

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 582.263; 662.75

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ И СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЕСТЕСТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

© 2023 г. К. В. Горин^{1,*}, В. М. Пожидаев¹

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*E-mail: Gorin_KV@nrcki.ru

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 05.10.2023 г.

Фотосинтезирующие микроорганизмы относят к перспективным возобновляемым источникам получения различных ценных продуктов, таких как протеины, липиды, углеводы, пигменты, антиоксиданты и др. Проведены исследования по культивированию микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV 1 на питательной среде с различной концентрацией азота при естественном освещении. Рассмотрено влияние концентрации азота на рост и изменение pH культуральной среды в процессе выращивания, а также состав индивидуальных жирных кислот в полученной биомассе.

DOI: 10.56304/S2782375X23020055

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время микроводоросли считаются одним из основных возобновляемых источников получения биодизеля благодаря преимуществам перед остальным сырьем: они обладают высокой утилизирующей способностью диоксида углерода и его накоплением в своей биомассе, высокой скоростью роста и продуктивностью, неприхотливостью и др. [1].

При оптимальных условиях культивирования достигается относительно небольшое количество образующихся липидов в биомассе микроводорослей. Недавние исследования, направленные на решение таких серьезных проблем, как осмотический стресс, регулирование pH, питательный стресс, применение химических реагентов, влияние температуры и тяжелых металлов, были проведены, чтобы разработать и определить эффективные стратегии для увеличения содержания липидов в биомассе микроводорослей. Кроме того, активно разрабатываются генетические манипуляции для индукции выработки липидов микроводорослями. Однако широко используемым методом для индукции выработки липидов микроводорослями является ограничение основных питательных веществ, таких как азот, в среде культивирования [2]. Дефицит азота и фосфора ингибирует рост *Chlamydomonas* приблизительно на 30% и в то же время значительно увеличивает содержание липидов [3]. В [4] показано, что ограничение по источнику

азота в течение культивирования *Scenedesmus quadricauda* приводит к увеличению более чем в 2 раза выхода липидов (226 мг/л) по сравнению с условиями с достаточным количеством азота (99.3 мг/л). В условиях недостатка азота *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris oleoabundans* и *Scenedesmus obliquus* накапливали более 35% триацилглицеридов от общего количества высушенной биомассы [5].

В [6] были применены два подхода по ограничению источника азота: двустадийный, при котором выращивание *C. vulgaris* осуществлялось на богатой азотом среде для стимуляции роста, а затем выросшую культуру помещали в бедную по азоту среду, и одностадийный, при котором засев культуры осуществлялся в питательную среду с необходимым содержанием источника азота, который расходовался по мере роста культуры и истощался к концу культивирования. Для обоих подходов характерно то, что накопление биомассы и липидов зависело от культивируемого вида микроводоросли.

В данной работе рассматривается влияние различной концентрации азота в питательной среде на рост и накопление жирных кислот (ЖК) микроводорослью *Chlorella vulgaris*, выращенной при естественном освещении.

Таблица 1. Состав питательной среды BG-11

Компонент	Концентрация, г/л
NaNO ₃	1.5
KH ₂ PO ₄	0.04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
Na ₂ CO ₃	0.02

Таблица 2. Состав стокового раствора микроэлементов

Компонент	Концентрация, г/л
ЭДТА	5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
MnCl ₂	0.03
H ₃ BO ₃	0.3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2
CuCl ₂	0.01
NiCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.02

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV 1 из коллекции НИЦ “Курчатовский институт”, широко используемую для различных исследовательских задач.

Микроводоросль *C. vulgaris* выращивали в конических колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 150 мл питательной среды BG-11 [7]. В питательную среду добавляли в количестве 1 мл на 1 мл среды стоковый раствор микроэлементов [8]. Состав питательной среды и стокового раствора микроэлементов представлен в табл. 1 и 2 соответственно. pH питательной среды доводили до 7.0. Температура при культивировании составляла 16–18 ± 1°C, а освещенность — 500–600 Лк в течение светового дня. Колбы располагали перед оконным проемом на расстоянии 5 см.

