

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 561.263+57.086.83

Г. Б. ВІНЯРСЬКА, О. І. БОДНАР, Н. В. БУРЕГА, А. О. ПАЛЬЧИК,
О. О. КАНТИЦЬКА, Л. А. ОНУФРІЙЧУК

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

КУЛЬТИВУВАННЯ *CHLORELLA VULGARIS* У ФОТОБІОРЕАКТОРІ НЕПЕРЕРВНОЇ ДІЇ ПІД ВПЛИВОМ СОНЯЧНОЇ ІНСОЛЯЦІЇ

Апробовано фотобіореактор інтенсивного культивування водорості *Chlorella vulgaris* Beij. за умов сонячної інсоляції з повністю контрольованими умовами в межах режимних параметрів за обраними критеріями оцінювання процесу культивування. Для перевірки ефективності функціонування оригінального фотобіореактора досліджували ріст у ньому *Chlorella vulgaris* Beij. (CHLOROPHYTA) у середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 за 21-27⁰С (22–25⁰С) та природного освітлення (сонячної інсоляції) (інтенсивність 9000 лк) упродовж 16 год/добу за додавання у культуральне середовище водних розчинів солей – натрій селеніту (Se (IV)) та ZnSO₄·7H₂O (Zn²⁺) як активаторів росту. Встановлено, що за стабілізації та автоматичного контролю умов культивування у розробленому фотобіореакторі максимальна щільність культури досягається на 17 добу культивування із вмістом клітин 24,8 ± 1,8·10⁹ кл/дм³ та з їх кількістю у стаціонарній фазі на 14 добу – 16,1 ± 1,2·10⁹ кл/дм³, що дає змогу вирощувати хлорелу в безперервному режимі з середньою продуктивністю біомаси у стаціонарному режимі близько 212,4 ± 18,1 мг сухої біомаси/дм³ з вмістом ліпідів 19,02 ± 0,4 мг сухої маси/дм³. Рівень біомаси та ліпідів хлорели можна змінювати, використовуючи інтенсивність природної інсоляції та речовин-стимуляторів, що становить перспективу подальших досліджень.

Ключові слова: хлорела, фотобіореактор, сонячне освітлення, кількість клітин, біомаса, ліпіди

Останнім часом мікроводорості, зокрема *Chlorella vulgaris*, широко використовують як джерело білкової та ліпідної біомаси, а також біологічно активних речовин [13, 15]. Разом з тим, для водоростей характерне інтенсивне, нами показано, що завдяки включенню до її складу екзогенних мікроелементів, ця мікроводорість може утворювати біологічно активні комплекси для отримання біоенергетичних субстратів та речовин з потенційною фармакологічною дією [2, 4].

Загальноприйняті методи культивування для промислового вирощування біомаси мікроводоростей передбачають їх достатню освітленість, забезпечення вуглекислотою та іншими поживними речовинами [7, 17]. Оскільки вуглекислий газ є основним, а іноді і єдиним джерелом вуглецю, то хлорела може інтенсивно розвиватися тільки за достатньої його кількості. Необхідною умовою культивування також є підтримання температурного режиму (в межах 25–27⁰С) та величини рН (у діапазоні 5,5–6,5) живильного середовища [19].

Нині розроблено низку культиваторів для інтенсивного вирощування різних видів мікроводоростей з урахуванням біологічних особливостей відповідних культур [6, 8, 10, 12]. Одним з найбільш перспективних методів культивування є проточне вирощування водоростей,

за якого здійснюють автоматичний відбір клітин (врожаю), подання свіжого живильного середовища і стабілізацію оптичної щільності культури. Головною перевагою такого методу є можливість вести тривале безперервне вирощування водоростей із підтриманням постійної щільності суспензії на оптимальних значеннях, коли спостерігається максимальна продуктивність культури [19]. Недоліками стандартної технології є підвищення окислювально-відновного потенціалу в процесі поділу клітин хлорели до позитивних значень, що призводить до уповільнення процесів росту хлорели та потреба у високовартісному закордонному обладнанні.

