

УДК 574.1:582.26

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ

© 2013 г. А.В. Пилигаев², К.Н. Сорокина^{1,2}, А.В. Брянская¹,
Е.А. Демидов¹, Р.Г. Кукушкин², Н.А. Колчанов¹, В.Н. Пармон², С.Е. Пельтек¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 26 сентября 2012 г. Принята к публикации 6 мая 2013 г.

Рассмотрены подходы к поиску новых источников непищевого возобновляемого сырья для получения биотоплива третьего поколения, а именно: штаммов микроводорослей, обитающих в природных экосистемах Западной Сибири. Исследование биоразнообразия данного региона представляет большой интерес в связи с широким ареалом обитания и малой изученностью свойств микроводорослей. В ходе работы был выделен ряд штаммов, один из которых, *Chlorella spp.* A1125, обладал необходимыми характеристиками для культивирования в пилотном фотобиореакторе, в том числе максимальной продуктивностью по липидам – 0,081 г/л (23 % от сухого веса клетки) при росте на минимальных средах. Штамм характеризуется высоким содержанием как насыщенных жирных кислот C16:0 (25 %), так и ненасыщенных C16:2 (16 %) и C18:2 (27 %), что делает его перспективным кандидатом для производства биотоплива третьего поколения.

Ключевые слова: микроводоросли, культивирование, возобновляемые ресурсы, липиды.

ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие отмечено возрастанием интереса к разработке технологий, основанных на использовании возобновляемого сырья, в том числе для получения экологически безопасного моторного топлива. В зависимости от типа сырья, применяемого для производства, биотопливо подразделяется на три поколения. Наиболее широко распространенным является биотопливо первого поколения, для которого в качестве сырья используются сельскохозяйственные зерновые культуры. В частности сахарный тростник, кукуруза, пшеница используются для производства биоэтанола, в то время как масличные культуры, такие, как соя, рапс, масличная пальма, подсолнечник и другие используются для производства биодизельного топлива. На

сегодняшний день мировыми лидерами по производству биоэтанола являются Бразилия и США, а основная доля производимого биодизельного топлива сосредоточена в странах ЕС. Основным недостатком этих видов биотоплива является их возрастающая конкуренция с сельским хозяйством за источники растительного сырья и земельные ресурсы.

В производстве биотоплива второго поколения основную часть сырьевой базы составляет непищевая биомасса, а именно древесная масса (целлюлоза, лигнин), отходы деревопереработки и непищевые остатки культивируемых растений сельского хозяйства, а также менее ценное сырье (солома). Однако ввиду высокой энергозатратности процесса производства и низкого выхода целевого продукта в настоящее время в мире существует лишь несколько

предприятий, которые успешно производят биотопливо второго поколения.

Использование превосходящих по энергетической выгоде и более дешевых микроводорослей в качестве сырья для производства биотоплива положило начало созданию третьего поколения биотоплива. По сравнению с производством биотоплива первого и второго поколений производство микроводорослей является менее энергозатратным, а также не предполагает использования сельскохозяйственных земель. Кроме того, важными показателями эффективности использования микроводорослей являются их высокая скорость роста (в том числе круглогодичного), а также высокое содержание липидов в клетках (до 80 %), что превышает аналогичные показатели отдельных маслических культур (до 40 % у рапса), являющихся исходным сырьем для получения биодизельного топлива и бионефти. Таким образом, считается, что именно микроводоросли обладают значительным потенциалом для замены ископаемого энергетического сырья в будущем.

В связи с этим актуальным является поиск штаммов микроводорослей, являющихся источником биомассы, характеризующихся одновременно высокой продуктивностью, а также низкой ресурсо- и энергозатратностью при культивировании и переработке, с широким спектром получаемых продуктов. Особое внимание привлекает возможность изучения природного биоразнообразия фототрофных микроорганизмов, в том числе обитающих в экстремальных сообществах, например в условиях высоких или низких температур, повышенной солености. Метаболические особенности отдельных штаммов также позволят найти микроводоросли, не только обладающие необходимыми характеристиками (высокой продуктивностью по липидам и высокой скоростью роста), но также и требуемым составом липидов, например, содержащих пониженное количество ненасыщенных жирных кислот, что позволит получать на их основе биотопливо более высокого качества с высоким цетановым числом и сниженной способностью к окислению. Отдельные штаммы микроводорослей, помимо производства моторных топлив, также целесообразно применять в процессах получения пигментов, сахаров, витаминов и антибиотиков (Becker, 2004).