В эксперименте по культивированию микроводоросли использовали ту же среду, что и для получения посевного материала, но с изменением концентрации нитрата натрия (NaNO₃): 1, 2, 6 и 10 мМ. pH питательной среды также доводили до 7.0.

Образцы культивировали в течение 21 сут при естественном освещении (интенсивность освещения 390–520 Лк) и комнатной температуре (18 ± 1°C), перемешивание осуществляли путем барботирования атмосферным воздухом со скоростью 200 мл/мин. Контроль роста культуры осуществляли путем измерения оптической плотно-

сти на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10s UV-Vis при длине волны 750 нм.

Для анализа содержания метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) необходима лиофильно высушенная биомасса. Сбор биомассы проводили центрифугированием при 7500 об./мин (центрифуга Awel MF 20, ротор AMF 20-8 RFID, Франция) в течение 10 мин при 20°C и дважды промывали дистиллированной водой для удаления адсорбированных солей. Собранную влажную биомассу лиофильно высушивали на лиофильной сушилке FreeZone 2.5 (Labconco, США) в течение 12 ч.

Получение МЭЖК проводили прямым метанолизом согласно [9].

Анализ МЭЖК проводили методом газовой хроматографии на газовом хроматографе Bruker 430 GC (Varian Inc. США), снабженном пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой Select TM Biodiesel (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм). Количество вводимой пробы — 1 мкл [10].

МЭЖК идентифицировали по относительному времени удерживания на колонке компонентов смеси в сравнении со стандартом, количественное содержание индивидуальных ЖК определяли методом нормализации площадей.

Определение абсолютно сухого вещества биомассы проводили высушиванием образца до постоянного веса.

В предварительно взвешенный стеклянный бюкс помещали точную навеску влажной биомассы и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 95°C в течение 2 ч. Далее образец биомассы охлаждали до комнатной температуры в эксикаторе над слоем хлорида кальция, взвешивали и повторно выдерживали в сушильном шкафу в течение 45 мин, после чего образец охлаждали и взвешивали.

Количество выросшей биомассы (X) определяли по формуле

$$X = X - X_0,$$

где X_0 и X — количество биомассы в начале и конце культивирования соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование проходило в весенний период (март), средняя продолжительность светового дня составляла 11.5 ч (рис. 1, 2). Изначально все образцы с различной концентрацией нитрата натрия засевали культурой *C. vulgaris* до достижения одинаковой оптической плотности 0.1 при 750 нм. Для различных концентраций нитрата натрия в среде характерна одинаковая закономерность постепенного роста. Максимальный рост по биомассе отмечался при концентрации 6 мМ нитрата



Рис. 1. Засеянные образцы с различной концентрацией нитрата натрия: 1, 2 – 1; 3, 4 – 2; 5, 6 – 6; 7, 8 – 10 мМ.

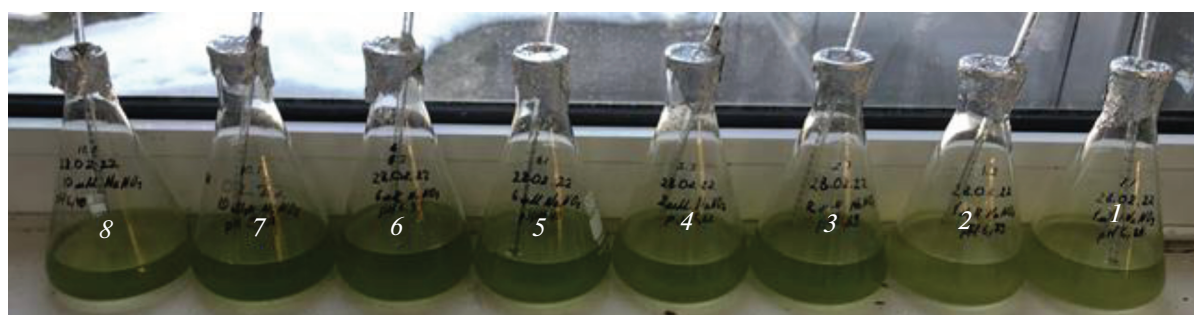


Рис. 2. Рост культуры *C. vulgaris* на 21-е сутки культивирования: 1, 2 – 1; 3, 4 – 2; 5, 6 – 6; 7, 8 – 10 мМ.

