

П. М. Царенко, О. В. Борисова, академік НАН України Я. Б. Блюм

Мікрводорості колекції IBASU-A — ресурс біомаси для отримання біодизелю

Для виявлення перспективних видів мікрводоростей — продуцентів біомаси для виробництва біодизелю проведено скринінг близько 500 їх видів та штамів з колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. За продукційно-ростовими параметрами проаналізовано попередньо сформовану колекцію перспективних видів-продуцентів ліпідів із 33 штамів мікрводоростей. Визначено 7 найперспективніших штамів мікрводоростей за ростовими параметрами та приростом біомаси як продуцентів біомаси для біопалива.

Пошук альтернативних джерел енергоресурсів на базі рослинної сировини — актуальна проблема сьогодення. В останні два десятиліття на тлі занепокоєння людства станом навколишнього середовища та зменшення різниці у вартості відновлювальних та традиційних джерел енергії біопаливо у вигляді біодизельного палива, а також біоетанолу, біобутанолу та біогазу, стало реальною альтернативою викопним енергоресурсам [1]. Слід відзначити, що основні тенденції пошуку альтернативних джерел біопалива сконцентровані в основному навколо технічних культур рослин, таких як ріпак, канола, арахіс, соя, олійна пальма, ятрофа, олива, а також кукурудза, соняшник, ріжій, рицина тощо [1, 2]. Однак використання олієвмісних продовольчих культур як паливної сировини першого покоління нині все більше піддається критичному переосмисленню, а одним з найперспективніших біологічних продуцентів біопалива як представників його третього покоління визнають мікроорганізми, зокрема мікроскопічні водорості [2–5]. В Україні проблема одержання біопалива з використанням водоростей лише почала розроблятися в межах цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України “Біомаса як паливна сировина” (“Біомаса”), не враховуючи окремих проектів та спорадичних деяких комерційних структур [6–8].

Лідерами практичного використання водоростей в біопаливному процесі є індустріально розвинуті країни Європи — Франція, Великобританія, Іспанія, Португалія, Німеччина, а також США, Австралія, Китай, ПАР, Японія, Нова Зеландія та ін. [3–5]. Відповідно, у світі вже сформувалося чимало науково-виробничих груп, які розробляють технічні параметри біокультураторів та біореакторів для активного нарощування біомаси водоростей та переробки сировини, пошуку продуктивних видів і штамів водоростей. Першочерговими завданнями для ефективного отримання біодизелю з мікрводоростей є пошук найпродуктивніших видів та штамів мікрводоростей, що характеризуються високим вмістом ліпідів та високою швидкістю росту і приросту біомаси, введення їх у культуру та підбір оптимальних умов вирощування (склад поживного середовища, температура культивування, рівень освітлення тощо). Із 45 000 видів водоростей світової флори відомо лише близько 50 видів, які характеризуються високим вмістом ліпідів (понад 10% маси сухої речовини). Це представники прісноводних та морських форм зелених (джгутикові та кокоїдні), евгленофітових, гаптофітових, евстигматофітових, діатомових та червоних водоростей, зокрема родів *Botryococcus* Kütz., *Chlorella* Beijer., *Nannochloris* Naumann, *Neochloris* R. C. Starr, *Dunaliella* Teodor., *Nannochloropsis* Hibberd, *Monallanthus* Pascher, *Isochrysis* Parke, *Tetraselmis*

F. Stein, *Cryptocodinium* Biecheler, *Cylindrotheca* Rabenh., *Phaeodactylum* Bohlin, *Nitzschia* Hassall [3, 9, 10]. Важливим елементом досліджень енергоємних видів водоростей є наявність їх у колекціях культур та здатність до активного росту за культуральних умов. У попередній нашій публікації розглядалась можливість використання видів мікрowodоростей з колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України як перспективних продуцентів біомаси для отримання біодизелю [8]. Ця колекція є однією з найбільших в Україні і нараховує понад 500 видів і штамів водоростей; її основу формують представники відділу *Chlorophyta* як провідної таксономічної групи альгофлори України, проте наявні також види евгленофітових, діатомових та стрептофітових водоростей [11]. Унікальність колекції полягає в тому, що більшість культур, які підтримуються як альгологічно чисті (unialgal) або аксенічні (axenic), є оригінальними, ізольовані з різних місцезнаходжень переважно на території України, і лише 65 із них отримані з колекцій закордонних установ.

