and blue-green algae has been investigated under the conditions of a periodical closed laboratory system. It was discovered, that in the stationary phase of growth the quantity of combinations of the given class is much higher comparing to the exponential one. From the eight investigated kinds of algae the highest content of the lipids has been found in the cells of the order Chlorophyta kinds: Dunaliella salina, Selenastrum gracile and Chlorella vulgaris, accordingly 14,8, 14,0 i 11,5% per dry mass

Key words: algae, algologically pure culture, Dunaliella salina, Selenastrum gracile, Chlorella vulgaris, biomass, lipids