натрия в питательной среде, минимальный – при 1 мМ (рис. 3).

Исходные значения pH для всех вариантов сред были одинаковыми и составляли 7.0. Для всех исследуемых образцов отмечено защелачивание культуральной среды в процессе роста. Наибольшее изменение pH наблюдалось при концентрации азота в среде 10 мМ, наименьшее – при 1 мМ (рис. 4).

Всего в биомассе было идентифицировано семь индивидуальных ЖК. Сильных различий в концентрациях ЖК при различном содержании азота в среде не наблюдалось. Отметим, что наибольшее содержание пальмитиновой кислоты, олеиновой и линоленовой и наименьшее гептадеценовой и линолевой наблюдалось при концентрации азота 1 мМ (рис. 5). Среди всех ЖК больше всего во всех образцах содержалось линолено-

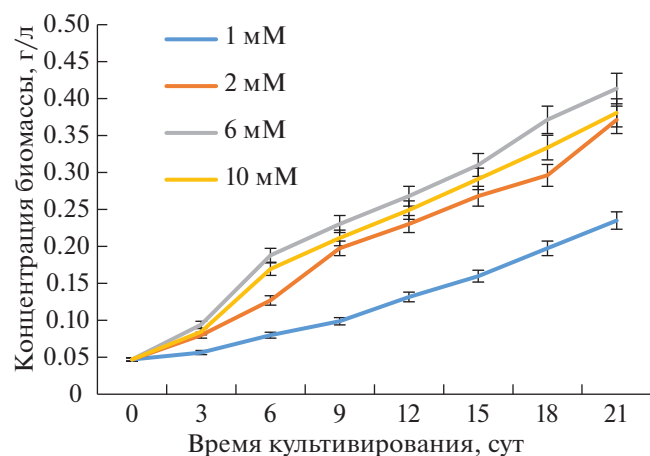


Рис. 3. Кривые роста *C. vulgaris* при различной концентрации азота в питательной среде.

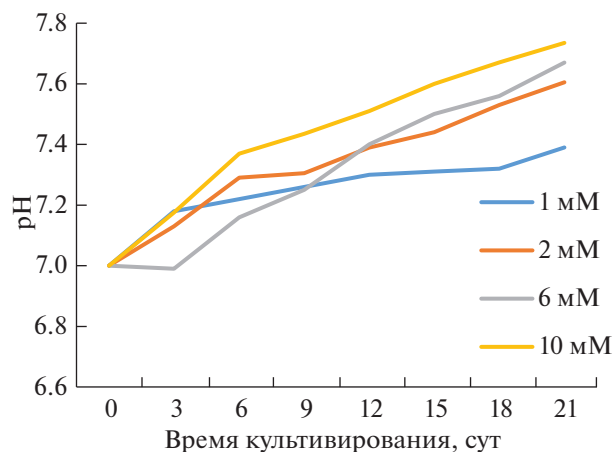


Рис. 4. Изменение pH в процессе роста культуры *C. vulgaris*.