Для неперервного культивування хлорели нами розроблено та апробовано фотобіореактор проточного типу в лабораторних умовах [1, 18], в якому за стабілізації хімічного складу та автоматичного контролю умов культивування значно збільшується кількість клітин, вміст біомаси та органічних речовин культури водоростей [18]. Однак, співвідношення вмісту протеїнів, вуглеводів і ліпідів можна змінювати, використовуючи інтенсивність та періодичність сонячного освітлення та речовин-стимуляторів біосинтезу окремих класів органічних речовин, наприклад Se (IV) і Zn^{2+} як активаторів росту і біосинтезу, в умовах природного культивування з метою зменшення витрат на культивування. Одночасно за умов включення зазначених мікроелементів до складу клітин водоростей, збагачену біомасу можна використовувати як біологічно активні добавки і фармацевтичні препарати [2].

Метою роботи було апробація фотобіореактора для інтенсивного культивування водорості під впливом сонячної інсоляції та активаторів росту (Se (IV) і Zn^{2+}) із повністю контрольованими умовами у межах режимних параметрів за обраними критеріями оцінки процесу культивування хлорели.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктом дослідження була альгологічно чиста культура зеленої прісноводної водорості *Chlorella vulgaris* Weij., яку культивували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 при температурі 22–25°C та освітленні лампами денного світла (інтенсивність 2500 лк) впродовж 16 год на добу [9]. В експериментальних умовах водорість культивували у фотобіореакторі об'ємом 50 дм³ впродовж 17 діб при температурі 21–27°C та природному освітленні інтенсивністю 9000 лк із 6.00 год до 22.00 год. При цьому використовували додаткове освітлення з використанням Led стрічок від 6.00 до 7.00 год та від 21.00 до 22.00 год з додаванням у культуральне середовище водних розчинів солей – натрій селеніту та $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ в розрахунку на кількість Se (IV) – 10,0 мг/дм³ і Zn^{2+} – 5,0 мг/дм³ [14]. Живлення CO₂ забезпечували автоматично балонним газом з чистотою 99,5% (ДСТУ 4817:2007, Сорт 1).

Показники температури середовища, рН, CO₂ контролювали автоматично за допомогою вбудованих у корпус культиватора електродів (рис. 1).

Відбір зразків біомаси водорості проводили кожних 3-4 доби, а кожних 7 діб доливали поживне середовище (по 2 дм³) з відповідними концентраціями Se (IV) та Zn^{2+} .

Чисельність клітин встановлювали за допомогою камери Горяєва, а біомасу розраховували стереометричним методом [11].

Ліпіди екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю у відношенні 2:1 за методом Фолча [5, 16]. При цьому до однієї масової частки вологої біомаси додавали 20 масових часток екстрагуючої суміші і залишали на 12 год для екстракції. Неліпідні домішки з екстракту видаляли шляхом відмивання 1% розчином KCl [5]. Кількість загальних ліпідів визначали ваговим методом після відгонки екстрагуючої суміші, висушували та зважували [3].

Споживання клітинами водорості CO₂ розраховували за інтенсивністю біосинтезу.

Статистичне опрацювання здійснювали з використанням t-критерієм Стьюдента за допомогою програми Statistica 5.0.

При проведенні експериментальних досліджень використано реактиви фірм “Sigma”, “Reanal” та “Химреактив” кваліфікація ч.д.а., вуглекислий газ ДСТУ 4817:2007, сорт 1 (АТ «Львівський хімічний завод»).

Результати досліджень та їх обговорення

Для процесу культивування мікроводоростей при природному освітленні (рис. 1) було змінено режими перемішування, оскільки на зовнішню поверхню фотобіореактора попадало значно більше від оптимального сонячного світла, і, відповідно, прискорювався ріст культури. Навідміну від культивування *Ch. vulgaris* в закритій системі, при штучному освітленні в приміщенні [17], де головним завданням було підтримка температури нижнього порогу, при проведенні дослідження на природному освітленні, важливим завданням було запобігти перегріву культури.



Рис. 1. Система культивування *Ch. vulgaris*: а) плоский вертикальний фотобіореактор (1а) із контрольно-вимірювальною системою (2а); б) вимірювальний сервер (1б), термоакумулятор (2б), вуглекислотний балон (3б)

Оскільки, даний штам водорості знаходиться в умовах мезофільного температурного режиму, то у випадку зниження температури на 3–4⁰С від мінімально допустимої (19⁰С), процес росту сповільнюється, у випадку перегрівання середовища на 5–6⁰С, вище максимальної – 27–28⁰С, культура гине.

