

УДК 66.098:546.11

Н.Б. Голуб, В.Ю. Бунча

ВПЛИВ ІОНІВ ЛУЖНИХ МЕТАЛІВ НА ПРИРІСТ БІОМАСИ ТА НАКОПИЧЕННЯ ЛІПІДІВ (МЕТАБОЛІЗМ) У *CHLORELLA VULGARIS*

In this paper, we analyze the influence of nutrient medium on the growth of algae biomass species *Chlorella vulgaris*. By employing methods of microscopy, one- and two-dimensional thin layer chromatography, as well as by using mathematical methods of interpolation and approximation of data, we show that reduction of nitrogen concentration, increase of salinity and concentration of potassium drastically decrease the biomass growth. The amount of lipids increases to 10–15% under nitrogen deficiency, moderate salinity (2,5 g/l NaCl) and in the joint action of both factors. The content of fatty acids and the number of minor factions also increases. At concentration of NaCl 2,5 g/l the content of 16:0 fatty acids increases, while the percentage of eicosapentaenoic acid 20:5 ω -3 is at the minimum level and increases by reducing the salinity to optimal level. The increase of potassium ions concentration does not promote the accumulation of lipids in the biomass of microalgae *Chlorella vulgaris*. The increase of salinity (2,5 g/l NaCl) can reduce energy costs for algae cultivation by increasing the amount of lipids within less period of time.

Вступ

У зв'язку зі зростанням екологічних, економічних і геополітичних проблем, пов'язаних з використанням традиційних видів мінерального палива, виникає необхідність їх заміни на альтернативні – відновлювані види енергії, що дасть можливість світовій спільноті диверсифікувати джерела отримання палива та зменшити залежність від викопної сировини.

Крім того, технології їх переробки створюють значне антропогенне навантаження на довкілля через викиди парникових газів: оксидів карбону, нітрогену та сульфуру. Таким чином, скорочення споживання традиційних енергоносіїв – нафти, газу і вугілля – та перехід на альтернативні джерела енергії є дуже актуальною проблемою, яка безпосередньо впливає на економіку і політику всіх країн імпортерів вуглеводневих енергоносіїв.

Сьогодні у світі, особливо в розвинутих країнах, доволі активно запроваджується використання біодизельного палива. Зазвичай для його отримання застосовують ліпіди технічних олійних культур вищих рослин. Проте внаслідок виснаження ґрунту олійними культурами та відведення під їх вирощування значної кількості сільськогосподарських площ, розробляються технології одержання відновлюваних джерел енергії (біодизелю, біоводню, біогазу тощо) з мікроводоростей. На відміну від олійних культур, у процесі росту біомаси мікроводоростей можна впливати на кількісний і якісний склад ліпідів за рахунок програмованої зміни метаболізму залежно від складу поживного середовища та параметрів процесу вирощування. Мікроводорості мають значні адаптивні властивості та

здатні пристосовуватись до доволі широкого інтервалу змін у поживному середовищі. У ході пристосування до стресових умов відбувається корегування функціональності біохімічного апарату клітин з поправкою на підвищений синтез тих або інших запасних речовин. Однак варто зазначити, що за одних і тих самих умов різні водорості накопичують різні речовини. Цей процес родо-, а доволі часто і видоспецифічний. Вміст ліпідів у мікроводоростях залежно від виду та за нормальних умов культивування становить 15–30 % від сухої маси, проте, за певних несприятливих або стресових умов може підвищуватись у деяких видів до 70 % [1]. Тому оптимізація процесу накопичення ліпідів і зміна їх складу в біомасі мікроводоростей є актуальною проблемою. На сьогодні відомим є вплив світла та температури, недостатності азоту, фосфору, марганцю й інших речовин на накопичення і формування ліпідів мікроводоростевими організмами [1–5]. До змін метаболізму ведуть також підвищена солоність середовища та стрес, пов'язаний із вмістом лужних металів [6].