Саме тому метою нашого дослідження визначено скринінг водоростей з колекції IBASU-A на наявність в ній видів-гіперпродуцентів ліпідів та найперспективніших штамів за особливостями росту та приростом біомаси як потенційного джерела сировини для виробництва біодизелю.

Об'єктами дослідження були 74 (попередньо відібрані з понад 500) штами водоростей з родів *Acutodesmus* (E. Hegew.) P. Tsarenko, *Botryococcus* Kütz., *Desmodesmus* (Chodat) An et al., *Chlorella* Beijer. s.l. (*Chloroidium* Nadson, *Parachlorella* Krienitz et al.), *Scenedesmus* Meyen, *Monoraphidium* Komárk.-Legn., *Chlamydomonas* Ehrenb. тощо, які здатні накопичувати ліпіди у значній кількості [4, 8–10]. Досліджувані штами вирощували за єдиною стандартною схемою від 7–10 діб (за умов інтенсивного культивування) до 3–5 тижнів (за умов екстенсивної культури). Вирощування водоростей проводили на різних мінеральних поживних середовищах (Тамія, Болда, Бурреллі, Чу-13) залежно від еколого-морфологічної характеристики виду та його фізіолого-біохімічних особливостей. Засів водоростей на різні середовища здійснювали однотипною кількістю клітин (близько 40–50 тис. кл./мл). Культивування проводили у конічних колбах з 40–50 – 200 мл рідкого поживного середовища на люміностації з освітлювальними лампами ЛБ-40 при освітленні 3000–4000 лк і температурі 26–32 °С. Приріст водоростей оцінювали шляхом прямого підрахунку кількості клітин у камері Горяєва на 7-му, 14-ту та 21-шу добу та вагових характеристик сухої речовини методом прямого зважування, а питому швидкість росту (μ) та продуктивність (P) розраховували за встановленими показниками [12].

Скринінг колекції водоростей IBASU-A з метою визначення високопродуктивних штамів проведено за стабільних умов росту та фотосинтезу культур водоростей (склад поживних середовищ, температура, рН, освітленість, перемішування тощо) при тривалому інтенсивному культивуванні, а також виявлення активних форм із застосуванням експрес-методу при найінтенсивнішому накопиченні біомаси та стандартизації методів лабораторних випробувань їх продуктивності і здійснено в декілька етапів залежно від визначених почергових пріоритетних завдань. Зокрема, одним з найважливіших факторів успішного вирощування водоростей в культурі є підбір оптимальних поживних середовищ (як правило, специфічних для видів різних таксономічних груп), оскільки за умов відсутності їх адаптації до конкретного середовища спостерігається вплив стресових чинників на клітину та втрата типової морфологічної структури (що може бути незворотним процесом) і деяких фізіолого-біохімічних особливостей. За результатами порівняльного аналізу морфології клітин, специфіки росту і приросту біомаси зелених кокоїдних требуксієфіцієвих водоростей (*Chlorella*, *Parachlorella*, *Chloroidium*, *Botryococcus*) визнано оптимальним мінеральне по-

живне середовище Тамії та Чу-13, а для вирощування штамів хлорофіцієвих сфероплеальних (*Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Enallax*, *Monoraphidium*) — середовище Бурреллі та Болда. Разом з цим, оптимальним середовищем для еугленофітових водоростей (*Euglena*) виявилось мінеральне середовище з ацетатом і дріжджовим екстрактом.

Аналогічна розмежованість досліджених штамів водоростей колекції відзначена також і щодо оптимальних значень рН середовищ для їх культивування: 6,5–8,5 — для зелених кокоїдних требуксієфіцієвих та хлорофіцієвих сфероплеальних (*Chlorella*, *Parachlorella*, *Chloroidium*, *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Enallax*), 6–7,5 — для *Monoraphidium*, 7–8 — для *Euglena*, 8,5–9 — для *Botryococcus*. Певна диференціація досліджених штамів водоростей проявляється і щодо температурних оптимумів їх культивування: 26–30 °С — для штамів родів *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Botryococcus*, *Enallax*, *Monoraphidium* і 30–32 °С — для *Chlorella*, *Parachlorella*, *Chloroidium*, *Euglena*.