Регулювання температури середовища відбувалося за рахунок його теплообміну із ємністю для підігріву води через системи теплообмінників (рис. 2). У разі підвищення температури в культиваторі вище 27⁰С контрольно-вимірювальний модуль (КВМ) вмикає циркуляційний насос і за рахунок теплообмінника, розташованого на задній частині культиватора, знижує її. Якщо температура у культиваторі та ємності підігріву води нижча 21⁰С, то КВМ вмикає електричний підігрівач та утримує температуру середовища на заданому рівні. Щоб запобігти перегріванню (вище 27⁰С), КВМ виводить частину води із ємності для її підігріву та вводить додаткову порцію холодної із загальної мережі. Така система культивування мікроводоростей дозволяє безперервно генерувати біомасу.

Для перевірки вищевказаної технологічної схеми було розроблено спрощений лабораторний стенд термоакумулятора, ємністю 80 дм³ із водою в якості теплоносія, який дозволив відбирати від фотобіореактора надлишки теплової енергії в день і використовувати її вночі. За рахунок збільшення теплової ємності системи фотобіореактора вдалося стабілізувати температуру в межах допустимих значень та попередити перегрів мікрокультури (рис. 2). Упродовж всього терміну культивування температурний режим підтримували у межах 21–27⁰С.

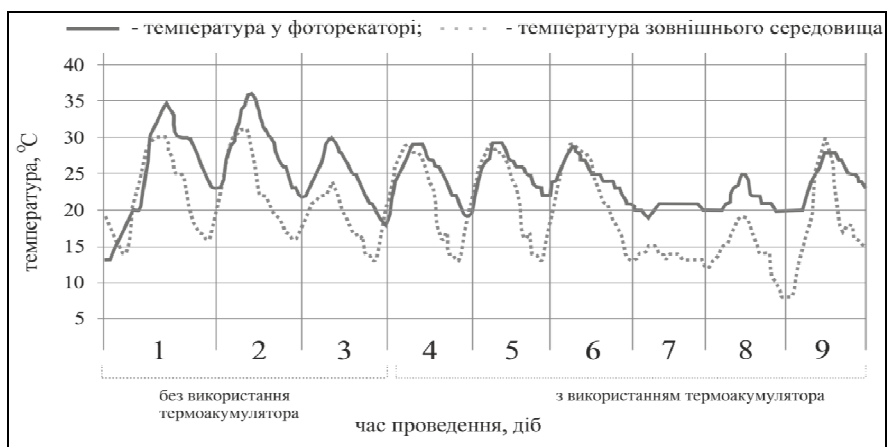


Рис. 2. Температурні режими роботи фотобіореактора без термоакумулятора з його використанням

Показник рН (рис. 3) вдень збільшувався з 1 доби (рН – 4,9) до 9 доби (рН – 6,7), після чого спостерігали зменшення рН до 17 доби (рН – 5,8), тоді як вночі рН збільшувався з 1 доби до 10 доби від 5,1 до 6,5, після чого також спостерігали зменшення показника до 17 доби (рН – 5,7).

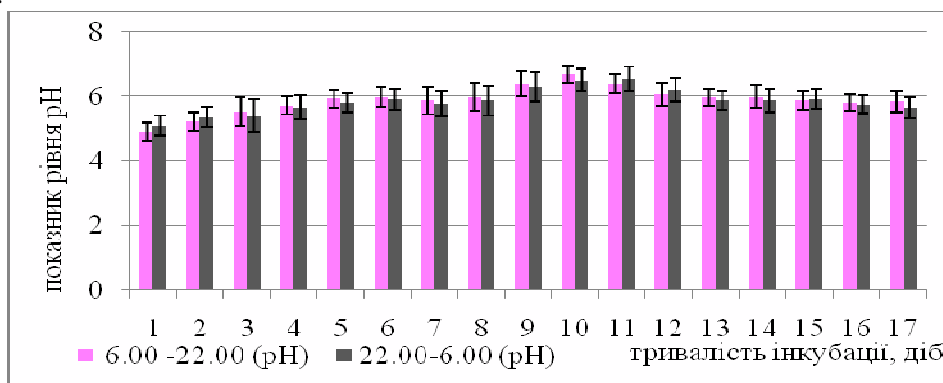


Рис. 3. Динаміка рН у фотобіореакторі

Запропонована система дала змогу здійснити тривале культивування *Ch. vulgaris* у стаціонарному режимі, про що свідчить динаміка вмісту клітин у культуральному середовищі (рис. 4). Кількість клітин водорості збільшувалася впродовж всього періоду дослідження: на 5 добу – у незначних кількостях, на 8 добу – у 5,4 рази, на 12 добу – майже у 9 разів, на 15 добу – у 12,1 рази і на 19 добу – у 18,6 рази порівняно із кількістю клітин на 1 добу.