Зелені водорості мають відносно широкий інтервал толерантності до солоності середовища, що перебуває у межах 1–3,5 % з оптимальним ростом у межах 2,5–3 %. У відповідь на зростання солоності (що часто виражається як відсотковий вміст NaCl) або осмотичного тиску середовища відбувається акумуляція синтезу невеликих молекул осморегулюючих речовин, до яких відносять багатоатомні спирти, наприклад гліцерол, і низькомолекулярні вищі жирні кислоти.

Іони калію необхідні для функціонування багатьох внутрішньоклітинних ферментів. До їх

числа належать ферменти, що каталізують фосфорилування карбоксильних груп або енольних аніонів, а також реакції елімінування з утворенням енолів. Калій бере участь у синтезі білків та у процесах осмотичної регуляції, від наявності у середовищі Na^+ і K^+ залежать також процеси поглинання поживних речовин. Згідно з даними [2], при нестачі калію у середовищі порушуються процеси росту та фотосинтезу і прискорюються дихальні.

Для отримання біомаси, багатой на цільову речовину, вигідним є застосування стратегії полістадійного культивування, за якого на першій фазі відбувається накопичення біомаси й індукція процесу акумуляції максимальної кількості цільової речовини [7].

Постановка задачі

Метою роботи є дослідження впливу поживного середовища на приріст біомаси та продукування ліпідів мікроводоростями виду *Chlorella vulgaris* для одержання біодизельного палива із заданими властивостями.

Для виконання поставленої мети необхідно дослідити вплив концентрації нітрогену, іонів калію та солоності в поживному середовищі на приріст біомаси і накопичення ліпідів у культурі мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

Матеріали та методи дослідження

Біологічним об'єктом дослідження є зелені мікроводорості виду *Chlorella vulgaris*, накопичені у лабораторних умовах. Культивування культури проводили у прозорих пластикових пляшках діаметром близько 5 см, в умовах термостату за температури 25 °С, режим освітлення 16/8 (світло/темрява, потужність 54 ватт). Склад середовища (мг/л): KNO_3 – 810, NaNO_3 – 680, NaH_2PO_4 – 480, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 250, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 17,5, Fe цитрат – 4, H_3BO_3 – 2,5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,125, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,03.

Біомасу переносили на середовища зі змішаним складом поживних елементів. При цьому відповідний об'єм суспензії осаджували центрифугуванням (5–10 хв при швидкості 1500 об/хв) і кількісно переносили на модифіковане середовище. При перенесенні на середовище, яке позбавлене одного з елементів, осаджену біомасу промивали дистильованою водою і повторно центрифугували.

Видалення із культурального середовища іону калію проводили шляхом заміщення KNO_3 на еквівалентну за нітрогеном кількість NaNO_3 , регуляція вмісту калію відбувалася за використання KCl .

Концентрацію клітин у суспензії визначали за допомогою підрахунку клітин, який проводився в малому квадраті камери Горяєва за формулою:

$$x = \frac{(a \cdot 4000 \cdot y)}{b}, \text{кЛ/мкЛ}, \quad (1)$$

де x – шукана кількість клітин у суспензії в 1 мм³; a – сума клітин у суспензії, підрахованих у певному об'ємі камери; b – кількість підрахованих малих квадратів; y – розведення суспензії.

Концентрацію висушеної біомаси (120 °С) визначали за формулою

$$C_B = \frac{(m_k - m_n) 1000}{V}, \text{г/л}, \quad (2)$$

де m_k – маса пробірки з біомасою після висушування; m_n – маса пустої сухої центрифужної пробірки; 1000 – перерахунок на об'єм 1 л при відбиранні аліквоти об'ємом V мл.

Екстракцію ліпідів із вологих клітин проводили за модифікованою системою Е. Блайя і В. Дайєра [8, 9]. Їх аналізували методами одно- і двовимірної тонкошарової хроматографії [10]. Для цього екстракти розчиняли у суміші $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 об.). Для одновимірної хроматографії використовували нейтральну систему складу хлороформ:метанол:вода (65:25:4 об.). Для двовимірної хроматографії використовували лужний розчин складу $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/25\% \text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:70:5,5:15 об.) і кислий розчин складу $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (40:15:14:13:7,5 об.). Для проявлення хроматографічних пластин в обох випадках використовували 5 %-ий розчин фосфомолібденової кислоти (для визначення фосфоліпідів) або α -нафтол (для специфічного визначення гліколіпідів). Розчин наносили у формі аерозолю на пластинку, яку надалі прогрівали при 120 °С до проявлення [10, 11].