Оскільки велике значення при культивуванні має здатність водоростей розвиватися в присутності солей при високих концентраціях та їх толерантність до змін хімічного складу середовища, на прикладі водоростей *Acutodesmus dimorphus* шт. 251 та *Desmodesmus armatus* шт. 270 нами проведено порівняльне дослідження приросту їх біомаси на середовищах з різним вмістом азоту — 20, 200, 2000 мг/л KNO_3 . Виявлено, що обидва штами можуть рости при всіх трьох зазначених концентраціях нітратного азоту, але найінтенсивніше — при концентрації 200 мг/л. Максимальна кількість клітин за цих умов сягала 10,4 млн кл./мл, а при концентрації 2000 мг/л — 5,8 млн кл./мл. Ріст штамів при концентрації 20 мг/л, порівняно з ростом при концентрації 200 мг/л KNO_3 , на 7-му добу за кількістю клітин був практично однаковим, але потім уповільнювався [10].

Раніше на основі оцінки вмісту ліпідів у водоростей колекції IBASU-A та особливостей їх росту в культурі були визначені найбільш перспективні штами, що ефективно нарощували біомасу. За цими критеріями нами сформована колекція перспективних штамів-продуцентів біомаси, серед яких представлені 33 штами 12 видів із родів *Acutodesmus* (6), *Botryococcus* Kütz. (1), *Chlorella* (6), *Chloroidium* (2), *Desmodesmus* (7), *Enallax* (1), *Euglena* (2), *Monoraphidium* (2) та *Parachlorella* (6) [10]. Ця колекція як самостійна складова загальної колекції мікроводоростей IBASU-A Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України об'єднує кокоїдні зелені водорості та два штами еугленофітових.

Нами проведено порівняльні дослідження параметрів росту у 20 штамів колекції штамів продуцентів біомаси. Визначено інтенсивність росту різних видів зазначених родів — *Chlorella vulgaris* Beijer., *Chloroidium saccharophilum* (W. Krüger) Darienko et al., *Parachlorella kessleri* (Fott et Novák.) Krienitz et al., *Acutodesmus dimorphus* (Turp.) P. Tsarenko, *A. obliquus* (Turp.) P. Tsarenko та *Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew., *D. armatus* (Chodat) E. Hegew., *D. communis* (E. Hegew.) E. Hegew., *D. magnus* (Meyen) P. Tsarenko, *D. pannonicus* (Hortob.) E. Hegew.) і кінетичні характеристики їх культур (питома швидкість росту, продуктивність) за однотипних умов вирощування в інтенсивному режимі. Показано, що всі досліджувані штами характеризуються високими показниками росту та розвитку за визначених умов культивування. У культурах *Chlorella*, *Chloroidium* та *Parachlorella* максимальна кількість клітин (B) досягала 38–250 млн кл./мл, при цьому питома швидкість росту (μ) та продуктивність (P) становила 0,55–1,4 доби⁻¹ і 9,5–72,5 млн кл./мл за добу. У культурах *Acutodesmus* та *Desmodesmus* максимальна кількість клітин становила 26–84,5 млн кл./мл, а питома швидкість росту та продуктивність — 0,35–1,2 доби⁻¹ і 6,4–29 млн кл./мл за добу відповідно. За сприятливих умов культивування (цілодобове освітлення (3–4 тис. лк), температура культивування — 30–32 °С, барботування тощо) приріст біомаси різних ви-

дів водоростей за добу змінювався у межах 0,34–1,6 г/л абсолютно сухої біомаси (а. с. б.). Більшість культур відзначалася вкороченими строками лаг-фази (1–2 доби) та найбільшою швидкістю росту в період активного росту. Показано, що більшість досліджуваних штампів характеризувалася вкороченим періодом адаптації і найшвидшим збільшенням обсягу біомаси за період активного росту. У культурах водоростей роду *Chlorella* продуктивність становила 0,5–1,6 г/л а. с. б. за добу, водоростей роду *Acutodesmus* та *Desmodesmus* 0,34–1,2 та 0,32–1,2 г/л а. с. б. за добу відповідно. Найпродуктивнішими з досліджуваних водоростей виявилися *Acutodesmus dimorphus* (Turp.) P. Tsarenko шт. 251, *Desmodesmus magnus* (Meyen) P. Tsarenko шт. 401, *Parachlorella kessleri* (Fott et Novák.) Krienitz et al. шт. 444 та *Chlorella vulgaris* Beijer. шт. 189, приріст біомаси яких становив 0,9–1,6 г/л а. с. б. за добу (рис. 1).