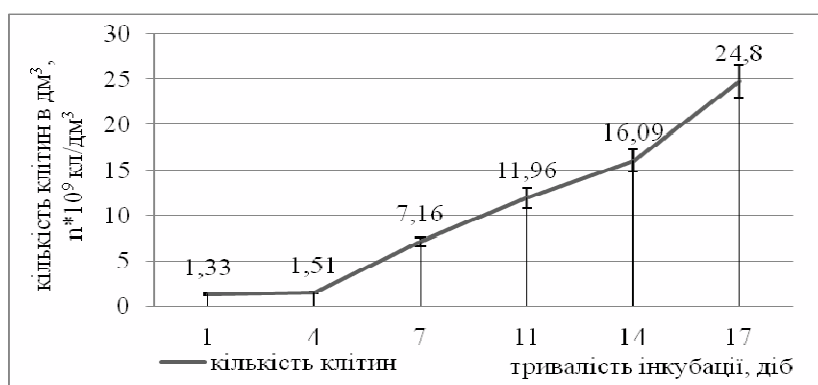


Рис. 4. Динаміка кількості клітин в експериментальному фотобіореакторі за сонячного освітлення

Аналогічно динаміці клітин водорості була динаміка кількості їх загальної біомаси та ліпідів (рис. 5).

Встановлено, що біомаса, як і кількість ліпідів, збільшувалася протягом усього періоду культивування хлорели. Так, на 5 день біомаса збільшилася на 34,2%, на 8 добу – на 94,7%, на 12 добу – на 155,3%, на 15 добу – на 178,9% та на 19 добу – на 350% порівняно із біомасою на 1 добу.

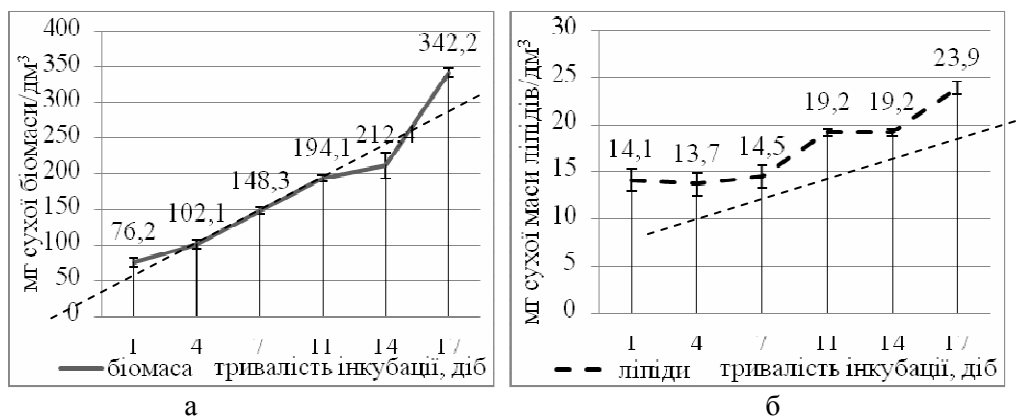


Рис. 5. Динаміка біомаси (а) і ліпідів (б) в експериментальному фотобіореакторі за сонячного освітлення

Щодо ліпідів то їх вміст також збільшився порівняно із вмістом ліпідів на 1 добу експерименту на 36,2% на 12 і 15 доби та на 69,5% на 19 добу культивування.

Висновки

Встановлено, що за стабілізації та автоматичного контролю умов культивування *Chlorella vulgaris* у розробленому фотобіореакторі під впливом сонячної інсоляції максимальну щільність культури спостерігали на 17 добу культивування із вмістом клітин $24,8 \pm 1,8 \cdot 10^9$ кл/дм³ та з кількістю у стаціонарній фазі на 14 добу в межах $16,1 \pm 1,2 \cdot 10^9$ кл/дм³. Це дає змогу вирощувати хлорелу в безперервному режимі з використанням природного освітлення із середньою продуктивністю біомаси у стаціонарному режимі близько $212,4 \pm 18,1$ мг сухої біомаси/дм³ та вмістом ліпідів $19,02 \pm 0,4$ мг сухої маси/дм³. Вміст біомаси та ліпідів хлорели можна змінювати, використовуючи сонячне світло та речовини-стимулятори біосинтезу окремих класів органічних речовин, що становить перспективу подальших досліджень.