В настоящее время в мире существует более 50 тыс. видов микроводорослей, широко распространенных не только в водной, но и наземной среде обитания (Richmond, 2004). К настоящему времени идентифицировано лишь около 4000 видов, среди которых относительно легко выделяются в культуры лишь диатомовые и зеленые водоросли (Khan *et al.*, 2009). Западная Сибирь, обладая значительными водными ресурсами, представляет интерес для исследования биоразнообразия микроводорослей и поиска перспективных штаммов. Так, например, из 12 тыс. озер региона для большинства водоемов изучение флоры либо проводилось эпизодически, либо не проводилось вообще (Ткачев, 2001), в некоторых из них недавно были обнаружены новые и редкие виды и формы водорослей, например синезеленые (цианопрокариоты) (Романов, 2008). Т.А. Сафоновой с соавт. (Сафонова, Ермолаев, 1983; Сафонова, 1996а, б; Сафонова, Шауло, 2006) были выявлены и уточнены таксономический состав, особенности пространственно-временной неоднородности сообществ планктонных гидробионтов различных озер Западной Сибири. Соленые озера Кулундинской степи представляют значительный интерес для изучения в связи с разнообразием условий обитания экстремальных микроорганизмов и малой изученностью их свойств. Показано, что в основном в течение весенне-летнего периода доминировали синезеленые водоросли, уступая место зеленым нитчатым водорослям поздним летом и осенью (Веснина и др., 2005). В содовых озерах наряду с синезелеными велика доля в численности и биомассе зеленых водорослей независимо от сезона года.

К настоящему времени накоплен существенный объем данных относительно содержания масла у некоторых перспективных видов микроводорослей в расчете на сухую массу клеток. Выявлено, что содержание масла в штаммах-продуцентах липидов составляет от 20 до 80 % в расчете на сухую массу клеток (Rosenberg, 2008). Наиболее перспективными из них являются виды *Chlorella sp.* (20–50 % липидов), *Neochloris oleoabundans* (35–54 %), *Nannochloropsis sp.* (31–68 %), *Botryococcus braunii* (25–85 %). Однако на практике столь высокие выходы по липидам не достижимы в условиях реального производства, при котором культивирование

осуществляют в фотобиореакторах различной конструкции, в том числе панельных, тубулярных, эрлифтных, пластиковых пакетах и др. (Wang *et al.*, 2012), а также в открытых бассейнах или прудах. Наибольшее количество работ посвящено исследованию свойств отдельных штаммов микроводоросли *Chlorella* в панельных фотобиореакторах, для которой в целом удается достичь продуктивности по липидам на уровне 20–50 % в пилотном биореакторе. Показано, что продуктивность сильно варьирует в зависимости от используемого способа культивирования: миксотрофного, гетеротрофного или на сточных водах (Andersen, 2005). Кроме того, в литературе имеется мало источников, посвященных исследованию процессов культивирования отдельных штаммов в фотобиореакторах большого объема с целью получения готовой биомассы с высоким содержанием липидов.

В данной работе было проведено выделение микроводорослей из природных образцов, отобранных на территориях Западной Сибири. Штаммы были выделены из акватории Новосибирского водохранилища, а также из соленых озер Кулундинской степи, отличающихся разнообразием флоры зеленых водорослей. В ходе исследований был выделен штамм *Chlorella* spp. A1125, обладавший высокой скоростью роста и стабильностью поддержания в культуре. Исследована продуктивность выделенного штамма по биомассе и липидам при культивировании в пилотном фотобиореакторе и определен его жирнокислотный состав.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение чистых культур микроводорослей с использованием проточной цитофлюориметрии