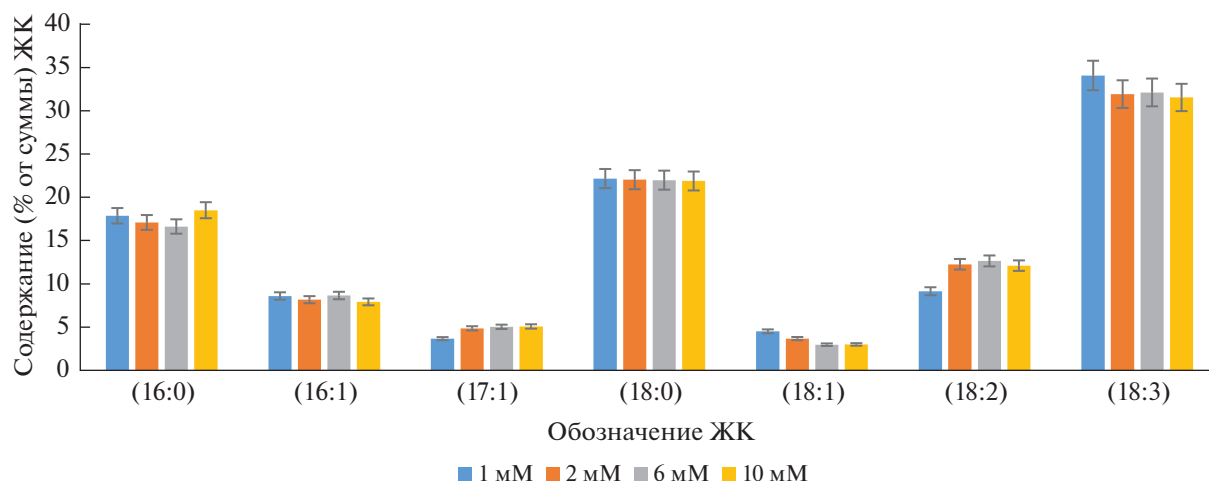


Рис. 5. Содержание индивидуальных жирных кислот в биомассе *C. vulgaris* (16:0 – пальмитиновая, 16:1 – пальмитолеиновая, 17:1 – гептадеценивая, 18:0 – стеариновая, 18:1 – олеиновая, 18:2 – линолевая, 18:3 – линоленовая кислота).

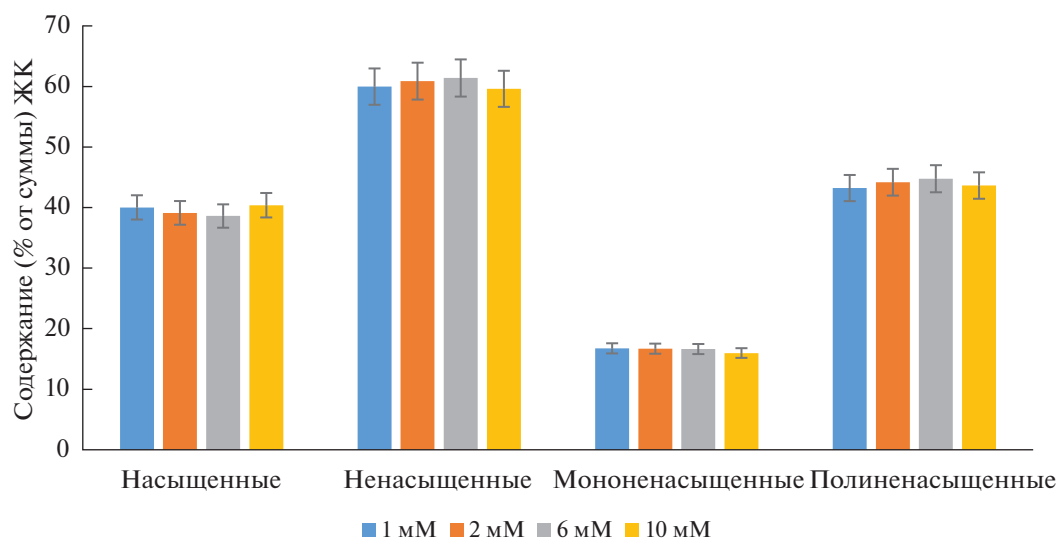


Рис. 6. Содержание индивидуальных жирных кислот в биомассе.