Дані дослідження дають змогу розробити подальшу стратегію розвитку технології в зоні помірнього клімату, яка полягає у зменшенні впливу температурних перепадів за рахунок збільшення теплової інерції фотобіореактора та зменшення впливу від штучного освітлення шляхом повної відмови від нього і переведення реактора лише на отримання енергії від сонячного випромінювання.

1. Бурега Н. В. Дослідження енергетичних параметрів утилізації вуглекислоти у плоскому фотореакторі під впливом штучного та природного освітлення / Н.В. Бурега, М.І. Рутіло, А.О. Пальчик // IV міжнародна науково-практична конференції «Проблеми та перспективи розвитку енергетики, електротехнологій та автоматики в АПК» 20-21 листопада 2016 р. у м. Київ. — С. 32—33.
2. Вінярська Г. Б. Накопичення селену та його вплив на метаболізм у *Chlorella vulgaris* Beij. в культурі за дії селеніту натрію та йонів металів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 «Біохімія» / Г.Б. Вінярська. — Тернопіль, 2016. — 24 с.
3. Кейтс М. Техніка липидології. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
4. Луців А. І. Регуляція біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beij. іонами металів та нафтопродуктами : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 «Біохімія» / А. І. Луців. — Тернопіль, 2015. — 24 с.

5. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : Учебное пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л.: ЛГУ, 1982. — 273 с.*
6. *Патент № 102777 Україна / Лабораторний фотобіореактор / Кравченко І.П., Карпенко В.І., Дідківська Г.Г.; опубл. 11.25.2015.*
7. *Патент № 2176667 Рос. Федерация, ИФР № С-111 / Способ культивирования микроводорослей на основе штамма *Chlorella vulgaris* / Богданов Н.И., Куницын М.В.; опубл. 12.10.2001.*
8. *Патент № 93282 Україна / Фотобіореактор для культивування мікрроводоростей / Чернов П.Я.; опубл. 01.25.2011.*
9. *Романенко В. Д. Основы гидроэкологии / В.Д. Романенко. — Киев: Генеза, 2004. — 664 с.*
10. *Сидоров Ю. І. Фотобіореактори / Ю.І. Сидоров // Біотехнологія. — 2010. — № 3 (5). — С. 19—30.*
11. *Топачевский А. В. Пресноводные водоросли Украинской ССР / А.В. Топачевский, Н.П. Масюк. — Киев : Наукова думка, 1984. — 336 с.*
12. *Шаманський С.Й. Установа для біоконверсії сонячної енергії безперервної дії / С.Й. Шаманський // Наукові технології. — 2015. — № 26 (2) — С. 115—119.*
13. *Abd El H. Healthy benefit of microalgal bioactive substances / H. El Abd Baky, G.S. El-Baroty // J. Aquat. Sci. — 2013. — N. 1 (1). — P. 11—23.*
14. *Ahalya N. Biosorption of Heavy Metals / N. Ahalya, T.V. Ramachandra, R.D. Kanamadi // Research J.of Chemistry & Environment. — 2003. — Vol. 7, N. 4. — P. 71—78.*
15. *Herrero M. Supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae / M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez // A review. Food Chem. — 2006. — N. 98. — P. 136—148.*
16. *Hokin L. E. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase IX. On the role of phospholipids in the enzyme / L.E. Hokin, T.D. Hexum // Arch. Biochem.andBiophys. — 1992. — Vol. 151, N. 2. — P. 58—61.*
17. *Kim S. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions / S. Kim, J. E. Park, Y.B. Cho // Bioresour. Technol. — 2013. — N. 144 (1). — P. 8—13.*
18. *Optimization of *Chlorella vulgaris* Beij. cultivation in a bioreactor of continuous action / [O.I. Bodnar, N.V. Burega, A.O. Palchyk and other] // Biotechnologia Acta. — 2016. — V. 9, N. 4. — P. 42—49.*
19. *Sidorov Yu. I. Photobioreactors / Yu.I. Sidorov // Biotechnologiya. — 2010. — N. 3 (5). — P. 19—30.*

Г. Б. Винярская, О. И. Боднар, Н. В. Бурега, А. А. Пальчик, О. О. Кантущкая, Л. А. Онуфрийчук
Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *CHLORELLA VULGARIS* В ФОТОБИОРЕАКТОРЫ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛНЕЧНОЙ ИНСОЛЯЦИИ