Образцы почв Западной Сибири помещали в стерильную селективную среду ВВМ, состоящую из следующих компонентов (мг/л): KH_2PO_4 (175), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75), NaNO_3 (250), K_2HPO_4 (75), NaCl (25), Na_2EDTA (10), KOH (0,62), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,98), H_2SO_4 (0,001), H_3BO_3 (8,05) и 1 мл стокового раствора микроэлементов (г/л), состоящего из H_3BO_3 (2,86), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,22), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,39), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,08),

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,05) в 1 л дистиллированной воды, pH доводили до 6,8 с помощью HCl или NaOH . Образцы культивировали в течение одного месяца. После проводили сортировку полученных накопительных культур с использованием проточного цитофлюориметра BD FACS Aria. Для возбуждения флюоресценции хлорофилла использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Измерение спектра флюоресценции осуществляли с использованием дихроичного фильтра на длинноволновую часть спектра (655LP) и интерференционного полосового фильтра на 695/40 нм. После этого проводили посев полученной клеточной суспензии на плотную агаризованную среду ВВМ и через три недели культивирования при 30 °C и фотопериоде 18 ч день/6 ч ночь отмечали отдельные колонии микроводорослей, не содержащие сопутствующей микрофлоры. Два последующих пересева изолированных колоний на аналогичную среду позволили получить ряд чистых культур микроводорослей.

Анализ нуклеотидной последовательности гена *18s* рРНК

ПЦР-амплификацию фрагмента гена *18s* рРНК проводили в присутствии 20 нг ДНК в общем объеме 50 мкл, содержащем 0,2 мМ смеси четырех дезокситрифосфатов, 1,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мкМ праймеров, буфера для Taq ДНК-полимеразы, и 0,05 е.а./мкл Taq ДНК-полимеразы (все производства «Сибэнзим», Россия). Для амплификации фрагмента гена *18s* рРНК использовали следующие пары праймеров: 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' и 5'-CCGTCAATTCTTTRAGTTT-3'; 5'-CTTAAAGGAATTGACGGA-3' и 5'-GCTGCGTTCTTCATGGATGC-3'. ПЦР-амплификацию проводили в амплификаторе MyCycler (производства BioRad): 95 °C – 3 мин, 40 циклов 95 °C – 30 с, 54 °C – 20 с, 72 °C – 1 мин 30 с; 72 °C – 10 мин. Реакцию амплификации фрагмента гена *18s* рРНК методом ПЦР для определения нуклеотидной последовательности проводили с использованием набора *BigDye*® Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу. Определение нуклеотидной последовательности проводили в ЦКП СО РАН «Секвенирование ДНК».

Для культивирования штамма микроводоросли *Chlorella spp.* A1125 был сконструирован пилотный панельный фотобиореактор. Внутри фотобиореактора перемешивание происходило методом барботажки смеси газов через пластиковую трубку, обеспечивающую равномерное распределение газа в виде мелких пузырьков. Объем фотобиореактора составил 125 л, рабочий объем – 110 л, размеры камеры – 1500 мм × 1000 мм × 200 мм. Поддержание постоянной температуры осуществлялось с использованием встроенного термостата от температуры окружающей среды до 32 °С. Блок двустороннего освещения фотобиореактора состоял из 8 ламп холодного дневного света со спектральным диапазоном излучения 530–610 нм, расположенных на расстоянии 10 см от поверхности фотобиореактора. Было установлено освещение 120 мкмоль м⁻²с⁻¹ и фотопериод 18 ч день/6 ч ночь. Культивирование проводили при начальной посевной концентрации культуры, составляющей 5 × 10⁴ клеток мл⁻¹, и температуре 25 °С в течение 20 сут. После осаждения клеток раствор сливали, осадок отделяли от остатков жидкости путем сепарации. Полученную пасту использовали в экспериментах.

Экстракция липидов из биомассы микроводорослей

Липиды экстрагировали по методу Фолча. Для этого пасту микроводорослей (1 г) интенсивно перемешивали в присутствии метанол-хлороформенной смеси (1 : 2). После к экстракту добавляли 0,9 %-й раствор KCl из расчета 0,25 части от полученного объема экстракта и интенсивно перемешивали. После расслоения фаз органическую фазу (в ней и содержатся липиды) отделяли. Растворитель отгоняли на роторном вакуумном испарителе при температуре 37–40 °С. После окончания жидкость выпаривали и взвешивали осадок.