Для опрацювання результатів дослідів використовували методи інтерполяції та апроксимації даних. Для оцінки величин за результатами вимірювань, що містять випадкові похибки, застосовано метод найменших квадратів як один з методів регресійного аналізу. Графічну інтерполяцію результатів проведено у середо-

вищі MSExcel, обробку результатів за методом найменших квадратів виконано в середовищі MathCAD. Для апроксимації даних використовували кілька видів рівнянь регресії, залежно від досліду – логістичну та логарифмічну апроксимації.

Рівняння логістичної апроксимації має такий вигляд:

$$y(x) = \frac{a}{1 + b \cdot e^{-c \cdot x}} \quad (3)$$

Параметр a визначає верхню асимптоту графіка, тобто його “розтягненість” вздовж осі ординат, параметр b визначає положення вихідної точки графіка при його перетині з віссю ординат, від величини параметра c обернено залежить швидкість переходу кривої у горизонтальне положення – стаціонарну стадію.

Рівняння логарифмічної апроксимації таке:

$$y(x) = a \cdot \ln(x + b) + c \quad (4)$$

Параметр a показує швидкість зростання графіка вздовж осі ординат, b визначає точку на осі абсцис, через яку проходить вертикальна асимптота графіка, c виконує паралельне перенесення кривої вздовж осі ординат.

Результати та їх обговорення

Хімічний склад *Chlorella vulgaris* за оптимальних умов культивування перебуває у межах (%): білки – 45–55, вуглеводні – 15–25, жири – 10–20, мінерали і вітаміни – близько 10. При вирощуванні з використанням неорганічного джерела вуглецю вміст нейтральних ліпідів становить приблизно 2 % сухої маси клітин, близько 6 % – фосfolіпіди і так само близько 6 % – гліколіпіди.

Для дослідження впливу солоності на метаболізм мікродоростей було проведено дві

серії дослідів. У першій середовище модифікували за фактором зміни солоності, у другій зміна рівня солоності середовища відбувалась одночасно з видаленням джерел нітрогену.

Було розглянуто чотири середовища: стандартне (вміст NaCl = 0 г/л) та середовища з концентрацією NaCl 2,5, 9 та 15 г/л. Встановлено, що швидкість приросту біомаси в початковий період на середовищах із вмістом NaCl у концентрації 9 та 15 г/л перевищує її зростання на середовищах із меншим вмістом NaCl – 0 та 2,5 г/л (таблиця). Найбільші показники накопичення ліпідів відносно приросту біомаси має культура, культивована на середовищі з концентрацією NaCl = 2,5 г/л. Таким чином, внесення NaCl у середовище культивування у межах 0,25 % дає змогу збільшити накопичення ліпідів культурою *Chlorella vulgaris*, не зменшуючи приріст її біомаси. Частка ліпідів майже не відрізняється для культур, вирощених на стандартному середовищі та середовищах із вмістом NaCl 9 та 15 г/л. За таких умов підвищення накопичення ліпідної фракції спостерігається вже після третього дня дослідження, її частка протягом всього періоду дослідження переважає частку ліпідної фракції зразка, вирощеного в нормальному середовищі, приблизно на 10 % (див. таблицю).

Деяке підвищення частки ліпідів спостерігається також у середовищі із вмістом NaCl 15 г/л, однак, варто врахувати, що відбувається цей процес у той період, коли уповільнюється приріст біомаси, тож зростання вмісту ліпідів не спричинить видимого ефекту в кількісному показнику їх продукування. За даними хроматографічного аналізу найбільш значимим за умов NaCl 2,5 г/л є вміст 16:0 жирної кислоти, у той час як процентний вміст ейкозапентаєнової кислоти 20:5 ω -3 перебуває на мінімальному рівні та підвищується в міру зниження солоності до оптимального рівня.