Апробировано фотобіореактор інтенсивного культивування водоросли *Chlorella vulgaris* Beij. в умовах сонячної інсоляції з повністю контролюваними умовами в межах режимних параметрів по вибраним критеріям оцінки процесу культивування. Для перевірки ефективності функціонування оригінального фотобіореактора дослідували в ньому ріст *Chlorella vulgaris* Beij. (CHLOROPHYTA) при 21-27⁰С і природному освітленні (сонячної інсоляції) (інтенсивність 9000 лк) впродовж 16 ч/сутки при додаванні в культуральну середовище водних розчинів солей – натрію селеніту (Se (IV)) і ZnSO₄·7H₂O (Zn²⁺) в якості активаторів росту. Встановлено, що при стабілізації і автоматичного контролю умов культивування в розробленому фотобіореакторі максимальна густина культури досягається на 17 днів культивування з вмістом клітин 24,8 ± 1,8·10⁹ кл/дм³ і з їх кількістю в стаціонарній фазі на 14 днів – 16,1 ± 1,2·10⁹ кл/дм³, що дозволяє вирощувати хлореллу в неперервному режимі з середньою продуктивністю біомаси в стаціонарному режимі близько 212,4 ± 18,1 мг сухої біомаси/дм³ з вмістом ліпідів 19,02 ± 0,4 мг сухої маси/дм³. Кількість біомаси і ліпідів хлорелли можна змінювати, використовуючи інтенсивність природної інсоляції і речовин-стимуляторів, що становить перспективу подальших досліджень.

Ключевые слова: хлорелла, фотобіореактор, сонячне освітлення, кількість клітин, біомаса, ліпіди

H. B. Viniarska, O. I. Bodnar, N. V. Burega, A. O. Palchyk, O. O. Kantycka, L. A. Onufrijchuk
Volodymyr Gnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

CULTIVATION *CHLORELLA VULGARIS* IN PHOTOBIOREACTOR CONTINUOUSLY
OF INFLUENCE SOLAR RADIATION

Were tested photobioreactor intensive cultivation of algae *Chlorella vulgaris* Beij. with the conditions of solar insolation of completely controlled environment within the operating parameters for the selected criteria evaluation process of cultivation.

The efficiency of the functioning of the original photobioreactor with continuous mode of algae cultivation was checked. Using this photobioreactor it was investigated the growth of freshwater green alga *Chlorella vulgaris* Beij. (CHLOROPHYTA) under conditions of the Fitzgerald's medium N 11 in the modification of Zender and Gorham at 22–25°C and natural light (solar radiation) (intensity 9000 lux) during 16 hours / day by adding to the culture medium aqueous solutions of salts - sodium selenite (Se (IV)) and ZnSO₄ 7H₂O (Zn²⁺) as an activator of growth.

Establish that under the influence of solar insolation and the stabilization and automatic control of *Chlorella vulgaris* cultivation conditions in the this photobioreactor were observed maximum density cultures for 17 days culturing cells containing $24,8 \pm 1,8 \cdot 10^9$ cells / dm³ and the number of stationary phase 14 day within $16,1 \pm 1,2 \cdot 10^9$ cells / dm³.

This is an opportunity to grow *Chlorella* in continuous mode using natural light with an average capacity of biomass in stationary mode about $212,4 \pm 18,1$ mg of dry biomass / dm³ and lipid content of $19,02 \pm 0,4$ mg dry weight / dm³.

The proposed system of cultivation *Chlorella* stimulates the accumulation of biomass and lipids. Under these conditions, the content of organic compounds algae can be customized using sunlight and stimulant substances biosynthesis of various classes of organic compounds.

These studies make it possible to develop a further strategy of technology in the temperate zone. It is to reduce the impact of temperature changes by increasing the thermal inertia photobioreactor and reduce the impact of artificial lighting by the complete abandonment of it and transfer the reactor only on the energy of sunlight.

In comparison with other analogous the proposed method of growing algae decreases total power consumption of the process through the use of solar radiation and through selection excess thermal energy obtained during operation of power plants. Also, there improving its quality indicators of cultivation process by filtering the flue gases from the selection of their carbon dioxide management and control of mineral and gas composition of medium, temperature and light mode control and metering system.

The resulting method of cultivation of microalgae allows continuously generate biomass of microalgae, take away carbon dioxide from the atmosphere and combustion systems, and can be used for the production of lipids and as an element of independent property management.

Keywords: *Chlorella*, photobioreactor, solar radiance, amount of cells, biomass, lipids

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 13.02.2017