Анализ жирнокислотного состава липидов микроводорослей методом газовой хроматомасс-спектрометрии

Перед началом анализа предварительно проводили переэтерификацию липидного экстракта с целью получения метиловых эфиров жирных

кислот. Навеску липидов (5 мг) растворяли в смеси толуола (1 мл), после добавляли раствор 1 %-й серной кислоты в метаноле (2 мл), интенсивно перемешивали. Смесь кипятили в течение 2 часов, после добавляли 5 мл 5 %-го раствора NaCl. Полученные метиловые эфиры жирных кислот двукратно экстрагировали 5 мл гексана. Гексановый слой промывали раствором 2 % NaHCO₃ и сушили над безводным Na₂SO₄. Раствор фильтровали для удаления сушильного агента и растворитель удаляли в токе азота.

Состав метиловых эфиров жирных кислот анализировали на газовом хроматомасс-спектрометре Agilent 7000В с ионизацией электронным ударом (70 эВ), оснащенный капиллярной колонкой DB-5-MS, с температурным градиентом от 80 до 290 °С, повышавшимся со скоростью 4 °С/мин. Температура инжектора и детектора была установлена на 250 и 230 °С соответственно. Поток газа-носителя составил 1,2 мл/мин. Идентификацию соединений производили путем сравнения получаемых данных с библиотекой спектров известных соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С целью получения природных изолятов микроводорослей проводили выделение их чистых культур. Для этого в летний период 2011 г. были отобраны природные образцы почвы и воды из соленых озер, расположенных в Баганском и Карасукском районах Новосибирской области (оз. Круглое, Долгое), и из пресноводных экосистем, в том числе из южной оконечности Новосибирского водохранилища. Образцы отбирались по стандартной для гидробиологических работ схеме (Вассер и др., 1989). Всего было отобрано 53 образца почв и воды.

Разделение ассоциаций микроорганизмов проводили с использованием метода проточной цитофлюориметрии, позволяющего проводить эффективное отделение сопутствующей микрофлоры (бактерий и грибов) по различию в сигнале от объектов в области эмиссии хлорофилла. Выделение чистых культур проводили с целью поиска новых штаммов микроводорослей, характеризующихся высокой скоростью роста и содержанием липидов, пригодных для массового культивирования для последующего производства липидосодержащей биомассы

в пилотном фотобиореакторе. Процедура выделения чистых культур микроводорослей включала следующие стадии: оценку состава природного микробиологического сообщества, получение накопительных культур микроводорослей, визуальное исследование состава накопительных культур, выделение чистых культур микроводорослей с использованием проточной цитофлюориметрии.

Сбор и анализ полевого материала показали, что доминирующими в сообществах исследованных природных источников являются представители цианобактерий, нитчатых зеленых водорослей и диатомей. Наиболее перспективными для выделения микроводорослей были культуры, полученные из природных проб соленых озер, в которых в период исследований наблюдалось развитие колониальных и одноклеточных цианобактерий, диатомовых и зеленых водорослей.

Из-за присутствия в образцах посторонней микрофлоры (бактерии, дрожжи, грибы) эффективность разделения значительно варьировала для разных образцов. Всего из отобранных в природе образцов на первоначальном этапе удалось эффективно выделить 75 культур, из которых многократным пересевом на агаризованных средах в наших лабораторных условиях стабильно поддерживаются 10 культур, относящихся к отряду Chlorophyta. Сводные результаты приведены в табл. 1.