Таблиця. Приріст біомаси та накопичення ліпідів у середовищах без нітрогену і з різним вмістом NaCl

Час дослідів, діб	Середовище							
	I (стандартне)		NaCl 2,5 г/л		NaCl 9 г/л		NaCl 15 г/л	
	Бм, г/л	Ліп, г/л	Бм, г/л	Ліп, г/л	Бм, г/л	Ліп, г/л	Бм, г/л	Ліп, г/л
0	0,12	0,019	0,12	0,019	0,11	0,019	0,11	0,019
3	0,13	0,023	0,13	0,029	0,12	0,024	0,13	0,023
5	0,15	0,029	0,15	0,036	0,15	0,031	0,16	0,03
7	0,16	0,032	0,165	0,043	0,19	0,04	0,19	0,038
10	0,19	0,04	0,205	0,0574	0,24	0,05	0,21	0,044

Примітка. Бм – біомаса; ліп – ліпіди.

Відсутність нітрогену призводить до зменшення приросту біомаси у середовищі з невисоким вмістом NaCl (N-/NaCl 0,23 г/л та N-/NaCl 0,5 г/л). Збільшення вмісту NaCl до рівня 2,5 г/л веде до підвищення логарифмічної фази росту (рис. 1). Одночасно зростає частка ліпідів порівняно з культурою, вирощеною на стандартному середовищі. Найбільшим значенням цього параметра характеризуються культури середовищ N-/NaCl 0,23 г/л та N-/NaCl 2,5 г/л (рис. 2).

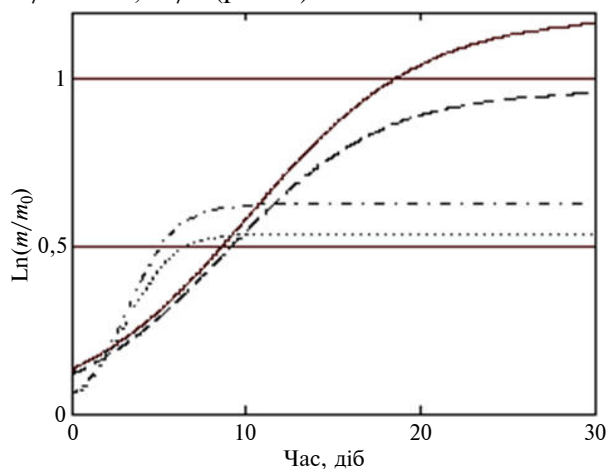


Рис. 1. Приріст біомаси у середовищах, позбавлених джерел нітрогену і з різним вмістом NaCl; — — — стандартне середовище (NaCl \approx 0); — середовище N-/NaCl 0,23 г/л; - - - - середовище N-/NaCl 2,5 г/л; - · - · - · - середовище N-/NaCl 0,5 г/л

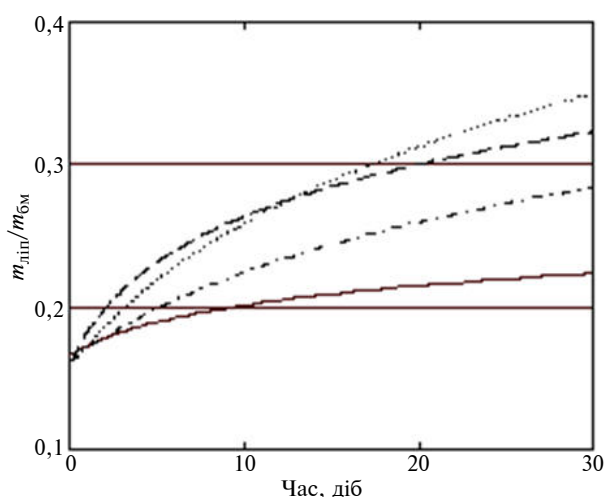


Рис. 2. Частка ліпідів у біомасі; — — — середовище I; — середовище N-/NaCl 0,23 г/л; - - - - середовище N-/NaCl 2,5 г/л; - · - · - · - середовище N-/NaCl 0,5 г/л

Найбільшим загальним вмістом ліпідів у біомасі характеризується культура з середовища N-/NaCl 2,5 г/л. Культивування біомаси і *Chlorella vulgaris* в умовах цього середовища дає змогу досягнути значного вмісту ліпідів у культурі, однак, потребує попереднього накопичення біомаси в середовищі з достатнім вмістом нітрогену.