Відомо, що за вмістом ліпідів серед одноклітинних водоростей вирізняються представники примнезіофіцієвих, зелених та еугленофітових, такі як *Prymnesium parvum* Carter (22–38% абсолютно сухої біомаси), *Acutodesmus* (= *Scenedesmus*) *dimorphus* (16–40%), *Chlorella vulgaris* (14–22%), *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (21%), *Euglena gracilis* G. A. Klebs (14–20% сухої речовини) тощо. Хоча високий вміст ліпідів у біомасі (не менше ніж 20% сухої речовини) використаний як важливий критерій для відбору штамів-продуцентів біомаси, види роду *Chlamydomonas* не були включені нами до списку перспективних штамів. Усі види цього роду схильні до значної контамінації іншими видами водоростей та грибів.

Одним із найвідоміших та найперспективнішим за вмістом ліпідів об'єктів для отримання біодизельного палива визнана зелена требуксієфіцієва колоніальна водорість *Botryococcus braunii* Kütz. — ботріококус Брауна [3–7]. За деякими оцінками клітини цієї водорості можуть містити понад 70% рідких вуглеводнів від сухої маси. Ботріококус має широку екологічну амплітуду та географічний ареал поширення, зростає на території України та інколи здатний до масового розвитку за природних умов, викликаючи “цвітіння” води. Він введений у культуру та зберігається в колекціях водоростей деяких країн Європи (Велика Британія, Німеччина, Португалія, Чехія тощо), Азії, Америки та Австралії. За природних умов спостерігається значна мінливість морфологічних ознак цього виду, особливо за розмірами та формою клітин, а також біохімічна варіабельність їхніх характеристик. Культуральні дослідження показали залежність кількості та особливостей складу жирних кислот ботріококуса залежно від виду та штаму водорості, умов культивування, фази росту культури та специфічних умов вирощування, а також географічних особливостей природного матеріалу. Результати наших досліджень з використанням штаму 504 [7] підтвердили високий вміст загальних ліпідів (близько 46% абсолютно сухої біомаси) та значний приріст біомаси ботріококуса при культивуванні за умов мінібіореактора (до 1,3 г/л за добу, при 0,3 г/л за добу за екстенсивних умов лабораторної культури) [10]. Відповідно, ці характеристики вирізняють ботріококус як один з найперспективніших видів-продуцентів біомаси та ліпідів.

Проте слід відзначити, що у процесі оригінальних досліджень виявлена висока контамінаційна вразливість культури, нестабільність росту та значна залежність приросту біомаси від впливу зовнішніх чинників за умов екстенсивного та інтенсивного культивування. Ймовірно, цими чинниками обумовлена обережність до залучення природних штамів *Botryococcus braunii* у промислові випробування в різних країнах світу. На нашу думку, біохімічна унікальність цього виду та подальші дослідження його штамової специфіки і перспективи генетичної модифікації його геному, на чому вже зосереджені значні зусилля фа-