Для оценки применимости отдельных культур в качестве источника биомассы предварительно проводили культивирование полученных изолятов в конических колбах в объеме 200 мл при непрерывном барботаже культуры сжатым воздухом в течение 10 дней с начальной концентрацией 5×10^4 клеток мл⁻¹. Было показано, что

большинство протестированных изолятов не обладали способностью к росту в суспензионной культуре (ряд штаммов имели сезонный характер роста) или достаточной скоростью роста. В результате для дальнейших исследований был взят изолят A1125, обладавший наилучшими характеристиками, выделенный из образцов, отобранных в литоральной зоне Новосибирского водохранилища. Исследование видовой принадлежности изолята по 18s рРНК показало высокую степень родства штамма *Chlorella spp.* A1125 с штаммом *Chlorella sp.* NMX37N (GI: 346721045). Чистая культура выделенной микроводоросли состояла преимущественно из одиночных шаровидных или эллипсоидных клеток с тонкой и гладкой оболочкой, одиночным хлоропластом. Ядро клеток без окраски незаметно, размер клеток варьировался от 1,5 до 10 мкм в диаметре, размножение происходит автоспорами. Морфологически штамм соответствовал типичному описанию рода *Chlorella* (Царенко, 1990).

В качестве сред для культивирования штамма *Chlorella spp.* A1125 в фотобиореакторе использовали среды с различным содержанием азота – с повышенным BBM-3N и с пониженными BBM и Chu-13. Была проведена оценка влияния различных параметров на рост биомассы: температуры, CO₂ и лимитирования культуры по источнику азота. Оценка влияния температуры на накопление биомассы в фотобиореакторе в среде BBM-3N позволила получить данные о том, что при 23 °С специфическая скорость роста составила $\mu_{\max} = 0,123 \text{ сут}^{-1}$, время удвоения культуры – 5,6 сут. При повышении температуры до 26 °С $\mu_{\max} = 0,13 \text{ сут}^{-1}$, время удвоения – 5,3 сут. Таким образом, при разнице температуры в 3 °С параметры роста культуры практически не

Таблица 1

Результаты выделения микроводорослей из природных образцов в Новосибирской области методом проточной цитофлюориметрии

Источник образцов	Количество отобранных образцов	Количество выделенных культур микроводорослей	Количество стабильно поддерживаемых культур микроводорослей
Южная оконечность Новосибирского водохранилища, (почва и вода)	43	64	9
Оз. Долгое	5	7	1
Оз. Круглое	5	4	0

изменились. Для оценки влияния CO_2 на рост биомассы *Chlorella spp.* A1125 проводили подачу 1,5 % газовой смеси в среде ВВМ-3М и при температуре 26 °С. При этом специфическая скорость роста культуры составила $\mu_{\text{max}} = 0,52 \text{ сут}^{-1}$ и время удвоения 1,32 сут. Таким образом, подача 1,5 % CO_2 в культивационную среду оказала значительное влияние на специфическую скорость роста, которая увеличилась в 4 раза. Исследование влияния состава среды на выход биомассы штамма *Chlorella spp.* A1125 в среде с пониженным содержанием азота (0,371 г/л) показало, что наблюдаемые параметры культивирования составляют: $\mu_{\text{max}} = 0,11 \text{ сут}^{-1}$, время удвоения – 6,2 сут. Таким образом, содержание азота в культивационной жидкости оказывало существенное влияние на рост биомассы. При дополнительной подпитке культуры CO_2 в среде значительный эффект на рост биомассы достигался только при наличии доступных источников азота.

Исследование динамики накопления липидов микроводорослью *Chlorella spp.* A1125 проводили при культивировании на среде Chu-13. Накопление липидов количественно определяли путем гравиметрического анализа экстрагированной из биомассы липофильной фракции на протяжении всего срока культивирования. Как показано в табл. 2, в течение всего срока культивирования наблюдается равномерное увеличение биомассы. В то же время накопление липидов имеет двухфазный характер: до 13-го дня содержание липидов возрастает и достигает максимума накопления – 0,081 г/л (23 % липидов по сухому весу), после наблюдается резкое уменьшение продукции липидов и на 18-е сутки составляет 0,053 г/л (10 % липидов по сухому весу).

Исследование накопления липидов при культивировании изолированного штамма *Chlorella spp.* A1125 показало, что в течение культиви-

рования наблюдается максимум накопления (80 мг/л на 13-й день культивирования), который уменьшается до 50 мг/л при выходе накопления липидов на плато. Стоит отметить, что несмотря на двухфазный характер метаболизма липидов, рост биомассы остается неизменным и составляет 30 мг л⁻¹ сутки⁻¹.