Високі значення частки ліпідів у біомасі та рівень продукування біомаси, порівнюваний зі стандартними умовами її накопичення, робить середовище NaCl 2,5 г/л привабливим для використання у технологічному процесі. При цьому зникає потреба у проведенні попереднього накопичення біомаси, тобто процес отримання культури мікродоростей, збагаченої ліпідами, може проводитись в одну стадію, що скорочує технологічний процес та економічні витрати, пов'язані з енергетичним та операційним забезпеченням проведення другої стадії.

У праці [2] показано, що оптимальними умовами для накопичення ліпідів клітиною є концентрація солей у середовищі на рівні 12% (за температури 14,5 °C). При цьому збільшується утворення насичених низьковуглецевих кислот, а при відхиленні від зазначених умов зростає відносний рівень ненасичених довголанцюгових кислот.

Відомо, що на ріст і розмноження мікродоростей більший вплив чинять іони калію, ніж натрію. Оскільки вміст калію у морській воді приблизно вдвічі менший за вміст натрію, вибірка концентрацій калію у розчинах середовища культивування для дослідження його впливу на приріст біомаси ґрунтується на нижчих середніх значеннях порівняно з дослідженнями, що проводились із вмістом натрію у середовищі культивування. Значення досліджуваних концентрацій калію становлять у перерахунку на кількість елементу (мг/л): 5 (надалі у тексті — середовище “К-”), 100 (далі — К 0,1 г/л), 1 (далі — К 1 г/л), 5 (далі — К 5 г/л), 10 (далі — К 10 г/л).

Зміну приросту біомаси залежно від концентрації калію у середовищі наведено на рис. 3.

З рис. 3 чітко видно, що швидкість росту і максимальне накопичення біомаси значно зменшується при відхиленні концентрації калію від оптимальної. Математична апроксимація отриманих даних (рис. 4) підтверджує, що

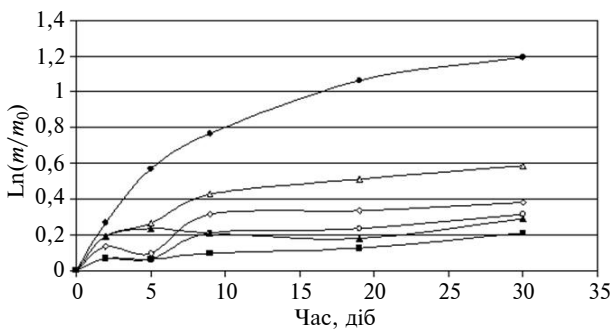


Рис. 3. Приріст біомаси залежно від вмісту калію у середовищі: ● – I; ○ – K-; ◇ – K 0,1 г/л; Δ – K 1 г/л; ▲ – K 5 г/л; ■ – K 10 г/л

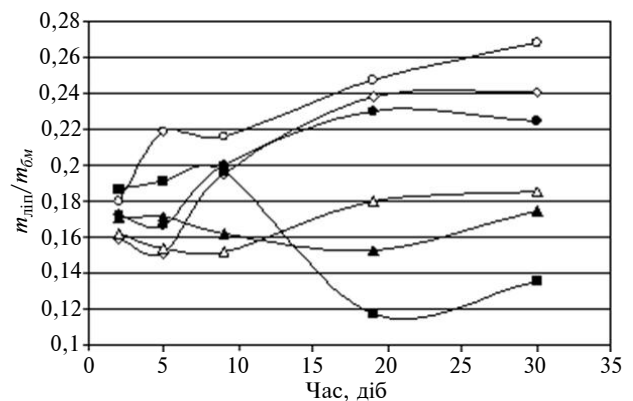


Рис. 5. Частка ліпідів у біомасі залежно від вмісту калію у середовищі: ● – I; ○ – K-; ◇ – K 0,1 г/л; Δ – K 1 г/л; ▲ – K 5 г/л; ■ – K 10 г/л