вой кислоты (18:3), затем стеариновой (18:0) и пальмитиновой кислот (16:0).

При рассмотрении отдельных групп ЖК отмечено, что наибольшее количество насыщенных и наименьшее ненасыщенных ЖК содержалось в образце с концентрацией азота 10 мМ (рис. 6).

В стандартах и требованиях к биодизелю существует ряд ограничений по профилю образующих его ЖК. Основой подобных ограничений, содержащихся, например, в стандарте EN 14214, является увеличение степени ненасыщенности липидов, приводящее к снижению цетанового числа [10]. С этой позиции наиболее предпочтительно получение биомассы при содержании азота в питательной среде 10 мМ.

В [11] при культивировании *C. vulgaris* при различной концентрации азота в питательной среде, но при искусственном освещении также было выявлено семь ЖК, аналогичных идентифицированным. Конечные плотности культуры были выше и достигались за меньшее время культивирования за счет использования постоянного искусственного освещения, более высокой температуры и подачи газо-воздушной смеси с 2% CO₂. В исследовании олеиновая (18:1), пальмитиновая (16:0) и линоленовая кислоты (18:3) также преобладали в биомассе. Отметим, что полученные данные (содержание насыщенных ЖК меньше ненасыщенных во всех образцах) согласуются с данными, представленными в [11].

В исследовании [12] представлено подтверждение, что уровень ненасыщенных ЖК увеличивается при низких температурах, а насыщенных ЖК — при высоких температурах. Это объясняется тем, что при более низких температурах содержание растворенного кислорода больше, и кислородзависимые ферменты, десатуразы, могут эффективно работать [6, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность эффективного культивирования *C. vulgaris* при естественном освещении. Максимальное содержание биомассы в количестве 0.4 г/л соответствует содержанию азота 6 мМ в питательной среде. В полученной биомассе было идентифицировано семь индивидуальных ЖК, преобладали линоленовая (18:3), стеариновая (18:0) и пальмитиновая (16:0) кислоты. Показано, что для получения биодизеля более подходящей является биомасса, выращенная при естественном освещении на питательной среде с содержанием азота 10 мМ.

Работа выполнена в рамках тематического плана “Разработка платформенных технологий на основе фототрофных микроорганизмов для интенсивной утилизации CO₂ и производства биотоплив и других полезных продуктов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горин К.В. // Вестник инновационного технополиса “ЭРА”. 2021. Т. 2. № 2. С. 5.
2. Arguelles E.D., Martinez-Goss M.R. // J. Appl. Phycol. 2021. V. 33. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02126-z>
3. Yang L., Chen J., Qin S. et al. // Biotechnol. Biofuels. 2018. V. 11. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1041-z>
4. Anand J., Arumugam M. // Bioresour Technol. 2015. V. 188. P. 190.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.097>
5. Breuer G., Lamers P.P., Martens D.E. et al. // Bioresour. Technol. 2012. V. 124. P. 217.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>
6. Minhas A.K., Hodgson P., Barrow C.J., Adholeya A. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
7. Alves D., Guimarães L., Sueira J. et al. // Environ. Technol. Innov. 2022. V. 25. P. 102204.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102204>
8. Gorin K., Badranova G., Gotovtsev P. et al. // IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 2018. V. 292. P. 012051.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/292/1/012051>
9. Liu J., Liu Y., Wang H. et al. // Technol. 2015. V. 176. P. 284.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.094>
10. Сергеева Я.Э., Мостова Е.Б., Горин К.В. и др. // Биотехнология. 2017. Т. 33. № 1. С. 53.
11. Farooq W., Naqvi S.R., Sajid M. et al. // J. Biotechnol. 2022. V. 345. P. 30.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.12.014>
12. Liu X.J., Jiang Y., Chen F. // Proc. Biochem. 2005. V. 40. P. 371.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.018>
13. Ward O.P., Singh A. // Proc. Biochem. 2005. V. 40. P. 3627.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>