На протяжении всего срока культивирования проводили анализ жирнокислотного состава липидной фракции микроводоросли *Chlorella spp.* A1125 методом газовой хроматомасс-спектрометрии. Результаты измерений приведены в табл. 3.

Как видно из представленных данных, в липидном экстракте присутствовали насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты (ЖК), наибольшую массовую долю из которых составляли С16:2, С16:0, С18:1 и С18:2.

В течение всего срока культивирования наблюдалась тенденция к разнонаправленному изменению в составе жирных кислот. Так, количество ненасыщенных жирных кислот было минимальным, а насыщенных – максимальным лишь в начале культивирования (лаг-фаза). Следует отметить, что количество коротких жирных кислот (С14:0) было максимальным в начале культивирования. Кроме того, количество триненасыщенных жирных кислот достоверно снижалось в течение всего культивирования. Так, содержание С14:0 было максимальным в начале культивирования (8 %), однако уже на 13-е сутки содержание составило лишь 2 %. Изолированный штамм *Chlorella spp.* A1125 также выгодно отличался высоким и стабильным содержанием насыщенных ЖК в течение всего периода культивирования: для С16:0 значения составляли 22–26 %, для С18:0 – 2–5 %. Для ненасыщенных ЖК количество С16:1 имело достоверное повышение от 3 до 5 %, а С18:1 равномерно повышалось начиная с

Таблица 2

Накопление липидов и биомассы при культивировании *Chlorella spp.* A1125 в пилотном фотобиореакторе

Признак	Сутки						
	1	6	8	11	13	18	20
Липиды, г/л	0,018	0,034	0,058	0,0735	0,081	0,0555	0,0535
Биомасса, г/л	0,0942	0,1992	0,2986	0,4242	0,4322	0,598	0,6056

Таблица 3

GC-MS анализ состава жирных кислот липидной фракции биомассы микроводоросли *Chlorella spp.* A1125 при разных сроках культивирования

Жирная кислота	Сутки				
	1	8	13	18	20
C14:0	8 ± 3,7	5 ± 4,1	2 ± 0,1	1 ± 0,2	2 ± 0,2
C16:0	26 ± 9,3	22 ± 4,2	25 ± 2,7	23 ± 4,0	26 ± 2,5
C16:1	3 ± 0,4	3 ± 0,4	4 ± 1,2	5 ± 1,2	5 ± 1,4
C16:2	7 ± 0,7	16 ± 2,0	16 ± 0,2	15 ± 0,5	14 ± 0,5
C16:3	10 ± 0,7	7 ± 1,2	7 ± 1,9	5 ± 0,5	2 ± 2,6
C18:0	5 ± 6,4	4 ± 0,0	2 ± 1,9	5 ± 3,9	2 ± 0,3
C18:1	10 ± 1,0	6 ± 0,3	11 ± 2,0	12 ± 2,6	14 ± 2,9
C18:2	20 ± 0,4	27 ± 0,3	27 ± 2,2	26 ± 5,2	28 ± 1,8
C18:3	12 ± 0,8	9 ± 2,0	8 ± 1,9	7 ± 1,6	6 ± 2,0

экспоненциальной фазы роста от 6 до 14 %. Количество диненасыщенных ЖК оставалось постоянным начиная с экспоненциальной фазы и составляло для C16:2 – 14–16 %, для C18:2 – 26–28 %. Три ненасыщенные ЖК показывали обозначенную тенденцию к понижению содержания: C16:3 от 10 до 2 %, C18:3 от 12 до 6 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что существует большой объем знаний об уровне накопления липидов отдельными штаммами микроводорослей на лабораторном уровне, открытым остается вопрос о выборе штаммов микроводорослей, сохраняющих высокое содержание липидов при культивировании в больших объемах в биореакторах. Помимо высоких выходов липидов, получаемое сырье должно быть определенного состава, в том числе иметь низкое содержание ненасыщенных жирных кислот для соблюдения требований, предъявляемых к качеству биотоплива, например стандарту ASTM D-6751. Таким образом, исследования, направленные на изучение возможности повышения продукции липидов и обеспечения определенного качества сырья, несомненно, позволят найти подходы к решению проблемы получения альтернативного биотоплива третьего поколения.