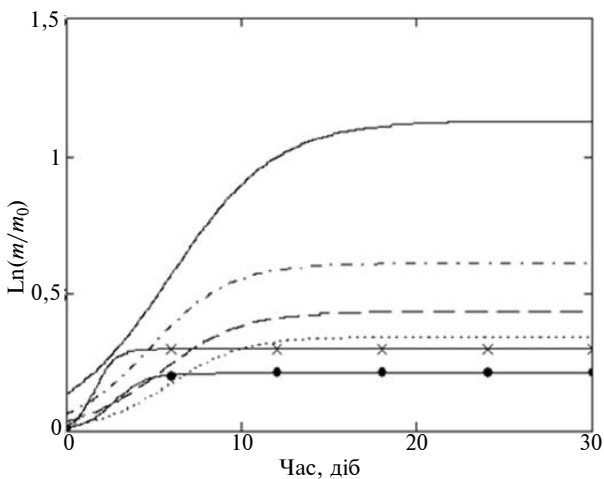


Рис. 4. Графік математичної апроксимації даних приросту біомаси залежно від вмісту калію у середовищі: — – I; – K-; - - - - K 0,1 г/л; - · - · - K 1 г/л; × – K 5 г/л; ● – K 10 г/л

характеристики росту *Chlorella vulgaris* в умовах, відмінних від умов оптимального середовища, значно погіршуються і, незважаючи на деяке підвищення швидкості росту у перші дні, не перевищують показники культури, вирощеної на стандартному середовищі, в якому концентрація калію ≈ 300 мг/л.

З рис. 5 видно, що збільшення вмісту калію у середовищі негативно впливає на значення частки ліпідів у біомасі.

У кількох випадках (середовища K 0,1 г/л, I та K 1 г/л), незважаючи на позитивну тенденцію росту згідно з кривими апроксимації, крива частки ліпідів у біомасі спочатку дещо знижується, проте, надалі показник стабілізується і починає зростати. Така поведінка добре вкладається у закономірності поведінки культури в період стресу (згідно з графіком "тріади" Г. Сельє). Її можна пояснити тим, що концент-

рація калію за таких умов створює позитивний вплив на приріст культури, однак, є стресовим фактором для накопичення ліпідів. Оптимальним для накопичення ліпідів у біомасі згідно з кривою апроксимації (рис. 6) є рівень вмісту калію, що відповідає середовищу з концентрацією калію в 1 г/л. З огляду на частку ліпідів у біомасі, оптимальним для накопичення цих речовин є середовище зі зменшеним вмістом калію, концентрацією 5 мг/л (середовище K-).

Однак приріст культури в оптимальному середовищі набагато перевищує аналогічний показник для інших середовищ культивування, чим компенсується зростання вмісту ліпідів у біомасі за умов відповідного середовища. Таким чином, зміна вмісту калію у поживному середовищі не може розглядатись як позитивний модулятор накопичення високоліпідної біомаси мікрородостей *Chlorella vulgaris* у промислових умовах.

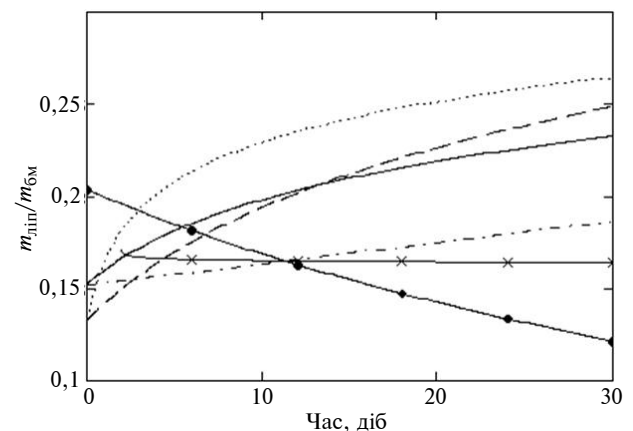


Рис. 6. Графік математичної апроксимації даних приросту біомаси залежно від вмісту калію у середовищі: — – I; – K-; - - - - K 0,1 г/л; - · - · - K 1 г/л; × – K 5 г/л; ● – K 10 г/л

Висновки

На приріст біомаси *Chlorella vulgaris* впливає зміна концентрації нітрогену, калію та рівня солоності середовища. При зменшенні концентрації нітрогену, збільшенні солоності та зміні концентрації калію різко зменшується приріст біомаси. Клітини за цих умов зменшуються у розмірах, а в їх складі збільшується вміст легких фракцій.