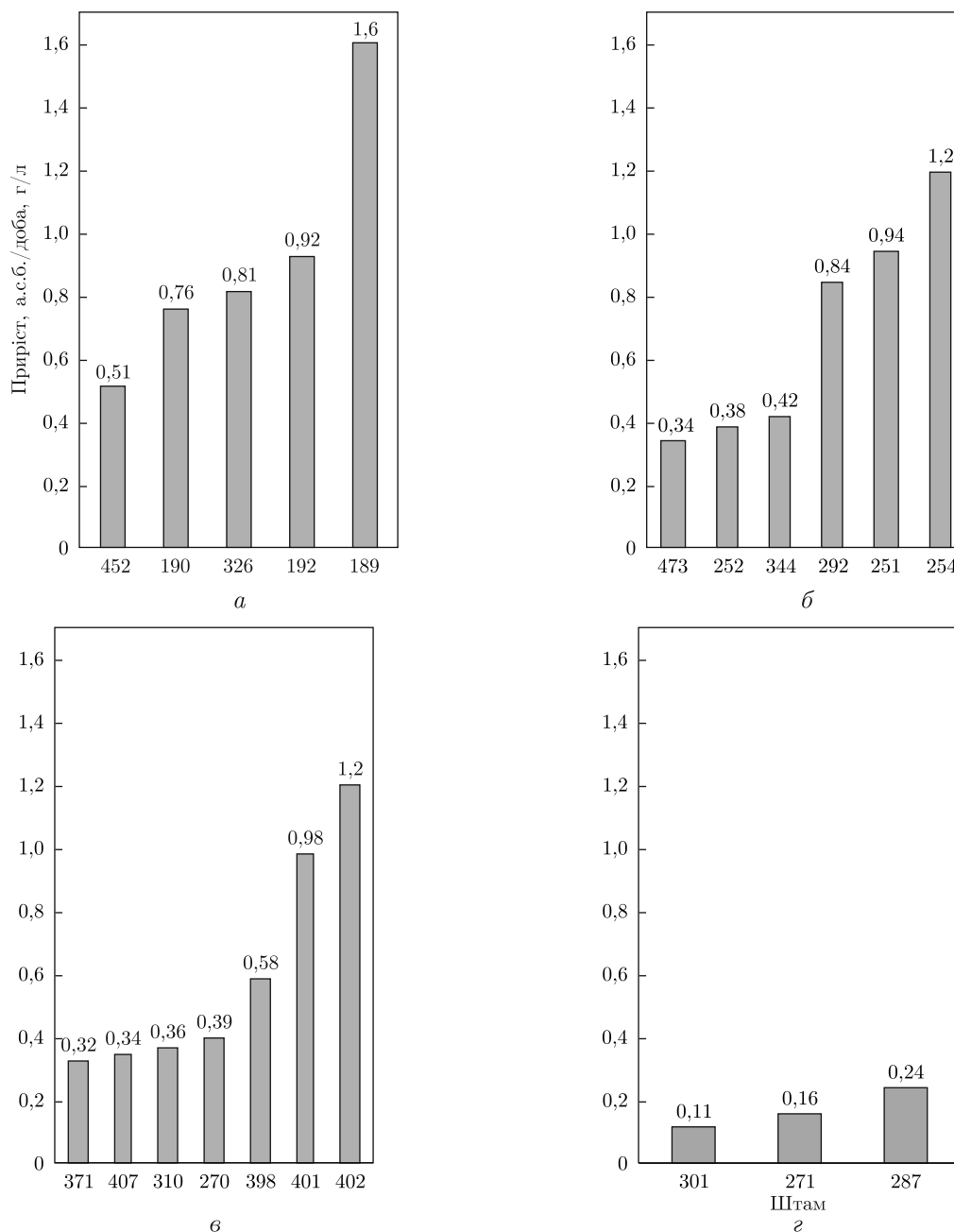


Рис. 1. Порівняльна характеристика приросту біомаси у штамів *Chlorella* Beijer. (а), *Acutodesmus* (E. Hegew.) P. Tsarenko (б), *Desmodesmus* (Chodat) An et al. (в), *Scenedesmus* Meyen (г)

хівців [13, 14], сприятимуть використанню цієї водорості як надзвичайного ефективного продуцента ліпідів у недалекому майбутньому.

Таким чином, за результатами скринінгу колекції високопродуктивних штамів-продуцентів біомаси із загальної колекції мікроводоростей IBASU-A визначено найперспективніші штами, які є потенційними об'єктами для подальшого виробництва біодизелю: *Chlorella vulgaris* 189 (B — 250 млн кл./мл, μ — 1,4 доби⁻¹, P — 72,5 млн кл./мл за добу), *Parachlorella*