В нашей работе был использован штамм микроводоросли *Chlorella spp.* A1125, выделенный из образцов, отобранных в Новосибир-

ском водохранилище. Выделение проводили методом очистки накопительной культуры от побочной микрофлоры с использованием проточной цитофлуориметрии. Для выделения были использованы фильтры, обеспечивающие эффективное отделение по поглощению в области хлорофилла а. Данный метод является широко применяемым для подобных целей (Cellamare *et al.*, 2010) и зарекомендовал свою эффективность. Выделенный штамм характеризовался устойчивым ростом, отсутствием сезонности в размножении и не приводил к обрастанию поверхности культуральных сосудов, что является важным для его успешного культивирования.

Сравнение эффективности накопления биомассы выделенным штаммом *Chlorella spp.* A1125 в панельном фотобиореакторе с результатами, полученными в других исследованиях, в частности для штамма микроводоросли *Chlorella zofingiensis* (Feng *et al.*, 2011), показало, что у исследуемого штамма наблюдается более низкая специфическая скорость роста. Так, при культивировании в наружном фотобиореакторе объемом 60 л штамма *Chlorella zofingiensis* специфическая скорость роста составила 0,447 г/л/сут, а время удвоения – 1,54 сут. Для культивирования использовали среду BG-11, освещенность составила 100–200 мкмоль/м²/с, что несколько выше, чем у исследованной *Chlorella*, что может быть связано с большей освещенностью фотобиореактора.

В аналогичных работах по исследованию микроводорослей р. *Chlorella* динамика накопления липидов в основном характеризуется экспоненциальным ростом в течение 4–5 сут с последующим выходом на плато. Однако в данном эксперименте было отмечено, что в клетках этого штамма только на 13-й день культивирования достигается явный максимум накопления липидов, который сменяется стационарной фазой. В целом продукция липидов на протяжении культивирования оказалась меньше, чем в работе Lv с соавт. (2011), у которых продукция липидов составляла $40 \text{ мг л}^{-1}\text{сутки}^{-1}$ при подпитке $1,0\% \text{ CO}_2$ в 5-литровом лабораторном фотобиореакторе при освещенности $60 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Это может быть связано с использованием для культивирования как более богатой питательной среды, так и более эффективного освещения культуры. Накопление липидов было сравнимо с внешним панельным фотобиореактором объемом 60 л, где продукция липидов составляла $6,3 \text{ мг л}^{-1}\text{сут}^{-1}$ при максимальном содержании $54,5\%$ от сухого веса (Feng *et al.*, 2011).

Наиболее подробно вопрос об изменениях, происходящих в составе липидов при культивировании микроодоросли *Chlorella*, рассмотрен в работе Guarnieri с соавт. (2011). Показано, что в процессе культивирования в условиях недостатка источников азота у исследованного штамма *Chlorella vulgaris* возрастает содержание исключительно С18:1 ЖК, в то время как остальные (С18:3, С18:2, С16:1 и С16:0) метаболизируются. У исследованного в данной работе штамма *Chlorella spp.* A1125 также наблюдается увеличение содержания С18:1, однако метаболизму подвергаются только С14:0, С16:3, С18:3. Для других видов микроводорослей, накапливающих липиды, например для штамма *Nannochloropsis sp.*, показано возрастание содержания другого ряда ЖК: С14:0, С16:0, С16:1, С18:1.

Таким образом, для выделенного штамма *Chlorella spp.* A1125 отмечена относительно высокая продуктивность по липидам $0,081 \text{ г/л}$ (23%) при росте на минимальных средах в пилотном фотобиореакторе. Штамм характеризуется высоким содержанием как насыщенных С16:0 (25%), так и ненасыщенных жирных кислот С16:2 (16%) и С18:2 (27%). Таким образом, результаты этого исследования показали, что

выделенный штамм *Chlorella spp.* A1125 является перспективным кандидатом для производства биотоплива третьего поколения с использованием традиционных каталитических подходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.11.2180 от 01.03.2011).