Кількість ліпідів за умов нестачі нітрогену, помірної солоності (2,5 г/л NaCl) та при сумісній дії обох факторів збільшується на 10 %. Зміна вмісту іонів калію у культуральному середовищі не є сприятливим чинником для накопичення значної кількості ліпідів у біомасі мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

Дослідження ліпідів за використання методів одно- та двовимірної хроматографії виявило зміни якісного складу та кількісного вмісту ліпідів у біомасі *Chlorella vulgaris* за культивування у стандартних умовах та модифікованому середовищі. В останньому випадку збільшується вміст жирних кислот і кількість мінерних фракцій. Найбільш значним за концентрації NaCl 2,5 г/л є вміст 16:0 жирної кислоти, у той час як відсотковий вміст ейкозапен-

таєнової кислоти 20:5 ω -3 перебуває на мінімальному рівні і підвищується в міру зниження солоності до оптимального рівня.

Використання одержаних результатів для промислового виробництва дає змогу знизити енергетичні витрати за рахунок зменшення тривалості культивування. Так, при культивуванні на середовищі NaCl 2,5 г/л накопичення ліпідів перебуває на тому ж рівні, що й у культурі мікроводоростей, культивованій на середовищі, позбавленому джерел нітрогену, але відбувається протягом значно меншого часу. При цьому приріст біомаси у перші п'ять днів перевищує її приріст за стандартних умов. Таким чином, друга стадія накопичення ліпідів у дво-стадійному процесі культивування високоліпідної біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* може бути відсутня.

У подальшому пропонується дослідження збільшення приросту біомаси та кількості ліпідів за використання в культуральному середовищі помірної солоності (NaCl 2,5 г/л) та топочних газів. Одержані результати стануть підґрунтям для створення технології одержання біодизельного пального з мікроводоростей за використання топочних газів.

1. Q. Hu, "Chapter 5: Environmental effects on cell composition", in *Handbook of Microalgal Culture*, A. Richmond, Ed., Blackwell Science Ltd, Oxford OX2 0EL, UK, 2004, pp. 83–93.
2. E.W. Becker, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, 1994, 295 p.
3. S. Chinnasamy, B. Ramakrishnan, A. Bhatnagar, K.C. Das, "Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature", *Int. J. of Molecular Sciences*, vol. 10, pp. 518–532, 2009.
4. S. Hatano, K. Kabata, M. Yoshimoto, H. Sadakane, "Accumulation of Free Fatty Acids during Hardening of *Chlorella ellipsoidea*", *Plant Physiology*, vol. 70, pp. 1173–1177, 1982.
5. M.M. Basova, "Fatty acid composition of lipids in microalgae", *Int. J. on Algae*, vol. 7, pp. 33–57, 2005.
6. *Инатова В.И.* Адаптация водных растений к стрессовым факторам среды. – М.: Графикон-принт, 2005. – 224 с.
7. D. Hazeelbeck, E.H. Dunlop, "Photosynthetic oil production in a two-stage bioreactor", U.S. Patent 20080086931A1, Int. Cl. A01G 7/10, 17.04.2008.
8. E.G. Bligh, W.J. Dyer, "A rapid method for total lipid extraction and purification", *Can. J. Biochem. Physiol.*, no. 37, pp. 911–917, 1959.
9. T. Lewis, P.D. Nichols, T.A. McMeekin, "Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs", *J. of Microbiol. Methods*, no. 43, pp. 107–116, 2000.
10. E.W. Hammond, *Chromatography for the analysis of lipids*, Boca Raton, USA: CRC Press, 2000.
11. J. Harwood, F. Gunstone, F. Padley, *The lipid handbook*, Cambridge: University Press, 1994.