kessleri 444 ($B = 123,4$ млн кл./мл, $\mu = 0,68$ доби⁻¹, $P = 24,3$ млн кл./мл за добу), *Acutodesmus dimorphus* 251, 254 ($B = 35-39$ млн кл./мл, $\mu = 0,46-0,52$ доби⁻¹, $P = 6,4-9,2$ млн кл./мл за добу), *Desmodesmus magnus* 401 ($B = 84,5$ млн кл./мл, $\mu = 1,2$ доби⁻¹, $P = 29$ млн кл./мл за добу). Відібрано найперспективніші штами: *Chlorella vulgaris* IBASU-A 189, 190, 192, *Acutodesmus dimorphus* IBASU-A 251, 254, *A. obliquus* IBASU-A 292, *Desmodesmus magnus* IBASU-A 401 та *D. multivariabilis* var. *turskensis* IBASU-A 398 з приростом біомаси 0,58–1,6 г/л а. с. б. за добу. Одержані дані засвідчують наявність серед мікроводоростей колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України потенційних високопродуктивних видів-продуцентів біомаси не лише як ресурсної сировини для біодизелю, але і як джерела біомаси для інших промислових потреб.

Робота виконана за проектами № 09 та № 19 цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України “Біомаса як паливна сировина” (“Біопалива”).

1. Блюм Я. Б., Гелетуха Г. Г., Григорюк І. П. та ін. Біологічні ресурси і технології виробництва біопалива. – Київ: Аграр Медіа Груп, 2010. – 403 с.
2. Сорочинський Б. В., Блюм Я. Б., Созінов О. О. Рідкі біопалива: сучасний стан та тенденції. – Київ: ДІА, 2010. – 116 с.
3. Amin S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae // Energy Convers. Management. – 2009. – **50**. – P. 1834–1840.
4. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnol. Adv. – 2007. – **25**. – P. 294–306.
5. Gouveia L. Microalgae as a feedstock for biofuels. – Heidelberg; London; New York: Springer, 2011. – 69 p.
6. Золотарьова О., Шнюкова Є. Куди прямує біопаливна індустрія? // Вісн. НАН України. – 2010. – № 4. – С. 10–20.
7. Корховий В. І., Пірко Я. В., Царенко П. М., Блюм Я. Б. Генетична диференціація штамів *Botryococcus braunii* Kütz. – продуцентів ліпідів – за допомогою RAPD фінгерпринтингу // Доп. НАН України. – 2011. – № 2. – С. 144–149.
8. Царенко П., Борисова О., Блюм Я. Мікроводорості як об’єкт біоенергетики. Види колекції IBASU-A – перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива // Вісн. НАН України. – 2011. – № 5. – С. 49–54.
9. Metting F. B. Biodiversity and application of microalgae // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – **17**, No 5–6. – P. 477–489.
10. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – **101**, No 2. – P. 87–96.
11. Борисова О. В., Царенко П. М. Колекція культур водоростей Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного (IBASU-A) // Укр. ботан. журн. – 2001. – № 5. – С. 627–633.
12. Тренкеніцу Р. П. Простейші моделі росту мікроводоростей. 1. Періодическая культура // Екологія моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 89–97.
13. Radakovits R., Jinkerson R. E., Darzins A., Posewitz M. C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production // Eukaryotic Cell. – 2010. – **9**, No 4. – P. 486–501.
14. Niehaus T. D., Okada S., Devarenne T. P. et al. Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2011. – **108**, No 30. – P. 12260–12265.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ
Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 06.03.2012

П. М. Царенко, Е. В. Борисова, академик НАН Украины Я. Б. Блюм

Микроводоросли коллекции IBASU-A — ресурс биомассы для получения биодизеля

С целью выявления перспективных видов микроводорослей — продуцентов биомассы для производства биодизеля проведен скрининг около 500 их видов и штаммов из коллекции IBASU-A Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины. По продукционно-ростовым параметрам проанализирована предварительно сформированная коллекция перспективных видов-продуцентов липидов из 33 штаммов микроводорослей. Определено 7 наиболее перспективных штаммов микроводорослей по ростовым параметрам и приросту биомассы как продуцентов биомассы для биотоплива.

P. M. Tsarenko, O. V. Borisova, Academician of the NAS of Ukraine Ya. B. Blume

Microalgae of the collection of IBASU-A — resource of biomass for the production of biofuel

Screening about 500 strains of the collection of microalgae of IBASU-A of M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine to reveal the promising types of microalgae as producers of biomass as a source of raw materials for the production of biofuel is conducted. The preliminarily formed collection of perspective species-hyperproducers of lipids from 33 strains by the parameters of productivity and growth is analyzed. 7 most perspective cultures of microalgae by the growth parameters and increase of biomass as producers of biomass for a biofuel are determined.