ЛИТЕРАТУРА

- Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. Киев: Наук. думка, 1989. 608 с.
- Веснина Л.В., Митрофанова Е.Ю., Лисицина Т.О. Планктон соленых озер территории замкнутого стока (юг Западной Сибири, Россия) // Сиб. экол. журнал. 2005. № 2. С. 221–233.
- Романов Р.Е. Новые находки редких видов водорослей в равнинных водотоках и водоемах юга Западной Сибири // Сиб. ботан. вестник: электрон. журнал. 2008. Т. 3. № 1/2. С. 3–10.
- Сафонова Т.А. Водоросли реки Катунь (Горный Алтай, Россия). Разнообразие, таксономическая структура // Альгология. Киев, 1996а. Т. 6. № 1. С. 42–48.
- Сафонова Т.А., Ермолаев В.И. Водоросли водоемов системы озера Чаны. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1983. 152 с.
- Сафонова Т.А. Материалы к альгофлоре водоемов системы р. Иртыш (Западная Сибирь, Россия). Центральный сибирский ботанический сад СО РАН. Новосибирск, 1996б. 26 с. Деп. В ВИНТИ 23.12.96. № 3745-В96.
- Сафонова Т.А., Шауло С.П. Новые и редкие виды водорослей для Западной Сибири // Turczaninowia. Барнаул, 2006. № 3. С. 102–108.
- Ткачев Б.П. Бессточные области юга Западной Сибири. Структура и динамика // Ишимский гос. пед. ин-т. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2001. 162 с.
- Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР / Отв. ред. Г.М. Паламарь-Мордвинцева. Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного АН УССР. Киев: Наук. думка, 1990. 208 с.
- Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. Elsevier: Academic Press, 2005. P. 596.
- Becker E.W. Microalgae for aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture. Handbook of Microalgal Culture. Oxford: Blackwell, 2004. P. 380–391.
- Cellamare M., Rolland A., Jacquet S. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton // J. Appl. Phycol. 2010. V. 22. No. 1. P. 87–100.
- Feng P., Deng Z., Hu Z., Fan L. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. No. 22. P. 10577–10584.
- Guarnieri M.T., Nag A., Smolinski S.L. *et al.* Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways *via de novo* transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga // PLoS One. 2011. V. 6. No. 10. e25851.

- Khan S.A., Rashmi Hussain M.Z., Prasad S., Banerjee U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India // *Renew. Sustain. Energy. Rev.* 2009. V. 13. P. 2361–2372.
- Ly J.M., Cheng L.H., Xu X.H. *et al.* Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. No. 17. P. 6797–6804.
- Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd., 2004. P. 159–160.
- Rosenberg J.N., Oyler A.G., Wilkinson L., Betenbaugh M.J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. V. 19. P. 430–436.
- Wang B., Lan C.Q., Horsman M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. No. 4. P. 904–912.

STUDY OF MICROSCOPIC ALGA DIVERSITY IN WEST SIBERIA IN THE CONTEXT OF THIRD GENERATION BIOFUEL PRODUCTION

A.V. Piligaev², K.N. Sorokina^{1,2}, A.V. Bryanskaya¹, E.A. Demidov¹, R.G. Kukushkin²,
N.A. Kolchanov¹, V.N. Parmon², S.E. Peltek¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru;

² Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia

Summary

The prospects of new alga strains as a source of non-food renewable biomass suitable for third generation biofuel production are discussed. West Siberia is of special interest, as it has a broad range of habitats and weakly studied microalga biodiversity. During this study, a number of strains were isolated. Of them, *Chlorella spp.* A1125 met the requirements for cultivation in a pilot-scale photobioreactor: high biomass productivity and high lipid content (0,081 g/l, or 23 % dry weight). The strain had high contents of saturated C16:0 (25 %) and unsaturated fatty acids: C16:2 (16 %) and C18:2 (27 %), thus being promising for catalytic production of third generation biofuel.

Key words: microalgae, culture, renewable resources, lipids.